

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. Hermann Einsele

**Optimierung eines molekularen Verfahrens zur
Quantifizierung des Chimärismus nach
allogener Stammzelltransplantation**

Inauguraldissertation

**zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät**

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Christiane Muhr

Würzburg, Dezember 2021

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Löffler

Korreferent: Prof. Dr. med. Matthias Eyrich

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Überarbeitete Version.

Tag der mündlichen Prüfung: 06.07.2023

Die Promovendin ist Ärztin.

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Stammzelltransplantation	1
1.1.1	Geschichte der Stammzelltransplantation	1
1.1.2	Grundlagen	1
1.1.3	HLA-Kompatibilität	3
1.1.4	Indikationen	3
1.1.5	Ablauf einer allogenen Stammzelltransplantation	4
1.1.6	Komplikationen nach Stammzelltransplantation	5
1.1.7	Nachsorge und Überwachung des Therapieerfolges	8
1.2	Chimärismus	9
1.2.1	Definition	9
1.2.2	Chimärismusanalyse nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation	9
1.3	Quantitative Real-Time-PCR	15
1.3.1	Grundlagen zur Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	15
1.3.2	Quantitative Real-Time-PCR mit dem TaqMan™-System	16
1.3.3	Verschiedene molekulare Marker	18
1.3.4	Verschiedene Methoden zur relativen Quantifizierung	19
1.3.5	Vor- und Nachteile der quantitativen Real-Time-PCR zur Chimärismusbestimmung	20
1.3.6	Schmelzkurvenanalyse mittels SYBR™ Green-qPCR	22
1.4	Amplification Refractory Mutation System (ARMS)	22
1.5	Fragestellung	25
2	Material und Methoden	26
2.1	Angaben zur Notwendigkeit eines Ethikvotums	26
2.2	Material	26
2.2.1	Geräte und Softwares	26
2.2.2	Verbrauchsmaterial	27
2.3	Methoden	29
2.3.1	Probengewinnung	29
2.3.2	Auswahl der Allele	29
2.3.3	DNA-Extraktion	30

2.3.4	Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration.....	32
2.3.5	Herstellung von Standardreihen.....	33
2.3.6	Quantitative Real-Time-PCR.....	35
2.3.7	Verbesserung der Sensitivität der quantitativen Real-Time-PCR	38
2.3.8	Test eines neuen „Single Nucleotid Polymorphisms“ zur Chimärismusbestimmung	41
2.3.9	Datenauswertung und statistische Methoden.....	46
3	Ergebnisse.....	47
3.1	Erhöhung des DNA-Ertrages für die Chimärismusuntersuchung	47
3.1.1	Mini-Kit	47
3.1.2	Midi-Kit	50
3.2	Optimierung des DNA-Inputs in die quantitative Real-Time-PCR.....	52
3.2.1	Nachweisgrenze und Sensitivität	53
3.2.2	Effizienz und Inhibition	54
3.2.3	DNA-Input und Präzision der Chimärismusberechnung	62
3.3	Experimente mit dem „Single Nucleotide Polymorphism“ rs713753	67
3.3.1	Frequenz und Informativität der Allele.....	67
3.3.2	Ergebnisse der Standardverdünnung in Wasser – Bewertung der Effizienz.....	68
3.3.3	Ergebnisse der Standardreihen in DNA	81
3.3.4	Erstellung einer Formel zur Chimärismusberechnung.....	86
3.3.5	Chimärismusberechnung bei Verlaufskontrollen	89
4	Diskussion	92
4.1	Verbesserung der DNA-Extraktion.....	92
4.2	Optimierung des DNA-Inputs in die quantitative Real-Time-PCR.....	94
4.2.1	Methodik	95
4.2.2	Einfluss auf Nachweisgrenze und Sensitivität der qPCR.....	96
4.2.3	Grenzen einer qPCR-Optimierung durch Erhöhung des DNA-Inputs	98
4.2.4	Einfluss auf Präzision und Sensitivität der Quantifizierung	99
4.2.5	Fazit zum DNA-Input.....	100
4.3	Anwendbarkeit des „Single Nucleotide Polymorphism“ rs713753.....	101
4.3.1	Allelfrequenz und Informativität.....	102
4.3.2	Effizienz, Bestimmtheitsmaß und Sensitivität – Standardverdünnungen in Wasser.....	104

4.3.3	Nachweisgrenze – Standardreihen allelpositiver in allelnegativer DNA...	105
4.3.4	Quantifizierung von Verlaufskontrollen.....	107
4.3.5	Vorteile der lokusspezifischen Referenz	109
4.3.6	Überlegungen zur Quantifizierungsmethode	110
4.4	Ausblick und andere Untersuchungsmethoden	111
5	Zusammenfassung.....	116
6	Literaturverzeichnis	118
I	Abkürzungsverzeichnis	
II	Abbildungsverzeichnis	
III	Tabellenverzeichnis	
IV	Formelverzeichnis	
V	Weitere Tabellen und Diagramme	
VI	Danksagung	

1 Einleitung

1.1 Stammzelltransplantation

1.1.1 Geschichte der Stammzelltransplantation

Die erste erfolgreiche hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT) wurde im Jahr 1957 von Edward Donnell Thomas, dem Pionier der Knochenmarktransplantation, in den USA durchgeführt (1, 2). Er infundierte einem Leukämie-Patienten nach Hochdosis-Strahlentherapie Knochenmarkzellen von dessen eineiigem Zwilling. Die Transplantation war zwar zunächst erfolgreich, der Patient starb jedoch später an einem Rezidiv (3). Fünf weitere an Leukämie erkrankte Personen zeigten nur einen transienten Erfolg – alle starben innerhalb von weniger als 100 Tagen nach der Transplantation an Abstoßung oder Immunreaktionen. Auch Versuche anderer Wissenschaftler/-innen scheiterten aufgrund fehlenden Wissens über den Einfluss der Histokompatibilitätsantigene. Die Identifizierung der „Human Leukocyte Antigens“ (HLA)-Gene ermöglichte schließlich eine Gewebekompatibilität zwischen Spender/-in und Empfänger/-in und ist somit einer der wichtigsten Meilensteine in der Geschichte der Transplantation (1). E. D. Thomas entwickelte durch weitere Forschung an Hunden serologische Nachweisverfahren zur Histokompatibilität und adaptierte Bestrahlungsdosen und Immunsuppression zur Vermeidung einer „Graft-versus-Host-Disease“ (GvHD) (2-4). 1968 wurden bei Leukämiekranken erste Versuche allogener HSZT mit Stammzellen HLA-identischer Geschwister nach Ganzkörperbestrahlung und Cyclophosphamidgabe durchgeführt (5). Ebenso wurde 1968 bei einem Kind mit angeborenem Immundefekt die erste pädiatrische allogene HSZT vorgenommen (6). Ende der 70er-Jahre gelang die erste erfolgreiche allogene HSZT mit einem HLA-identischen, nicht-verwandten Spender. Daraufhin wurden die ersten HSZT-Spendenregister in Europa, Asien und den USA eingerichtet (3, 4) und es kam zu einem starken Anstieg von Knochenmarktransplantationen (2, 3). 1979 beschrieb Thomas den Graft-versus-Tumor-Effekt, nachdem er beobachtet hatte, dass das Auftreten einer GvHD mit einer geringeren Rezidivhäufigkeit einhergeht (5). 1990 erhielt E. D. Thomas für die Einführung der allogenen HSZT den Nobelpreis für Medizin (6).

1.1.2 Grundlagen

Bei der HSZT handelt es sich um eine der ersten erfolgreichen Zelltherapien (2). Ihr Ziel ist die Regeneration der Hämatopoese und der Aufbau eines neuen Immunsystems,

nachdem das Knochenmark des Empfängers/der Empfängerin (teilweise) ausgelöscht wurde, sowie bei einigen Erkrankungen die Normalisierung eines Enzymmangels (7). Darüber hinaus macht man sich bei der allogenen HSZT die Immunreaktivität von Spender-T-Zellen auf residuale maligne Zellen zunutze, die die Ablation überlebt haben (2, 5, 8). Dieser auf Alloantigenen beruhende, sogenannte „Graft-versus-Leukemia“ (GvL)-Effekt senkt die Rezidivrate, erhöht aber gleichzeitig das GvHD-Risiko. Die Beobachtung, dass eine T-Zell-Depletion des Transplantats das Gegenteil bewirkt und die vergleichsweise hohe Rezidivrate bei Patientinnen/Patienten mit genetisch identischen Spendenden bestätigen die Rolle der Donor-T-Zellen bei der Zerstörung von Krebszellen (9).

Die HSZT kann nach verschiedenen Aspekten eingeteilt werden. Von einer allogenen HSZT spricht man, wenn das Transplantat von einem/einer Familien- oder Fremdspendenden stammt. Bei einer autologen HSZT hingegen werden die eigenen Stammzellen der Patientin/des Patienten gewonnen, eingefroren und ihm/ihr zu einem späteren Zeitpunkt, zum Beispiel nach einer Hochdosis-Chemotherapie, wieder zurückgegeben (8). Zudem unterscheidet man unmanipulierte von aufgereinigten Präparaten. Unmanipulierte Präparate enthalten neben Stammzellen noch verschiedene weitere Zellen. Bei aufgereinigten Präparaten werden die hämatopoetischen Stammzellen durch spezielle Techniken selektioniert und angereichert, wobei man sich Oberflächenantigene zunutze macht: hämatopoetische Stammzellen sind positiv auf den Marker CD34 und negativ auf Marker reifer Zellen. Zweck dieser Anreicherung sind unter anderem eine Reduktion des GvHD-Risikos durch T-Zell-Depletion und eine Verringerung EBV-assoziiierter Lymphome durch B-Zell-Depletion (8).

Zuletzt wird die HSZT aufgrund der Herkunft der Zellen unterschieden: Diese können entweder direkt aus dem Knochenmark, aus Nabelschnurblut oder aus dem peripheren Blut gewonnen werden (8). Bei letzterem erfolgt eine ca. fünftägige Vorbehandlung des/r Spendenden mit Wachstumsfaktoren (z. B. Granulocyte-Colony Stimulating Factor) zur Mobilisierung der Stammzellen aus dem Knochenmark ins Blut, wo sie dann per Apherese gesammelt werden können (8). Die Anwendung dieser „peripheral blood stem cells“ hat in den letzten Jahren kontinuierlich zugenommen. Sie hat den großen Vorteil eines schnelleren Engraftments, was weniger Infektionen und kürzere Hospitalisierungen mit sich bringt, birgt jedoch auch ein höheres Risiko einer GvHD (1). Stammzellen aus Nabelschnurblut haben ein geringes Risiko für GvHD und virale Kontamination und sind

zudem leicht zugänglich. Ihr Gebrauch ist allerdings durch die geringe Zellmenge im Nabelschnurblut sehr limitiert (1).

1.1.3 HLA-Kompatibilität

Bei der Wahl eines/einer allogenen Spendenden sollte die HLA-Kompatibilität beachtet werden, um das Risiko einer Abstoßung oder einer GvHD zu minimieren (8). Die Gene für HLA, auch „major histocompatibility complex“ genannt, liegen auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 und werden als komplette Haplotypen vererbt, sodass ein Haplotyp vom Vater und einer von der Mutter stammt (5, 6). Da Rekombinationen selten sind, liegt die Wahrscheinlichkeit, dass eine Person ein HLA-identisches Geschwister hat, bei ca. 25 % (5). Stimmen Spender/-in und Empfänger/-in in den wichtigsten Merkmalen HLA-A, -B, -C_w, -DRB1 und -DQB1 mit jeweils zwei Allelen überein (10/10 Match), so sind sie „HLA-identisch“ (5, 6, 8).

Wird kein/-e HLA-identische/-r Spender/-in gefunden, wird in manchen Zentren auf eine/-n 9/10 oder sogar 8/10 identische/-n Spender/-in zurückgegriffen (6). Zunehmend wird bei einem Mangel an Spendenden oder Zeit auch die haploidentische Transplantation durchgeführt. Spendende sind hierbei üblicherweise die Eltern, die in der Regel nur in einem Haplotyp mit dem Kind übereinstimmen, sodass wegen des erhöhten GvHD-Risikos nur aufgereinigte Stammzell-Präparate verwendet werden (6, 8).

1.1.4 Indikationen

Ursprünglich als Therapie gegen Strahlenschäden gedacht, gibt es aktuell viele Indikationen für eine HSZT. Die allogene HSZT wird hauptsächlich in der Therapie von Leukämien und Lymphomen angewandt. Für manche Erkrankungen, wie Immundefekte und Knochenmarksinsuffizienzen, stellt sie zurzeit sogar die einzige kurative Behandlungsoption dar (3, 5, 8). Für einige nichtmaligne Erkrankungen besteht zudem heutzutage eine relative Therapieindikation, da die transplantationsassoziierte Mortalität durch Fortschritte in der Supportivtherapie gesenkt werden konnte. Es werden Lebensqualität, Langzeitüberleben und Langzeitmorbidity mit und ohne HSZT gegeneinander abgewogen (6). Eine Übersicht über die Indikationen für eine allogene HSZT zeigt Tabelle 1.

Tabelle 1: Übersicht über die häufigsten Indikationen für eine allogene HSZT (5, 7, 8).
 (ALL = Akute lymphatische Leukämie; AML = Akute myeloische Leukämie;
 CLL = Chronische lymphatische Leukämie; CML = Chronische myeloisch Leukämie;
 MDS = Myelodysplastisches Syndrom; NHL = Non-Hodgkin-Lymphom;
 MPS = Myeloproliferatives Syndrom; SCID = „Severe combined immunodeficiency“)

Hämatopoetische und lymphatische Malignome	ALL, AML, MDS, CML, CLL, chronisch juvenile myelomonozytäre Leukämie, M. Hodgkin, NHL, MPS, Multiples Myelom
Solide Tumoren (selten; eher autolog)	Neuroblastom, Rhabdomyosarkom, Ewing-Sarkom
Kongenitale Erkrankungen mit Knochenmark-Versagen	Fanconi-Anämie, kongenital hypoplastische Anämie, schwere aplastische Anämie, Störungen der Granulopoese und Granulozytenfunktion
Hämoglobinopathien	Sichelzellanämie, β -Thalassämia major
Primäre Immundefekte	Septische Granulomatose, Wiskott-Aldrich-Syndrom, SCID, CD40-Mangel
Angeborene Stoffwechselstörungen	Adrenoleukodystrophie, Mukopolysaccharidose Typ I
Weitere	Osteopetrose

Die autologe HSZT wird vor allem im Rahmen des Hochdosiskonzeptes bei malignen Erkrankungen durchgeführt. Sie ermöglicht die Therapie mit einer Hochdosis-Chemotherapie, da durch Reinfusion der Stammzellen die Hämatopoese nach Myelosuppression wiederhergestellt werden kann (8). Eine Übersicht über die häufigsten Indikationen für eine autologe HSZT zeigt Tabelle 2.

Tabelle 2: Übersicht über die häufigsten Indikationen für eine autologe HSZT (5, 8).
 (AML = Akute myeloische Leukämie; NHL = Non-Hodgkin-Lymphom;
 MS = Multiple Sklerose)

Maligne Erkrankungen	Multiples Myelom, M. Hodgkin, NHL, AML, Neuroblastom, Rhabdomyosarkom, Ewing-Sarkom, einige Keimzelltumore
Andere Erkrankungen	Autoimmunerkrankungen (MS und juvenile rheumatische Arthritis in Pilotstudien), Amyloidose

1.1.5 Ablauf einer allogenen Stammzelltransplantation

Nach erfolgreicher Spendensuche gliedert sich die Transplantation in drei Phasen. Die erste Phase ist eine drei- bis siebentägige Konditionierung. Ihr Ziel ist eine Myeloablation zur Ermöglichung des Transplantateinwachsens, eine Immunoablation zur Verhinderung einer Abstoßung und bei malignen Erkrankungen eine Eliminierung eventuell persistierender Tumor- bzw. Leukämiezellen (6, 8). Durch Zerstörung der malignen

Zellen werden zudem massenhaft Tumorantigene freigesetzt, die zur Proliferation von T-Zellen führen, welche anschließend überlebende Tumor- bzw. Leukämiezellen attackieren (5). Die Konditionierung besteht aus einer fraktionierten Ganzkörperbestrahlung (TBI) und/oder der Gabe von Chemotherapeutika (vor allem Alkylantien) (8). Bei Kindern wird die TBI wegen ihrer gravierenden Nebenwirkungen jedoch nur bei Hochrisikopatienten/-patientinnen eingesetzt (6). Des Weiteren können antileukämische Medikamente angewandt werden sowie Antilymphozytenglobuline und Immunsuppressiva zur Verhinderung einer Abstoßung (6, 8).

Grundsätzlich unterscheidet man zwischen komplett myeloablativer Konditionierung, intensitätsreduzierter Konditionierung (RIC) und nichtmyeloablativer Konditionierung. Erstere bewirkt eine komplette Zerstörung der Empfängerhämatoopoese (6) und hat eine hohe Toxizität. Letztere ist weniger toxisch und reduziert das Auftreten früher Infektionen (5), birgt aber ein höheres Rezidivrisiko, sodass sie bevorzugt für Malignome mit geringer Teilungsrate angewandt wird (5).

Nach der Konditionierung folgt die eigentliche Transplantation des Stammzellpräparats in Form einer intravenösen Transfusion. Anhand bestimmter Homing- und Adhäsionsrezeptoren siedeln sich die Spenderzellen im Stroma des Knochenmarks an. Dieses sendet daraufhin Signale, welche die Stammzellen zur Teilung und Differenzierung anregen (8).

Die folgende Phase der Teilung und Differenzierung der Zellen nennt man Aplasie. Es dauert ca. zwei bis drei Wochen, bis eine Leukozytenzahl $> 1.000/\mu\text{l}$ im peripheren Blut gemessen werden kann. In dieser Phase werden die Patientinnen/Patienten aufgrund der hohen Komplikationsrate intensivmedizinisch überwacht (8).

1.1.6 Komplikationen nach Stammzelltransplantation

Nach einer HSZT können einige relevante Komplikationen auftreten, welche für bestimmte Phasen der Transplantation spezifisch sind und unter anderem von der Toxizität der Konditionierung, der Art der Immunsuppression und der Grunderkrankung beeinflusst werden (1).

Zu Beginn steht die Akuttoxizität der Konditionierung im Vordergrund, welche noch während oder kurz nach dieser auftritt und diverse Organsysteme betrifft (6). Es kommen Alopezie, Exantheme, gastrointestinale Symptome, Mukositis, Entzündungsreaktionen

mit Fieber (6) und Funktionsverlust von Organen bis hin zum Organversagen vor (6). Besonders häufig kommt es zur Mukositis des gesamten Gastrointestinaltraktes, welche aufgrund starker Schmerzen nicht selten eine parenterale Ernährung und eine Opiattherapie erforderlich macht (6). Durch toxische Wirkungen auf das Gefäßendothel kann es zur transplantationsassoziierten Mikroangiopathie kommen. Diese betrifft meist die kleinen Lebervenen, was als „Sinusoidales Obstruktionssyndrom“ bezeichnet wird und zu Leberversagen führen kann (5, 6). Das Sinusoidale Obstruktionssyndrom besitzt eine hohe Mortalität und wird mit Fibrinolytika (Defibrinolytika und Gewebsplasminogenaktivator) behandelt (8).

Ferner können pulmonale nichtinfektiöse Komplikationen wie das Idiopathische Pneumoniesyndrom auftreten, welches im Durchschnitt 20-60 Tage nach Transplantation auftritt und mit Dyspnoe, trockenem Husten und nichtinfektiösen Infiltraten einhergeht (6, 10). Als Risikofaktoren gelten GvHD und Ganzkörperbestrahlung, weswegen als Ursache eine Schädigung durch Spenderlymphozyten vermutet wird (5).

Infektionen gehören zu den bedeutsamsten Komplikationen. Sie werden meist durch ansonsten wenig pathogene Keime verursacht und können fulminante Verläufe haben (1). Durch bessere Prävention und Therapiemöglichkeiten dieser Infektionen konnte das Outcome von HSZT stark verbessert werden (5). Wichtige Risikofaktoren für Infektionen sind neben aggressiver Konditionierung eine verzögerte Regeneration des Immunsystems und das Auftreten einer GvHD (1). Man unterscheidet zwischen frühen und späten Infektionen. Erstere treten in der Aplasie auf (8) und sind der Neutropenie und der Zerstörung der Schleimhautbarrieren geschuldet (8), weshalb sie nach RIC seltener auftreten als nach myeloablativer Konditionierung (5). Es handelt sich vornehmlich um schwere bakterielle und fungale Infektionen. Um schwere Verläufe abzuwenden, sollte bei Fieber und dem geringsten Verdacht auf eine Infektion unverzüglich eine empirische Therapie mit Antibiotika bzw. Antimykotika begonnen werden (8). Die späten Infektionen treten in der Phase der Immunrekonstruktion bis zu zwölf Monate nach der Transplantation auf (8). Es sind vornehmlich virale Infektionen, die auf der noch verminderten T-Zell-Funktion beruhen. Es handelt sich überwiegend um endogene Reaktivierungen von Zytomegalieviren und Adenoviren, seltener auch von Herpesviren (6). Besonders relevant sind EBV-Reaktivierungen, da sie zur EBV-assoziierten Lymphoproliferation führen können. Therapeutisch werden Virostatika angewandt, bei Therapieresistenz kommt die Infusion virusspezifischer Donorlymphozyten (Donorlymphozyteninfusion = DLI) in Frage (6).

Eine weitere ernste Komplikation ist die GvHD. Hier erkennen reife T-Lymphozyten des/der Spendenden neben malignen Zellen (GvL) auch gesundes Gewebe der Empfängerin/des Empfängers als fremd, woraufhin sie proliferieren und das Gewebe angreifen (8). Stimuliert wird dieser Prozess durch Schleimhautläsionen, die bei der Konditionierung entstehen. Aus dem verletzten Gewebe werden Chemokine freigesetzt, welche die T-Zellen aktivieren (5). Die Schwere der GvHD ist abhängig vom Grad der Inkompatibilität zwischen Spender/-in und Empfänger/-in (5). Die akute GvHD tritt innerhalb von 100 Tagen auf und ist potenziell letal. Hauptsymptome sind ein Erythem der Haut bis hin zur Epidermolyse, eine starke Zerstörung der gastrointestinalen Mukosa sowie ein Untergang der Leberzellen bis zum Leberversagen (8). Die chronische GvHD tritt nach Ablauf von 100 Tagen auf und kann sowohl aus einer akuten GvHD hervorgehen als auch eigenständig auftreten. Sie geht mit einer chronischen Entzündung und Sklerosierung von Haut und Schleimhäuten und mit sekundären Infektionen Monate bis Jahre nach der Transplantation einher (8). Die Therapie einer GvHD besteht in der Gabe von Prednisolon und ggf. Antikörpern gegen TNF- α oder den IL-6-Rezeptor. Besonders bei Steroidresistenz liegt die Mortalität bei bis zu 80 %. Darum findet nach jeder Transplantation prophylaktisch eine Immunsuppression statt. Diese senkt das Risiko einer GvHD, vermindert allerdings gleichzeitig den GvL-Effekt und erhöht das Infektionsrisiko (8).

Rezidive der Grunderkrankung stellen die häufigste Todesursache nach zunächst erfolgreicher Transplantation dar (11) und treten gehäuft bei T-Zell-depletierter HSZT auf, da hier die Effektorzellen für den GvL-Effekt fehlen, sowie bei unzureichender Konditionierung (8, 12). Bereits wenige teilungsaktive Blasten, die die Konditionierung überlebt haben, reichen aus, um ein Rezidiv hervorzurufen, welches sich durch die Abnahme der Thrombozyten im Blut und der Zunahme der Blasten im Knochenmark bemerkbar macht (8). Therapeutisch kommen eine erneute Chemotherapie und eine zweite Transplantation infrage; zudem besteht die Option einer DLI oder einer Reduktion der Immunsuppression, welche jedoch beide das Risiko einer GvHD erhöhen (8).

Eine weitere Komplikation ist das Transplantatversagen, bei dem verbleibende immunologisch aktive Effektorzellen das Transplantat als fremd erkennen (8). Vom „Nichtan-gehen“ oder „primärem Transplantatversagen“ spricht man, wenn das Transplantat nicht innerhalb von 28 Tagen anwächst, sich also keine von Spenderzellen ausgehende Hämatopoese einstellt. Therapeutisch werden erneut Stammzellen des-/derselben Spendenden infundiert (6). Kommt es nach erfolgreichem Anwachsen zu einer aktiven Zerstörung der Transplantatzellen durch Empfängerzellen, spricht man von einer echten

Abstoßung. Sie geht mit einer starken Entzündungsreaktion einher und wird mit einer immunoablativen Therapie und einer Infusion von Stammzellen einer/eines anderen Spendenden therapiert (6). Im Gegensatz dazu handelt es sich beim sekundären Transplantatversagen um eine Zytopenie nach initialem Anwachsen, ohne dass eine echte Abstoßungsreaktion stattfindet. Hier wird mit einem Stammzellboost ohne vorherige Konditionierung therapiert (6).

Besonders bei Kindern können überdies noch Jahre nach der HSZT Spätfolgen auftreten. Dazu gehören Osteoporose, ein vermindertes Längenwachstum, Sekundär-malignome und endokrinologische Störungen wie gonadale Insuffizienz und Hypothyreose (1, 6).

1.1.7 Nachsorge und Überwachung des Therapieerfolges

Nach dem Anwachsen des Transplantats dauert es bis zu zwölf Monate, bis Blutbildung und Immunkompetenz wiederhergestellt sind. Zu Beginn ist oft die Gabe von Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentraten erforderlich (8). Die natürlichen Killerzellen regenerieren bereits nach ca. 3-4 Wochen, wohingegen B- und T-Zell-Funktion noch bis zu zwölf Monate lang reduziert sind (8). In dieser Zeit ist das Risiko für das Auftreten von Komplikationen stark erhöht, sodass ein systematisches ambulantes Monitoring empfohlen wird (8).

Besonders wichtig ist eine engmaschige molekularbiologische Überwachung. Bei der Analyse der Resterkrankung (MRD = Minimal Residual Disease) werden residuale maligne Zellen im Blut oder Knochenmark anhand krankheitsspezifischer Veränderungen der Zellen erfasst (12, 13), wie zum Beispiel die NPM1-Mutation bei AML, BCR-ABL bei CML oder JAK2V617F bei myeloproliferativen Neoplasien (14). Dies ermöglicht ein Monitoring des GvL-Effektes und ein frühzeitiges Erkennen von Rezidiven (12). Normalerweise sollte durch den GvL-Effekt die Restlast maligner Zellen innerhalb weniger Monate verschwinden (8). Eine MRD-Bestimmung kann sowohl nach autologer als auch nach allogener HSZT vorgenommen werden (7). Sie ist jedoch dadurch limitiert, dass nicht alle Patienten/Patientinnen bekannte molekulare Veränderungen aufweisen (14, 15). Insbesondere bei einem Rezidiv werden zunächst vorhandene leukämische Marker nicht mehr exprimiert (11). Ein Vorteil der MRD-Analyse ist, dass ausschließlich maligne Zellen detektiert werden (16).

Die Chimärismusanalyse (siehe 1.2.2) hingegen ist bei allen Grunderkrankungen nach allogener HSZT indiziert und funktioniert unabhängig von krankheitsspezifischen Markern. Als Hauptthema dieser Arbeit wird sie in 1.2.2 näher beschrieben.

Die Intervalle dieser Untersuchungen nach HSZT sind nicht standardisiert und variieren abhängig von Krankheitsbild und individuellen Umständen der Patientin/des Patienten (14).

1.2 Chimärismus

1.2.1 Definition

Das Wort Chimär (griech.: Chimaira = Ziege (17)) entspringt der griechischen Mythologie und wurde von Homer für feuerspeiendes Ungeheuer aus Löwe, Ziege und Schlange eingesetzt. Über Jahrhunderte wurde der Begriff Chimärismus zur Metapher für die Verbindung mehrerer Organismen zu einem Lebewesen (18). In den Naturwissenschaften bezeichnet ein Chimär heutzutage einen Organismus, in dem genetisch unterschiedliche Zellen oder Gewebe koexistieren (17), die von der gleichen oder von verschiedenen Arten stammen können (12). Das Wort Chimärismus beschreibt den Zustand dieser Koexistenz. Ein Chimärismus kann spontan auftreten oder künstlich hergestellt werden (12). Nach einer allogenen HSZT liegt demnach ein Chimärismus vor, da das hämatopoetische System des Empfängers/der Empfängerin von einem anderen Menschen stammt und somit eine andere genetische Information enthält (13).

1.2.2 Chimärismusanalyse nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation

Die Chimärismusanalyse dient der Bestimmung des Chimärismusgrades nach allogener HSZT und gibt somit Auskunft über die genotypische Herkunft der Hämatopoese (13). Dies ermöglicht die Überwachung des Transplantatanwachsens sowie ein frühzeitiges Erkennen von Transplantatversagen, Abstoßung (19), GvHD (12) und Rezidiv (8, 19). Die Chimärismusanalyse ist damit unerlässlich für eine frühzeitige therapeutische Intervention (12, 20) und dient zugleich der Beurteilung des Ansprechens auf therapeutische Maßnahmen (wie DLI oder Reduktion der Immunsuppression) (21), was seit der Einführung des RIC noch bedeutsamer geworden ist (22). Überdies stellt sie bei Fehlen krankheitsspezifischer Marker die einzige Möglichkeit dar, die Anzahl verbleibender Empfängerzellen zu quantifizieren, die potenziell die MRD repräsentieren (23).

Allerdings hat ein einzelner Chimärismuswert nur eine bedingte Aussagekraft; besonders wichtig für das frühzeitige Erkennen unerwünschter Ereignisse ist die Dynamik des Chimärismus (12), nicht zuletzt, weil sich die Werte sehr schnell verändern können (24). Nur die Zusammenschau mehrerer Chimärismuswerte im Verlauf erlaubt eine verlässliche Aussage (24), weshalb regelmäßige Untersuchungen in kurzen Zeitintervallen empfohlen werden (13).

Je nach Verhältnis von Empfänger- zu Spenderzellen werden verschiedene Formen des hämatopoetischen Chimärismus unterschieden (13) (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Verschiedene Formen des hämatopoetischen Chimärismus.
Je nach Quelle existieren leicht abweichende Definitionen (12-14).

Kompletter (Donor-)Chimärismus	Alle Zellen (100 %) stammen von der spendenden Person.
Transient gemischter Chimärismus	Ein Teil der Zellen stammt von dem/der Empfänger/-in (normaler Zustand in den ersten Wochen nach Transplantation).
Stabil gemischter Chimärismus	Stabiler Anteil an Spender- und Empfängerzellen (5 % - 90 % Spenderzellen).
Progressiv gemischter / zunehmender Chimärismus	Der Anteil an Empfängerzellen nimmt kontinuierlich zu (der Anteil an Spenderzellen nimmt kontinuierlich ab).
Split-Chimärismus	Eine oder mehrere Zelllinien stammen von dem/der Spender/-in, die übrigen von dem/der Empfänger/-in.
Chimärismusverlust	Verschwinden eines zuvor bestehenden kompletten oder gemischten Donorchimärismus, z. B. bei sekundärem Transplantatversagen.
Mikrochimärismus	Weniger als 1 % der Zellen stammen von dem/der Empfänger/-in (oft nach Transplantation solider Organe).

Bei malignen Erkrankungen wird in der Regel ein kompletter (Donor-)Chimärismus (CC) angestrebt; er gilt als Kennzeichen einer erfolgreichen HSZT (21). Allerdings ist das Erreichen eines CC sehr früh nach der Transplantation mit einer erhöhten Inzidenz von GvHD assoziiert (21). Bei benignen Erkrankungen ist ein CC nicht unbedingt nötig, jedoch ist für eine funktionierende Blutbildung ein Spenderzellanteil von mindestens 10 % erforderlich (12).

Eine Kontrolle des Transplantatanwachsens ist vor allem bei Patientinnen/Patienten mit hohem Risiko für Transplantatabstoßung indiziert, zum Beispiel nach non-myeloablativer

Transplantation, nach T-Zell-Depletion, bei nicht-HLA-identischem/identischer Spender/-in oder bei schwerer aplastischer Anämie (12, 13).

Bei der Bewertung eines gemischten Chimärismus (MC) ist zu beachten, dass es sich bei den detektierten Empfängerzellen nicht zwingend um ein Rezidiv handeln muss. Ebenso kann es sich um normale überlebende hämatopoetische Stammzellen handeln (16). Deren Vorkommen wird beeinflusst von der Stärke der Konditionierung, der Durchführung einer T-Zell-Depletion, der Anzahl infundierter Stammzellen, der Sensitivität der Untersuchungstechnik sowie dem Zeitintervall nach Transplantation (12). So tritt ein MC beispielsweise vermehrt nach RIC auf, da hier keine komplette Ablation der Empfängerzellen stattgefunden hat (14). Tritt er jedoch bei myeloablativer Konditionierung früh nach Transplantation auf, ist dies ein Hinweis auf Transplantatversagen oder Persistenz der Grunderkrankung (21). Zudem kann es im Rahmen einer Infektion zu einer Zunahme autologer virusspezifischer T-Zellen kommen (11).

Zwar suggerieren einige Studien, dass eine niedrige Anzahl persistierender Empfängerzellen das Rezidivrisiko nicht erhöhe (12, 21). Viele Studien zeigen jedoch, dass Patienten/Patientinnen mit einem MC, insbesondere mit abnehmenden Donorchimärismus, ein erhöhtes Rezidivrisiko aufweisen (13, 15). Das liegt daran, dass ein MC der mononuklearen Zellen den GvL-Effekt abschwächt (7). Eine frühzeitige Intervention durch DLI oder Senkung der Immunsuppression kann hier die Umwandlung in einen CC bewirken und so ein Rezidiv verhindern (7, 13). Die Therapie ist umso effektiver, je früher sie begonnen wird, was die Relevanz einer möglichst sensitiven Methode zu Chimärismusanalyse verdeutlicht (15).

Überdies kann die isolierte Analyse einzelner Zellreihen sinnvoll sein: So ist ein MC der T-Zellen ein Hinweis auf Transplantattoleranz und Resistenz gegen GvHD, wohingegen ein MC der myeloischen Reihe bei AML und CML ein Hinweis auf ein Rezidiv ist (9).

1.2.2.1 Verschiedene Methoden zur Chimärismusanalyse

Es gibt viele verschiedene Methoden zur Durchführung der Chimärismusanalyse (siehe Tabelle 4). Alle basieren auf der Darstellung geno- oder phänotypischer Unterschiede zwischen Spender- und Empfängerhämatopoese (13, 20). Diese werden vor der Transplantation detektiert und nach der Transplantation zur Quantifizierung von Spender- und Empfängerzellen im Empfängerblut oder -knochenmark analysiert (12). „Restriction fragment length polymorphism“ (RFLP), Erythrozytenphänotypisierung, Zytogenetik und

Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) werden aufgrund der Überlegenheit anderer Methoden kaum noch verwendet (13). Sie sind sehr zeitaufwendig und können oft nur für bestimmte Spender-Empfänger-Konstellationen, beispielweise bei Sex-Mismatch, verwendet werden (7). Stattdessen werden heutzutage auf genetischen Markern beruhende Polymerase-Kettenreaktion(PCR)-Methoden bevorzugt, da diese schneller, sensibler und zuverlässiger sind (25).

Tabelle 4: Übersicht über verschiedene Methoden zur Chimärismusdiagnostik. (12, 13, 15, 22, 26-31)

Methode	Prinzip	Vorteile	Nachteile	Sensitivität in %	Informativität
RFLP (Restriktions-Fragment-Längen-Poly-morphismus)	Southern-Blot-basierte Analyse nach Verdauung mit Restriktions-enzymen	Analyse aller kernhaltigen Zellen	zeitaufwendig; teuer; unklare Ergebnisse durch multiple Restriktionsstellen möglich; viel DNA nötig	5-10	hoch
Blutgruppen-merkmale	Differenzierung verschiedener Erythrozyten-phänotypen mittels Fluoreszenz-mikroskopie	einfach; akkurat; schnell; gut geeignet für CML	nur Detektion von Erythrozyten; Verfälschung der Ergebnisse durch Bluttransfusionen möglich	0,04-3	gering
Zytogenetik	Untersuchung polymorpher Genregionen in der Metaphase	gut geeignet für CML mit Philadelphia-Chromosom	Analyse nur von teilenden Zellen; häufig falsch-positiv; viel DNA nötig	5-10	niedrig
FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung)	zytogenetische Untersuchung; Hybridisierung mit fluoreszierenden Sonden in der Interphase	selten falsch-positiv; Untersuchung großer Zellzahl	Sex-Mismatch erforderlich; viel DNA nötig	0,7-5	hoch

Methode	Prinzip	Vorteile	Nachteile	Sensitivität in %	Informativität
STR/VNTR-Analyse	siehe Text	höchste Informativität; sehr polymorph; unabhängig von HLA- oder Sex-Mismatch; wenig DNA nötig; sehr akkurat	gleiche Primer für Empfänger/-in und Spender/-in; zeitaufwendig	0,4-5	höchste (fast 100 %)
Y-/X-Chromosom-spezifische Marker	PCR-basierte Analyse Y-/X-Chromosom-spezifischer Sequenzen	bei Sex-Mismatch sehr informativ (bei weiblichen oder männlichen Spendenden); keine Prä-Transplantations-Proben nötig	nur bei Sex-Mismatch	0,1-4	hoch
Amelogenin-Marker	Differenzierung anhand des X- bzw. Y-spezifischen Amelogenin-Gens	bei Sex-Mismatch sehr informativ (bei weiblichen oder männlichen Spendenden)	nur bei Sex-Mismatch; häufig falsch-positiv	0,1-4	hoch
qPCR (quantitative Real-Time-PCR)	siehe Text	schnell und exakt; höchste Sensitivität	relativ teuer; hohe Sensitivität senkt positiv prädikativen Wert; ungenau bei > 10 % allelpositiver DNA	0,001-0,1	sehr hoch (abhängig von Anzahl getesteter Marker)
dPCR (digitale PCR)	tröpfchenweise Kompartimentierung des PCR-Ansatzes in Mini-Reaktionen mit 0 - mehreren Allelkopien; Messung per Endpunktanalyse	absolute und relative Quantifizierung über großen dynamischen Bereich; hohe Präzision und Reproduzierbarkeit, keine Standardkurven oder Replikate nötig, unempfindlicher gegenüber PCR-Inhibition	teurer als qPCR	0,001-0,1	sehr hoch (abhängig von Anzahl getesteter Marker, vergleichbar mit qPCR)

Besonders hervorzuheben sind die Analyse von „short tandem repeats“ (STR) und „variable number of tandem repeats“ (VNTR) sowie die quantitative Real-Time-PCR (qPCR). Die Analyse von STR und VNTR basiert auf komparativer Amplifikation eines Polymorphismus (32) und galt lange als Goldstandard der Chimärismusanalyse (12). Bei STR/VNTR handelt es sich um hochpolymorphe Mikro- bzw. Minisatelliten mit einer Länge von wenigen 100 Basenpaaren (bp) bzw. 10-100 bp (STR bzw. VNTR), die an mehr als 10^6 Stellen über das gesamte Genom verteilt vorkommen und sich 5-100 Mal wiederholen (31), wobei die Anzahl der Wiederholungen bei jedem Menschen individuell verschieden ist (31). Dieser Längenpolymorphismus kann zur Differenzierung zwischen Spender- und Empfängerzellen dienen (12). Dabei werden die STR/VNTR mittels konventioneller PCR amplifiziert und per Gelelektrophorese analysiert. Vorzüge dieser Methode liegen darin, dass sie eine gute Reproduzierbarkeit und Präzision auch bei hohen Empfängerzellanteilen und eine Informativität von nahezu 100 % aufweist, da STR in vielen Varianten vorliegen können (19). Zudem hat die Methode einen hohen positiv prädikativen Wert (19), ist geschlechtsunabhängig und bedarf nur weniger Zellen zur Analyse (12). Ein großer Nachteil ist allerdings die geringe Sensitivität von 0,5-5 % (19, 22, 33), die häufig zu einer Unterschätzung des Empfängerzellanteils (33) und somit im Vergleich zur qPCR zu einer verzögerten therapeutischen Intervention bei Rezidiv führt (34). Die geringe Sensitivität ist zum einen durch Konkurrenz um Reagenzien in der PCR bedingt, da Allele von Spender/-in und Empfänger/-in im gleichen Ansatz mit den gleichen Primern amplifiziert werden (33). Zum anderen findet die Analyse der Produkte im Plateau der Amplifikation statt, welches von vielen Faktoren beeinflusst wird (33, 35). Auch spektrale Überlappungen des Fluoreszenzsignals bei der Auswertung sind möglich (9). Schließlich ist die STR/VNTR-Analyse relativ zeitaufwendig, da sie nicht mit qPCR vereinbar ist (25) und somit nach der konventionellen PCR noch weitere Arbeitsschritte wie eine Gelelektrophorese vorgenommen werden müssen, was zusätzlich das Risiko einer Kontamination erhöht (32).

Die quantitative Real-Time-PCR (qPCR) weist diese Nachteile nicht auf und wird in vielen Studien als derzeit beste Methode zur Chimärismusanalyse dargestellt (11, 16, 21, 25, 32, 33, 36). Da sich diese Arbeit vornehmlich mit qPCR beschäftigt, wird im nächsten Abschnitt genauer hierauf eingegangen.

1.3 Quantitative Real-Time-PCR

1.3.1 Grundlagen zur Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Erfindung der PCR durch Kary Mullis im Jahr 1984 revolutionierte die Biowissenschaften (37), da sie erstmals die Detektion und Synthese großer Mengen an DNA-Fragmenten in kürzester Zeit ermöglichte. Heutzutage ist die PCR im klinischen Alltag als schnelle und präzise Methode zum Nachweis bestimmter Genorte aus kleinsten DNA-Mengen zur Diagnostik von Erregern und Mutationen nicht mehr wegzudenken (38).

Zur Durchführung der PCR braucht es neben der DNA-Matrize und Nukleotiden, die als Bausteine für den neuen Strang dienen, auch sogenannte Primer. Dies sind sequenzspezifische Oligonukleotide, die den zu amplifizierenden Genabschnitt einrahmen und zugleich als Startpunkt für die DNA-Polymerase dienen (39). Als Polymerase wird meist die thermostabile *Thermus aquaticus*(Taq)-DNA-Polymerase mit 5' → 3'-Exonukleaseaktivität verwendet (40). Zudem braucht es weitere Reagenzien wie Magnesium und Puffer, die meist als „Mastermix“ gebrauchsfertig gemischt sind.

Die PCR läuft in Zyklen ab (siehe Abb. 1). Bei der Denaturierung wird die DNA über den Schmelzpunkt der DNA, in der Regel auf ca. 95 °C, erhitzt, sodass diese in zwei Einzelstränge denaturiert. Beim folgenden Annealing wird die Temperatur gesenkt, damit die Primer mit den Einzelsträngen hybridisieren können. Die anschließende Elongation der Primer zu komplementären DNA-Strängen findet wiederum bei optimaler Arbeitstemperatur der eingesetzten Polymerase statt (38, 39). Dieser Zyklus kann beliebig oft wiederholt werden. Dabei kommt es zunächst zu einem exponentiellen Wachstum der Kopienzahl, da diese in jedem Zyklus verdoppelt wird (41). Irgendwann wird jedoch durch Mangel an Reagenzien und PCR-Inhibition eine Plateauphase erreicht (39). Anschließend werden die resultierenden Amplifikate meist mittels Gelelektrophorese analysiert, wobei chemische Färbemittel oder der Einsatz fluoreszenz-markierter Nukleotide die Detektion erleichtern (38).

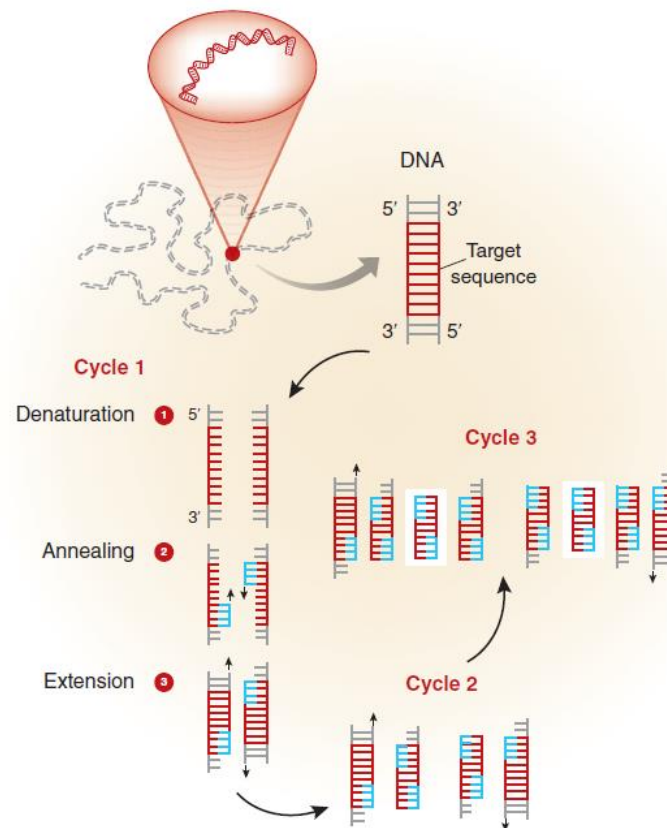


Abb. 1: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips einer PCR. Abgedruckt aus „Polymerase Chain Reaction“, Garibyan et al. (38) (modifiziert nach schoolworkhelper.net, St. Rosemary Educational Institution), mit Erlaubnis von Elsevier (Erlaubnis erteilt durch Copyright Clearance Center, Inc.) und von Schoolworkhelper.net.

Diese ursprüngliche Art der PCR wird qualitative PCR genannt, da sie nur zwischen Vorhandensein und Fehlen von PCR-Produkten unterscheidet. Im Gegensatz dazu kann mit der quantitativen PCR auch eine Aussage über die Menge der gesuchten Genabschnitte gemacht werden (38). Die quantitative Real-Time-PCR (qPCR) basiert auf der Messung bzw. „online-Beobachtung“ des PCR-Prozesses selbst (33, 39) durch Fluorophore, die endständig an sequenzspezifische Oligonukleotid-Sonden gekoppelt sind (39). Diese Fluorophore emittieren durch Anregung mit kurzwelligem Licht höherwelliges Licht, welches von optischen Detektionseinheiten (Thermocyclern) gemessen und ausgewertet wird (39).

1.3.2 Quantitative Real-Time-PCR mit dem TaqMan™-System

Das zur Chimärismusanalyse verwendete TaqMan™-System (siehe Abb. 2) basiert auf der 5' → 3'-Exonukleaseaktivität der Taq-DNA-Polymerase (39). Als Sonde wird eine „dual hybridization probe“ eingesetzt, die am 5'-Ende mit einem Reporter-Fluorophor und am 3'-Ende mit einem Quencher markiert ist, der das Signal des Reporters bei

räumlicher Nähe auslöscht. Eine Emission durch den Reporter findet nur statt, wenn die Taq-DNA-Polymerase in der Elongationsphase die Sonde vom 5'-Ende her degradiert, sodass der Reporter vom Quencher getrennt wird (39). Die Sonde bindet sequenzspezifisch zwischen den beiden Primern (12), sodass die Emission in Abhängigkeit von den amplifizierbaren PCR-Produkten steigt und sich wie diese in der logarithmischen Phase der PCR (41) in jedem Zyklus verdoppelt (12, 39). Somit besteht eine strikte lineare Korrelation zwischen dem Logarithmus der Kopienzahl der zu amplifizierenden Ausgangs-DNA und dem ersten PCR-Zyklus, in dem eine statistisch signifikante Zunahme des fluoreszierenden Signals detektiert wird (12, 33, 42). Dieser Zyklus wird Schwellenwertzyklus („cycle threshold“ = Cq) genannt. Er ist ein relatives Maß für die Ausgangsmenge der Ziel-DNA und umso geringer, je höher die anfängliche Kopienzahl ist (33). Das entsprechende Fluoreszenzniveau, ab dem die Signale einer Reaktion die Hintergrundsignale deutlich überschreiten, sich aber noch in der exponentiellen Wachstumsphase befinden, wird durch die Schwellenwertlinie markiert (43), welche automatisch durch die PCR-Software oder auch manuell ermittelt werden kann. Der Cq-Wert wird am Schnittpunkt dieser Schwellenwertlinie mit der durch die PCR-Software automatisch erstellten Amplifikationskurve abgelesen (43). Diese entsteht durch Auftragung der Signalintensität ΔR_n gegen die Zykluszahl. Dabei steht R_n für das auf das Fluoreszenzsignal einer passiven Referenz (hier ROX™-Farbstoff) normalisierte Reportersignal; ΔR_n ist R_n abzüglich des Fluoreszenzsignals der Basislinie, welche durch das Hintergrundsignal definiert wird (33, 43).

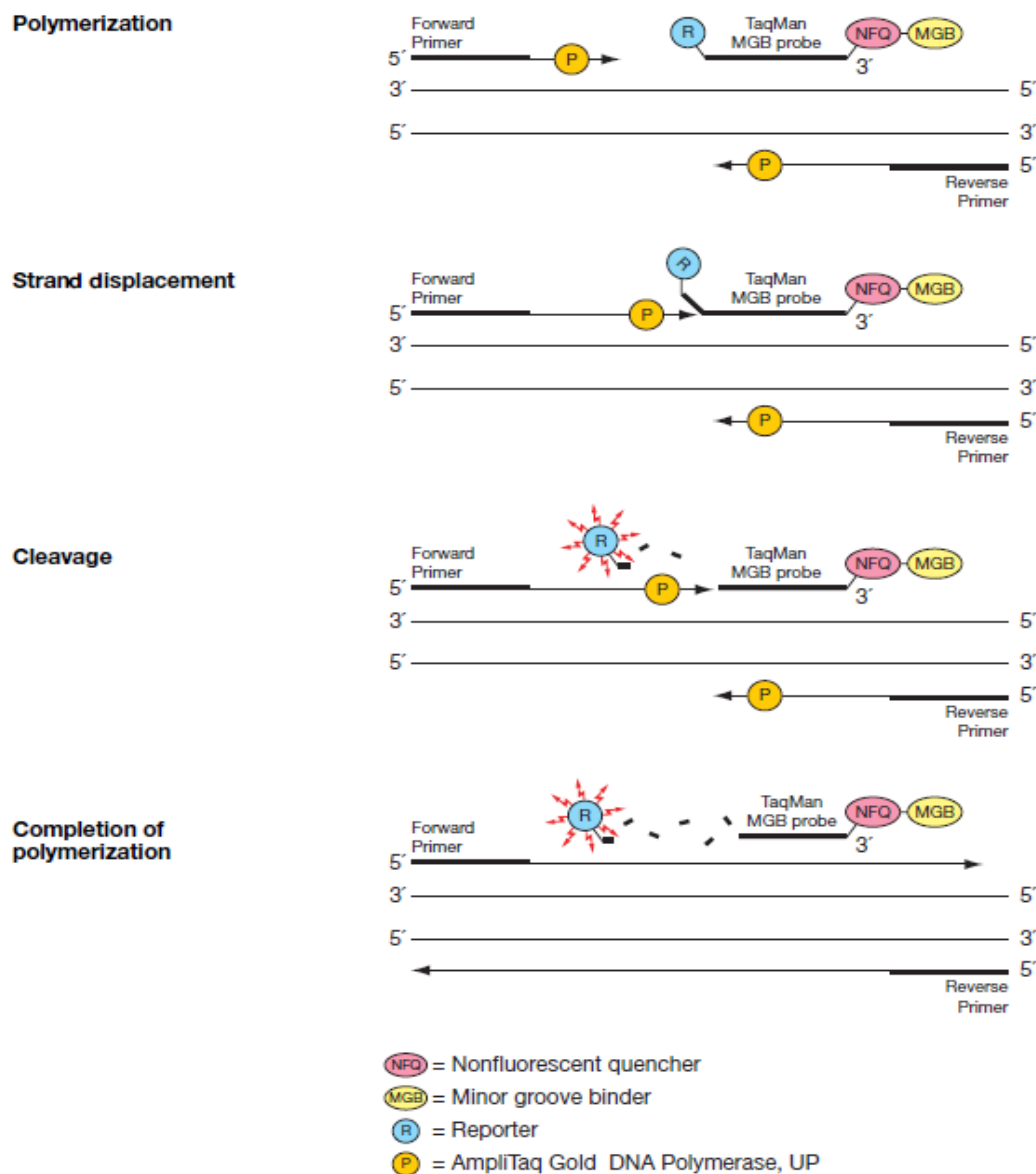


Abb. 2: Schematische Darstellung der qPCR mittels TaqMan™-System. Abgedruckt aus „TaqMan Gene Expression Master Mix Protocol“ (42), mit Erlaubnis von Thermo Fisher Scientific (Life Science Solutions).

1.3.3 Verschiedene molekulare Marker

Es gibt verschiedene Arten genetischer Polymorphismen, die als Marker für die qPCR geeignet sind. Biallelische „short-sized polymorphisms“ unterscheiden sich in je zwei aufeinanderfolgenden Basen (44) und wurden von Alizadeh et al. (33) als Marker etabliert. Biallelische „single nucleotide polymorphisms“ (SNPs) hingegen unterscheiden sich nur in einer Base und wurden beispielsweise von Maas et al. (9) und Gineikiene et al. (25) als Marker eingeführt. SNPs kommen durchschnittlich alle 1.000 bp vor und bilden ca. 90 % der Sequenzvarianten des menschlichen Genoms (30, 45). Durch ihre hohe

Dichte und Mutationsstabilität eignen sie sich gut zur Differenzierung zweier Individuen (45); man geht davon aus, dass sich zwei Individuen jeweils in über einer Million SNPs unterscheiden (46). Sowohl SNPs als auch SPs beruhen auf sehr kleinen Unterschieden zwischen den einzelnen Allelen, was eventuell die diskriminative Fähigkeit der Assays vermindert (44) und zu mehr falsch-positiven Ergebnissen führt (24). Bei Nullallelen und „insertion and deletion polymorphisms“ (Indels) hingegen handelt es sich um ganze Gene bzw. längere genomische Abschnitte, die in einem Genom entweder vorhanden sind oder fehlen (44). Dies hat den Vorteil, dass keine unspezifische Amplifikation der Marker-negativen DNA auftritt (44). Kletzel et al. (20) führten 34 Indels ein; Jimenez et al. beschrieben vier Nullallele und sechs weitere Indels (44).

1.3.4 Verschiedene Methoden zur relativen Quantifizierung

Grundsätzlich kann zwischen zwei verschiedenen, gleichwertigen Methoden zur relativen Quantifizierung des Chimärismusgrades unterschieden werden (32), der $\Delta\Delta Cq$ - und der Standardkurvenmethode. Beiden ist eine Normalisierung der eingesetzten DNA-Menge anhand einer internen aktiven Referenz gemein (33), mit dem Ziel, qualitative und quantitative Unterschiede der eingesetzten DNA zu relativieren (47). Als Referenzgene können sogenannte Haushaltsgene dienen, die Proteine oder RNA-Moleküle für grundlegende Zellfunktionen kodieren und konstant exprimiert werden (48), oder eine gemeinsame, lokusspezifische Sequenz (25). Wichtig ist, dass die qPCR-Effizienzen für Referenzgen und spezifisches Allel vergleichbar sind (49). Der normalisierte Cq-Wert (ΔCq) ergibt sich aus der Differenz des Cq-Wertes des spezifischen Allels und des Cq-Wertes des Referenzgens (21) (siehe Formel 1).

$$\Delta Cq = Cq_{\text{allel}} - Cq_{\text{ref}}$$

Formel 1: Berechnung des normalisierten Cq-Wertes ΔCq .
(allel = spezifisches Allel; ref = Referenzgen)

Bei der $\Delta\Delta Cq$ -Methode dienen Prä-Transplantations-DNA-Proben der Empfängerin/des Empfängers als Kalibrator zur Quantifizierung des Empfängerchimärismus (33). Der Cq-Wert der Kalibratorprobe entspricht dabei definitionsgemäß einem Empfängerchimärismus von 100 %. Der Chimärismusgrad der unbekannt Probe wird nun als Anteil des normalisierten Cq-Wertes der unbekannt Probe am normalisierten Cq-Wert der Kalibratorprobe errechnet (33), wobei die qPCR-Effizienz des spezifischen Markers miteinbezogen wird (siehe Formel 2 und Formel 3). Diese Methode wird von Alizadeh et al. (33), Gineikiene et al. (25) und weiteren (32, 44) verwendet.

$$\Delta\Delta Cq = (Cq_{\text{allel U}} - Cq_{\text{ref U}}) - (Cq_{\text{allel C}} - Cq_{\text{ref C}})$$

Formel 2: Berechnung von $\Delta\Delta Cq$.
(allel = spezifisches Allel; C = Kalibratorprobe; ref = Referenzgen; U = Unbekannte Probe)

$$\% \text{ Empfänger Chimärismus} = (1 + E)^{\Delta\Delta Cq} \times 100$$

Formel 3: Berechnung des Empfängerchimärismus in Prozent.
(E = Effizienz)

Bei der Quantifizierung anhand von Standardkurven hingegen sind keine Prä-Transplantations-DNA-Proben nötig. Stattdessen werden aus DNA-Proben gesunder Probanden/Probandinnen allelspezifische Standardreihen artifizierender Chimärismen hergestellt und mittels qPCR amplifiziert. Durch logarithmische Auftragung des Chimärismusgrades gegen ΔCq erhält man eine Standardkurve in Form einer linearen Trendlinie. Aus der hieraus abgeleiteten Formel (siehe Formel 4) und dem Cq-Wert der unbekannt Probe kann dann der Chimärismusgrad berechnet werden (32).

$$\% \text{ Donorchimärismus} = 100 - e^{\frac{\Delta Cq - b}{a}}$$

Formel 4: Aufbau der Formel zur Chimärismusberechnung mittels Standardkurvenmethode.
(a = Steigung; b = y-Achsen-Schnittpunkt der Trendlinie)

1.3.5 Vor- und Nachteile der quantitativen Real-Time-PCR zur Chimärismusbestimmung

Viele Studien zeigen, dass die qPCR im Vergleich zu anderen Methoden eine bessere Nachweisgrenze von 0,01-0,1 % Empfängerzellen hat (9, 12, 32, 33, 36, 44). Die Sensitivität ist dabei abhängig vom eingesetzten Marker, von der qPCR-Effizienz und von der eingesetzten DNA-Menge (9). So erlaubt die qPCR eine frühere Detektion von Rezidiven und GvHD, als es mittels STR-Analyse oder klinischen Parametern möglich ist (20). So können Rezidive ca. 38-95 Tage (11, 21, 44) vor der klinischen Diagnose vorhergesagt werden. Laut Kletzel et al. ermöglicht die qPCR sogar eine frühe Differenzierung zwischen primärem und sekundärem Transplantatversagen (20). Zwar ist der negativ prädikative Wert der qPCR für ein Rezidiv sehr hoch, der positiv prädikative Wert allerdings ist durch die hohe Sensitivität der Methode eingeschränkt (11, 16). Dies ist dadurch zu erklären, dass jede Blut- oder Knochenmarkprobe durch Kontamination mit beispielsweise Endothel- oder Stromazellen einen minimalen Anteil nicht-hämatopoetischer autologer Zellen aufweisen kann, der bei hoher Sensitivität der qPCR detektiert wird. Dies könnte zu unnötiger Therapie von Patientinnen/Patienten führen, die eventuell nie ein Rezidiv erleiden würde, inklusive des Risikos einer GvHD-Induktion (19). Durch

Definition eines Schwellenwertes für autologe Signale, der die Diagnose eines MC erlaubt, können die Spezifität erhöht und unnötige Therapien vermieden werden (19).

Die Informativität der qPCR variiert abhängig von Anzahl und Heterozygotenfrequenz der eingesetzten Marker und kann bis zu 100 % erreichen (20, 36). Per Definition gilt ein Marker als informativ für Empfängerdiskriminierung, wenn der/die Empfänger/-in positiv und der/die Spender/-in negativ für diesen Marker ist (25). Im Vergleich zur STR/VNTR ist die Einzelinformativität der verwendeten Marker bei der qPCR jedoch geringer, da biallelische Marker immer nur in drei Genotypen vorliegen können, ein STR hingegen in bis zu vierzig (25).

Die qPCR weist, unabhängig vom getesteten Marker (33), eine sehr hohe Genauigkeit bei der Detektion geringer Anteile Marker-positiver Zellen auf. Mit steigendem Anteil (> 5 %) nimmt die Genauigkeit jedoch ab, was in der Natur der Methode liegt (9, 13): Durch logarithmische Zunahme der Kopienzahl entspricht die gleiche Cq-Spanne Werten von 0-90 % und von 99-99,9 %. Zwar bleibt der relative Variationskoeffizient gleich, die absolute Abweichung steigt aber mit dem Anteil positiver DNA (32). So kann bei einem Anteil über 50 % eine Variation von nur einem Cq-Wert zu 100 % Variation im Ergebnis führen. In diesem Bereich liefert die STR-Analyse genauere Resultate (33).

Im Vergleich zu manch anderen Methoden ist die qPCR mit geringen DNA-Mengen durchführbar, was bei den vielen zytopenen Transplantationspatienten/-patientinnen sehr nützlich ist (21). Multiple Studien belegen zudem eine sehr gute, von der eingesetzten DNA-Menge unabhängige Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (21, 25, 33, 36).

Zuletzt ist die Chimärismusanalyse anhand qPCR weniger zeitaufwendig als viele andere Methoden (12), da Amplifikation und Detektion in einem System möglich sind und keine weitere Verarbeitung der Amplifikate mehr nötig ist (33). Dies ermöglicht eine hohe Frequenz der Chimärismusuntersuchungen, was vor allem in der Anfangsphase nach Transplantation wichtig ist. Überdies wird dadurch das Risiko von Verunreinigungen (19) und somit die Fehlerrate reduziert. Zuletzt können alle Marker unter den gleichen PCR-Bedingungen laufen, was die Analyse mehrerer DNA-Proben und Allele in einem Lauf ermöglicht (20, 33).

1.3.6 Schmelzkurvenanalyse mittels SYBRTM Green-qPCR

SYBRTM Green ist ein interkalierendes Fluorophor, das bei Bindung an doppelsträngige DNA (dsDNA) unter Anregung von kurzwelligem ultraviolettem(UV)-Licht längerwelliges Licht emittiert (39). Während des PCR-Prozesses steigt die Fluoreszenzintensität also proportional zur Menge amplifizierter DNA (39) (siehe Abb. 3). Zur Schmelzkurvenanalyse findet nach Abschluss der exponentiellen Phase der PCR eine langsame Temperaturerhöhung statt. Wird die spezifische Schmelztemperatur T_m eines PCR-Produktes erreicht, denaturiert die dsDNA unter Freisetzung von SYBRTM Green, sodass die Fluoreszenz wieder abnimmt. Bei Kenntnis der spezifischen Schmelztemperatur kann so anhand der Temperatur, bei der die maximale Fluoreszenz auftritt, auf das Vorhandensein spezifischer Genorte geschlossen werden. So kann die Schmelzkurvenanalyse zur Typisierung auf bestimmte molekulare Marker im Genom eines Probanden/einer Probandin verwendet werden (39).

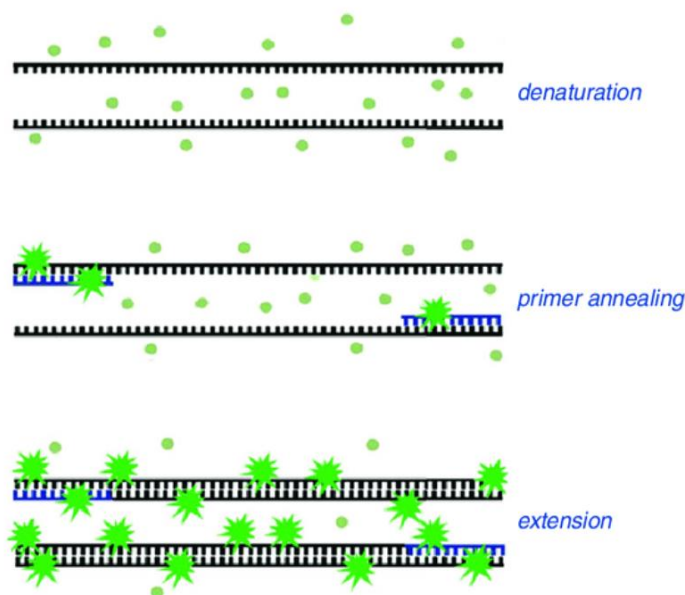


Abb. 3: Schematische Darstellung der qPCR mittels SYBRTM Green. Die Fluoreszenz steigt um das 100-200-fache, wenn der Farbstoff an dsDNA bindet. Abgedruckt aus „Real Time-PCR“, Fraga et al. (50), mit Erlaubnis von John Wiley & Sons, Inc. (Erlaubnis erteilt durch Copyright Clearance Center, Inc.).

1.4 Amplification Refractory Mutation System (ARMS)

Das „Amplification Refractory Mutation System“ (ARMS), auch „allelspezifische PCR“ (ASPCR) oder „PCR-Amplifikation spezifischer Allele“ (PASA) genannt, ist ein ursprünglich von Newton et al. (51) entwickeltes System zur Detektion von SNPs (52). Es

basiert auf der Amplifikation eines DNA-Fragments in zwei getrennten Ansätzen (39) und ermöglicht eine Genotypisierung nach konventioneller PCR anhand von Gelelektrophorese ohne die Notwendigkeit der Aufspaltung durch Restriktionsenzyme oder der Verwendung markierter allelspezifischer Oligonukleotide (51, 53).

Das ARMS basiert auf der Beobachtung, dass Oligonukleotide mit einer Fehlpaarung am 3'-Ende nicht als Primer funktionieren (51). Wählt man einen Primer so, dass sein 3'-Ende auf Höhe des entsprechenden SNP zu liegen kommt, ist eine Amplifikation nur möglich, wenn das Zielallel in der Probe vorhanden ist (52). Die Spezifität der Primer beschränkt sich auf das 3'-Ende und wird erhöht, wenn zusätzlich zur Fehlpaarung des SNP eine weitere an Position -2 des 3'-Endes eingefügt wird (45) (siehe Abb. 4). Insgesamt werden zwei allelspezifische Primer, die jeweils für das andere Allel refraktär sind, sowie ein gemeinsamer Primer benötigt (39). Der gemeinsame Primer weist kein Mismatch auf und kann zusätzlich als zweiter Primer für eine lokusspezifische interne Referenz dienen (25).



Abb. 4: Veranschaulichung des „Amplification Refractory Mutation Systems“. „Allel a“ und „Allel b“ stehen für die zwei Allele eines SNP. Eine Amplifikation findet nur statt, wenn der allelspezifische Primer mit der DNA hybridisiert. Dabei verhindert ein alleiniges Mismatch an Position -2 des 3'-Endes (grün) die Elongation nicht. Liegt allerdings ein zusätzliches Mismatch am 3'-Ende auf Position des SNP (rot) vor, kann die Taq-DNA-Polymerase den Strang nicht elongieren. Ein alleiniges Mismatch nur an Position des SNP würde eine Elongation nicht sicher verhindern. Abgedruckt aus und modifiziert nach „Genetic Education - ARMS or Allele-Specific PCR“ (54), mit Erlaubnis von Genetic Education Inc.

Gineikiene et al. verwendeten die ARMS-Technologie zur Primererstellung für ihr SNP-basiertes qPCR-System zur Chimärismusdiagnostik. Sie variierten dabei Anzahl und Position der Fehlpaarungen in den allelspezifischen Primern, um eine maximale Spezifität zu erreichen (25).

Eines der von Gineikiene et al. erstellten Primer-Sets, nämlich das für den SNP rs713753, wurde in dieser Arbeit verwendet. Als allelspezifische (Forward-)Primer dienen hierbei solche mit einer zusätzlichen Fehlpaarung. Als interne Referenz wurde eine Sequenz gewählt, die mit dem jeweiligen SNP überlappt. Der entsprechende Forward-Primer dieser lokusspezifischen Referenz ist im Vergleich zu den allelspezifischen Primern des jeweiligen SNP lediglich um einige Nucleotide stromaufwärts verschoben; er enthält keine Fehlpaarungen. Als Gegenstück für alle drei Forward-Primer wird ein gemeinsamer Reverse-Primer eingesetzt. Auch dieser enthält keine Fehlpaarungen (25).

1.5 Fragestellung

Am Universitätsklinikum Würzburg werden jährlich über 100 allogene HSZT vorgenommen, unter anderem mit haploidenten Spendenden (55). Die Chimärismusdiagnostik stellt einen wesentlichen Bestandteil der Überwachung nach allogener HSZT dar, da sie auch ohne spezifische molekulare Marker eine frühzeitige Erkennung von Rezidiven, GvHD und Transplantatversagen ermöglicht, noch bevor es zur klinischen Manifestation kommt. Die möglichst genaue und sensitive Quantifizierung des hämatopoetischen Chimärismus ist ein kritischer Punkt der Nachsorge nach HSZT, da die Ergebnisse einen starken Einfluss auf das weitere therapeutische Vorgehen wie beispielsweise DLI, erneute Transplantation oder Chemotherapie haben.

Die aktuell im Würzburger Labor etablierte Methode – qPCR von „short-sized polymorphisms“ (33) und SNPs (9) – ermöglicht mit einer Sensitivität von 0,1 % die sichere Detektion einer Empfängerzelle unter 1.000 Zellen. Indessen wird von manchen Autoren eine Sensitivität von 0,01 % beschrieben (20, 44).

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb die Verbesserung der Sensitivität der qPCR durch Erhöhung des DNA-Inputs, respektive die Ermittlung der optimalen DNA-Menge, die eine maximale Sensitivität ohne PCR-Inhibition oder störende Hintergrundamplifikation ermöglicht. Damit verknüpft war die Frage nach einer Optimierung der DNA-Extraktion, um dem damit einhergehenden erhöhten DNA-Bedarf gerecht zu werden. Dafür sollte insbesondere die Elutionsmethode bei der Extraktion modifiziert werden.

Ein weiteres Ziel war das Hinzufügen neuer Genorte für die qPCR, da sich zurzeit bei ca. 5 % der Spender-Empfänger-Paare keines der im Labor etablierten Genorte als informativ erweist. Dazu wurde ein von Gineikiene et. al. (25) beschriebenes SNP ausgewählt, welches auf Allelfrequenz und Informativität in unserer Population getestet werden sollte. Überdies sollten Effizienz, Nachweisgrenze, Präzision und klinische Anwendbarkeit des auf der ARMS-Technologie basierenden Primersatzes für die qPCR des gewählten SNP evaluiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Angaben zur Notwendigkeit eines Ethikvotums

Für Arbeiten an anonymisierten Proben freiwilliger Probanden/Probandinnen sowie an anonymisiertem Restmaterial (in diesem Falle DNA-Rest-Eluate) ist nach Maßgabe der Ethikkommission an der Medizinischen Fakultät Würzburg kein Ethikvotum erforderlich.

2.2 Material

2.2.1 Geräte und Softwares

Tabelle 5: Auflistung verwendeter Geräte und Softwares.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Heizblock	neoBlock Heizer Mono I Thermoblock	neoLab Migge GmbH
Kühl-/Gefrierschrank	Mediline Igex 3410, -20 °C	Liebherr International GmbH
	Liebherr comfort, 3 °C	
Manueller Zellzähler	Handstückzähler	VWR International
Mikroskop	Eclipse 50 I Mikroskop	Nikon
Neubauer Zählkammer	Neubauer Improved	HBG Henneberg-Sander
Pipetten	Research / Reference (2,5 µl; 10 µl; 20 µl; 100 µl; 1.000 µl)	Eppendorf
Pipettierhilfe	Accu Jet Pro Pipettierhelfer	Brand
Real-Time-PCR-System	StepOnePlus™	Thermo Fisher Scientific
	StepOne™	
	Dell laptop latitude E6540	
	Dell laptop latitude D530	
Softwares	StepOne™-Software v2.2.3	Thermo Fisher Scientific
	NanoDrop-Software ND 1000, V3.1.0	Thermo Fisher Scientific
	Excel 2016	Microsoft Office
	Word 2016	Microsoft Office
Spectrophotometer	NanoDrop ND-1000	Thermo Fisher Scientific

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
UV-Arbeitsbank	UVC/T-AR, DNA/RNA UV-Cleaner Box	BioSan
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries
Wasserbad	WNB14	Memmert GmbH
Zentrifugen	5415R Zentrifuge	Eppendorf
	VWR Galaxy Mini Zentrifuge	VWR International
	Heraeus Multifuge 3S Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific
	Heraeus Multifuge 3S-R Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific

2.2.2 Verbrauchsmaterial

2.2.2.1 Laborbedarf

Tabelle 6: Auflistung verwendeter Labormaterialien.

Material	Bezeichnung	Hersteller
Blutentnahmenadel	Safety-Multifly-Kanüle grün	Sarstedt
Blutentnahmeröhrchen	S-Monovette Hämatologie EDTA K ₃ ; 9 ml	Sarstedt
Einmalhandschuhe	Peha-Soft Nitrile Einmalhandschuhe	Hartmann
Hautantiseptikum	Octeniderm farblos	Schülke
Klebefolien	Klebefolie für PCR-Platte, optisch klar	Sarstedt
Mikroreaktionsgefäße	Mikroreagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt
PCR-Platten	96 Fast PCR-Platte Halbrand	Sarstedt
	Multiplate 48-Well PCR Plate	Bio-Rad
Pipetten	Pipette 25 ml in 2/10 ml	Greiner Bio One
Pipettenspitzen	Biosphere Fil. Tip 20 / 100 / 1.000	Sarstedt
	Biosphere Fil. Tip 1250 µl lang	Sarstedt
Spin-Säulen	Spin columns	QIAGEN
Tubes	Collection tubes	QIAGEN
	Falcon™ 15 mL Conical Centrifuge Tubes	Thermo Fisher Scientific

2.2.2.2 Reagenzien, Lösungsmittel und Kits

Tabelle 7: Auflistung verwendeter Reagenzien, Lösungsmittel und Kits.

Produkt	Bezeichnung	Hersteller
DNA-Extraktionskit	QIAamp DNA Blood Mini-Kit	QIAGEN
DNA-Extraktionskit	QIAamp DNA Blood Midi-Kit	QIAGEN
Ethanol	Ethanol 70 % V/V	Otto Fischar GmbH
Ethanol absolut	Ethanol absolut 1 L > 99,8 %	Sigma-Aldrich
Färbemittel	Tryptanblau	Fluka (Sigma-Aldrich)
HBSS-Puffer	Hanks Balanced Salt Solution (no magnesium, no calcium, no phenol red)	GIBCO (Thermo Fisher Scientific)
PCR-Mastermix	TaqMan™ Gene Expression Master Mix	Thermo Fisher Scientific
Primer	Primer für qPCR	Biomers.net
Sonden	Sonden für qPCR	Biomers.net; Sigma-Aldrich
SYBR™ Green-qPCR-Mastermix	iTaq™ Universal SYBR™ Green Supermix	Bio-Rad
Wasser	PCR-Wasser	Roche

2.2.2.3 Primer und Sonden

Tabelle 8: Auflistung verwendeter Primer.

(¹ = publiziert von Alizadeh et al. (33); ² = publiziert von Gineikiene et al. (25))

Name	Genlokation	5'-Primer-3'
S 02 F ¹	Y	GCQTCQCQGGTTGGAGTCACG
S 02 R ¹		GCQTGCQGGCGGACCCQ
S 07b F ¹	X	GGTATTGGCQTAAAATACQCAACC
S 07b R ¹		CAGCQGCAACAGTTATCAACGTT
SRY F ¹	Y	AACQCACCQCCAACACATACQCCAC
SRY R ¹		TTCATGATGAAATCQGCQTTTTGTTT
HCK F ³	20q11-q12	TATTAGCACCATCCATAGGAGGCQT
HCK R ³		GTTAGGGAAAGTGGAGCGGAAG

Name	Genlokation	5'-Primer-3'
rs713753_C F ²	22q13	TCAAAGGTGGGGAATCGAC
rs713753_T F ²		TCAAAGGTGGGGAATCGAT
rs713753_Uni F ²		GTCAAAGGTGGGGAACCAA
rs713753 R ²		GCQGACQCQTGCQCCATC

Tabelle 9: Auflistung verwendeter Sonden.
¹ = publiziert von Alizadeh et al. (33); ² = publiziert von Gineikiene et al. (25);
³ = publiziert von Fehse et al. (22)

Name	Art	Genlokation	TaqMan™-Sonde (FAM-TAMRA)
S 02 ¹	FAM-TAMRA	Y	CQGCACCACCAAATCATCCCCGTG
S 07 ¹	FAM-TAMRA	X	TCCQCACQTCQCCACCCCQAGTTAAACAG
SRY ¹	FAM-TAMRA	Y	CAGCCACCAGAATTATCQCCAAGCQCQCQGA
rs713753 ²	FAM-TAMRA	22q13	CCQGCCCCAAAGGCCAGAGAGAC
HCK ³	JOE-TAMRA	20q11-q12	TAACGCGTCCACCAAGGATGCGAA

2.3 Methoden

2.3.1 Probengewinnung

Bei den Proben handelte es sich um Vollblut, welches anhand einer venösen Blutentnahme gewonnen wurde. Für die Experimente zur Optimierung der DNA-Extraktion und der Sensitivität der qPCR wurde Blut gesunder Probanden/Probandinnen gewonnen. Für den Test neuer Genorte wurden zusätzliche Proben von Spender-Empfänger-Paaren verwendet, die zuvor im Labor zur Diagnostik eingegangen waren.

2.3.2 Auswahl der Allele

Von den in der Routinediagnostik verwendeten Allelen wurden in dieser Arbeit nur die von Alizadeh et al. (33) beschriebenen „short-sized polymorphisms“ S02, S07b und SRY

verwendet. Die Auswahl erfolgte nach der Häufigkeit der Anwendung im Jahr 2017, wobei die drei am häufigsten verwendeten Allele ausgewählt wurden (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: Häufigkeit der Anwendung der Allele SRY, S02 und S07b zur Chimärismusanalyse. Es handelt sich um Daten aus dem Würzburger Labor aus dem Jahr 2017. Die Gesamtzahl der Chimärismusanalysen in jenem Jahr lag bei 1277.

Allel	Häufigkeit absolut	Häufigkeit in %
SRY	227	17,78
S02	219	17,15
S07b	146	11,43

Als interne Referenz zur Normalisierung der DNA-Menge diente für diese Allele das bei uns in der Routinediagnostik etablierte, auf Chromosom 20q11-q12 lokalisierte Gen für die „hematopoietic cell kinase“ (HCK). Dabei handelt es sich um eine Protein-Tyrosinkinase, die vorrangig in hämatopoetischen Zellen exprimiert wird (56).

Zum Test neuer Allele wurde der von Gineikiene et al. (25) publizierte biallelische SNP rs713753 gewählt, da die zugehörigen Allele rs713753_C und rs713753_T mit 30 % bzw. 23 % die höchste Informativität der von Gineikiene et al. beschriebenen Allele aufwiesen. Als interne Referenz diente hier eine lokusspezifische interne Kontrollregion.

2.3.3 DNA-Extraktion

Zur Typisierung der Probandinnen/Probanden sowie zur anschließenden Quantifizierung des Chimärismus musste zunächst DNA aus dem Probenmaterial extrahiert werden. Hier wurden zwei verschiedene kommerzielle Kits benutzt, die beide nach dem gleichen Prinzip ablaufen: Lyse der Zellen, Bindung der DNA an die Spin-Säule, Waschen und schließlich Elution der gebundenen DNA. Alle Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur unter einer Flow Hood durchgeführt. Wurde die extrahierte DNA nicht sofort verwendet, wurde sie bei -20 °C gelagert.

2.3.3.1 Extraktion mit dem QIAamp DNA Blood Mini-Kit

Das Mini-Kit ist für Probenvolumina von bis zu 400 µl geeignet (57) und wurde in unserem Labor zur täglichen Chimärismusdiagnostik eingesetzt.

Zur Zellyse wurden zunächst 40 µl Protease in ein 1,5 ml-Mikroreaktionsgefäß pipettiert, welches nach Zugabe von 400 µl Probenmaterial¹ und 400 µl AL-Puffer kurz gevortext und für 10 Minuten im Heizblock bei 56 °C inkubiert wurde. Vor und nach der Inkubation wurde es mit der Minizentrifuge leicht zentrifugiert, damit sich der gesamte Inhalt am Boden sammelt. Die anschließende Zugabe von 400 µl Ethanol absolut, gefolgt von Vortexen und kurzem Zentrifugieren, optimierte die Bindung der DNA an die Membran der Säule. Nun wurde das halbe Volumen in die vorbereitete Säule, die in einem 2 ml-Tube steckte, überführt und in der Tischzentrifuge bei 6000 x g (relative Zentrifugalkraft) für 1 Minute zentrifugiert. Die Säule wurde auf ein neues Tube gesteckt und der gleiche Schritt mit dem Rest der Probe wiederholt. Anschließend erfolgte das Waschen der DNA. Dazu wurde die Säule erneut in ein frisches Tube gesteckt, 500 µl AW1-Puffer hinzugefügt und das Ganze bei 6000 x g für 1 Minute zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit dem AW2-Puffer und einer 3-minütigen Zentrifugation bei 16,11 x g wiederholt. Die Säule wurde erneut in ein frisches Tube gesteckt und 1 Minute bei 16,11 x g zentrifugiert. Schließlich folgte die Elution: Dazu wurde die Säule in ein Mikroreaktionsgefäß gesteckt, 100-200 µl² AE-Puffer (Elutionspuffer) über den Filter pipettiert und die Probe nach einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur bei 6000 x g für 1 Minute zentrifugiert.

2.3.3.2 Extraktion mit dem QIAamp DNA Blood Midi-Kit

Das Midi-Kit ist für Probenvolumina von 0,3-2 ml³ Blut geeignet (58). Es wurde angewendet, wenn zur Durchführung der Experimente große DNA-Mengen nötig waren und der Ertrag des Mini-Kits nicht ausreichte. Das Prinzip der Extraktion entspricht dem des Mini-Kits, auch werden die gleichen Reagenzien verwendet.

Zunächst wurde 1 ml Probenmaterial⁴ zusammen mit 100 µl Protease in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen gegeben und vermischt. Nach Zugabe von 1,2 ml AL-Puffer wurde die Probe durch mehrfaches Invertieren und 1-minütiges Schütteln gemischt. Nun erfolgte eine 10-minütige Inkubation im Wasserbad bei 70 °C und eine Zugabe von 1 ml Ethanol absolut. Zum Mischen wurde die Probe erneut invertiert und 1 Minute lang geschüttelt. Dann wurde die gesamte Probe in die in einem Tube steckende Säule überführt und bei 1850 x g für 3 Minuten zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen, 2 ml AW1-Puffer

¹ In dieser Arbeit wurde EDTA-Blut verwendet sowie isolierte Leukozyten zur Herstellung von Standardreihen. Letztere wurden mit HBSS-Puffer auf 400 µl aufgefüllt.

² Die Menge war abhängig von der Elutionsmethode (siehe hierzu 2.3.3.3).

³ In dieser Arbeit wurde mit maximal 1 ml Probenvolumen gearbeitet.

⁴ In dieser Arbeit wurde EDTA-Blut verwendet sowie isolierte Leukozyten zur Herstellung von Standardreihen. Letztere wurden mit HBSS-Puffer auf 1 ml aufgefüllt.

hinzugefügt und das Tube bei 4500 x g für 1 Minute zentrifugiert. Nach Zugabe von 2 ml AW2-Puffer wurde das Tube bei 4500 x g für 15 Minuten zentrifugiert. Zur Elution der DNA wurde die Säule in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen gesetzt und 200 µl AE-Puffer wurden direkt auf die Membran pipettiert. Es folgte eine 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur und eine Zentrifugation bei 4500 x g für 2 Minuten.

2.3.3.3 Verbesserung der DNA-Extraktion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der DNA-Ertrag verschiedener Elutionsmethoden vom QIAamp DNA Blood Mini-Kit und QIAamp DNA Blood Midi-Kit verglichen (siehe Tabelle 11), um einen möglichst hohen DNA-Ertrag zu erzielen. Bei der Elution handelt es sich um den letzten Teil der Extraktion, in dem der AE-Puffer auf den Filter pipettiert wird, um die DNA herauszulösen. Beim Mini-Kit wurden fünf verschiedene Elutionsmethoden an vier Blutproben gesunder Probanden/Probandinnen und beim Midi-Kit zwei verschiedene Elutionsmethoden an drei Blutproben gesunder Probandinnen/Probanden je zweimal getestet. Das Volumen des gewonnenen Eluats wurde mit einer Pipette abgeschätzt und die Konzentration des Eluats wurde photometrisch vermessen (siehe 2.3.4). Aus Volumen und Konzentration wurde schließlich der DNA-Ertrag errechnet. Zuletzt wurden die Ergebnisse der verschiedenen Elutionsmethoden verglichen.

Tabelle 11: Überblick über die bei der DNA-Extraktion getesteten Elutionsmethoden.
 Beim Mini-Kit wurde jede Methode an Blutproben vierer gesunder Probandinnen/Probanden jeweils zweimal getestet, beim Midi-Kit wurde jede Methode an Blutproben dreier gesunder Probanden/Probandinnen jeweils zweimal getestet.

	Mini-Kit	Midi-Kit
Getestete Elutionsmethoden	2 x 200 µl	200 µl + Reelution
	200 µl + Reelution	2 x 200 µl
	200 µl	
	100 µl	
	100 µl + Reelution	

2.3.4 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration des Eluats nach DNA-Extraktion wurde anhand einer photometrischen Vermessung der optischen Dichte mit dem NanoDrop ND-1000 bestimmt. Die Messung wurde mit jeweils 2 µl Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm durchgeführt, da hier das Absorptionsmaximum der DNA liegt. Als Referenzwert diente

die optische Dichte des AE-Puffers, welcher zur Elution verwendet wurde. Um die Reinheit der Proben in späteren Experimenten zu gewährleisten, wurde darauf geachtet, dass die A_{260}/A_{280} -Ratio zwischen 1,7 und 1,9 lag.

2.3.5 Herstellung von Standardreihen

In dieser Arbeit wurden mehrere Standardverdünnungsreihen hergestellt, um artifizielle Chimärismen mit bekannten DNA-Verhältnissen zu erhalten.

2.3.5.1 Leukozytenisolation und Herstellung von Standardreihen

Die hier beschriebene Methode wurde im Labor in der Routinediagnostik zur Herstellung von Standardkurven verwendet. In dieser Arbeit wurde sie zur Herstellung von Standardreihen bekannter Chimärismen (siehe Tabelle 12) der Allele S02, S07b und SRY für die in 2.3.7 beschriebenen Experimente angewendet.

Tabelle 12: Übersicht über die mittels Leukozytenisolation hergestellten artifiziellen Chimärismen. Diese wurden für die Allele SRY, S02 und S07b hergestellt.

Spender/-in	99,99 %	99,90 %	99,70 %	99,00 %	97,00 %	90,00 %
Empfänger/-in	0,01 %	0,10 %	0,30 %	1,00 %	3,00 %	10,00 %

Zunächst wurde DNA gesunder Probanden/Probandinnen mittels Schmelzkurvenanalyse (siehe 2.3.6.1) auf das Vorkommen der relevanten Allele getestet. Aus Vollblut zweier Probandinnen/Probanden, die sich in einem dieser Allele unterscheiden, wurde dann die Leukozytenisolation durchgeführt.

Pro Proband/-in wurden zwei Ansätze benötigt. Zunächst wurden 35 ml Erythrozytenlyse(EL)-Puffer in ein 50 ml-Falcon-Tube vorgelegt und 18 ml EDTA-Blut hinzugefügt. Während einer anschließenden 20-minütigen Inkubation bei 3 °C wurden die Röhren mehrmals geschwenkt. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 300 x g und 4 °C wurde der Überstand dekantiert und das Pellet aufgeratscht. Danach wurden 30 ml EL-Puffer hinzugegeben und die Röhren nach Homogenisierung des Inhalts für 15 Minuten bei 3 °C inkubiert und bei 300 x g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand erneut dekantiert. Das nun aus den isolierten Leukozyten bestehende Pellet wurde aufgeratscht und mit 15 ml HBSS-Puffer verdünnt.

Zur Berechnung der Leukozytenzahl folgten weitere Verdünnungen: 10 µl der Leukozyten-Mischung wurden mit 90 µl HBSS-Puffer verdünnt (1:10-Verdünnung);

davon wurden 10 µl mit 10 µl Tryptanblau vermischt (1:2-Verdünnung). Vom resultierenden Gemisch wurden 10 µl in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und die Zellen in den vier Eckquadraten ausgezählt. Zur Minimierung der Fehlerquote wurde die Auszählung doppelt durchgeführt und der Mittelwert beider Zählungen genommen. Zur Berechnung der im Puffer enthaltenen Leukozytenzahl wurde folgende Formel (Formel 5) angewandt:

$$L = M * V * 20 * 10.000$$

Formel 5: Berechnung der Leukozytenzahl im Puffer bei Leukozytenisolation.
(L = Leukozytenzahl; M = Mittelwert Leukozyten pro Eckquadrat;
V = Volumen HBSS-Puffer (hier 15 ml))

Die Leukozyten-Mischung wurde schließlich bei 300 x g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde aufgeratscht und mit HBSS-Puffer verdünnt, sodass eine Konzentration von 5 x 10⁶ Zellen/ml erreicht wurde. Das dafür benötigte Volumen an HBSS-Puffer wurde mit folgender Formel (Formel 6) errechnet:

$$\frac{\text{Errechnete Zellzahl im Pellet}}{5 \times 10^6 \frac{\text{Zellen}}{\text{ml}}}$$

Formel 6: Berechnung des benötigten Volumens an HBSS-Puffer zum Erreichen einer Leukozytenkonzentration von 5 x 10⁶/ml.

Wichtig war, auf eine homogene Suspension aus Pellet und Puffer zu achten. Nun wurden pro Proband/-in zwölf 15 ml-Falcon-Tubes benötigt, in die jeweils 1 ml der entstandenen Suspension sowie 9 ml HBSS-Puffer gegeben wurde. Die Falcon-Tubes beider Probanden/Probandinnen wurden auf einem LabRack gegenübergestellt. Die Standardreihen wurden erstellt, indem zwischen je zwei gegenüberstehenden Tubes Volumina gemäß Tabelle 13 ausgetauscht wurden. Schließlich wurden die Tubes bei 500 x g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur anschließenden DNA-Extraktion wurden die Leukozyten mit HBSS-Puffer auf das zur Extraktion benötigte Ausgangsvolumen aufgefüllt.

Tabelle 13: Auszutauschende Volumina in Abhängigkeit von den gewünschten Chimärismen. Dies gilt für die aus isolierten Leukozyten hergestellten Standardreihen.

Chimärismus in %	99,99	99,90	99,70	99,00	97,00	90,00
Volumen in µl	1	10	30	100	300	1.000

2.3.5.2 Herstellung von Standardreihen ohne Leukozytenisolation

Im dritten Teil der Arbeit (siehe 2.3.8) wurde ein System entwickelt, standardisierte Verdünnungsreihen und Chimärismen herzustellen, ohne zuvor Leukozyten isolieren zu müssen. Stattdessen wurden die Standardreihen aus bereits extrahierter und vermessener DNA zweier gesunder Probandinnen/Probanden hergestellt.

Zur Messung der Nachweisgrenze wurden Standardreihen von allelpositiver in allelnegativer DNA hergestellt. Von der allelpositiven DNA wurde zunächst eine Verdünnungsreihe in Wasser ausgehend von einer Konzentration von 100 ng/9,5 µl hergestellt, um pipettierbare Volumina zu erhalten. Dann wurde die allelpositive DNA mit der allelnegativen DNA und Wasser gemäß folgendem Schema (Tabelle 14) gemischt:

Tabelle 14: DNA-Mengenverhältnisse der Standardreihen für die Allele des SNP rs751753. Die Angaben der DNA-Masse beziehen sich jeweils auf 9,5 µl Gesamtvolumen.

Verdünnungsstufe	Masse allelpositiver DNA	Masse allelnegativer DNA
1	100 ng	0 ng
10 ⁻¹	10 ng	90 ng
10 ⁻²	1 ng	99 ng
10 ⁻³	0,1 ng	99,9 ng
10 ⁻⁴	0,01 ng	99,99 ng
10 ⁻⁵	0,001 ng	99,999 ng

Zur Beurteilung der qPCR-Effizienz der SNP-Primer wurden zudem Standardverdünnungen allelpositiver DNA in Wasser angelegt. Dazu wurde zunächst eine Verdünnung mit einer Konzentration von 100 ng/µl angefertigt. Hieraus wurden weitere Verdünnungen als 10er-Potenz bis zu einem Verdünnungsgrad von 10⁻⁵ hergestellt.

Beide Standardreihen wurden mit dem TaqMan™-qPCR-System amplifiziert. Dabei wurden pro Verdünnungsstufe und Allel je drei Ansätze (Triplikate) pipettiert. Zur Verringerung der Fehlerquote wurde jede Standardreihe dreimal angelegt und amplifiziert.

2.3.6 Quantitative Real-Time-PCR

Die qPCR zur Typisierung der Probandinnen/Probanden sowie zur Chimärismusbestimmung wurden mit dem StepOne™- und dem StepOnePlus™-Real-Time-PCR-System von Applied Biosystems durchgeführt.

2.3.6.1 Allelnachweis mittels SYBR™ Green und Schmelzkurvenanalyse

Die Typisierung auf die von Alizadeh et al. (33) beschriebenen Allele S02, S07b und SRY wurde, wie es bereits in der Routinediagnostik im Labor etabliert war, mittels SYBR™ Green-Real-Time-PCR und anschließender Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Es handelt sich dabei um eine qualitative Untersuchung des PCR-Produkts. Pro Allel und Proband/-in wurden jeweils Duplikate angelegt sowie eine Extraktionskontrolle und eine Positivkontrolle mitgeführt.

Zunächst wurde für jedes zu testende Allel ein Mastermix hergestellt (siehe Tabelle 15). Schließlich wurden jeweils 19 µl Mastermix und 1 µl der zu untersuchenden DNA in ein Well pipettiert. Da es sich um ein qualitatives Verfahren handelt, war die exakte DNA-Menge hierbei nicht von Bedeutung. Die PCR-Platte wurde schließlich mit einer Folie verschlossen, zentrifugiert und in das PCR-Gerät eingesetzt.

Tabelle 15: Zusammensetzung des Mastermixes für die SYBR™ Green-PCR.

Komponente	Volumen pro Well	Endkonzentration
iTaq™ Universal SYBR™ Green Supermix	10 µl	
Forward-Primer 10µM	1 µl	500 nM
Reverse-Primer 10µM	1 µl	500 nM
H ₂ O	7 µl	
DNA	1 µl	
Gesamt	20 µl	

Die PCR wurde am StepOnePlus™-Real-Time-PCR-System folgendermaßen durchgeführt (siehe Tabelle 16):

Tabelle 16: Programm für die SYBR™ Green-PCR.

Polymerasenaktivierung		5 min	95 °C	} 42 x
Amplifikation	Denaturierung	3 sec	95 °C	
	Annealing / Extension	30 sec	60 °C	
Schmelzkurve		15 sec	95 °C	} 70 x; bis 95 °C
		60 sec	60 °C + 0,5 °C	
		15 sec	95 °C	

Die Analyse der Schmelzkurven wurde mit der StepOne™-Software durchgeführt. Daraus konnte anhand im Labor etablierter Schmelztemperatur-Standards bestimmt werden, welche/-r Proband/-in welches Allel aufweist.

2.3.6.2 Quantitative Real-Time-PCR mit dem TaqMan™-System

Der TaqMan™-qPCR-Ansatz wurde in dieser Arbeit bei allen verwendeten Allelen zur Erstellung von Standardreihen und zur Chimärismusquantifizierung von Spender-Empfänger-Paaren angewandt. Dabei wurden in jedem Experiment je nach Fragestellung verschieden viele Ansätze pro Allel angelegt und Mastermix- und Extraktionskontrollen mitgeführt.

Zunächst wurde für jedes Allel ein eigener Mastermix hergestellt (siehe Tabelle 17). Die DNA wurde mit Wasser verdünnt, sodass sich in 9,5 µl je nach Experiment 10-500 ng DNA befanden. Nun wurden in jedes Well 9,5 µl der DNA-Verdünnung und 15,5 µl Mastermix pipettiert. Die PCR-Platte wurde mit einer Folie verschlossen, zentrifugiert und in das PCR-Gerät eingesetzt.

Tabelle 17: Pipettierschema für die Real-Time-PCR mit TaqMan™-Sonde.

Komponente	Volumen pro Well	Endkonzentration
GEX Mastermix 2x (Applied)	12,5 µl	
Primer F 10 µM	1 µl	400 nM
Primer R 10 µM	1 µl	400 nM
Sonde 5 µM	1 µl	200 nM
DNA	X µl (50-500 ng)	10-500 ng/25 µl
H ₂ O	9,5 µl-x µl	
Gesamt	25 µl	

Es wurde sowohl das StepOnePlus™- als auch das StepOne™-Real-Time-PCR-System verwendet. Bei beiden wurde das in Tabelle 18 beschriebene Programm angewandt.

Tabelle 18: Programm für die Real-Time-PCR mit TaqMan™-Sonde.

UDG Inkubation		50 °C	2 min	} 45-60x
Polymerasenaktivierung		95 °C	10 min	
Amplifikation	Denaturierung	95 °C	15 sec	
	Annealing / Extension / Messung der Fluoreszenz	60 °C	1 min	

Anschließend wurden die Cq-Werte mittels StepOne™-Software ermittelt. Dabei wurde der Schwellenwert zum Ablesen der Cq-Werte nach der im Labor etablierten Methode festgelegt. Eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten allelspezifischen Schwellenwerte zeigt Tabelle 19.

Tabelle 19: Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit verwendeten allelspezifischen ΔR_n -Schwellenwerte zur Bestimmung des Cq-Wertes.

Allel	Schwellenwert (ΔR_n)
S02	0,09
S07b	0,13
SRY	0,15
rs713753_T	0,02
rs713753_C	0,02
rs713753_Uni	0,02

2.3.7 Verbesserung der Sensitivität der quantitativen Real-Time-PCR

Im Rahmen dieser Arbeit wurde getestet, wie sich eine Änderung der in der qPCR eingesetzten DNA-Menge auf deren Sensitivität auswirkt. Dafür wurden zunächst, wie in 2.3.5.1 beschrieben, Standardreihen aus DNA gesunder Probandinnen/Probanden für die Allele S02, S07b und SRY hergestellt. Da es um den Einfluss der eingesetzten DNA-Menge auf die Nachweisgrenze ging, wurden für die anschließende qPCR lediglich die beiden höchsten Verdünnungsstufen, 99,99 % und 99,90 %, verwendet. Für beide Stufen wurden Ansätze mit verschiedenen DNA-Mengen angelegt, und zwar in 50 ng-Schritten von 100 ng bis 500 ng. Jede Probe wurde dreimal auf das entsprechende Allel und einmal auf HCK getestet. Zum Ausschluss von Verunreinigungen wurden eine Mastermix- und eine Extraktionskontrolle mitgeführt. Die TaqMan™-PCR wurde wie in

2.3.6.2 beschrieben mit 45 PCR-Zyklen durchgeführt. Abb. 5 zeigt beispielhaft das Pipettierschema für eines der Experimente mit dem Allel SRY.

Chim-Versuch_3-18_CM													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	CM6-2 100ng 99,99%	CM6-2 150ng 99,99%	CM6-2 200ng 99,99%	CM6-2 250ng, 99,99%	CM6-2 300ng 99,99%	CM6-2 350ng 99,99%	CM6-2 400ng 99,99%	CM6-2 450ng 99,99%	CM6-2 500ng 99,99%			Mxko SRY	A
B	CM6-2 100ng 99,99%	CM6-2 150ng 99,99%	CM6-2 200ng 99,99%	CM6-2 250ng, 99,99%	CM6-2 300ng 99,99%	CM6-2 350ng 99,99%	CM6-2 400ng 99,99%	CM6-2 450ng 99,99%	CM6-2 500ng 99,99%			Mxko HCK	B
C	CM6-2 100ng 99,99%	CM6-2 150ng 99,99%	CM6-2 200ng 99,99%	CM6-2 250ng, 99,99%	CM6-2 300ng 99,99%	CM6-2 350ng 99,99%	CM6-2 400ng 99,99%	CM6-2 450ng 99,99%	CM6-2 500ng 99,99%			Exko HCK	C
D	CM6-2 100ng 99,99%	CM6-2 150ng 99,99%	CM6-2 200ng 99,99%	CM6-2 250ng, 99,99%	CM6-2 300ng 99,99%	CM6-2 350ng 99,99%	CM6-2 400ng 99,99%	CM6-2 450ng 99,99%	CM6-2 500ng 99,99%				D
E	CM6-2 100ng 99,9%	CM6-2 150ng 99,9%	CM6-2 200ng 99,9%	CM6-2 250ng 99,9%	CM6-2 300ng 99,9%	CM6-2 350ng 99,9%	CM6-2 400ng 99,9%	CM6-2 450ng 99,9%	CM6-2 500ng 99,9%				E
F	CM6-2 100ng 99,9%	CM6-2 150ng 99,9%	CM6-2 200ng 99,9%	CM6-2 250ng 99,9%	CM6-2 300ng 99,9%	CM6-2 350ng 99,9%	CM6-2 400ng 99,9%	CM6-2 450ng 99,9%	CM6-2 500ng 99,9%				F
G	CM6-2 100ng 99,9%	CM6-2 150ng 99,9%	CM6-2 200ng 99,9%	CM6-2 250ng 99,9%	CM6-2 300ng 99,9%	CM6-2 350ng 99,9%	CM6-2 400ng 99,9%	CM6-2 450ng 99,9%	CM6-2 500ng 99,9%				G
H	CM6-2 100ng 99,9%	CM6-2 150ng 99,9%	CM6-2 200ng 99,9%	CM6-2 250ng 99,9%	CM6-2 300ng 99,9%	CM6-2 350ng 99,9%	CM6-2 400ng 99,9%	CM6-2 450ng 99,9%	CM6-2 500ng 99,9%				H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

Abb. 5: Pipettierschema einer 96-Well-Platte zur Chimärismusquantifizierung anhand des Allels SRY. Es wurde pro Verdünnungs- und DNA-Stufe dreimal auf das entsprechende Allel sowie einmal auf das Referenzgen HCK getestet. Es handelt sich um das Pipettierschema für das Experiment SRY/2. (ExKo = Extraktionskontrolle; MxKo = Mastermixkontrolle)

Zur Auswertung wurde zunächst aus den allelspezifischen Cq-Werten jedes Triplikats das arithmetische Mittel und die Standardabweichung ermittelt. Aus diesem allelspezifischen Mittelwert und dem dazugehörigen Cq-Wert von HCK wurde nun ΔCq berechnet (siehe Formel 7).

$$\Delta Cq = \frac{x1 + x2 + x3}{3} - Cq_{HCK}$$

Formel 7: Berechnung von ΔCq bei Normalisierung mittels dem Haushaltsgen HCK. (x1-x3 = allelspezifische Cq-Werte der Triplikate)

Zur Überprüfung der Frage, ob es in Ansätzen mit höherem DNA-Input zu PCR-Inhibition durch hohe DNA-Mengen kommt, wurden anschließend die Cq- und die ΔCq -Werte der einzelnen Ansätze evaluiert. Hierzu wurde unter anderem mittels Formel 8 pro Experiment und Chimärismusstufe die Cq-Differenz zwischen den Ansätzen mit 200 ng und 400 ng DNA-Input⁵ berechnet, und zwar jeweils für die spezifischen Allele und für HCK.

⁵ Es wurden die Ansätze mit 200 ng und 400 ng DNA-Input gewählt, da diese beiden Ansätze in fast allen Experimenten zur Amplifikation führten (Ausnahme: HCK in Experiment S07b/1, 99,99 %).

Bei optimaler Effizienz und Abwesenheit von Inhibition ist bei Verdoppelung der allelpositiven DNA mit einer Abnahme des Cq-Wertes um einen Zyklus zu rechnen.

$$\Delta_{200-400} = Cq_{200ng} - Cq_{400ng}$$

Formel 8: Berechnung der Differenz der Cq-Werte zwischen den Ansätzen mit 200 ng und 400 ng DNA-Input (= $\Delta_{200-400}$).
Bei den spezifischen Allelen wurde jeweils der Cq-Mittelwert der Triplikate betrachtet.

Weiterhin wurden zur Evaluierung einer möglichen Inhibition für jedes Experiment die ΔCq -Differenzen und die allelspezifischen Cq-Differenzen zwischen den beiden Chimärismusstufen bei gleichem DNA-Input berechnet (siehe Formel 9). Beide sollten bei optimaler Effizienz ($E = 1$) und Abwesenheit von Inhibition bei 3,3 liegen. Pro DNA-Input wurde der Mittelwert über alle Experimente gebildet. Ebenso wurde ein Mittelwert über alle Experimente und DNA-Input-Varianten gebildet. Dieser wurde dann speziell mit den über alle Experimente gemittelten Werten der Ansätze mit 250 ng⁶ und 500 ng DNA-Input verglichen.

$$\Delta_{log10} = Cq_{99,99} - Cq_{99,90}$$

$$\Delta_{\Delta log10} = \Delta Cq_{99,99} - \Delta Cq_{99,90}$$

Formel 9: Berechnung der Differenzen der allelspezifischen Cq-Werte (= Δ_{log10}) und der ΔCq -Werte (= $\Delta_{\Delta log10}$) zwischen 99,99 %- und 99,90 %-Chimärismus bei gleichem DNA-Input.
Bei den spezifischen Allelen wurde jeweils der Cq-Mittelwert der Triplikate betrachtet.

Um eine Aussage über den Einfluss der DNA-Menge auf die Präzision der Chimärismusbestimmung machen zu können, wurden aus den ΔCq -Werten gemäß der in der Routinediagnostik etablierten Methode – nämlich relative Quantifizierung mittels Standardkurvenmethode (siehe 1.3.4) – die entsprechenden Empfängerzellanteile und Donorchimärismuswerte berechnet und mit den wahren Werten der artifiziell hergestellten Chimärismen (99,99 % und 99,90 %) verglichen. Zur Berechnung wurden folgende Formeln (Formel 10) angewandt, welche im Labor aus zuvor erstellten Standardkurven für die jeweiligen Allele und die aktuelle Mastermix-Charge erstellt worden waren:

⁶ Als Vergleich zu den Ansätzen mit 500 ng DNA-Input wurden die Ansätze mit 250 ng DNA-Input gewählt, da hier in allen Experimenten eine verlässliche Amplifikation auch von 0,01 % allelpositiver DNA auftrat.

$$S02: x = e^{\frac{\Delta Cq+1,6734}{-1,492}}$$

$$S07b: x = e^{\frac{\Delta Cq+1,1657}{-1,435}}$$

$$SRY: x = e^{\frac{\Delta Cq+1,0116}{-1,531}}$$

Formel 10: Formeln zur Chimärismusberechnung für die Allele S02, S07b und SRY.
Die Formeln wurden im Labor anhand von Standardkurven spezifisch für jedes Allel und die aktuelle Mastermix-Charge entwickelt. Zur Berechnung des Donorchimärismus muss das Ergebnis von Dezimal in Prozent umgewandelt und von 100 subtrahiert werden.
(x = Anteil allelpositiver DNA)

2.3.8 Test eines neuen „Single Nucleotid Polymorphisms“ zur Chimärismusbestimmung

Ein weiterer Ansatz, die qPCR-basierte Chimärismusbestimmung in der Diagnostik zu optimieren, war der Test neuer Genorte. In dieser Arbeit wurde die Anwendbarkeit des von Gineikiene et al. (25) vorgestellten Ansatzes getestet. Von den sieben dort beschriebenen SNPs wurde der SNP „rs713753“ auf Chromosom 22q13 ausgewählt, da dieser die höchste individuelle Informativität im von Gineikiene et al. gescreenten Kollektiv aufwies (25). Eine Aussage über die Informativität in unserer Population wurde mittels Typisierung von gesunden Probanden/Probandinnen und von Spender-Empfänger-Paaren ermöglicht. Zur Evaluation von Effizienz und Nachweisgrenze des Ansatzes wurden verschiedene Standardkurven hergestellt. Zudem wurden zur Bewertung der klinischen Anwendbarkeit Verlaufskontrollen einer erkrankten Person nach HSZT quantifiziert.

2.3.8.1 Typisierung von gesunden Probandinnen/Probanden und von Spender-Empfänger-Paaren

Um Proben für die Erstellung von Standardreihen zu gewinnen, wurden zunächst 13 gesunde Probanden/Probandinnen bezüglich des SNP rs713753 typisiert. Dafür wurde eine TaqMan™-qPCR gemäß 2.3.6.2 vorgenommen, da eine Schmelzkurvenanalyse bei SNPs aufgrund der ähnlichen Schmelztemperatur der Amplifikate beider Allele sehr ungenau ist. Jede Probe wurde jeweils doppelt auf die Allele rs713753_C und -T und die lokusspezifische Referenz getestet. Zunächst wurden 60 Zyklen benutzt, dann wurde die Zykluszahl auf 50 reduziert, da in den Zyklen 50-60 keine neuen Signale beobachtet werden konnten. Die Typisierung wurde zunächst gemäß Gineikiene et al. (25) mit 100 ng DNA durchgeführt. Nach Beobachtung ausreichend hoher Cq-Werte wurde jedoch auf 10 ng DNA-Input umgestellt, da dies im klinischen Alltag bei Typisierung

zelldepletierter Patienten/Patientinnen praktikabler ist als eine Typisierung mit 100 ng DNA. Abb. 6 zeigt beispielhaft das Pipettierschema für eines dieser Experimente.

Chim-Typ_15-19_CM									
	1	2	3	4	5	6	7	8	
A	CM6	CM7	CM8	C18/19	C20/19	C21/19	C28/19	Exko rs753_f_C	A
B	CM6	CM7	CM8	C18/19	C20/19	C21/19	C28/19		B
C	CM6	CM7	CM8	C18/19	C20/19	C21/19	C28/19	Exko rs753_f_T	C
D	CM6	CM7	CM8	C18/19	C20/19	C21/19	C28/19		D
E	CM6	CM7	CM8	C18/19	C20/19	C21/19	C28/19	Exko rs753_f_	E
F	CM6	CM7	CM8	C18/19	C20/19	C21/19	C28/19		F
	1	2	3	4	5	6	7	8	

Abb. 6: Pipettierschema einer 48-Well-Platte zur Typisierung gesunder Probandinnen/Probanden auf den SNP rs713753.

Um die Anwendbarkeit des SNP in der klinischen Routine zu testen, wurden auf die gleiche Weise 14 Spender-Empfänger-Paare typisiert, deren Blutproben im Labor zur Diagnostik eingegangen waren.

2.3.8.2 Erstellung von Standardreihen zur Evaluation von Effizienz und Detektionslimit

Zur Bestimmung der qPCR-Effizienzen wurden für beide Allele des SNP rs713753 Verdünnungsreihen allelpositiver DNA gesunder Probandinnen/Probanden in Wasser in den Stufen 1:1 bis 1:100.000 angelegt (siehe 2.3.5.2) und mittels TaqMan™-qPCR (siehe 2.3.6.2) quantifiziert. Zur Fehlerreduktion wurden für beide Allele je drei Standardreihen aus der gleichen DNA erstellt und es wurde pro Standardreihe und Verdünnungsstufe jeweils dreimal auf das spezifische Allel (C oder T) und die interne Referenz getestet. Dabei waren in der kleinsten Verdünnungsstufe (1:1) 100 ng allelpositive DNA pro Well enthalten. Um eventuelle Verschiebungen der Cq-Werte durch abweichende PCR-Bedingungen zu registrieren, wurden, anders als bei Gineikiene et al. (25), 60 statt 50 PCR-Zyklen benutzt.

Um die Nachweisgrenze des SNP-Assays zu bestimmen, wurden aus Blutproben gesunder Probandinnen/Probanden Standardreihen allelpositiver in allelnegativer DNA in den

Stufen 1:1 bis 1:100.000 hergestellt (siehe 2.3.5.2) und per qPCR quantifiziert⁷. Dabei enthielt jedes Well 100 ng Gesamt-DNA, wobei in der Stufe 1:1 nur allelpositive DNA enthalten war. Auch hier wurde zur Fehlerreduktion pro Verdünnungsstufe jeweils dreimal auf das spezifische Allel und die interne Referenz getestet und es wurden drei Standardreihen aus der gleichen DNA erstellt. Die Quantifizierung per TaqMan™-PCR erfolgte gemäß 2.3.6.2 wie bei den Verdünnungsreihen in Wasser mit 60 Zyklen. Mithilfe der StepOne™-Software und Excel wurden die Cq-Werte und die zugehörigen Standardabweichungen analysiert und Detektionslimit („limit of detection“, LOD) und Quantifizierungslimit („limit of quantification“, LOQ) für die qPCR des Allels rs713753_C bestimmt.

2.3.8.3 Berechnung von Standardkurven, Bestimmtheitsmaß und Effizienz

Die Standardkurven für den SNP wurden mithilfe von Excel erstellt. Es erfolgte eine logarithmische Auftragung der Mittelwerte der allelspezifischen Cq-Werte (y-Achse) gegen die Kopienzahl (x-Achse). Die Kopienzahl pro Ansatz wurde zuvor anhand der Größe und molekularen Masse des menschlichen Genoms ermittelt, wobei berücksichtigt wurde, ob Heterozygotie oder Homozygotie für den SNP rs713753 vorlag (siehe Tabelle 20).

Tabelle 20: Pro Ansatz enthaltene Kopienzahl eines Allels in Abhängigkeit von der Gesamt-DNA-Masse. Das menschliche Genom umfasst ca. 3,3 Gigabasenpaare ($3,3 \times 10^9$ bp) (31). 1 pg DNA enthält $0,96 \times 10^9$ bp (59). Das menschliche Genom (haploid) hat ergo eine Masse von 3,44 pg.

Verdünnung	Enthaltene DNA-Masse	Kopienzahl des spezifischen Allels	
		Homozygotie	Heterozygotie
1:1	100 ng	29.091	14.546
1:10	10 ng	2.910	1.455
1:100	1 ng	291	146
1:1.000	0,1 ng	29	15
1:10.000	0,01 ng	2,9	1,5
1:100.000	0,001 ng	0,29	0,15

Aus der resultierenden logarithmischen Trendlinie ließ sich folgende Gleichung erschließen: $y = a \times \ln(x) + b$, wobei a die Steigung und b den Schnittpunkt mit der Y-Achse darstellt. Die Steigung und das Bestimmtheitsmaß (R^2) der Trendlinie wurden automatisch durch Excel berechnet. Wie in unserem Labor geläufig, wurde mit dem natürlichen

⁷ Da keine gesunden Probanden/Probandinnen gefunden wurden, die negativ auf das Allel T waren, konnte dies nur für das Allel C durchgeführt werden.

Logarithmus zur Basis e gerechnet. Demnach wurde die Effizienz der PCR mithilfe folgender Formel (Formel 11) berechnet:

$$E = e^{\frac{1}{\text{Steigung}} - 1}$$

Formel 11: Berechnung der qPCR-Effizienz eines Primersatzes anhand zuvor erstellter Standardkurven. Verändert nach (25, 33)

In vielen Publikationen wird mit dem dekadischen Logarithmus zur Basis 10 gearbeitet, wobei die optimale Steigung bei -3,3 liegt. Um die durch Excel errechnete Steigung mit diesem Wert vergleichen zu können, wurde sie mit folgender Formel (Formel 12) in die Steigung bei dekadischem Logarithmus umgerechnet:

$$p = a \times \ln(10)$$

Formel 12: Umrechnung der auf einem natürlichen Logarithmus basierenden Steigung einer Standardkurve in eine auf dekadischem Logarithmus basierende Steigung. (a = Steigung bei Logarithmus zur Basis e; p = Steigung bei Logarithmus zur Basis 10)

Aus den Ergebnissen der drei Standardreihen allelpositiver in allelnegativer DNA, die jeweils für beide Allele C und T des SNP rs713753 hergestellt worden waren, wurden schließlich die Mittelwerte genommen und daraus jeweils eine Standardkurve für jedes spezifische Allel sowie für die dazugehörige Amplifikation der lokusspezifischen Referenz erstellt.

Anschließend wurden qPCR-Effizienz, R^2 und Steigung der Kurven der spezifischen Allele und der lokusspezifischen Referenz miteinander verglichen.

2.3.8.4 Vergleichender Test auf klinische Anwendbarkeit und Präzision der Chimärismusbestimmung

Die Anwendbarkeit der qPCR des getesteten SNP rs713753 in der Routinediagnostik wurde überprüft, indem eine Chimärismusbestimmung von Verlaufskontrollen nach HSZT vorgenommen wurde, die im Labor zur Diagnostik eingegangen waren. In Anpassung an die in unserem Labor etablierte Standardkurvenmethode und mangels ausreichender Prä-Transplantations-DNA-Proben der Empfängerin/des Empfängers wurde der Chimärismusgrad nicht wie von Gineikiene et al. (25) beschrieben mit der $\Delta\Delta Cq$ -Methode bestimmt, sondern mittels der in der Routinediagnostik etablierten Standardkurvenmethode.

2.3.8.4.1 Erstellung einer Formel zur Chimärismusberechnung gemäß Standardkurvenmethode

Die Formel zur Chimärismusberechnung wurde mithilfe von Excel anhand der Ergebnisse der qPCR des SNP rs713753 aus den Standardreihen allelpositiver in allelnegativer DNA (siehe 2.3.8.2) erstellt⁸. Zunächst wurde aus den Cq-Mittelwerten des spezifischen Allels und der lokusspezifischen Referenz aller drei Standardreihen für jede Verdünnungsstufe ein ΔCq -Wert berechnet. ΔCq wurde dann logarithmisch gegen den Anteil allelpositiver DNA aufgetragen. Aus der entstandenen Standardkurve errechnete Excel eine Trendlinie inklusive Steigung, Y-Achsenabschnitt und R^2 . Die zugehörige Trendlinien-Formel wurde anschließend nach dem Anteil allelpositiver DNA aufgelöst (siehe Formel 13).

$$y = a \ln(x) + b \Leftrightarrow x = e^{\frac{y-b}{a}}$$

Formel 13: Auflösung der Formel der Standardkurven-Trendlinie für das Allel rs713753_C nach dem Anteil allelpositiver DNA.

Durch Einsetzen von ΔCq ergibt sich so der Anteil allelpositiver Zellen bzw. der Empfängerchimärismus in Dezimal.

(a = Steigung; b = y-Achsenabschnitt; x = Chimärismusgrad in Dezimal; y = ΔCq)

2.3.8.4.2 Vergleichende Chimärismusbestimmung von Verlaufskontrollen

Unter den 14 Spender-Empfänger-Paaren befanden sich nur zwei, bei denen eine Empfängerdiskriminierung anhand des Allels rs713753_C möglich war; sprich, der/die Empfänger/-in wurde positiv und der/die Spender/-in negativ auf das Allel getestet. Nur von einem dieser beiden Paare stand ausreichend Verlaufskontrollen-DNA des Empfängers für weitere Experimente zur Verfügung. Von diesem wurden vier Verlaufskontrollen nach HSZT untersucht. Dabei handelte es sich um DNA-Proben, die aus dem peripheren Blut des Patienten extrahiert worden waren. Die TaqManTM-PCR wurde mit 100 ng DNA unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wie zur Quantifizierung der Standardreihen (siehe 2.3.6.2). Dabei wurden jeweils drei Ansätze auf das Allel C und zwei Ansätze auf die lokusspezifische Referenz getestet. Aus den jeweiligen Cq-Mittelwerten von spezifischem Allel und lokusspezifischer Referenz wurde ΔCq berechnet und in die zuvor erstellte Formel (siehe Formel 13) eingesetzt. Die errechneten Werte wurden schließlich mit den Werten verglichen, die zuvor im Labor anhand „short-sized polymorphism“-

⁸ Da keine Standardverdünnung allelpositiver in allelnegativer DNA für das Allel T hergestellt werden konnte, war hier auch keine Formelberechnung möglich.

basierter qPCR der Allele S02 und SRY (nach Alizadeh et al. (33)) ermittelt worden waren.

2.3.9 Datenauswertung und statistische Methoden

Der Großteil der Datenauswertung erfolgte mit Microsoft Excel. Zudem wurde die StepOne™-Software zur Analyse der Schmelzkurven, der Amplifikationskurven und der C_q-Werte verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Erhöhung des DNA-Ertrages für die Chimärismusuntersuchung

Für die Experimente dieser Arbeit sowie für die in der Routinediagnostik angefertigten Standardreihen waren teilweise große DNA-Mengen nötig, die mit der bis dato im Labor angewendeten Extraktionsmethode mit dem QIAamp DNA Blood Mini-Kit nicht immer gewonnen werden konnten. Erschwerend kommt hinzu, dass der Leukozytengehalt im peripheren Blut bei Patienten/Patientinnen nach einer allogenen HSZT oft stark erniedrigt ist, was sich direkt auf den DNA-Gehalt auswirkt. Es wurde nun getestet, wie die DNA-Extraktion im Hinblick auf den DNA-Ertrag optimiert werden kann. Dazu wurden verschiedene Elutionsmethoden des Mini- und des Midi-Kits getestet und anschließend DNA-Konzentration und DNA-Gesamtertrag des Eluats gemessen und verglichen. Eluate mit schlechter Reinheit ($A_{260}/_{280} < 1,7$ oder $> 1,9$) wurden ausgeschlossen.

3.1.1 Mini-Kit

Wie in 2.3.3.3 beschrieben, wurden fünf verschiedene Elutionsmethoden des QIAamp DNA Blood Mini-Kits miteinander verglichen. Jede Methode wurde an vier Blutproben gesunder Probanden/Probandinnen jeweils zweimal getestet. Fünf Eluate (5/40) wurden wegen schlechter Reinheit ausgeschlossen.

Es fiel auf, dass die Ergebnisse recht variabel waren (siehe Abb. 7 und Abb. 8). Dies lag hauptsächlich daran, dass Blutproben verschiedener Probandinnen/Probanden verwendet wurden, die per se einen heterogenen Zellgehalt und somit verschiedene DNA-Konzentrationen aufwiesen. Die größte Streuung der DNA-Konzentration trat bei Elution mit 100 μ l auf, die des DNA-Ertrags bei Elution mit 2 x 200 μ l. Der Mittelwert der Differenz der Konzentrationen eines Duplikates lag bei 9,4 ng/ μ l. Wie zu erwarten (57), resultierte die höchste DNA-Konzentration von durchschnittlich 96,7 ng/ μ l, wenn mit 100 μ l AE-Puffer eluiert und das Eluat anschließend erneut auf den Filter pipettiert wurde (100 μ l + Reelution) (siehe Tabelle 21), da die DNA durch die doppelte Elution zweimal aus dem Filter gelöst wurde, und zwar in einem relativ geringen Volumen von insgesamt 100 μ l. Bei drei von vier Extraktionen wurde auf diese Weise die höchste DNA-Konzentration erreicht; auch die insgesamt höchste Einzelkonzentration von 137,9 ng/ μ l wurde so erzielt.

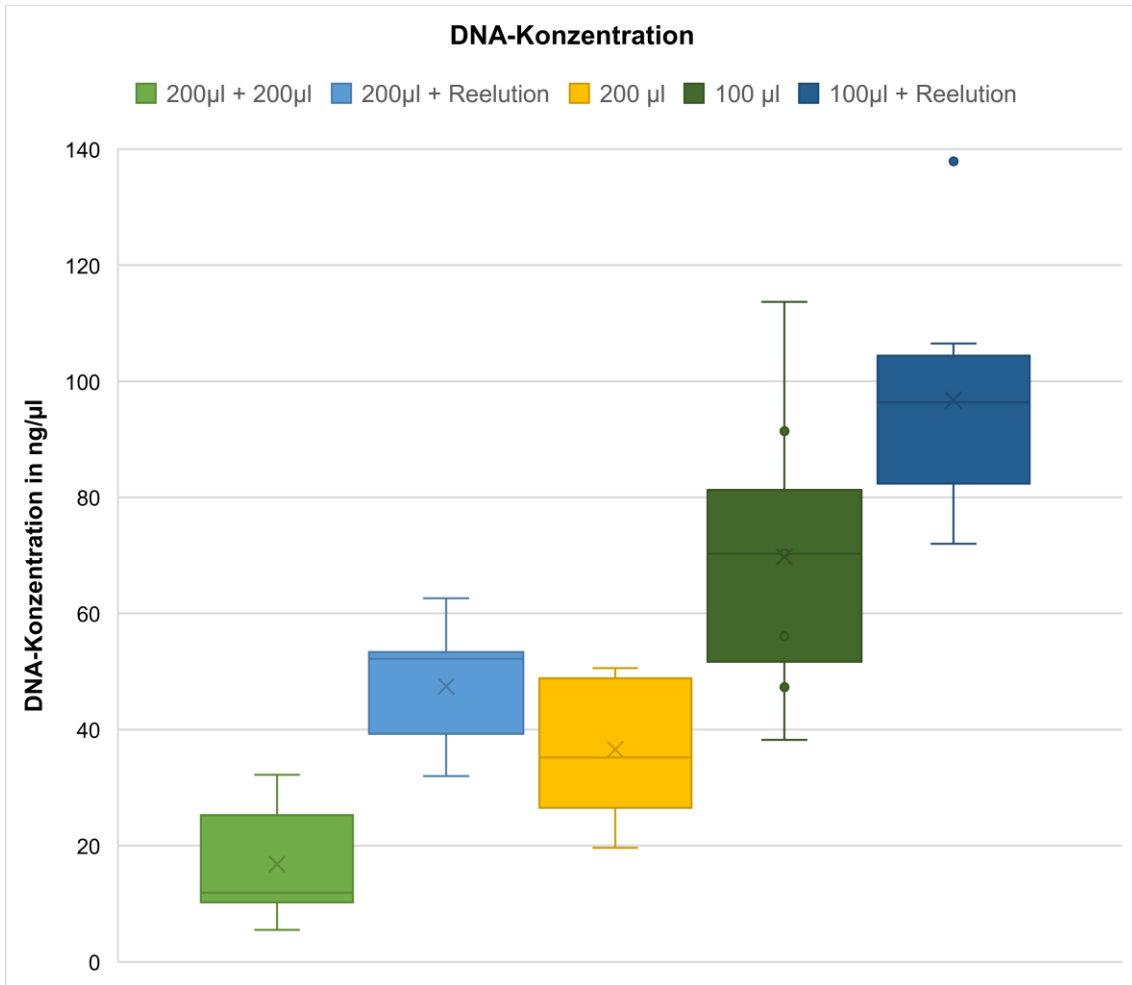


Abb. 7: Streuung der gemessenen DNA-Konzentrationen in Abhängigkeit von der Elutionsmethode beim Mini-Kit.

Die größte Streuung trat bei Elution mit 100 µl auf, die höchste Einzelkonzentration sowie der höchste Durchschnitt wurde bei Elution mit 100 µl + Reelution erreicht. Dabei lag der Wert der höchsten gemessenen Konzentration mehr als einen 1,5-fachen Interquartilsabstand vom 3. Quartil entfernt.

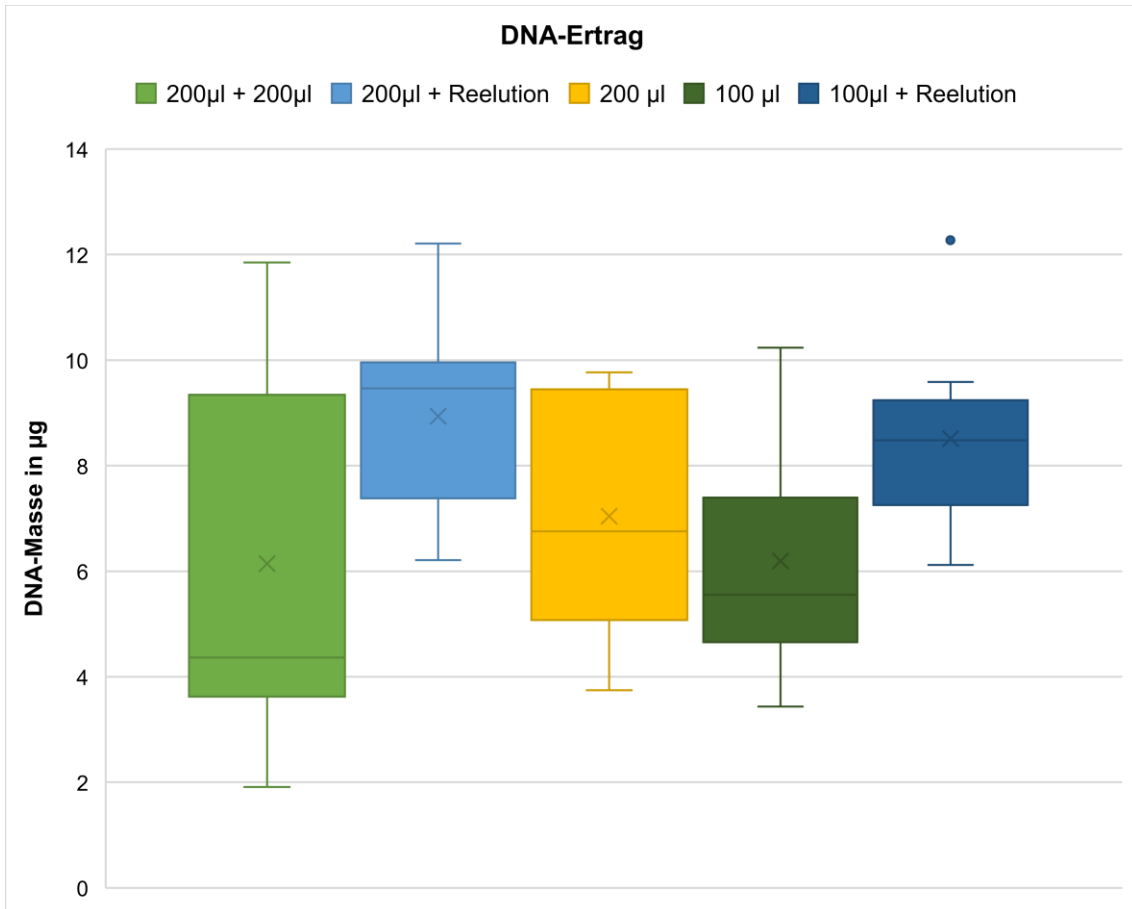


Abb. 8: Streuung der resultierenden DNA-Erträge in Abhängigkeit von der Elutionsmethode beim Mini-Kit. Die größte Streuung trat bei Elution mit 200 µl + 200 µl auf. Der höchste Einzelwert trat bei Elution mit 100 µl + Reelution auf, lag aber mehr als einen 1,5-fachen Interquartilsabstand vom 3. Quartil entfernt. Der höchste durchschnittliche Ertrag resultierte bei Elution mit 200 µl + Reelution.

Tabelle 21: Übersicht der Ergebnisse des Extraktionsexperiments mit dem Mini-Kit. Reelution bedeutet, dass das Eluat der ersten Elution erneut auf den Filter pipettiert wurde.

Elutionsmethode	Mittelwert DNA-Konzentration	Mittelwert Eluat-Volumen	Mittelwert DNA-Ertrag
2 x 200 µl	16,8 ng/µl	361 µl	6,5 µg
200 µl + Reelution	45,1 ng/µl	189 µl	9,0 µg
200 µl	36,6 ng/µl	192 µl	6,9 µg
100 µl	69,7 ng/µl	88 µl	6,7 µg
100 µl + Reelution	96,7 ng/µl	88 µl	8,5 µg

Der höchste DNA-Ertrag war laut Handbuch (57) bei einer zweimaligen Elution mit 200 µl AE-Puffer zu erwarten (2 x 200 µl), da hier mit insgesamt 400 µl das größte Volumen durch den Filter lief und somit auch die größte Menge an DNA gelöst werden konnte. Dies konnte allerdings nur bei einer Extraktion beobachtet werden. Stattdessen wurde der höchste Ertrag von durchschnittlich 9,0 µg bei einer Elution mit 200 µl AE-Puffer und anschließender Reelution mit dem Eluat (200 µl + Reelution) erreicht (siehe Tabelle 21). Der höchste Einzelwert von 12,27 µg wurde allerdings bei Elution mit 100 µl + Reelution erzielt. Im Gegensatz dazu brachte die Elution mit 2 x 200 µl nur einen durchschnittlichen Ertrag von 6,5 µg. Es fiel auf, dass das Eluat bei Elution mit 2 x 200 µl durchschnittlich weniger als halb so konzentriert war wie bei 200 µl + Reelution (16,8 ng/µl vs. 45,1 ng/µl), das Gesamtvolumen des Eluats aber nicht doppelt so groß: Es lag bei Elution mit 2 x 200 µl bei durchschnittlich 361 µl, bei Elution mit 200 µl + Reelution jedoch bei durchschnittlich 189 µl. Dies könnte die Divergenz der Ergebnisse zu den Angaben im Handbuch erklären.

Braucht man also eine hohe DNA-Konzentration, ist bei Verwendung des Mini-Kits eine Elution mit 100 µl + Reelution des Eluats zu empfehlen. Für einen hohen DNA-Ertrag ist eine Elution mit 200 µl + Reelution sinnvoll.

3.1.2 Midi-Kit

Da auch nach Optimierung der Extraktion mit dem Mini-Kit der DNA-Ertrag teilweise nicht ausreichte, wurde das QIAamp DNA Blood Midi-Kit getestet. Wie in 2.3.3.3 beschrieben, wurden zwei verschiedene Elutionsmethoden verglichen. Jede Methode wurde an zwei Blutproben gesunder Probanden/Probandinnen jeweils zweimal getestet. Ein Eluat (1/12) wurde wegen schlechter Reinheit ausgeschlossen.

Wie laut Handbuch (58) zu erwarten, zeigte sich die höchste DNA-Konzentration mit durchschnittlich 154,4 ng/µl bei einer Elution mit 200 µl + Reelution. Auch die insgesamt höchste Einzelkonzentration von 110,5 ng/µl wurde so erreicht (siehe Abb. 9). Dies ist durch das gleiche Prinzip zu erklären, wie bei der Elution mit 100 µl + Reelution beim Mini-Kit.

Der höchste Ertrag von durchschnittlich 22,3 µg zeigte sich wie erwartet bei Elution mit 2 x 200 µl, da hier mit 400 µl das größte Volumen durch den Filter lief (siehe Abb. 10). Auch der höchste Einzelertrag wurde hier mit 26 µg erreicht. Eine Divergenz zu den Angaben im Handbuch wie beim Mini-Kit trat hier nicht auf. Im Gegenteil war das Eluat bei

Elution mit 2 x 200 µl mehr als halb so konzentriert wie das Eluat bei Elution mit 200 µl + Reelution und ergab mehr als das doppelte Volumen, sodass bei Elution mit 2 x 200 µl tatsächlich ein höherer Ertrag resultierte (siehe Tabelle 22).

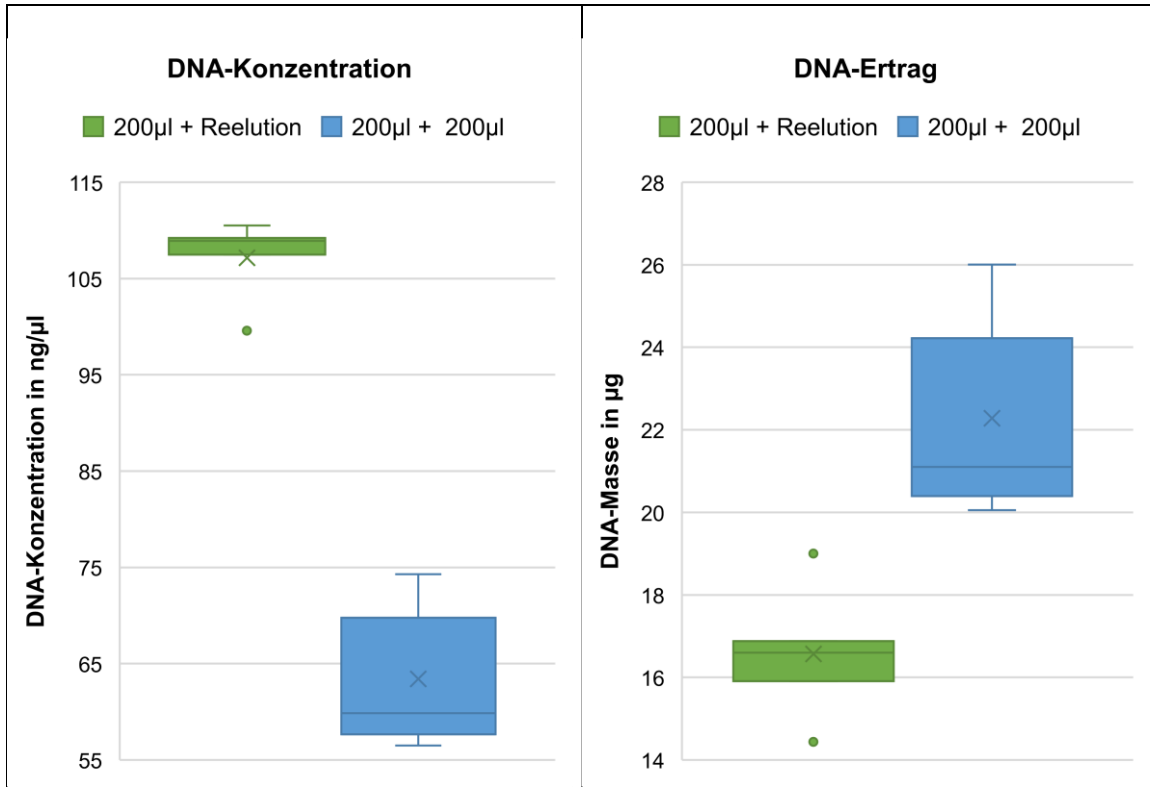


Abb. 9: Streuung der gemessenen DNA-Konzentrationen in Abhängigkeit von der Elutionsmethode beim Midi-Kit. Die größte Streuung der Werte trat bei Elution mit 2 x 200 µl auf, die höchste Konzentration bei Elution mit 200 µl + Reelution.

Abb. 10: Streuung der resultierenden DNA-Erträge in Abhängigkeit von der Elutionsmethode beim Midi-Kit. Die größte Streuung der Werte sowie der höchste DNA-Ertrag traten bei Elution mit 2 x 200 µl auf.

Tabelle 22: Übersicht der Ergebnisse des Extraktionsexperiments mit dem Midi-Kit. Reelution bedeutet, dass das Eluat der ersten Elution erneut auf den Filter pipettiert wurde.

Elutionsmethode	Mittelwert DNA-Konzentration	Mittelwert Eluat-Volumen	Mittelwert DNA-Ertrag
200 µl + Reelution	107,4 ng/µl	154 µl	16,6 µg
2 x 200 µl	63,4 ng/µl	352 µl	22,3 µg

Der maximale DNA-Ertrag des Midi-Kits ist folglich mehr als doppelt so hoch wie der des Mini-Kits (22,3 µg vs. 9 µg). Für weitere Extraktionen wurde daher das Midi-Kit mit einer Elution mit 2 x 200 µl verwendet, wenn viel DNA nötig war. Diese Methode wird auch zukünftig empfohlen, wenn hohe DNA-Mengen benötigt werden.

3.2 Optimierung des DNA-Inputs in die quantitative Real-Time-PCR

Die Sensitivität der in unserem Labor zur Routinediagnostik durchgeführten Chimärismusbestimmung mit TaqMan™-qPCR liegt je nach Allel bei mindestens 0,1 %. Nun wurde untersucht, ob sich die Sensitivität durch Erhöhung des im Labor üblichen DNA-Inputs von 100 ng steigern lässt, ohne dass PCR-Inhibition durch erhöhte DNA-Mengen auftritt. Dazu wurden artifizielle 99,99 %- und 99,90 %-Donorchimärismen der drei häufigsten in der Diagnostik verwendeten Allele S02, S07b und SRY hergestellt und per TaqMan™-qPCR quantifiziert, wobei der DNA-Input von 100 ng bis 500 ng in 50 ng-Schritten variiert wurde. Pro Allel, Chimärismusgrad und DNA-Menge wurde jeweils dreimal auf das spezifische Allel und einmal auf HCK getestet (siehe 2.3.7). Für die Allele S07b und SRY wurden beide Chimärismen doppelt hergestellt und getestet, für S02 jedoch nur einmal, da hier nicht genug DNA für eine zweite Standardreihe verfügbar war. Abb. 11 zeigt beispielhaft den Amplifikationsplot des Experiments SRY/2.

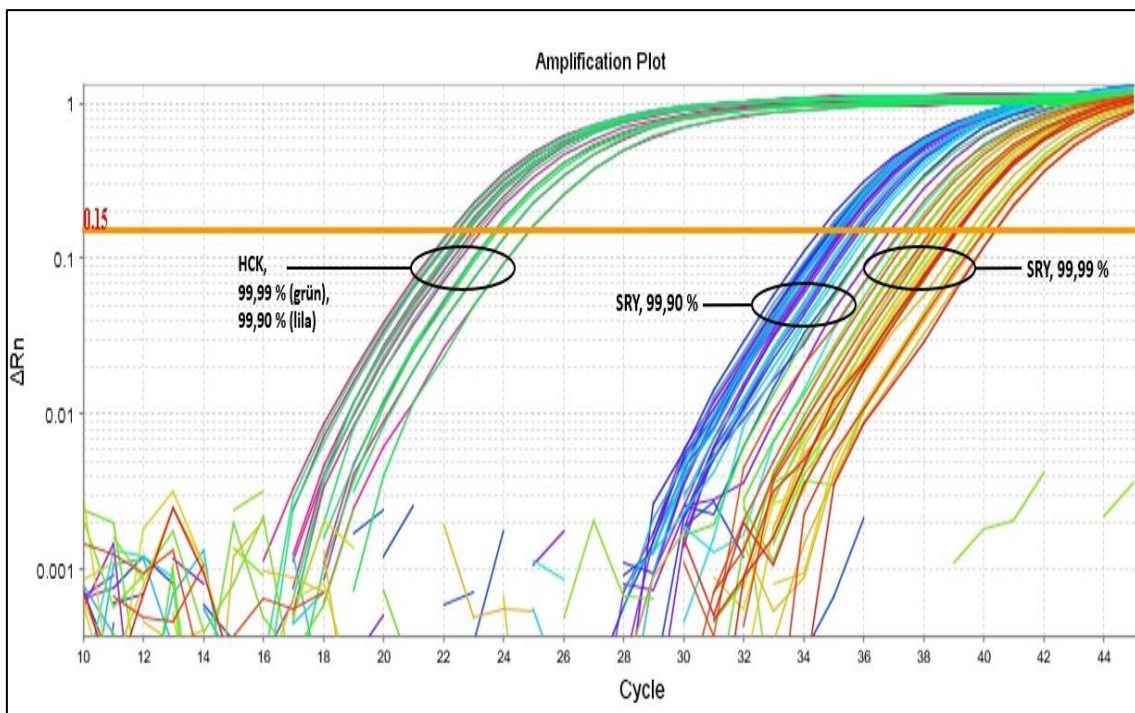


Abb. 11: Amplifikationsplot des Experiments SRY/2. Die Kurven des artifizellen 99,90 %-Chimärismus gehen in die des 99,99 %-Chimärismus über, sind aber noch voneinander abzugrenzen. Durch Variation der eingesetzten DNA-Menge sind die Kurven relativ weit gestreut, genauso wie die Kurven von HCK.

3.2.1 Nachweisgrenze und Sensitivität

Um den Einfluss der DNA-Menge auf die Nachweisgrenze zu bestimmen, wurden die PCR-Signale der Ansätze der höchsten Verdünnungsstufe, also des 99,99 %-Chimärismus, miteinander verglichen. Insgesamt wurden fünf Experimente durchgeführt (2 x SRY, 2 x S07b, 1 x S02). Bei zweien (S02, S07b/1) fanden bei 100 ng und 150 ng DNA-Input keine und bei 200 ng DNA-Input nur in 1/3 Ansätzen eine Amplifikation statt. Bei den anderen drei Experimenten (SRY/1, SRY/2, S07b/2) zeigten bei 100 ng DNA-Input nur 2/3 Ansätzen eine Amplifikation, ab 150 ng DNA-Input trat dann in 3/3 Ansätzen eine Amplifikation auf. Das Experiment S07b/2 zeigte jedoch bei 100 ng DNA-Input eine hohe Standardabweichung von 1,96. Setzt man als Bedingung für eine verwertbare Chimärismusbestimmung eine Amplifikation in mindestens 2/3 Ansätzen und eine Standardabweichung unter 1,5 voraus⁹, war diese bei zwei Experimenten erst ab 250 ng DNA-Input (S07b/1 und S02), bei einem Experiment ab 150 ng DNA-Input (S07b/2) und bei zwei Experimenten (SRY/1 und SRY/2) schon ab 100 ng DNA-Input möglich.

Ähnliche Unterschiede zwischen den Experimenten zeigten sich auch im 99,90 %-Donorchimärismus. Hier trat sowohl bei den Experimenten mit SRY als auch mit S07b bereits bei 100 ng DNA-Input eine Amplifikation auf. Im Experiment mit S02 zeigte sich erst bei 200 ng DNA-Input eine Amplifikation.

Eine Erhöhung des DNA-Inputs kann folglich die Nachweisgrenze der qPCR verbessern. Um eine sichere Amplifikation von 0,01 % Empfänger-Zellen mit geringer Standardabweichung zu erhalten, ist ein Input von mindestens 250 ng DNA pro Well sinnvoll. Allerdings deuten die Ergebnisse darauf hin, dass es allelspezifische Unterschiede gibt (siehe Abb. 12). So reichen zum Nachweis des Allels SRY schon 100 ng DNA aus, um eine Sensitivität von 0,01 % zu erreichen. Bei Amplifikation des Allels S07b sollte der DNA-Input zum Erreichen der gleichen Sensitivität auf mindestens 200 ng DNA erhöht werden, bei Amplifikation des Allels S02 auf 250 ng DNA. Für eine Sensitivität von 0,1 % genügt zum Nachweis der Allele SRY und S07b der Einsatz von 100 ng DNA, zum Nachweis des Allels S02 sind 200 ng DNA nötig. Allerdings ist zu beachten, dass nur ein Experiment mit dem Allel S02 und je zwei mit den Allelen SRY und S07b durchgeführt wurden. Zur Überprüfung der hier gewonnenen Ergebnisse wären zusätzliche Experimente sinnvoll, insbesondere für das Allel S02. Hier traten in den Ansätzen des artifiziel-

⁹ Diese Werte wurden nach Analyse der Ergebnisse willkürlich festgelegt, da unter diesen Bedingungen gerade noch deutliche Amplifikationskurven auftraten. Eine Standardabweichung von 1,5 ist zwar relativ hoch, bei Amplifikation im Bereich der Nachweisgrenze jedoch nicht unüblich.

len 99,99 %-Chimärismus mit 200 ng, 300 ng und 350 ng DNA-Input sehr hohe Standardabweichungen ($SD > 1,5$) der Cq-Werte des spezifischen Allels sowie ein sehr hoher Cq-Wert für HCK auf. Weitere Experimente könnten Aufschluss geben, ob die qPCR des Allels S02 tatsächlich eine schlechtere Sensitivität aufweist oder es sich eventuell um einen Pipettierfehler handelt.

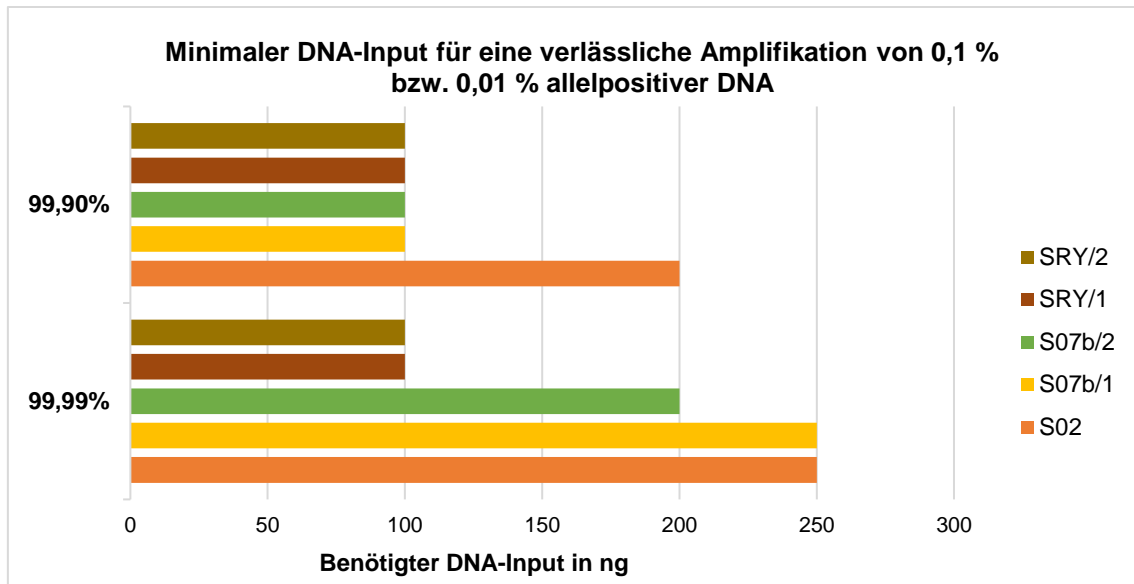


Abb. 12: Notwendiger DNA-Input für eine verlässliche Amplifikation in Abhängigkeit vom getesteten Allel und vom Chimärismusgrad.
Es fällt auf, dass bei Analyse des Allels SRY schon 100 ng DNA für den Nachweis von 0,01 % Empfängerzellen ausreichen, wohingegen bei Analyse von S02 und S07b mehr DNA nötig war. Für das Allel S02 waren selbst für den Nachweis von 0,1 % Empfängerzellen 200 ng DNA nötig.

3.2.2 Effizienz und Inhibition

Zwar verbessert ein erhöhter DNA-Input die Sensitivität der qPCR, allerdings besteht bei zu großen DNA-Mengen die Gefahr einer PCR-Inhibition, welche sich wiederum negativ auf Effizienz und Sensitivität auswirken würde (60, 61). Zum Ausschluss einer solchen Inhibition wurden die ermittelten Cq- und ΔCq -Werte genauer betrachtet.

Wie erwartet war mit steigender DNA-Menge eine Abnahme der Cq-Werte sowohl der spezifischen Allele als auch des Referenzgens HCK zu beobachten. Abb. 13 - Abb. 15 zeigen beispielhaft das Verhalten der Cq-Werte des Experiments SRY/2. Es fällt auf, dass die Cq-Werte des 99,99 %-Chimärismus größeren Schwankungen unterlagen als die des 99,90 %-Chimärismus, was durch die nachlassende Reproduzierbarkeit im Bereich des LOD und die Poisson-Verteilung geringer Kopienzahlen erklärbar ist (43).

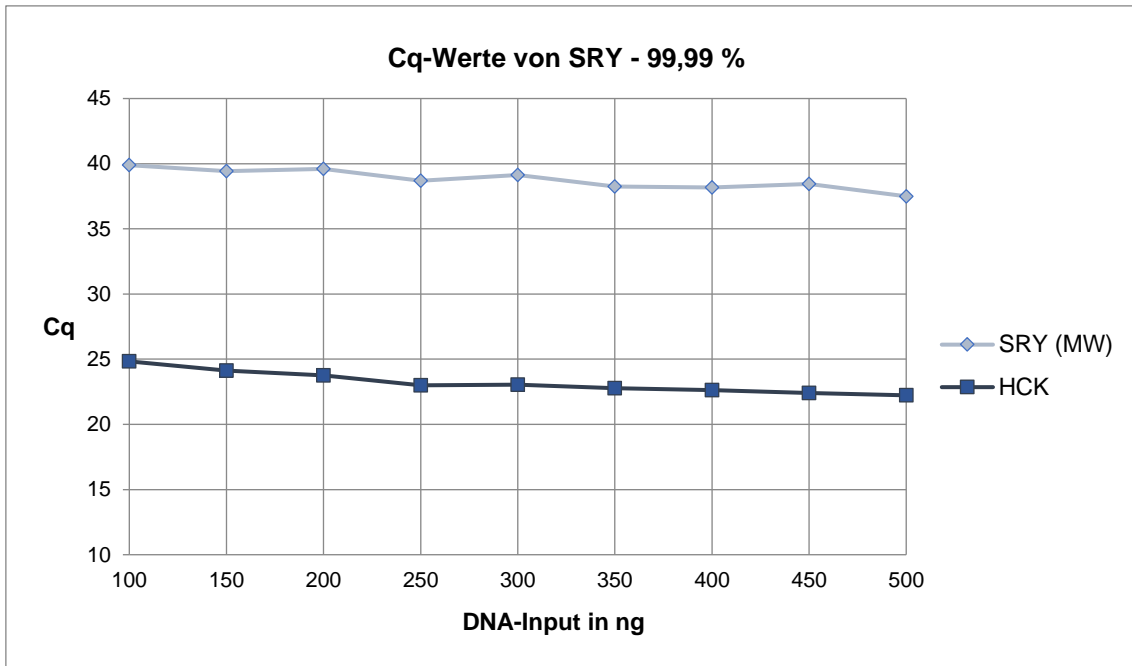


Abb. 13: Cq-Werte von SRY und HCK bei qPCR des artifiziiellen 99,99 %-Chimärismus unter Variation des DNA-Inputs.
 Mit steigendem DNA-Input ist sowohl bei SRY als auch bei HCK eine Verringerung der Cq-Werte zu beobachten. Dabei verringern sich die Cq-Werte beider Genorte etwa im gleichen Maße. Die Werte stammen aus dem Experiment SRY/2. (MW = Mittelwert)

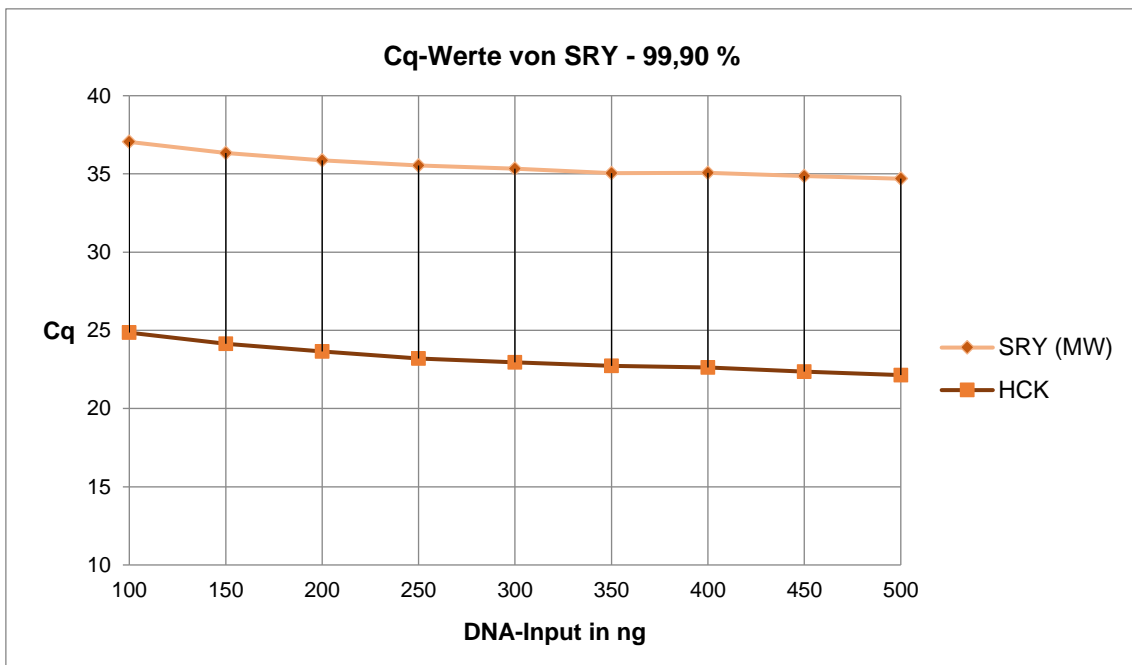


Abb. 14: Cq-Werte von SRY und HCK bei qPCR des artifiziiellen 99,90 %-Chimärismus unter Variation des DNA-Inputs.
 Mit steigendem DNA-Input ist sowohl bei SRY als auch bei HCK eine Verringerung der Cq-Werte zu beobachten. Dabei verringern sich die Cq-Werte beider Genorte etwa im gleichen Maße. Die Werte stammen aus dem Experiment SRY/2. (MW = Mittelwert)

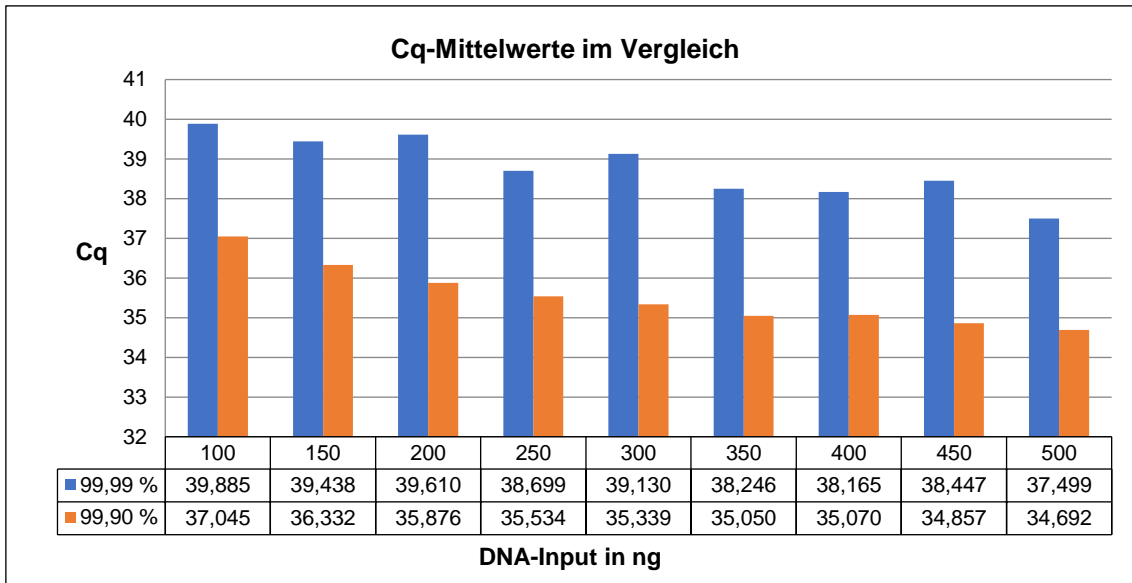


Abb. 15: Cq-Mittelwerte von SRY bei qPCR der artifiziiellen 99,99 %- und 99,90 %-Chimärismen unter Variation des DNA-Inputs. Bei beiden Chimärismen kam es mit steigendem DNA-Input zur Abnahme der Cq-Werte, allerdings wies der 99,99 %-Chimärismus größere Cq-Schwankungen auf. Die Werte stammen aus dem Experiment SRY/2.

ΔCq blieb unabhängig von der eingesetzten DNA-Menge innerhalb eines Chimärismusgrades gleich groß (siehe beispielhaft Abb. 16), was für ein gleichbleibendes Verhältnis der Effizienzen von HCK und dem jeweiligen spezifischen Allel spricht. Dies macht eine Inhibition durch hohe DNA-Mengen unwahrscheinlich, da diese sich wahrscheinlich auf jeden einzelnen Assay unterschiedlich stark auswirken würde (60, 62, 63).

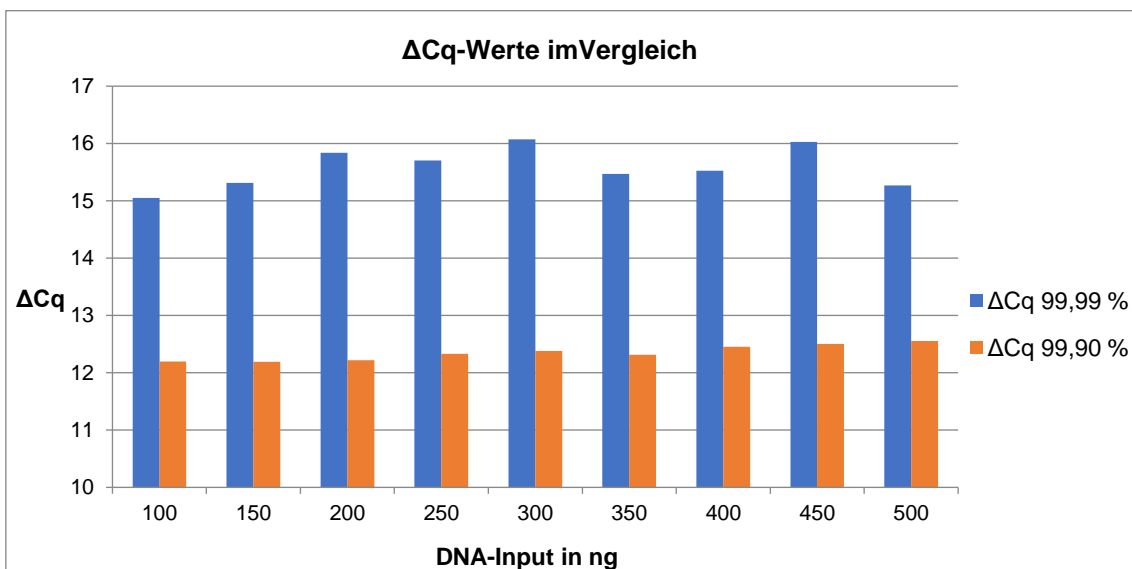


Abb. 16: ΔCq von SRY bei qPCR der artifiziiellen 99,99 %- und 99,90 %-Chimärismen unter Variation des DNA-Inputs. Es ist keine klare Tendenz einer Zu- oder Abnahme der Werte zu beobachten. Beim 99,99 %-Chimärismus schwankten die ΔCq -Werte stärker als beim 99,90 %-Chimärismus. Die Werte stammen aus dem Experiment SRY/2.

Es fiel jedoch auf, dass ΔCq sich zwischen den einzelnen Experimenten unterschied, auch zwischen zwei Experimenten des gleichen Allels (siehe Tabelle 23). Es kann hier also nicht wie in puncto Sensitivität auf allelspezifische Unterschiede geschlossen werden. Die Tatsache, dass auch der Cq-Wert von HCK zwischen den einzelnen Experimenten variierte, aber innerhalb eines Experiments bei gleichem DNA-Input sowohl beim 99,99 %- als auch beim 99,90 %-Chimärismus gleich war, lässt eher auf Fehler bei der Vermessung der DNA-Konzentration oder beim Vorbereiten der Ansätze schließen.

Tabelle 23: ΔCq -Mittelwerte und Standardabweichungen der Triplikate pro Experiment und Chimärismusgrad.

Werte berechnet pro Experiment, gemittelt über alle Varianten des DNA-Inputs. Die geringen Standardabweichungen (außer bei S02, 99,99 %) zeigen, dass ΔCq über alle DNA-Mengen kaum variierte, was für ein gleichbleibendes Verhältnis der Effizienzen von HCK und jeweiligem spezifischem Allel spricht. Die Mittelwerte unterscheiden sich jedoch zwischen den einzelnen Experimenten, auch zwischen zweien des gleichen Allels.

Experiment	99,99 %		99,90 %	
	Mittelwert	Standardabweichung	Mittelwert	Standardabweichung
S07b/1	12,22	0,65	9,14	0,24
S07b/2	13,92	0,56	10,40	0,20
SR Y/1	12,14	0,37	8,77	0,27
SR Y/2	15,59	0,35	12,35	0,13
S02	15,53	1,52	11,62	0,27

Unter der Annahme einer exponentiellen Vermehrung und einer Effizienz von 1 war zu erwarten, dass der Cq-Wert mit Verdoppelung der eingesetzten DNA-Menge um einen Zyklus abnimmt. Dies wurde anhand der Cq-Differenz zwischen den Ansätzen mit 200 ng und 400 ng DNA-Input überprüft, da diese beiden Ansätze in fast allen Experimenten zur Amplifikation führten (Ausnahme: HCK in Experiment S07b/1, 99,99 %). Diese Differenz ($\Delta_{200-400}$) wurde gemäß Formel 8 pro Experiment und Chimärismusstufe separat berechnet, und zwar jeweils für das spezifische Allel und für HCK.

Die Werte zeigten eine recht große Variation (siehe Tabelle 24) und ließen keine Aussage über allelspezifische Unterschiede zu. Der Mittelwert über alle Experimente betrug bei HCK 0,99 (SD 0,23) und bei den spezifischen Allelen 1,00 (SD 0,36), was für eine gute Effizienz und somit gegen eine Inhibition spricht. Andernfalls wäre eine geringere Cq-Differenz zu erwarten, da sich eine Inhibition durch zu hohe DNA-Mengen in Ansätzen mit 400 ng DNA-Input aufgrund der größeren DNA-Menge stärker manifestieren

würde als in Ansätzen mit 200 ng DNA-Input und somit auch die Ansätze mit 400 ng DNA-Input einen stärkeren Cq-Shift hin zu späteren Zyklen erfahren würden als die Ansätze mit 200 ng DNA-Input.

Tabelle 24: Differenz der Cq-Werte zwischen den Ansätzen mit 200 ng und 400 ng DNA-Input ($\Delta_{200-400}$). Die Werte wurden gemäß Formel 8 berechnet. Bei exponentieller Vermehrung und einer Effizienz von 1 ist eine Differenz von 1 zu erwarten. (Sp.A. = Spezifisches Allel; x = keine Amplifikation (bei HCK mit 200 ng DNA-Input))

Experiment	$\Delta_{200-400}$			
	99,99 %		99,90 %	
	Sp. A.	HCK	Sp.A.	HCK
S07b/1	0,83	x	1,14	1,09
S07b/2	0,79	1,15	1,41	1,08
SRV/1	0,96	0,89	0,36	0,40
SRV/2	1,45	1,13	0,81	1,04
S02	0,81	0,98	1,49	1,10
Mittelwert	0,97	1,04	1,04	0,94
Standardabweichung	0,28	0,12	0,46	0,30

Eine qPCR-Effizienz von 1 (und somit die Abwesenheit von PCR-Inhibition) vorausgesetzt, ist überdies zu erwarten, dass bei gleichem DNA-Input die Differenz der allelspezifischen Cq-Werte zwischen den beiden Chimärismusstufen 99,99 % und 99,90 % circa 3,3 beträgt. Dies basiert auf der Tatsache, dass sich die Menge allelpositiver DNA in den beiden Chimärismusstufen um eine 10er-Potenz unterscheidet, was ca. 3,3 Verdoppelungen bzw. PCR-Zyklen entspricht. Bei Vorliegen von PCR-Inhibition durch zu hohe DNA-Mengen würde es hingegen zu einer Abnahme der qPCR-Effizienz und somit zu einem Anstieg der Cq-Differenz zwischen zwei Log-Stufen auf Werte > 3,3 kommen. Das gleiche gilt für die Differenzen der Δ Cq-Werte zwischen den beiden Chimärismusstufen bei gleichem DNA-Input; der Cq-Wert von HCK sollte vom Chimärismusgrad unbeeinflusst bleiben, da die detektierbare Menge HCK nur von der Gesamt-DNA-Menge abhängt, sodass Δ Cq hauptsächlich von den allelspezifischen Cq-Werten beeinflusst wird. Die beschriebenen Cq- bzw. Δ Cq-Differenzen wurden gemäß Formel 9 für jedes

Experiment jeweils für 250 ng¹⁰ und 500 ng DNA-Input berechnet sowie über alle DNA-Input-Variationen gemittelt. Betrachtet man alle Experimente und alle DNA-Input-Variationen¹¹ (siehe Abb. 17 und Abb. 18), lag die durchschnittliche Differenz der allelspezifischen Cq-Werte zwischen den beiden Verdünnungsstufen bei 3,48 (SD 0,21), die von ΔCq bei 3,32 (SD 0,24). Betrachtet man die gleichen Werte isoliert bei den Ansätzen mit 500 ng DNA-Input, so betrug ersterer 3,4 (SD 0,38), letzterer 3,23 (SD 0,37). Bei den Ansätzen mit 250 ng DNA-Input lagen die Werte bei 3,33 (SD 0,78) respektive 3,22 (SD 0,81). Die Werte der Ansätze mit 500 ng DNA-Input unterscheiden sich also nur geringfügig sowohl von den Werten der Ansätze mit 250 ng DNA-Input als auch von den über alle DNA-Input-Variationen gemittelten Werten. Der Abstand zur idealen Differenz von 3,3 ist zudem so klein, dass nicht von einer relevanten Inhibition ausgegangen werden kann.

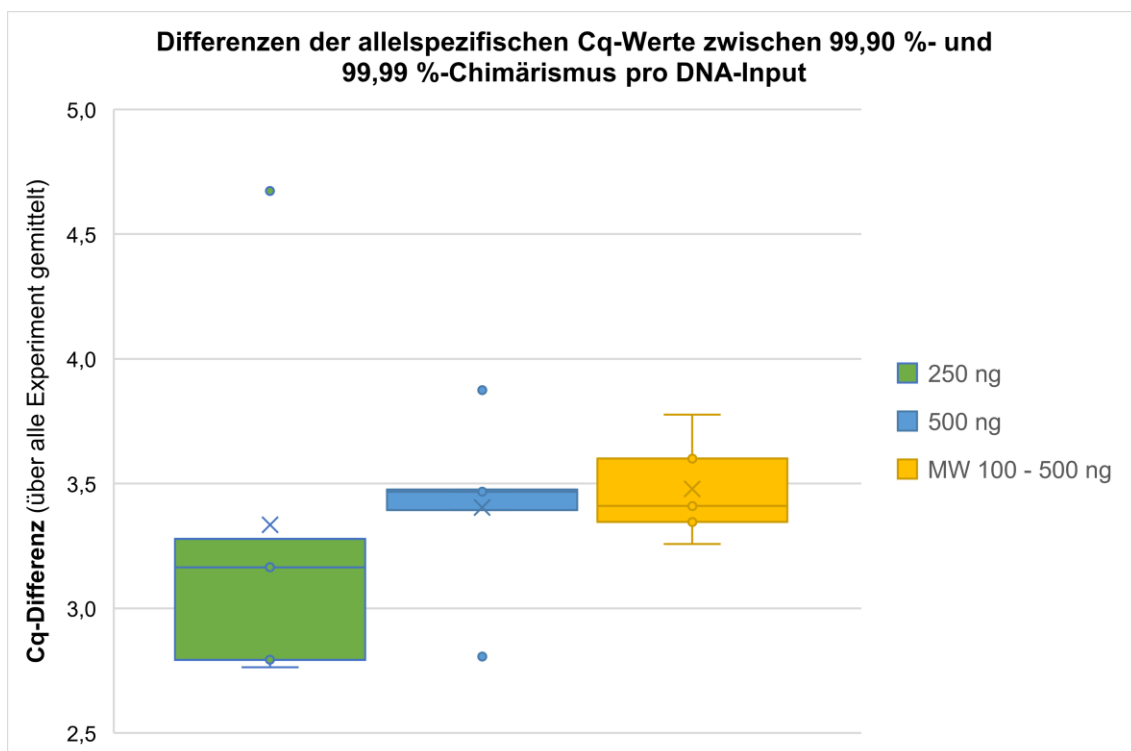


Abb. 17: Differenz der allelspezifischen Cq-Werte zwischen den beiden Chimärismusgraden (99,90 % und 99,99 %).

Es handelt sich um die pro DNA-Input über alle Experimente gemittelten Werte. Zur Berechnung wurden jeweils die Cq-Mittelwerte der Triplikate herangezogen. Es fällt auf, dass die Werte bei 500 ng DNA-Input weniger gestreut sind, was für eine bessere Reproduzierbarkeit spricht. Sowohl bei 500 ng DNA-Input als auch bei 250 ng DNA-Input ist der Abstand zur optimalen, bei einer Effizienz von 1 zu erwartenden Differenz von 3,3 so gering, dass man nicht von einer relevanten Inhibition ausgehen kann. (MW = Mittelwert)

¹⁰Als Vergleich zu den Ansätzen mit 500 ng DNA-Input wurden die Ansätze mit 250 ng DNA-Input gewählt, da hier in allen Experimenten eine verlässliche Amplifikation auch von 0,01 % allelpositiver DNA auftrat.

¹¹Triplikate, in denen eine Standardabweichung der Cq-Werte über 1,5 auftrat, wurden ausgeschlossen.

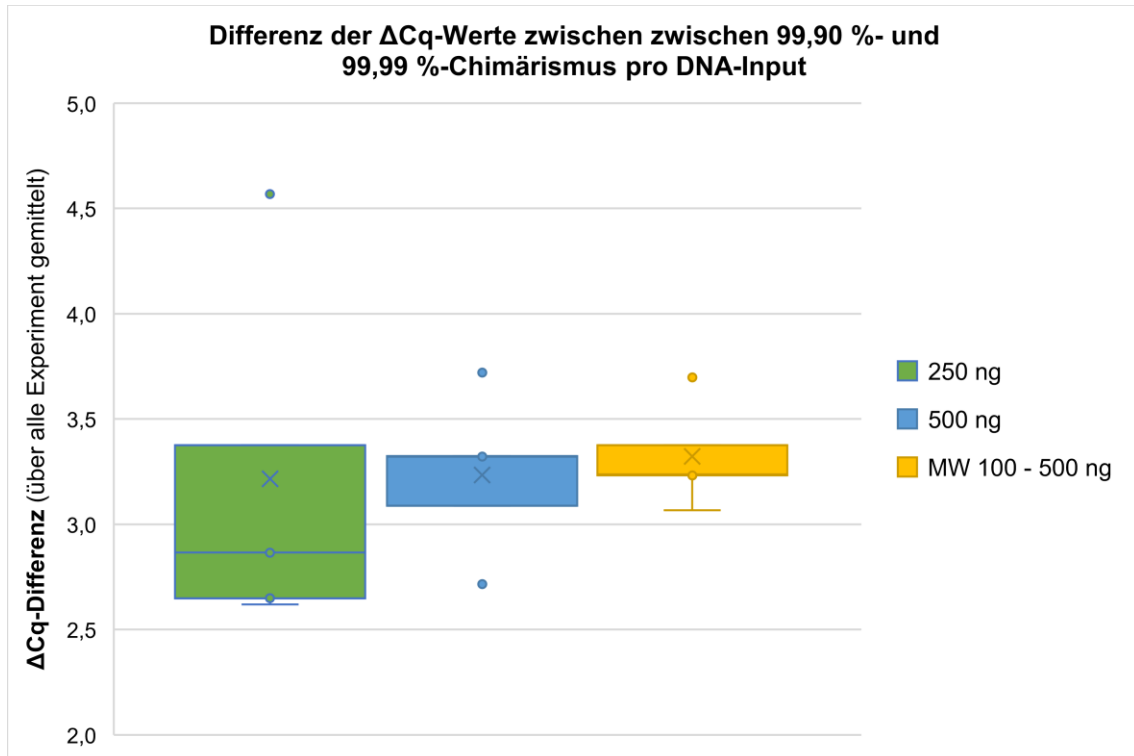


Abb. 18: Differenz der ΔCq -Werte zwischen den beiden Chimärismusgraden (99,90 % und 99,99 %). Es handelt sich um die pro DNA-Input über alle Experimente gemittelten Werte. Zur Berechnung wurden jeweils die Cq -Mittelwerte der Triplikate herangezogen. Es fällt auf, dass die Werte bei 500 ng DNA-Input weniger gestreut sind, was für eine bessere Reproduzierbarkeit spricht. Sowohl bei 500 ng DNA-Input als auch bei 250 ng DNA-Input ist der Abstand zur optimalen, bei einer Effizienz von 1 zu erwartenden Differenz von 3,3 so gering, dass man nicht von einer relevanten Inhibition ausgehen kann. (MW = Mittelwert)

Ein weiteres Zeichen einer PCR-Inhibition bzw. einer Abnahme der Effizienz wäre eine Abflachung der Amplifikationskurve in der exponentiellen Phase der qPCR (63). In keinem der fünf Experimente war eine Abflachung der Kurven der Ansätze mit 500 ng DNA-Input im Vergleich zu den Kurven der Ansätze mit weniger DNA-Input zu beobachten (siehe beispielhaft Abb. 19). Es tritt folglich bei keinem der fünf Experimente eine Inhibition durch zu hohe DNA-Mengen auf.

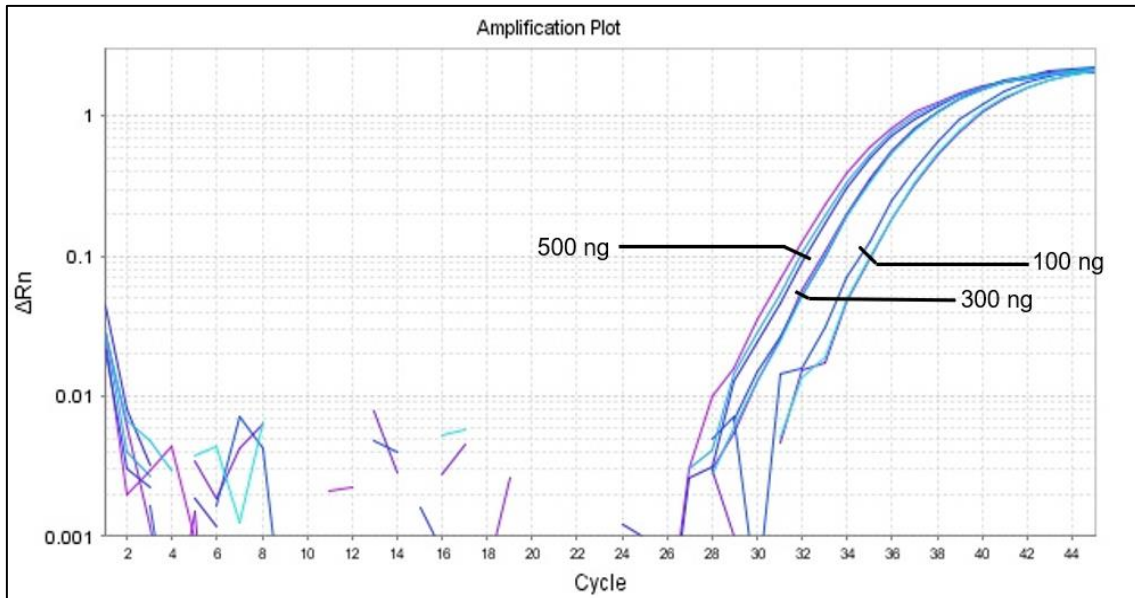


Abb. 19: Ausschnitt aus der Amplifikationskurve von S07b/2, 99,90 %.
 Es sind die Kurven von drei Triplikaten mit verschiedenem DNA-Input (100 ng, 300 ng, 500 ng) zu sehen. Die Kurven mit 500 ng DNA-Input zeigen in der exponentiellen Phase im Vergleich zu den anderen Kurven keine Abflachung.

Zuletzt wurde überprüft, ob höhere DNA-Mengen zu höheren Hintergrundsignalen führen, die sich mit den allelspezifischen Signalen überschneiden könnten. Dazu wurden die Basislinien der DNA-Input-Variationen miteinander verglichen. Zwar zeigte sich bei 500 ng DNA-Input teilweise eine höhere Basislinie als bei geringerem DNA-Input, diese war jedoch nie so hoch, dass sie das Signal der allelspezifischen Amplifikation übertönte (siehe beispielhaft Abb. 20).

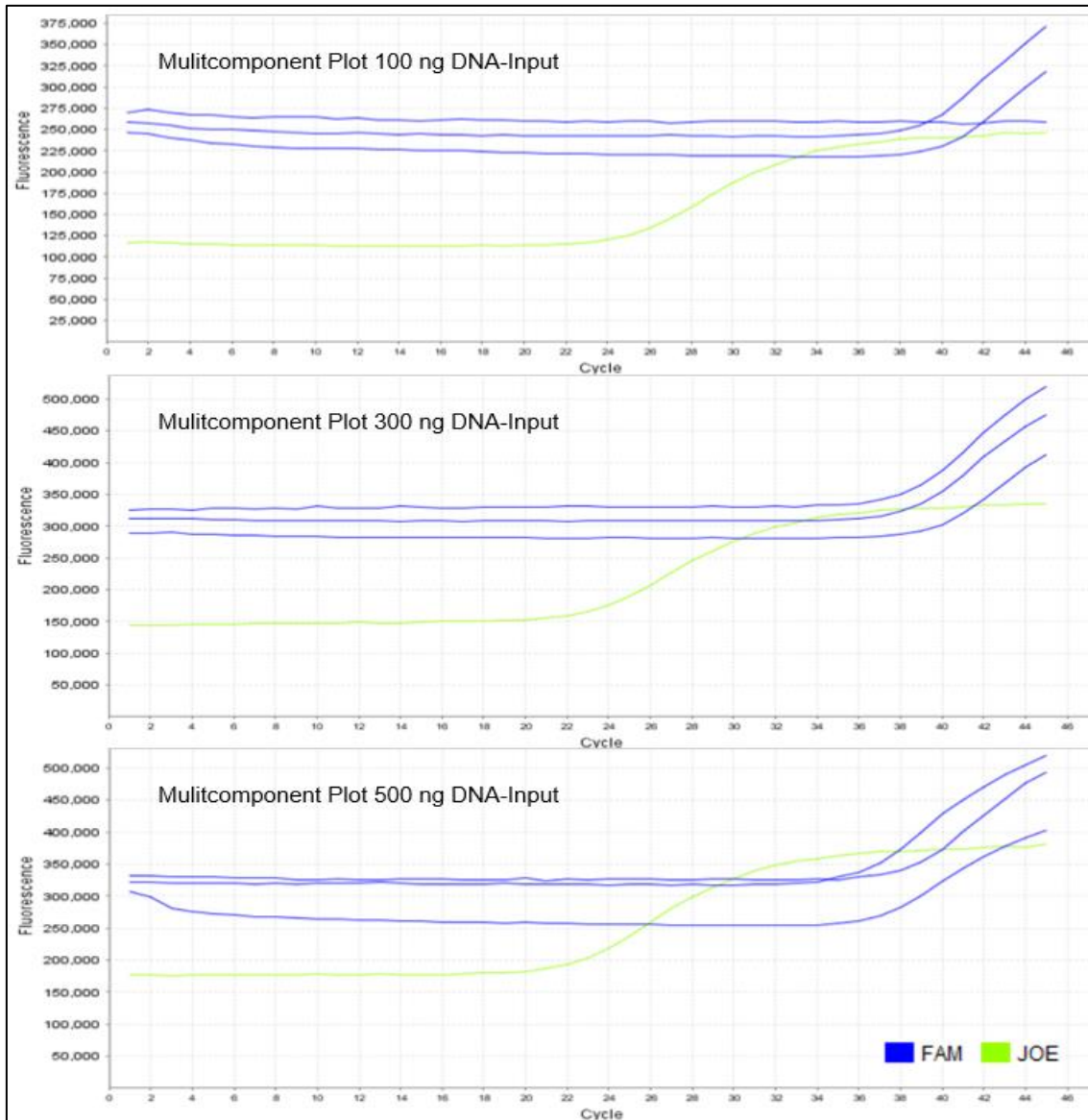


Abb. 20: Multicomponent-Plots des Experiments SRY/2, 99,99 %.

Gezeigt sind beispielhaft die Signale aus den Ansätzen mit 100 ng, 300 ng und 500 ng DNA-Input. Dabei handelt es sich bei den Kurven des Reporter-Fluorophors „FAM“ (blau) um die spezifischen Signale des Allels SRY, bei denen des Reporter-Fluorophors „Joe“ (grün) um die Signale der lokusspezifischen Referenz. Da pro DNA-Input-Variation drei Ansätze auf SRY, und (wegen DNA-Mangels) nur einer auf HCK getestet wurde, sind jeweils drei Kurven von „Fam“, aber nur eine von „Joe“ zu erkennen.

Der flache Verlauf von „Joe“ und „Fam“ zu Beginn bildet die Basislinie, also die Hintergrundsignale der qPCR. Zwar steigt die Basislinie mit zunehmendem DNA-Input leicht an, dennoch ist sowohl für SRY als auch für die lokusspezifische Referenz der Beginn der exponentiellen Phase deutlich auszumachen; Die spezifischen Signale werden also nicht von Hintergrundsignalen übertönt.

3.2.3 DNA-Input und Präzision der Chimärismusberechnung

Mithilfe der im Labor für das jeweils spezifische Allel und den aktuellen Mastermix bereits erstellten Formeln (siehe Formel 7 und Formel 10) wurden aus den gemessenen C_q-Werten die entsprechenden Chimärismusberechnungswerte berechnet und mit den wahren Werten

der artifiziell hergestellten Chimärismen verglichen (siehe 2.3.7). Dabei wurde aus Ansätzen, bei denen die Cq-Werte der Triplikate eine Standardabweichung über 1,5 aufwiesen, kein Chimärismus berechnet, da es sich in diesen Ansätzen nicht um verlässliche Amplifikation handelt.¹²

Beim künstlich hergestellten 99,99 %-Donorchimärismus wurden aus den Daten der Experimente insgesamt 34 Werte berechnet (siehe Abb. 21). Alle Werte wurden, wie in der Routinediagnostik üblich, auf zwei Nachkommastellen gerundet. Die 34 Werte lagen alle über 99,97 %. 22/34 Werten ergaben einen 100 %-Donorchimärismus. 12/34 Werten lagen zwischen 99,97 % und 99,99 %, sieben davon stammten aus dem Experiment SRY/1, fünf aus dem Experiment S07b/1. In anderen Worten ergaben die Experimente S02, SRY/2 und S07b/2 ausschließlich einen CC, wohingegen die Experimente SRY/1 und S07b/1 (bis auf einen Wert in S07b/1) einen 99,9 %-Donorchimärismus ergaben.

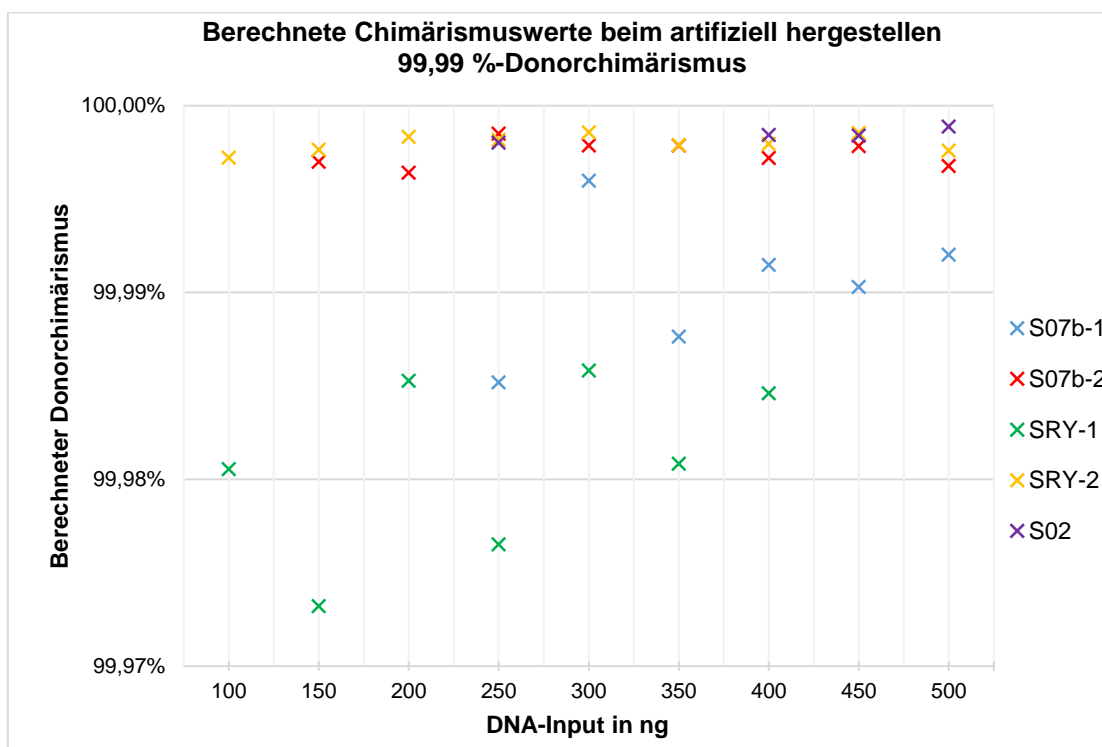


Abb. 21: Aus Cq-Werten berechnete Chimärismuswerte des artifiziell hergestellten 99,99 %-Donorchimärismus in Abhängigkeit vom DNA-Input und vom getesteten Allel.

Es ließ sich kein Zusammenhang zwischen DNA-Input und berechnetem Wert feststellen. Beim Experiment SRY/1 waren wegen DNA-Mangels keine Ansätze (und somit keine Werte) mit 450 ng und 500 ng-DNA-Input vorhanden, bei den anderen fehlenden Werten wurden keine verwertbaren Cq-Werte generiert.

¹²Dies waren die Ansätze mit 200 ng, 300 ng und 350 ng DNA-Input aus dem Experiment S02 und die Ansätze mit 100 ng DNA-Input aus dem Experiment S07b/2.

Beim künstlich hergestellten 99,90 %-Donorchimärismus konnten insgesamt 41 Werte berechnet werden (siehe Abb. 22). Die errechneten Donorchimärismus-Werte waren alle kleiner als die des entsprechenden Ansatzes des 99,99 %-Donorchimärismus (siehe beispielhaft Abb. 23). 7/41 Werten lagen unter 99,90 % – alle stammten aus dem Experiment SRY/1, welches auch beim artifiziellen 99,99 %-Donorchimärismus die kleinsten Werte erbrachte. Nur 9/41 Werten lagen zwischen 99,90 % und 99,95 % – alle stammten aus dem Experiment S07b/1. Die Werte aus den Experimenten S02, SRY/2 und S07b/2 lagen alle über 99,95 %. Somit lagen 61 % (25/41) der Werte näher an 99,99 % als an 99,90 %; Auch hier wurde demnach der Empfängerzellanteil unterschätzt, sodass der 99,90 %-Chimärismus nicht deutlich von einem 99,99 %-Chimärismus differenziert werden konnte.

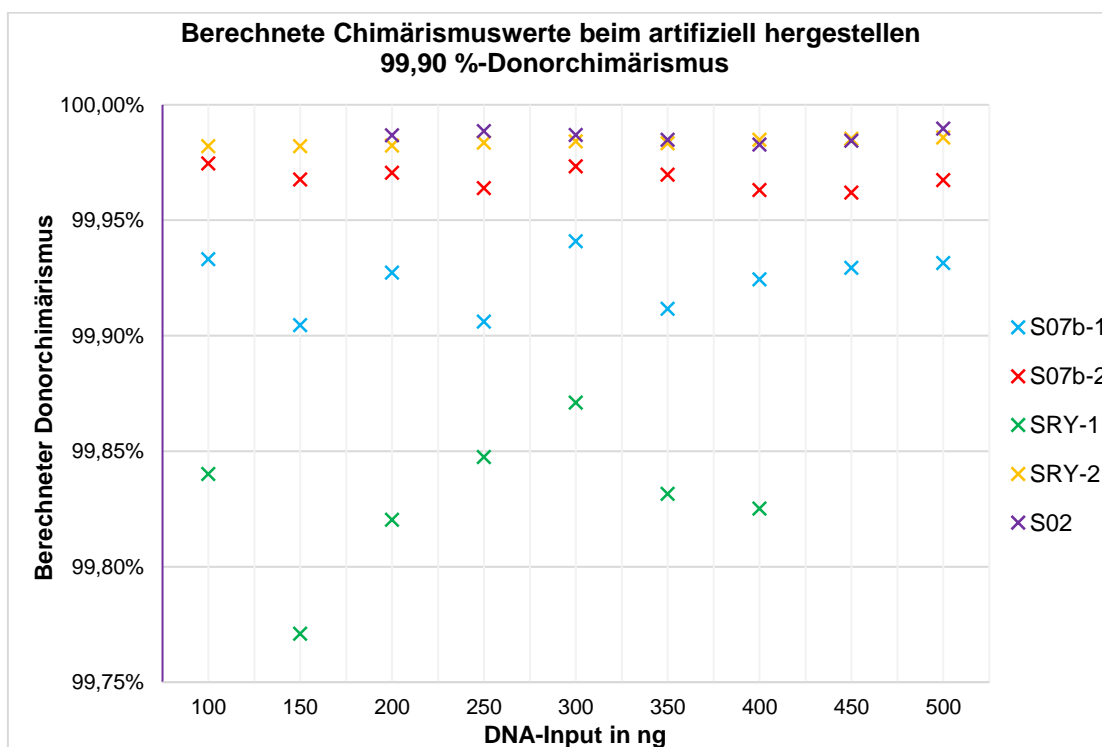


Abb. 22: Aus Cq-Werten berechnete Chimärismuswerte des artifiziell hergestellten 99,90 %-Donorchimärismus in Abhängigkeit vom DNA-Input und vom getesteten Allel. Es ließ sich kein Zusammenhang zwischen DNA-Input und berechnetem Wert feststellen. Vielmehr unterschieden sich die Ergebnisse zwischen den einzelnen Standardreihen, auch zwischen zwei Reihen desselben Allels. Beim Experiment SRY/1 waren wegen DNA-Mangels keine Ansätze (und somit keine Werte) mit 450 ng und 500 ng-DNA-Input vorhanden, bei den anderen fehlenden Werten wurden keine verwertbaren Cq-Werte generiert.

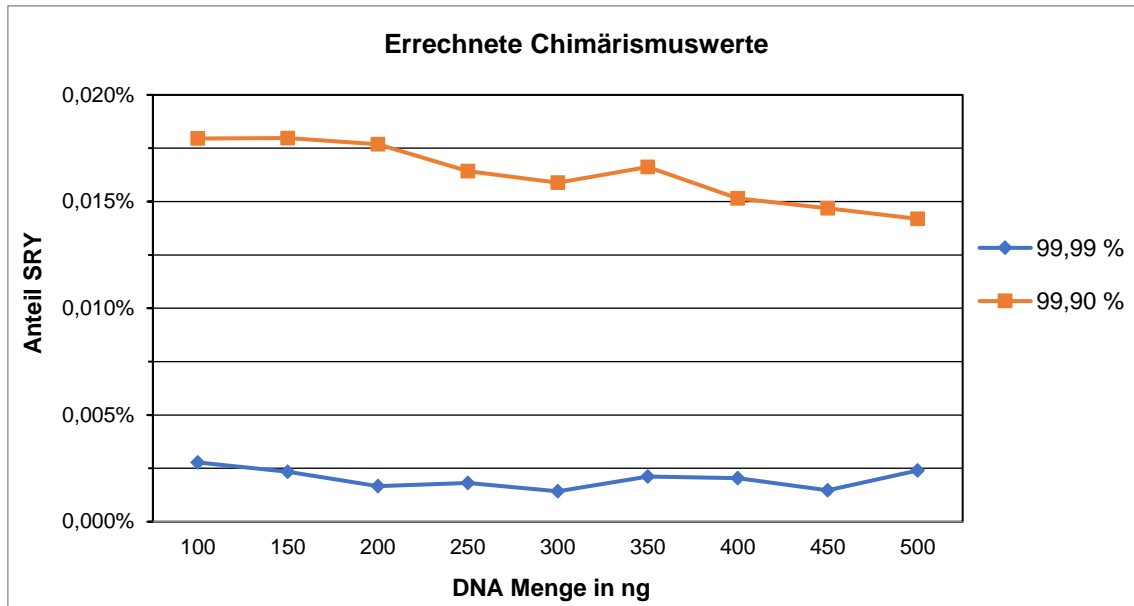


Abb. 23: Aus Cq-Werten errechnete Chimärismuswerte des Allels SRY in Abhängigkeit vom DNA-Input. Die Werte wurden aus den Cq-Werten von SRY und HCK berechnet (Experiment SRY/2). Es fällt auf, dass die errechneten Werte bei beiden Chimärismen kleiner sind als die eigentlichen Werte (0,01 % bzw. 0,1 %). Die Werte der verschiedenen Chimärismen sind jedoch gut differenzierbar. Es zeigt sich keine Abhängigkeit des Chimärismuswertes vom DNA-Input.

Die in insgesamt 62,7 % der Experimente auftretende Unterschätzung des Empfängerzellanteils könnte auf Ungenauigkeiten bei der Herstellung der artifiziellen Chimärismen beruhen oder aber Ausdruck der Sensitivitätsgrenze des Assays sein. Da die klinische Relevanz eines solchen Sensitivitätsdefizits insbesondere im Bereich eines 99,99 %-Donorchimärismus fraglich ist (siehe 4.2.4) und sich zudem keine Abhängigkeit der errechneten Werte vom DNA-Input zeigte (siehe nächster Absatz), soll auf die Ursache dieses Sensitivitätsdefizits an dieser Stelle nicht weiter eingegangen werden.

Pro Experiment und artifiziellem Chimärismus wurden Mittelwert und Standardabweichung aus den jeweiligen errechneten Chimärismuswerten¹³ (über alle Variationen des DNA-Inputs) ermittelt, um eine eventuelle Variation des errechneten Wertes in Abhängigkeit vom DNA-Input zu verdeutlichen (siehe Tabelle 25). Beim artifiziellen 99,99 %-Chimärismus war die Standardabweichung des Mittelwerts bei allen Experimenten sehr gering ($\leq 0,005$ %). Beim artifiziellen 99,90 %-Chimärismus trat nur im Experiment SRY/1 mit 0,031 % eine relativ hohe Standardabweichung auf. Die Standardabweichung war umso höher, je höher der errechnete Empfängerzellanteil war, was in der Natur der qPCR liegt. Die geringen Standardabweichungen verdeutlichen die Beobachtung, dass

¹³Aus Ansätzen, in denen die Cq-Werte der Triplikate eine Standardabweichung über 1,5 aufwiesen, wurde kein Chimärismus berechnet (Ansätze mit 200 ng, 300 ng und 350 ng DNA-Input des Experiments S02 und Ansätze mit 100 ng DNA-Input des Experiments S07b/2).

der berechnete Chimärismus bei Vorliegen verlässlicher Cq-Werte unabhängig vom DNA-Input ist.

Tabelle 25: Mittelwerte und Standardabweichungen der errechneten Chimärismuswerte pro Experiment. Ansätze, in denen die Cq-Werte der Triplikate eine Standardabweichung über 1,5 aufwiesen, wurden ausgeschlossen. (MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung)

Artifizieller Chimärismus		S07b/1	S07b/2	SRY/1	SRY/2	S02
99,99 %	MW	99,99 %	100,00 %	99,98 %	100,00 %	100,00 %
	SD	0,004 %	0,001 %	0,005 %	0,00 %	0,00 %
99,90 %	MW	99,92 %	99,97 %	99,83 %	99,98 %	99,99 %
	SD	0,013 %	0,004 %	0,031 %	0,001 %	0,002 %

Zusammengefasst ließ sich bei Vorliegen verlässlicher Cq-Werte kein Zusammenhang zwischen den errechneten Chimärismuswerten und der eingesetzten DNA-Menge feststellen. Vielmehr unterschieden sich die errechneten Chimärismuswerte zwischen den einzelnen Experimenten, auch zwischen zwei Experimenten desselben Allels, was vor allem bei den artifiziellen 99,90 %-Chimärismen zu beobachten war. Dies könnte auf Ungenauigkeiten bei der Leukozytenisolation und Herstellung der Standardreihen zurückzuführen sein. Eine Abhängigkeit vom verwendeten Allel konnte hier nicht beobachtet werden, ist aber weiter zu untersuchen. Die errechneten Werte legen nahe, dass trotz einer Nachweisgrenze der qPCR von 0,01 % allelpositiver DNA bei der anschließenden Berechnung des Chimärismusgrades mithilfe der in unserem Labor etablierten Formeln für die Allele S02, S07b und SRY keine Sensitivität von 0,01 % erreicht werden kann. Ob dies ebenso für andere zur Chimärismusdiagnostik genutzten Allele gilt, kann ohne weitere Experimente nicht beantwortet werden und war nicht Teil dieser Arbeit.

3.3 Experimente mit dem „Single Nucleotide Polymorphism“ rs713753

3.3.1 Frequenz und Informativität der Allele

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 40 Personen mit den für den SNP rs713753 spezifischen Primern typisiert. Darunter waren zwölf gesunde Probanden/Probandinnen und 14 Spender-Empfänger-Paare. 17/40 (42,5 %) Personen waren heterozygot, 5/40 (12,5 %) waren homozygot für das Allel C und 18/40 (45 %) waren homozygot für das Allel T (siehe Abb. 24). Daraus resultierte eine Allelfrequenz von 0,338 für das Allel C und 0,663 für das Allel T. Somit lagen die Allelfrequenzen des SNP rs713753 in der hier getesteten Stichprobe leicht außerhalb des optimalen Bereiches zur genotypischen Differenzierung eines Spender-Empfänger-Paares, welcher bei Allelfrequenzen von 0,4-0,6 liegt (33).

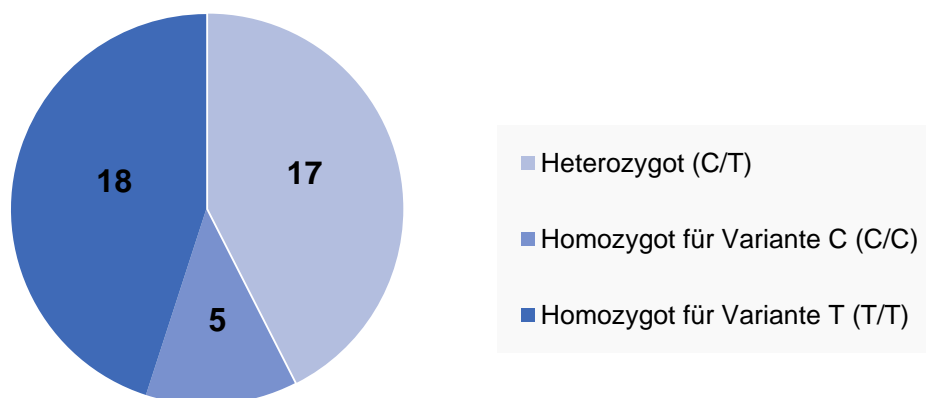


Abb. 24: Genotypenverteilung des SNP rs713753.

Die Informativität des SNP rs713753 für die Diskriminierung von Spender-Empfänger-Paaren wurde anhand der Ergebnisse der Typisierung der Spender-Empfänger-Paare ermittelt (siehe Abb. 25). Ein SNP gilt als informativ für den Empfänger-genotyp, wenn der/die Empfänger/-in positiv und der/die Spender/-in negativ ist, und als informativ für den Spender-genotyp, wenn der/die Empfänger/-in negativ und der/die Spender/-in positiv ist. Dabei kann die positive Person entweder homo- oder heterozygot für das positive Allel sein. Der SNP rs713753 zeigte sich bei 5/14 Paaren (35,7 %) informativ für den Empfänger-genotyp, und zwar bei zwei Paaren (14,3 %) durch das Allel C und bei drei Paaren (21,4 %) durch das Allel T. Informativität für den Spender-genotyp lag bei 6/14 Paaren (42,9 %) vor; sie war bei vier Paaren (28,6 %) durch das Allel C und bei zwei Paaren durch das Allel T (14,3 %) gegeben. Die Differenzierung sowohl von Spender- als auch von Empfänger-genotyp durch den SNP rs713753 war bei 2/14 Paaren

(14,3 %) möglich, die Differenzierung von mindestens einem von beiden bei 8/14 Paaren (64,3 %). Die Einzelinformativität der beiden getesteten Allele, definiert als der Anteil an Paaren, in dem eine Differenzierung zwischen Spender/-in und Empfänger/-in durch das jeweilige Allel möglich ist, betrug 35,7 % für das Allel T und 42,9 % für das Allel C. Die geringere Einzelinformativität des Allels T ist dadurch begründet, dass nur 12,5 % der Personen homozygot auf das Allel C und somit 87,5 % positiv auf das Allel T waren.

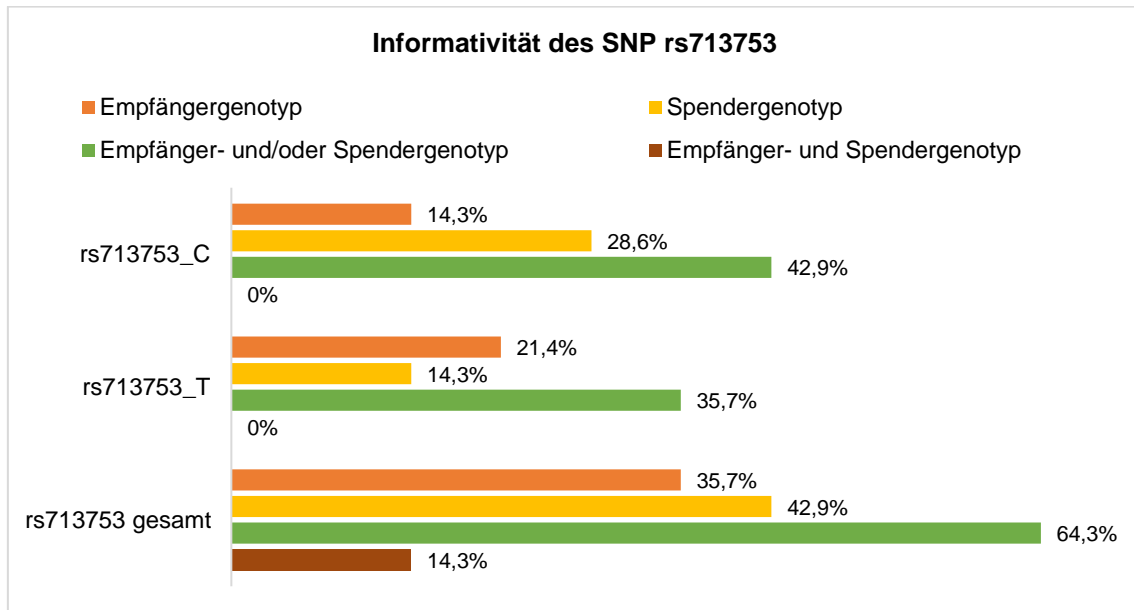


Abb. 25: Informativität des SNP rs713753.

„Empfänger- und/oder Spendergenotyp“ bedeutet, dass eine Informativität für mindestens einen von beiden vorlag. Wichtig für die Chimärismusdiagnostik ist vor allem die Diskriminierung des Empfängergenotyps.

Wichtig für die klinische Praxis zur Chimärismusdiagnostik ist vor allem die Empfänger-diskriminierung, welche bei über einem Drittel (35,7 %) der getesteten Spender-Empfänger-Paare durch den SNP rs713753 möglich war. Somit scheint er in puncto Informativität gut geeignet zur Ergänzung eines bestehenden Genpanels.

3.3.2 Ergebnisse der Standardverdünnung in Wasser – Bewertung der Effizienz

Zur Bewertung der Effizienz wurden, wie in 2.3.8.2 beschrieben, Verdünnungsreihen allelpositiver DNA in Wasser in den Verdünnungsstufen 1:1 bis 1:100.000 angelegt. Dabei waren in der Stufe 1:1 100 ng allelpositiver DNA enthalten, was ca. 30.000 Allelkopien bei DNA einer homozygoten Person und ca. 15.000 Allelkopien bei DNA einer heterozygoten Person entspricht. Die Auswertung erfolgte wie in 2.3.8.3 ausgeführt. Es ist vorwegzunehmen, dass zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit aller erstellten

Standardkurven in dieser Arbeit lediglich Standardkurven aus nur drei Verdünnungsstufen (1:100 bis 1:1) beschrieben werden, da für das Allel T ab Stufe 1:1.000 keine lineare Korrelation mehr vorlag, bzw. keine Amplifikation mehr stattfand. Für das Allel C und die lokusspezifische Referenz wurden jedoch auch Standardkurven aus vier Verdünnungsstufen erstellt; diese generierten ähnliche Werte für Steigung, R^2 und Y-Achsenabschnitt wie die Kurven aus nur drei Stufen (siehe Appendix V). Abb. 26 zeigt beispielhaft den Amplifikationsplot einer Standardreihe aus sechs Verdünnungsstufen für das Allel C inklusive lokusspezifischer Referenz.

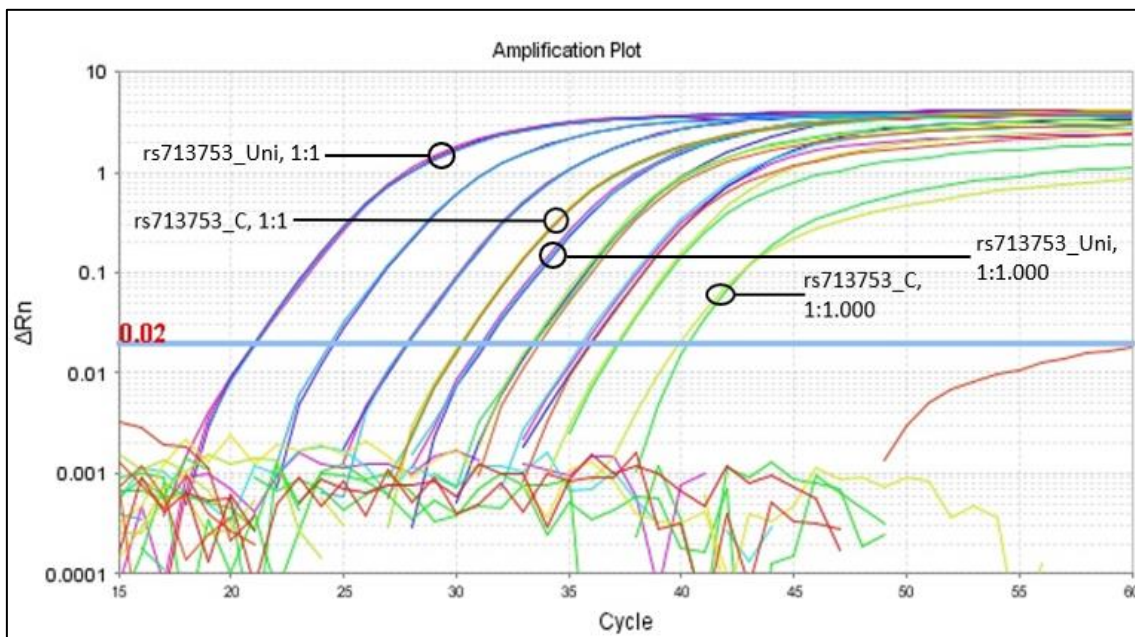


Abb. 26: Amplifikationsplot einer Standardreihe in Wasser für das Allel rs713753_C. Man erkennt deutlich, dass die Kurven verschiedener Verdünnungsstufen jeweils um ein paar Zyklen auf der X-Achse versetzt zueinander liegen, wobei Kurven höherer Verdünnungsstufen in späteren Zyklen auftreten. Zudem fällt auf, dass die Kurven des Allels rs713753_C (Grün-/Rot-/Gelbtöne) im Vergleich zu denen der Referenz rs713753_Uni (Blau-/Violettöne) zu späteren Zyklen hin verschoben sind. Zur besseren Vergleichbarkeit sind beispielhaft die Kurven der Verdünnungsstufen 1:1 und 1:1.000 markiert. In den Ansätzen des Allels rs713753_C trat in den Stufen 1:10.000 und 1:100.000 keine Amplifikation auf, in den Ansätzen der Referenz trat in der Stufe 1:100.000 keine Amplifikation auf.

3.3.2.1 Standardkurven des Allels rs713753_T

Für das Allel rs713753_T konnten homozygote Probanden/Probandinnen gefunden und somit Verdünnungsreihen in Wasser mit homozygoter DNA angelegt werden. In den Verdünnungsstufen 1:100.000 und 1:10.000 trat bei keiner der drei Verdünnungsreihen eine Amplifikation auf. In der Stufe 1:1.000 fand nur in vier von insgesamt neun Ansätzen eine Amplifikation statt, die in sehr hohen und weit gestreuten Cq-Werten zwischen 47,69 und 58,96 (Mittelwert (MW) 54,73; SD 6,14) resultierte. Diese Werte zeigten keine lineare Korrelation und waren zu unpräzise für einen Einschluss in die Standardkurve.

Aus diesem Grund konnten die Standardkurven für das Allel T nur aus den drei schwächsten Verdünnungsstufen zusammengesetzt werden; hier kam es in allen Ansätzen zur Amplifikation: In der Stufe 1:100 schwankten die Cq-Werte zwischen 38,85 und 40,82 (MW 39,89; SD 0,59), in der Stufe 1:10 zwischen 34,82 und 36,64 (MW 35,88; SD 0,56) und in der Stufe 1:1 zwischen 32,30 und 32,92 (MW 32,52; SD 0,24). Die geringen Standardabweichungen sprechen für eine gute Reproduzierbarkeit ab einer Ausgangsmenge von ca. 300 Allelkopien, welche statistisch gesehen in 1 ng homozygoter DNA vorliegt. Die Differenz der Cq-Werte zwischen den drei schwächsten Verdünnungsstufen lag bei durchschnittlich 3,69 Zyklen (SD 0,46); die bei einer optimalen Effizienz von 1 zu erwartende Differenz zwischen 10er-Verdünnungen betrüge 3,3 (41). Abb. 27 zeigt die aus den drei Verdünnungsreihen entstandenen Standardkurven. R^2 lag bei allen drei Kurven $\geq 0,9953$, was eine gute Lage der Werte auf der Standardkurve bedeutet. Die Steigungen schwankten zwischen -1,542 und -1,636 (MW -1,601; SD 0,051) und der Y-Achsenabschnitt lag im Mittel bei 48,907 (SD 0,591) (weitere Daten siehe Appendix V).

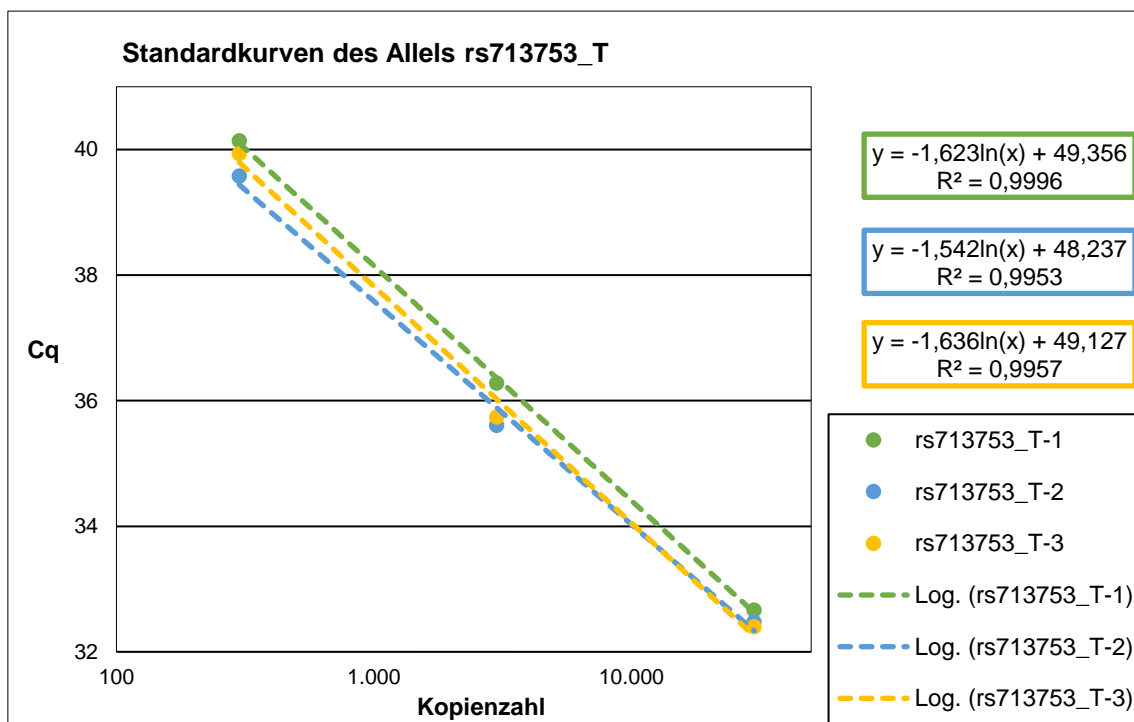


Abb. 27: Standardkurven der drei Verdünnungsreihen in Wasser für das Allel rs713753_T. Alle drei Verdünnungsreihen wurden aus der gleichen DNA-Probe eines homozygoten Individuums erstellt. Die Kurven wurden aus den Cq-Werten von drei Verdünnungsstufen (1:1 bis 1:100) generiert.

Zusätzlich zu den drei einzelnen Standardkurven wurde eine Standardkurve aus den arithmetischen Mitteln der Cq-Werte aller drei Verdünnungsreihen erstellt. Diese wies

ein gutes R^2 von 0,9974 auf. Bei einer Steigung von -3,868 beim dekadischen Logarithmus liegt die Effizienz der qPCR des Allels rs713753_T nur bei 0,868 (siehe Abb. 32). Die optimale Steigung bei 10er-Verdünnungen und einer Effizienz von 1 betrüge -3,3.

3.3.2.2 Standardkurven des Allels rs713753_C

Für das Allel rs713753_C konnte keine homozygote Probandin/kein homozygoter Proband gefunden werden, sodass die Standardreihen mit DNA eines heterozygoten Individuums hergestellt wurden. Dies ändert nichts an Steigung, Effizienz oder dem R^2 , macht sich allerdings bei Auftragen der Cq-Werte gegenüber der Verdünnungsstufe am Y-Achsenabschnitt bemerkbar.

In der Verdünnungsstufe 1:100.000 kam es in keinem der neun Ansätze zur Amplifikation, in der Stufe 1:10.000 in nur einem Ansatz (1/9). Dies ist bei 0,15 bzw. 1,5 Allelkopien pro Ansatz nicht verwunderlich, sondern spricht vielmehr für eine gute Spezifität der Primer, insbesondere des ARMS-Mismatch-Primers. Allerdings zeigt die fehlende Amplifikation in 8/9 Ansätzen der 1:10.000er-Verdünnung, dass der Nachweis einer Allelkopie mit diesem qPCR-Ansatz nicht möglich ist. In der 1:1.000er-Verdünnung mit 15 Allelkopien kam es in 8/9 Ansätzen zur Amplifikation mit Cq-Werten zwischen 38,90 und 42,96 (MW 40,74; SD 1,72). In den Stufen 1:100, 1:10 und 1:1 kam es in allen Ansätzen zur Amplifikation mit nur geringen Schwankungen der Cq-Werte. Diese lagen in der 1:100er-Verdünnung zwischen 35,97 und 37,92 (MW 36,85; SD 0,6), in der 1:10er-Verdünnung zwischen 33,30 und 34,06 (MW 33,59; SD 0,25) und in der 1:1-Verdünnung zwischen 30,21 und 30,47 (MW 30,32; SD 0,07). Die Differenz der Cq-Werte zwischen zwei aufeinanderfolgenden Verdünnungsstufen lag bei durchschnittlich 3,45 Cq-Werten (SD 0,32), was auf eine gute Effizienz hinweist.

Die aus den drei Verdünnungsreihen entstandenen Standardkurven (siehe Abb. 28) lagen sehr nah beieinander. Ihre Steigungen lagen zwischen -1,337 und -1,488 (MW 1,418; SD 0,076), der Y-Achsenabschnitt lag im Mittel bei 43,958 (SD 0,56). Alle drei Kurven wiesen ein gutes $R^2 > 0,995$ auf (weitere Daten siehe Appendix V).

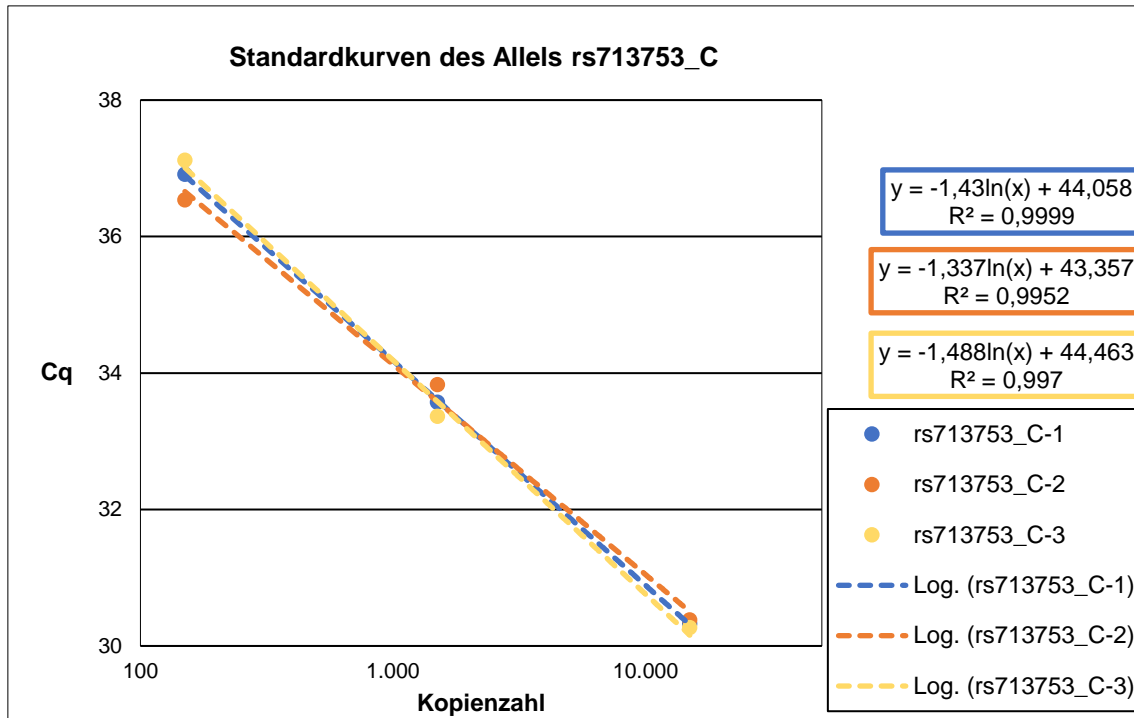


Abb. 28: Standardkurven der drei Verdünnungsreihen in Wasser für das Allel rs713753_C. Alle drei Verdünnungsreihen wurden aus der gleichen DNA-Probe eines heterozygoten Individuums erstellt. Die Kurven wurden aus den Cq-Werten von drei Verdünnungsstufen (1:1 bis 1:100) generiert.

Die Standardkurve, die aus den Cq-Mittelwerten aller drei Verdünnungsreihen erstellt wurde (siehe Abb. 33), wies ein optimales R² von 1 auf sowie eine Steigung von -3,265 bei dekadischem Logarithmus, woraus sich eine sehr gute qPCR-Effizienz von 1,024 ergibt.

3.3.2.3 Standardkurven der lokusspezifischen Referenz von rs713753

In den Ansätzen der lokusspezifischen Referenz der Verdünnungsreihen, die für das Allel T hergestellt wurden, kam es bereits in der 1:100.000er-Verdünnung in 2/9 Ansätzen zur Amplifikation, was zum statistischen Vorkommen von 0,3 Allelkopien pro Ansatz (bzw. einer Allelkopie in jedem dritten Ansatz) passt. Ab der 1:10.000er-Verdünnung mit ca. drei Allelkopien fand in allen Ansätzen eine Amplifikation statt, mit vergleichsweise geringen Cq-Schwankungen innerhalb einer Verdünnungsstufe. Die größten Schwankungen traten in der 1:10.000er-Verdünnung auf, mit Cq-Werten zwischen 34,12 und 39,7 (MW 35,72; SD 1,4). In der 1:1.000er-Verdünnung schwankten die Cq-Werte zwischen 30,99 und 31,68 (MW 31,28; SD 0,26), in der 1:100er-Verdünnung zwischen 27,67 und 27,91 (MW 27,78; SD 0,08), in der 1:10er-Verdünnung zwischen 24,27 und 24,60 (MW 24,42; SD 0,09) und in der 1:1-Verdünnung zwischen 20,64 und 20,97 (MW 20,84; SD 0,09). Die geringen Standardabweichungen sprechen für eine gute

Reproduzierbarkeit der qPCR der lokusspezifischen Referenz bereits bei geringen Ausgangsmengen von nur ca. drei Allelkopien. Die Differenz der Cq-Werte zwischen den einzelnen Verdünnungsstufen lag zwischen 3,36 und 4,09, wobei 4,09 die Cq-Differenz zwischen der 1:10.000er- und der 1:1.000er-Verdünnung war. Die anderen Differenzen lagen zwischen 3,36 und 3,58 (MW 3,48; SD 0,11) und somit ab einem Input von ca. 30 Allelkopien nahe am optimalen Wert von 3,3.

Abb. 29 zeigt die entsprechenden Standardkurven für die lokusspezifische Referenz. Es fällt auf, dass die drei Kurven nahezu identisch sind mit $R^2 \geq 0,9994$. Die Standardabweichung der Steigung betrug bei einem Mittelwert von -1,508 nur 0,001 und auch die Spanne der Y-Achsenabschnitte war sehr gering (MW 36,422; SD 0,25) (weitere Daten siehe Appendix V).

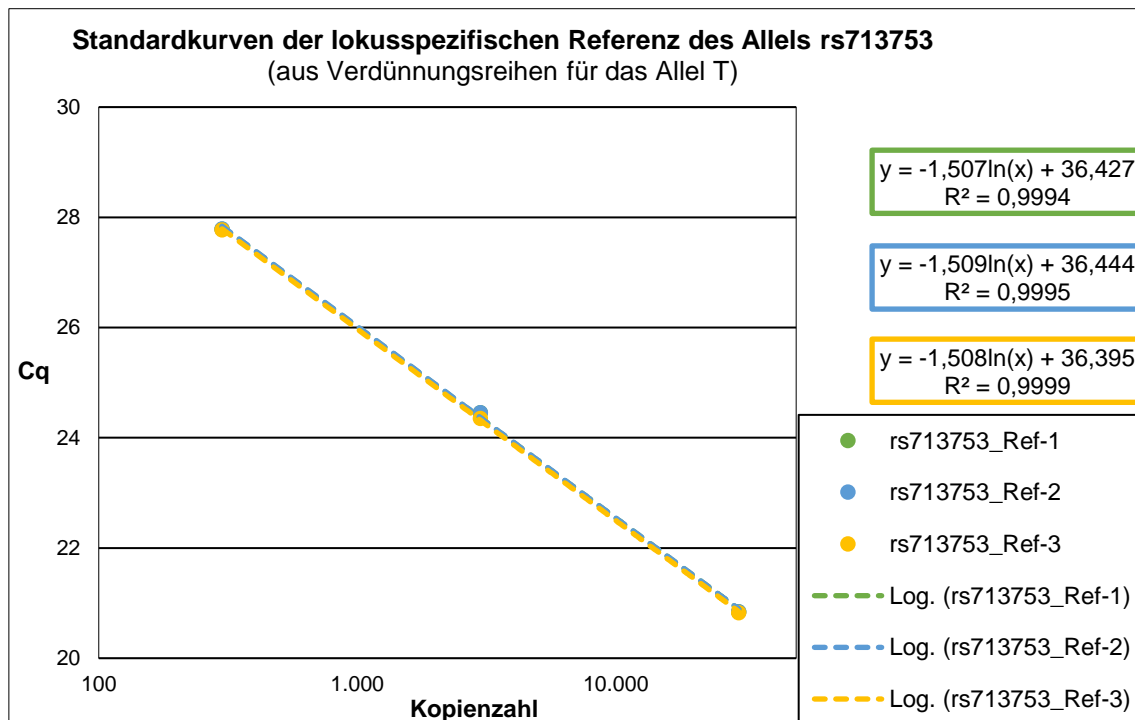


Abb. 29: Standardkurven von drei Verdünnungsreihen in Wasser für die lokusspezifische Referenz des SNP rs713753.

Es handelt sich um die drei Verdünnungsreihen, die zur Standardisierung des Allels T hergestellt wurden. Alle drei wurden aus einer DNA-Probe erstellt. Die Kurven waren nahezu identisch, was für eine gute Reproduzierbarkeit spricht. Die Kurven wurden aus den Cq-Werten von drei Verdünnungsstufen (1:1 bis 1:100) generiert.

Die Standardkurve, die aus den arithmetischen Mitteln der Cq-Werte aller drei Verdünnungsreihen erstellt wurde (siehe Abb. 32), wies ein nahezu optimales R^2 von 0,9997 auf sowie eine Steigung von -3,472 bei dekadischem Logarithmus. Daraus ergab sich eine sehr gute qPCR-Effizienz von 0,941.

Auch die zur Standardisierung des Allels C hergestellten Verdünnungsreihen wurden auf die lokusspezifische Referenz getestet. Wie in den für das Allel T erstellten Verdünnungsreihen kam es in der Verdünnungsstufe 1:100.000 mit statistisch gesehen ca. 0,3 Allelkopien in 2/9 Ansätzen zur Amplifikation. In den anderen Verdünnungsstufen wurde in allen Ansätzen eine Amplifikation detektiert. In der 1:10.000er-Verdünnung mit drei Allelkopien schwankten die Cq-Werte noch stark zwischen 33,53 und 39,25 (MW 36,26; SD 2,118). Ab der 1:1.000er-Verdünnung traten nur noch geringe Schwankungen der Cq-Werte auf. Sie reichten in der 1:1.000er-Verdünnung von 30,99 bis 31,87 (MW 31,46; SD 0,435), in der 1:100er-Verdünnung von 27,76 bis 28,00 (MW 27,87; SD 0,083), in der 1:10er-Verdünnung von 24,48 bis 24,67 (MW 24,58; SD 0,071) und in der 1:1-Verdünnung mit ca. 30.000 Allelkopien von 21,02 bis 21,19 (MW 21,14; SD 0,052). Die Differenz der Cq-Mittelwerte zwischen einzelnen Verdünnungsstufen lag unter Einbeziehung der Stufe 1:10.000 bei durchschnittlich 3,78 (SD 0,89), ab Stufe 1:1.000 aufwärts bei durchschnittlich 3,44 (SD 0,17) und somit ab einem Input von ca. 30 Allelkopien (Stufe 1:1.000) nahe des optimalen Wertes von 3,3.

Da die Cq-Werte in den Verdünnungsstufen 1:100 bis 1:1 sehr wenig variierten, waren die Standardkurven der drei Verdünnungsreihen auch hier fast identisch (siehe Abb. 30). Die Steigung schwankte nur gering zwischen -1,444 und -1,475 (MW -1,461; SD 0,016), der Y-Achsenabschnitt lag im Mittel bei 36,233 (SD 0,128). R^2 war bei allen drei Kurven sehr gut ($\geq 0,9996$) (weitere Daten siehe Appendix V).

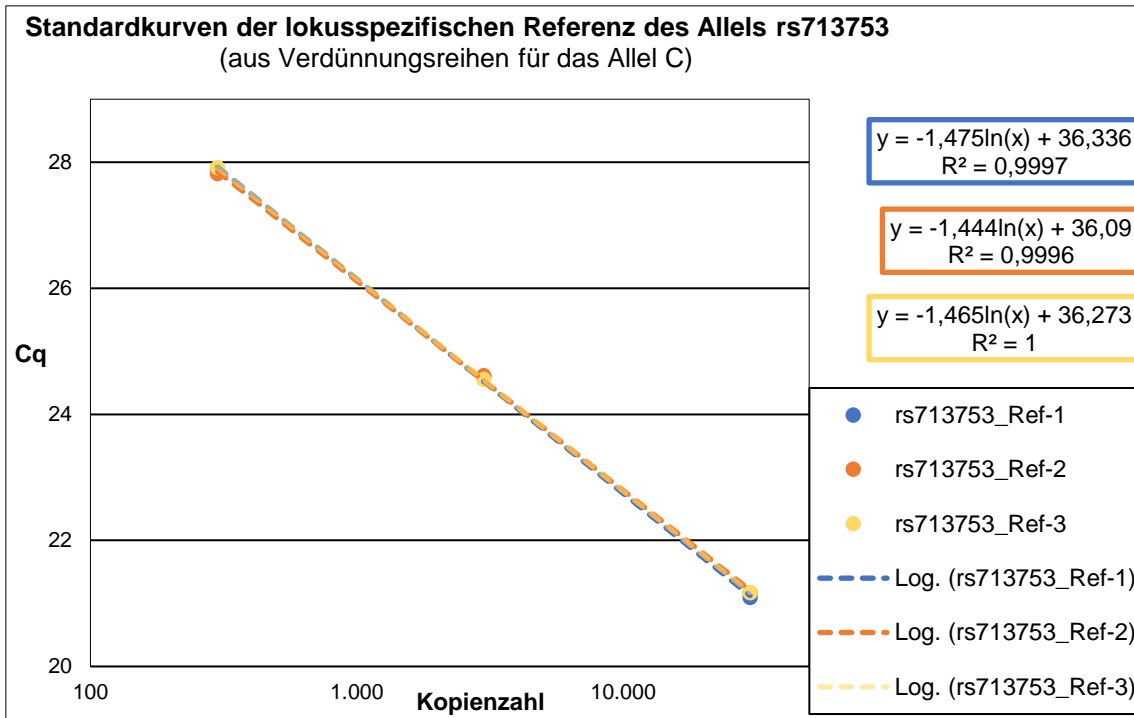


Abb. 30: Standardkurven von drei Verdünnungsreihen in Wasser für die lokusspezifische Referenz des SNP rs713753.

Es handelt sich um die drei Verdünnungsreihen, die zur Standardisierung des Allels C hergestellt wurden. Alle drei wurden aus einer DNA-Probe erstellt. Die Kurven sind nahezu identisch, was für eine gute Reproduzierbarkeit spricht. Die Kurven wurden aus den Cq-Werten von drei Verdünnungsstufen (1:1 bis 1:100) generiert.

Dementsprechend wies auch die aus den Cq-Mittelwerten aller drei Verdünnungsreihen erstellte Standardkurve (siehe Abb. 33) ein sehr gutes R² von 0,9998 auf. Bei einer nahezu optimalen Steigung von -3,364 bei dekadischem Logarithmus ergab sich eine sehr gute qPCR-Effizienz von 0,983.

Die gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der lokusspezifischen Referenz konnte zusätzlich anhand des Vergleichs der beiden Standardkurven nachgewiesen werden, welche aus den Cq-Mittelwerten der lokusspezifischen Referenz der beiden Verdünnungsreihen für die Allele rs713753_C und T generiert wurden. Abb. 31 zeigt, dass die beiden Kurven sehr ähnlich sind. Die Differenz von R² beträgt 0,0001; die Steigungen unterscheiden sich lediglich um 0,047. Somit sind auch die Effizienzen mit 0,983 und 0,941 sehr ähnlich. Für die lokusspezifische Referenz liegt folglich eine gute Reproduzierbarkeit unabhängig vom Genotyp und der verwendeten DNA-Probe vor.

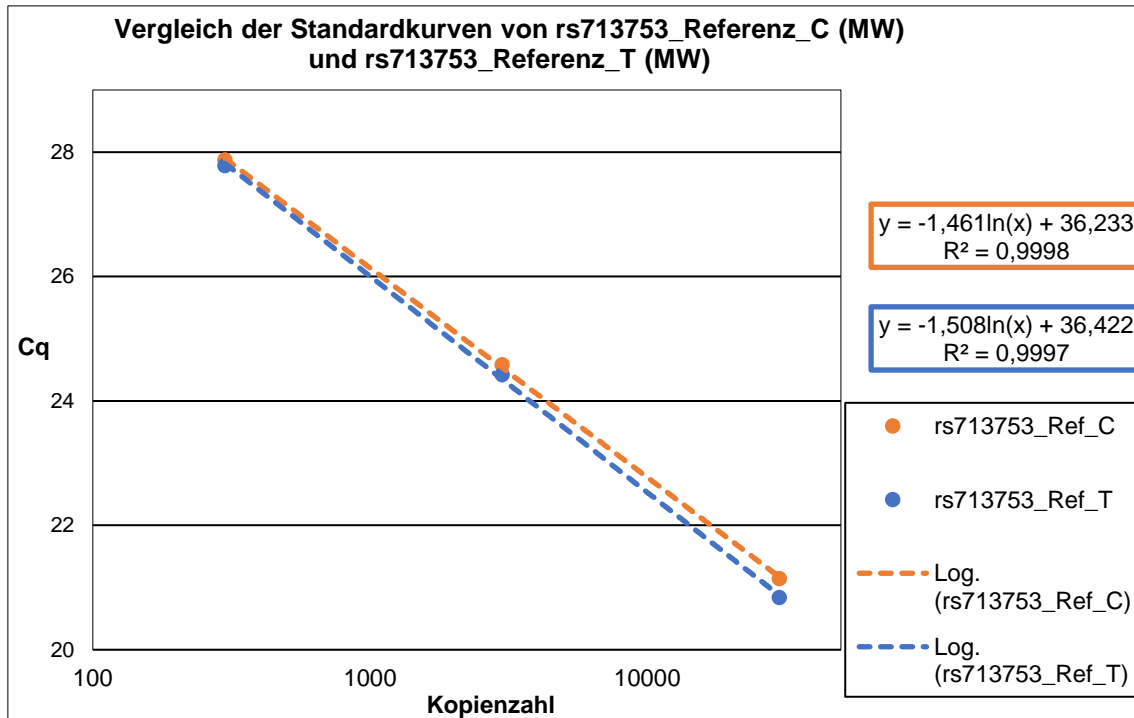


Abb. 31: Vergleich der beiden Standardkurven der lokusspezifischen Referenz. Es sind die Standardkurven zu sehen, die für die lokusspezifische Referenz aus den Mittelwerten der jeweils für die Allele T und C hergestellten Verdünnungsreihen entstanden sind. Die Kurven wurden aus den Cq-Werten von drei Verdünnungsstufen (1:1 bis 1:100) generiert. (MW = Mittelwert)

Auch aus den Mittelwerten aller Cq-Werte für die lokusspezifische Referenz wurde eine Kurve erstellt (siehe Abb. 36). Sie wies ein R² von 0,998 auf und eine Steigung von -3,419 bei dekadischem Logarithmus, woraus sich eine qPCR-Effizienz von 0,961 ergibt (siehe Tabelle 26).

3.3.2.4 Vergleich der Standardkurven der spezifischen Allele und der Referenz untereinander

Um einen genetischen Marker wie einen SNP für die Chimärismusdiagnostik anhand von qPCR verwenden zu können, müssen die qPCR-Ansätze des spezifischen Allels und der internen Referenz zwingend eine vergleichbare Effizienz aufweisen. Nach Gineikiene et al. (25) liegt eine akzeptable Vergleichbarkeit vor, wenn die Differenz der Effizienzen der beiden qPCR-Ansätze (ΔE) $\leq 0,1$ beträgt. Aus diesem Grund wurden die Standardkurven und Effizienzen der Allele T und C, die aus den Verdünnungsreihen in Wasser gewonnen wurden, mit denen der lokusspezifischen Referenz verglichen, die aus den jeweils gleichen Verdünnungsreihen erstellt wurden.

Für das Allel rs713753_T wurde eine Effizienz von 0,868 errechnet, für die lokusspezifische Referenz anhand derselben Verdünnungsreihen eine Effizienz von 0,941.

ΔE beträgt folglich 0,0733, sodass eine akzeptable Vergleichbarkeit vorliegt. Dies spiegelt sich auch in den Standardkurven wider, welche nahezu parallel verlaufen (siehe Abb. 32).

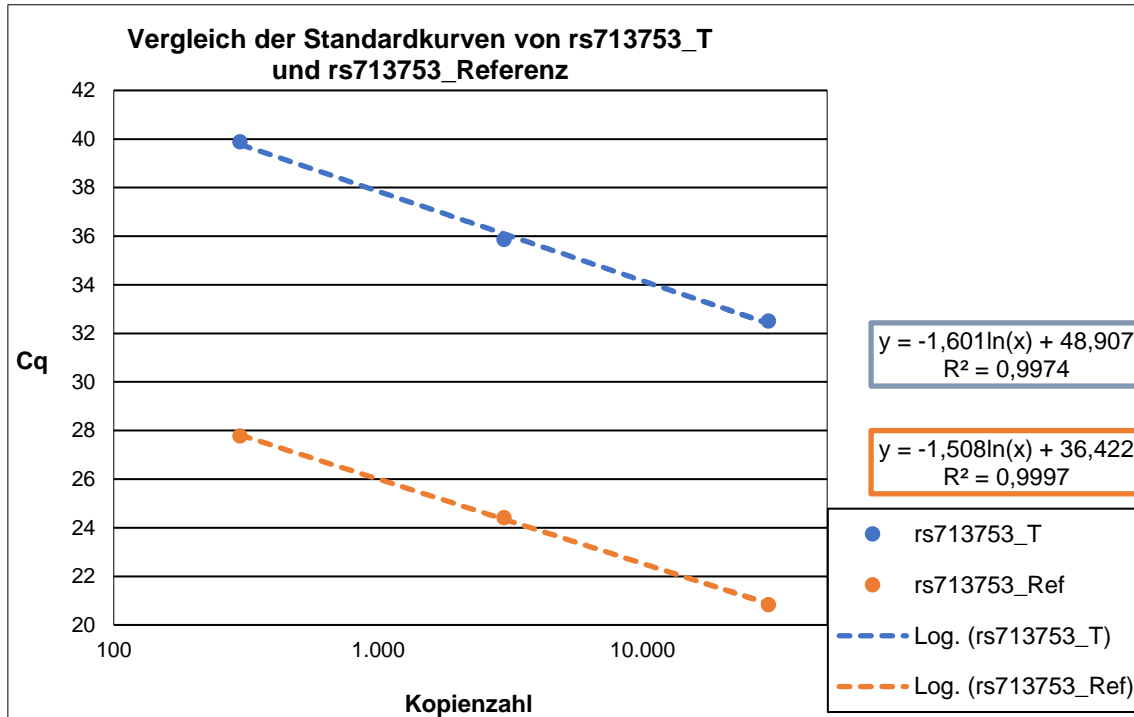


Abb. 32: Vergleich der Standardkurven des Alleles rs713753_T und der lokusspezifischen Referenz. Beide Kurven wurden aus den Cq-Mittelwerten der drei für das Allel T hergestellten Verdünnungsreihen gebildet (aus den Verdünnungsstufen 1:1 bis 1:100). Die Kurven laufen annähernd parallel. Die Steigungen unterscheiden sich nur um 0,092, R^2 um 0,0023.

Die Effizienz der qPCR des Allels C betrug 1,024, die der lokusspezifischen Referenz aus denselben Verdünnungsreihen 0,983. ΔE liegt mit 0,0416 deutlich unter 0,1, sodass auch hier eine akzeptable Vergleichbarkeit vorliegt. Abb. 33 verdeutlicht dies anhand der nahezu parallel verlaufenden Standardkurven.

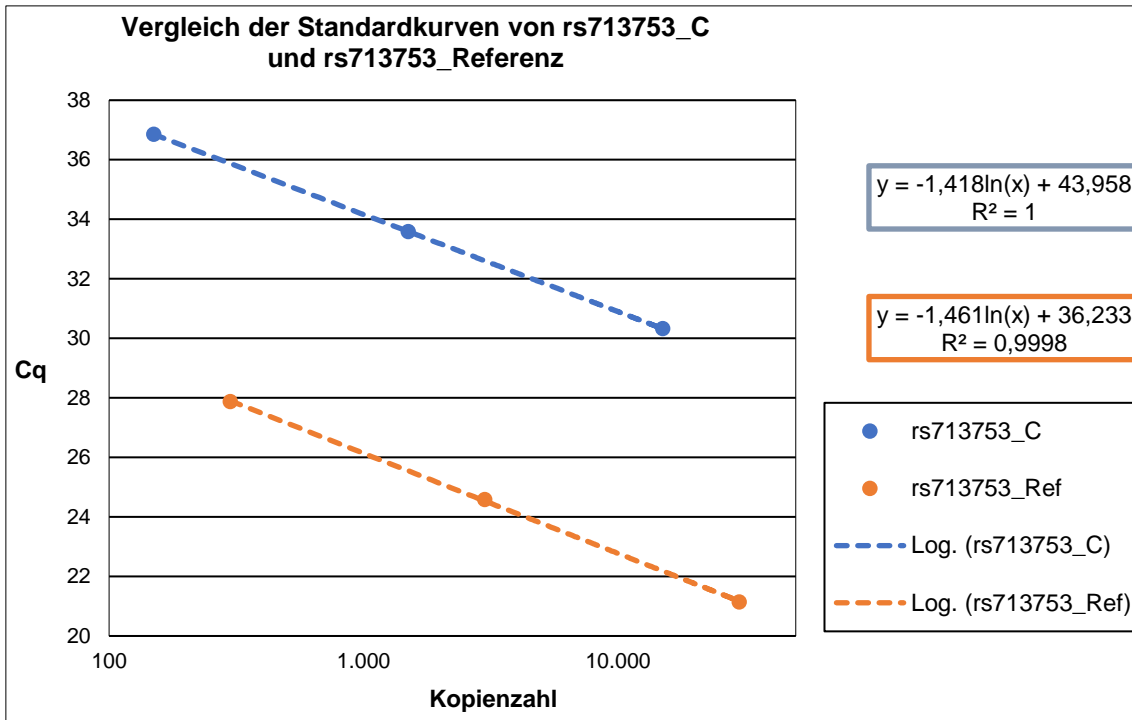


Abb. 33: Vergleich der Standardkurven des Alleles rs713753_C und der lokusspezifischen Referenz. Beide Kurven wurden aus den Cq-Mittelwerten der drei für das Allel C hergestellten Verdünnungsreihen gebildet (aus den Verdünnungsstufen 1:1 bis 1:100). Die Kurven laufen annähernd parallel. Die Steigungen unterscheiden sich nur um 0,043, R2 um 0,0002. Die Kurven liegen horizontal versetzt zueinander, da die Standardreihen aus DNA eines heterozygoten Individuums erstellt wurden.

Überdies wurden die Standardkurven und Effizienzen der beiden spezifischen Allele miteinander verglichen (siehe Abb. 34). Die Kurven unterscheiden sich deutlich voneinander. Die Differenz der Steigungen beträgt 0,183; somit unterscheiden sich auch die Effizienzen mit einer Differenz von 0,157 deutlich. Die Differenz der Y-Achsenabschnitte beträgt 4,95 Cq-Werte. Es fällt auf, dass der Abstand zwischen den Kurven mit abnehmender Kopienzahl zunimmt, was durch die Unterschiede in der Effizienz erklärbar ist.

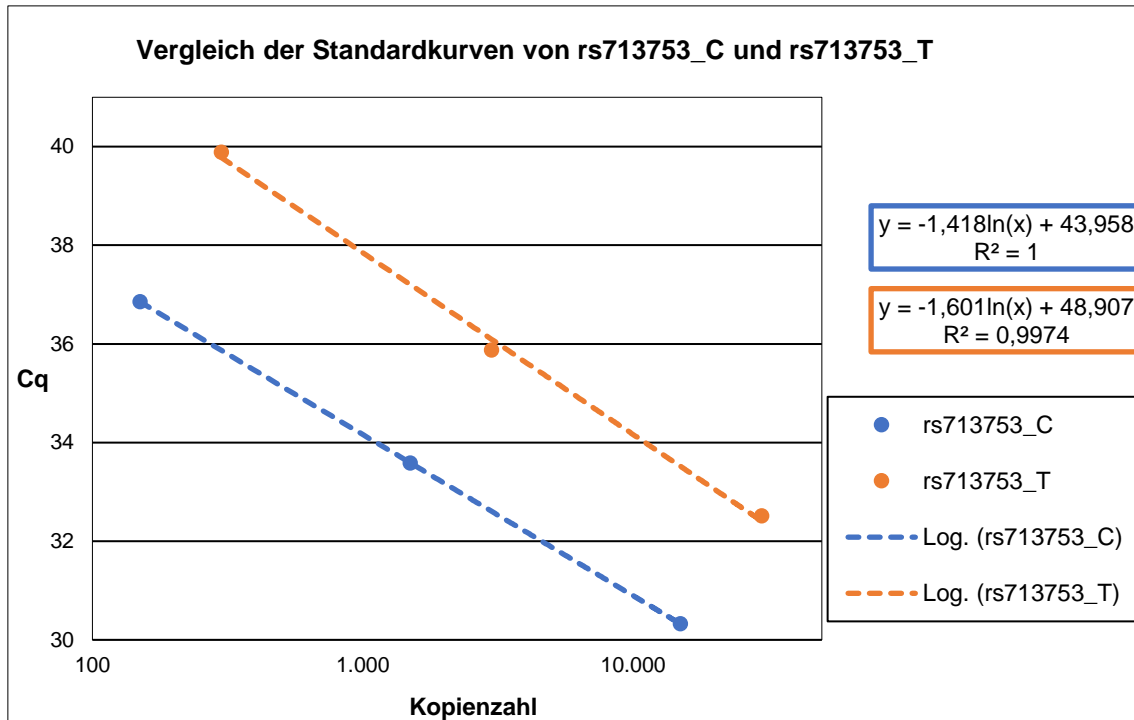


Abb. 34: Vergleich der Standardkurven der Allele rs713753_C und T.
 Die Kurven wurden jeweils aus den Cq-Mittelwerten der drei für das Allel C bzw. T hergestellten Verdünnungsreihen gebildet (aus den Verdünnungsstufen 1:1 bis 1:100). Es fällt auf, dass der Abstand zwischen den Kurven mit abnehmender Kopienzahl zunimmt, was durch die Unterschiede in der Effizienz zu erklären ist.

Vergleicht man die absolute Differenz der Cq-Werte der beiden spezifischen Allele bei gegebener Kopienzahl, so nimmt sie folglich mit steigender Kopienzahl ab (siehe Abb. 35). Der Cq-Wert des Allels C bleibt dabei immer kleiner als der des Allels T. Dies liegt an der Tatsache, dass ein höhere Effizienz in einer besseren Sensitivität vor allem bei geringen Konzentrationen des Zielallels resultiert (43). Folglich ist die qPCR des Allels rs713753_C aufgrund ihrer höheren Sensitivität besser zur Chimärismusdiagnostik geeignet als die des Allels rs713753_T.

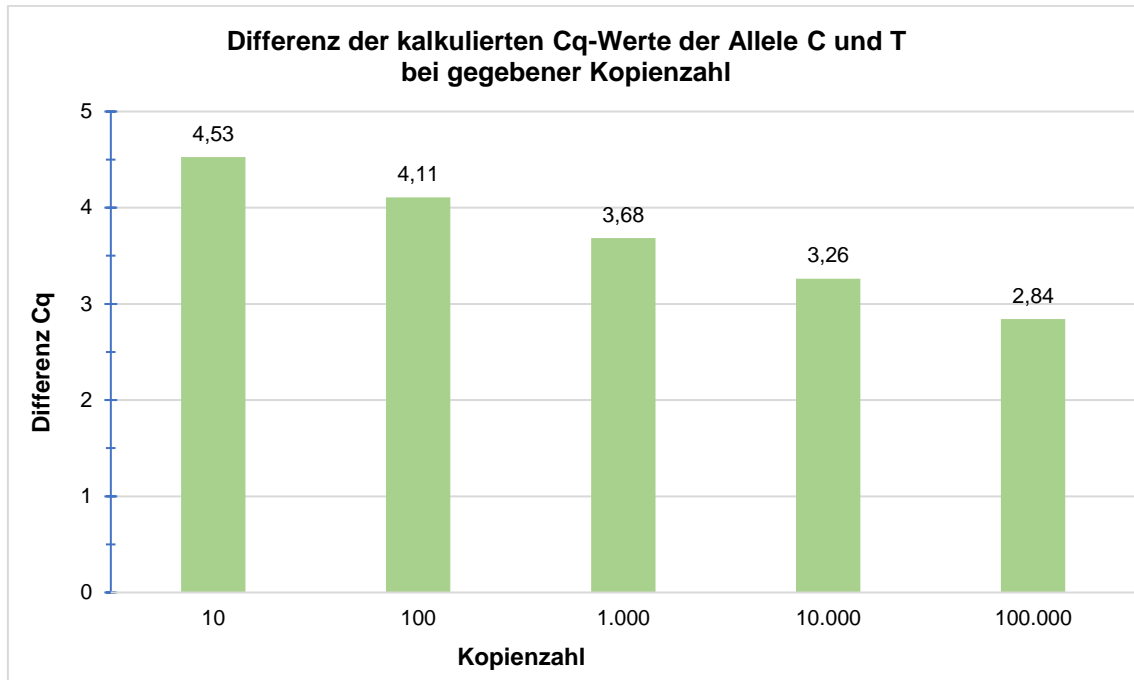


Abb. 35: Differenz der kalkulierten Cq-Werte der Allele rs713753_C und T bei gegebener Kopienzahl. Der Cq-Wert des Allels C bleibt immer kleiner als der des Allels T. Die Cq-Werte wurden mithilfe der erstellten Standardkurven berechnet (siehe Abb. 34), indem die Kopienzahl in die Formel der Standardkurven eingesetzt wurde.

Zusammengefasst wiesen sowohl die Standardkurven der beiden spezifischen Allele als auch die der internen Referenz ein gutes R^2 ($> 0,997$) auf. Es fiel jedoch auf, dass die Standardkurve des Allels T im Vergleich zu denen des Allels C und der lokusspezifischen Referenz deutlich schlechtere Werte für R^2 , Steigung und Effizienz aufwies. Betrug die Differenz zur optimalen Steigung von $-3,3$ (dekadischer Logarithmus) beim Allel T $0,356$, so betrug sie nur $0,064$ beim Allel C und $0,088$ bei der lokusspezifischen Referenz. Dies spiegelte sich auch in der Effizienz wider, die für das Allel T nur $0,8675$ betrug. Dennoch lag ΔE zwischen spezifischem Allel und Referenz sowohl beim Allel C als auch beim Allel T im akzeptablen Bereich von $\leq 0,1$, sodass in puncto Effizienz eine Chimärismusbestimmung per qPCR mit beiden Allelen des SNP rs713753 mit Normalisierung mittels der lokusspezifischen Referenz möglich wäre.

Abb. 36 zeigt die Standardkurven der spezifischen Allele und der lokusspezifischen Referenz, die aus den jeweiligen Cq-Mittelwerten aller Verdünnungsreihen entstanden sind. Tabelle 26 gibt einen Überblick über die dazugehörigen Werte der Standardkurven.

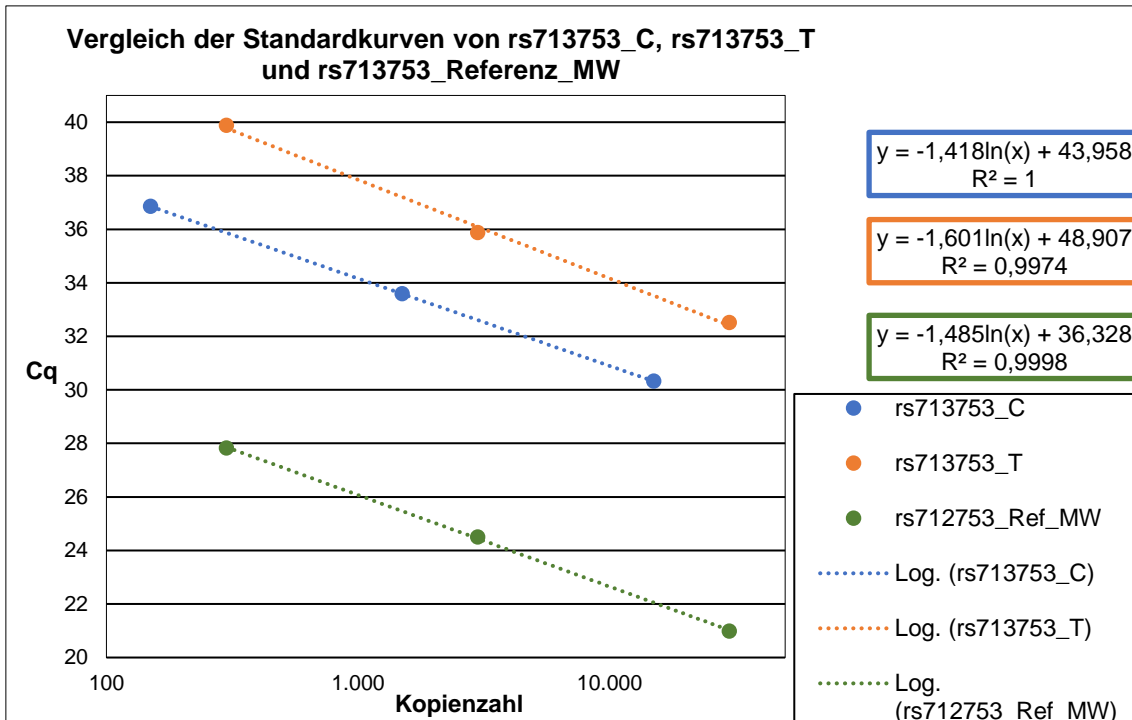


Abb. 36: Vergleich der Standardkurven der Allele rs713753_C und T und der lokusspezifischen Referenz. Die Kurve der Referenz wurde aus den Mittelwerten der Cq-Werte aller sechs Standardreihen gebildet, die Kurven der Allele C und T wurden aus den Cq-Mittelwerten der drei dafür hergestellten Verdünnungsreihen gebildet (aus den Verdünnungsstufen 1:1 bis 1:100). Es fällt auf, dass die Kurve des Allels T eine steilere Steigung aufweist als die anderen beiden Kurven. (MW = Mittelwert)

Tabelle 26: Übersicht über die Eigenschaften der aus den Standardverdünnungsreihen in Wasser abgeleiteten Standardkurven. Die Werte der lokusspezifischen Referenz stellen das arithmetische Mittel der in 3.3.2.3 beschriebenen Standardkurven der Referenz dar (ergo die Mittelwerte aller Standardkurven der lokusspezifischen Referenz, die aus den für die Allele C und T hergestellten Standardverdünnungsreihen abgeleitet wurden).

Allel	R ²	Effizienz	Steigung bei log ₁₀	Y-Schnittpunkt
T	0,9974	0,8675	-3,6864	48,907
C	1,0000	1,0243	-3,2658	43,958
Referenz	0,9998	0,961	-3,419	36,328

3.3.3 Ergebnisse der Standardreihen in DNA

Zur Beurteilung der Nachweisgrenze des Assays wurden Standardreihen allelpositiver in allelnegativer DNA in den Stufen 1:1 bis 1:100.000 aus Blutproben gesunder Probanden/Probandinnen angelegt (siehe 2.3.8.2), weil eine Verdünnung allelpositiver in allelnegativer DNA die realen Bedingungen einer Chimärismusdiagnostik besser imitiert

als eine Verdünnung in Wasser. Da unter den zwölf gesunden Probandinnen/Probanden niemand homozygot für das Allel C war und somit keine T-negative DNA vorlag, konnten solche Standardreihen nur für das Allel C hergestellt werden. Bei der Auswertung dieser war die Heterozygotie der allelpositiven DNA für das Allel C zu beachten. Abb. 37 zeigt beispielhaft einen Amplifikationsplot einer solchen Standardreihe.

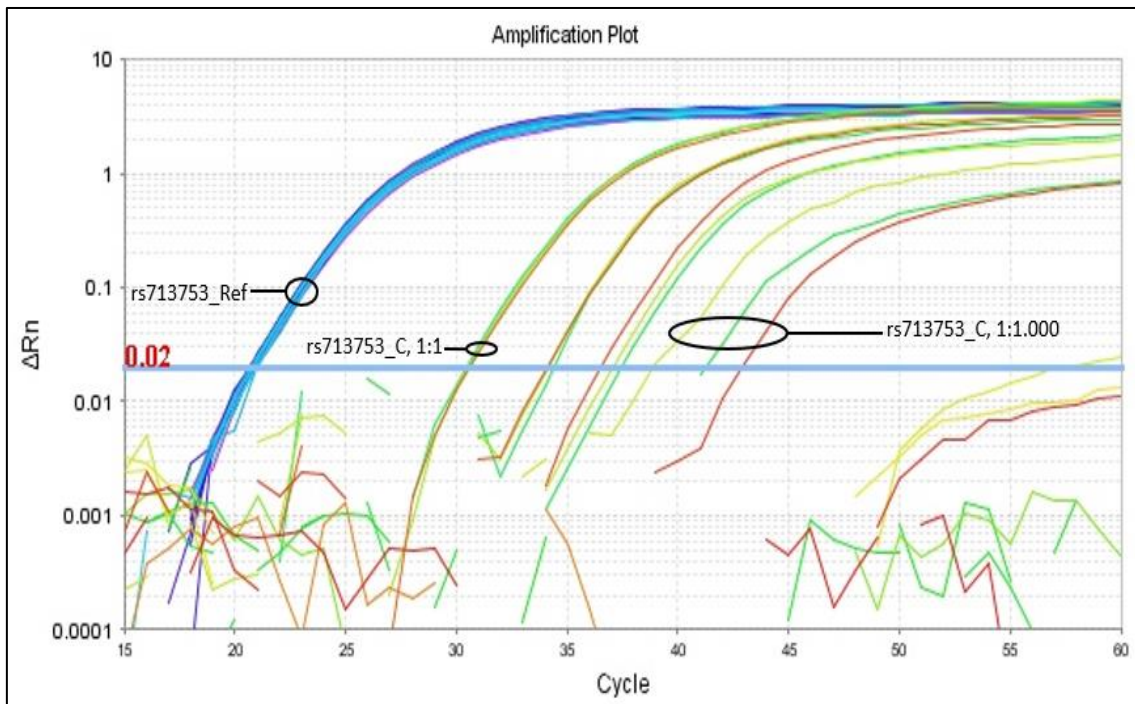


Abb. 37: Amplifikationsplot einer Standardreihe allelpositiver in allelnegativer DNA des Allels rs713753_C. Die Kurven zweier Verdünnungsstufen sind beispielhaft markiert. Man erkennt deutlich, dass die Kurven des Allels C verschiedener Stufen zueinander verschoben sind, und dass die Variation der drei Kurven einer Verdünnungsstufe mit steigendem Anteil positiver DNA abnimmt. Die Kurven der lokusspezifischen Referenz liegen unabhängig von der Verdünnungsstufe alle sehr nah aneinander, was für eine hohe Reproduzierbarkeit spricht, denn der Cq-Wert der Referenz ist abhängig vom Gesamt-DNA-Input, welcher in allen Ansätzen gleich war. (Blautöne = Referenz, grün/gelb/rot = Allel C)

3.3.3.1 qPCR der Standardreihen allelpositiver in allelnegativer DNA

Wie zu erwarten, blieben die Cq-Werte der lokusspezifischen Referenz über alle Verdünnungsstufen hinweg konstant, da eine Amplifikation hier unabhängig vom Genotypen passiert und die Gesamt-DNA-Menge in allen Ansätzen gleich war. Der Cq-Mittelwert betrug 20,83 (SD 0,14). Es kam in allen 54 Ansätzen zur Amplifikation.

In den Ansätzen des Allels C kam es in der höchsten Verdünnungsstufe (1:100.000) in nur 2/9 Ansätzen zur Amplifikation mit Cq-Werten > 44,5. Ein Ergebnis dieser Größenordnung war zu erwarten, da diese Stufe nur 0,001 % allelpositive DNA pro Ansatz enthielt, was bei einer Gesamtmenge von 100 ng DNA und einem heterozygoten Individuum

statistisch gesehen 0,15 Allelkopien entspricht. In der nächsten Verdünnungsstufe (1:10.000) mit ca. 1,5 Allelkopien pro Ansatz kam es in 5/9 Ansätzen zur Amplifikation mit Cq-Werten zwischen 40,11 und 57,47 (MW 47,72; SD 7,64). Ab der Verdünnungsstufe 1:1.000 kam es in allen (9/9) Ansätzen zur Amplifikation. In der 1:1.000er-Verdünnung schwankten die Cq-Werte zwischen 38,86 und 43,93 (MW 41,21; SD 2,03), in der 1:100er-Verdünnung zwischen 36,59 und 37,55 (MW 37,12; SD 0,41) und in der 1:10er-Verdünnung zwischen 33,05 und 35,73 (MW 34,34; SD 0,87). In der Stufe 1:1, die mit 100 ng allelpositiver DNA der Stufe 1:1 der Verdünnungsreihe in Wasser entspricht, schwankten die Cq-Werte nur noch gering zwischen 30,43 und 30,90 (MW 30,67; SD 0,14).

Die Differenz der Cq-Mittelwerte zwischen den einzelnen Verdünnungsstufen (ab Stufe 1:1.000) lag zwischen 4,87 und 2,39 (MW 3,51; SD 0,71), wobei die beiden höchsten Werte (> 3,75) zwischen den beiden höchsten amplifizierbaren Verdünnungsstufen 1:1.000 und 1:100 lagen.

Abb. 38 zeigt die aus den Cq-Werten der drei Standardreihen erstellten Standardkurven. Eine wies im Vergleich zu den anderen ein schlechteres R^2 von 0,9846 auf. Die Steigungen variierten zwischen -1,323 und -1,47 (MW -1,401; SD 0,074). Die daraus resultierenden Unterschiede in der Effizienz wurden vor allem in den Cq-Werten der Ansätze mit geringem Anteil allelpositiver DNA erkennbar.

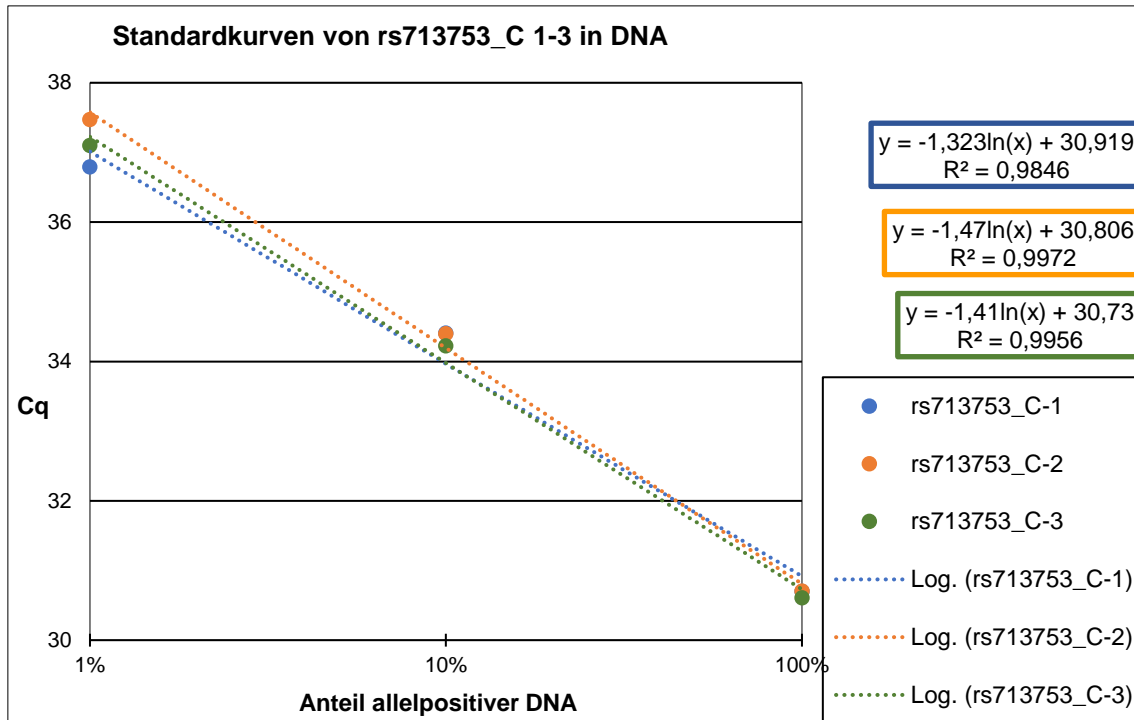


Abb. 38: Standardkurven der drei Standardreihen allelpositiver in allelnegativer DNA für das Allel rs713753_C.

Alle drei Kurven wurden aus denselben DNA-Proben erstellt, aus den Verdünnungsstufen 1:1 bis 1:100. Die Unterschiede in der Effizienz wurden vor allem im Bereich geringerer Anteile allelpositiver DNA erkennbar.

Auch hier wurde eine Standardkurve aus den Mittelwerten aller drei Standardreihen erstellt. Diese wurde mit der Standardkurve der Verdünnungsreihe in Wasser des gleichen Allels verglichen (siehe Abb. 39). Beide wiesen ein gutes R² (> 0,993) auf. Die Differenz der Steigungen betrug nur 0,017. Es lag eine leichte Differenz des Y-Achsenabschnitts um 0,33 Zyklen vor, wobei die Verdünnungsreihe in Wasser die kleineren Cq-Werte zeigte. Vergleicht man die aus diesen Ergebnissen resultierenden qPCR-Effizienzen, so ergibt sich eine zu vernachlässigende Differenz von lediglich 0,017.

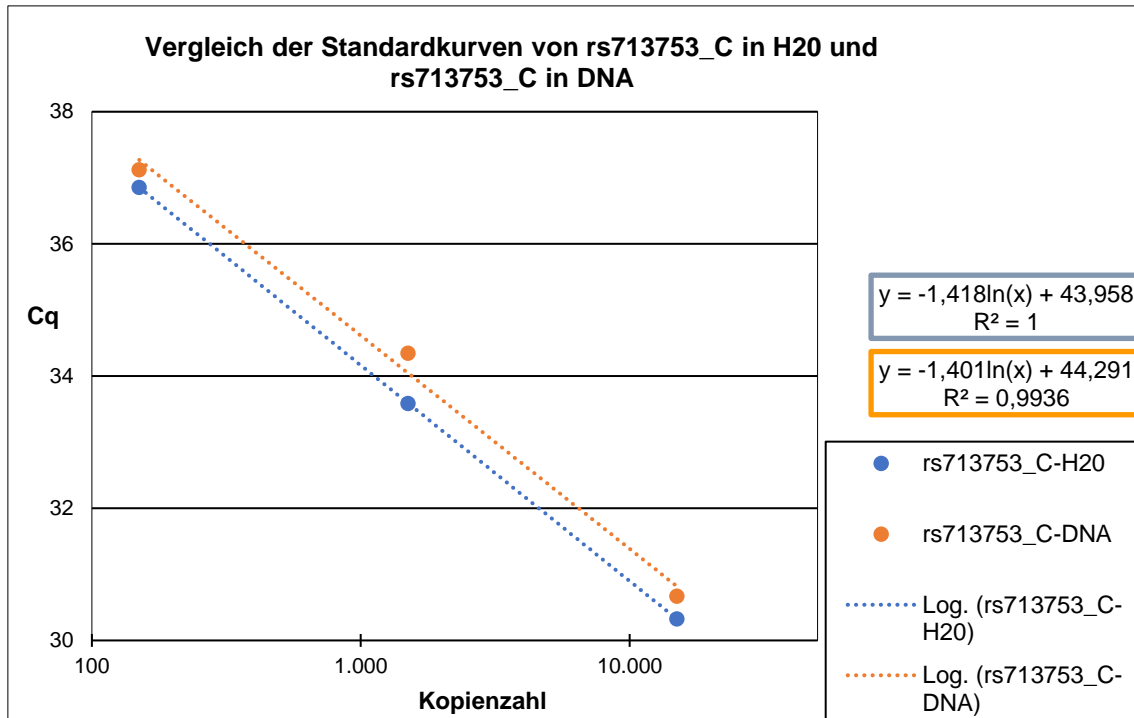


Abb. 39: Vergleich der beiden Standardkurven für das Allel rs713753_C aus den Standardreihen allelpositiver DNA in Wasser und in allelnegativer DNA.

Beide Kurven wurden aus den Cq-Mittelwerten der jeweiligen drei Verdünnungsreihen gebildet (aus den Verdünnungsstufen 1:1 bis 1:100). Die Kurven verlaufen annähernd parallel, aber leicht horizontal versetzt zueinander. Dabei weist die aus den Standardreihen in Wasser abgeleitete Kurve die kleineren Cq-Werte auf.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Effizienz der qPCR des Allels C unabhängig vom Vorhandensein allelnegativer DNA ist. Möchte man den Chimärismusgrad nach der $\Delta\Delta Cq$ -Methode berechnen, könnte man zur Erstellung der Formel also die mittels einer Verdünnungsreihe in Wasser ermittelte Effizienz heranziehen. Die Herstellung einer Verdünnungsreihe in Wasser ist weniger zeitaufwendig und birgt aufgrund der kleineren Anzahl an Arbeitsschritten ein geringeres Risiko für Ungenauigkeiten und Verunreinigungen als die Herstellung einer Standardreihe allelpositiver in allelnegativer DNA.

Beim Vergleich der Standardreihen für das Allel C positiver DNA in Wasser und in allelnegativer DNA fiel auf, dass es in der Verdünnungsstufe 1:10.000 mit ca. 15 Allelkopien pro Ansatz bei Verdünnung in Wasser nur in 1/9 Ansätzen zur Amplifikation kam, wohingegen es in der gleichen Stufe bei Verdünnung in allelnegativer DNA in 5/9 Ansätzen zur Amplifikation kam. Dies könnte Zeugnis einer schlechten Spezifität des Primers sein, zumal sich das Risiko einer unspezifischen Bindung zum anderen Allel erhöht, wenn dieses im Überschuss vorhanden ist (30). Dies konnte hier jedoch nicht geklärt werden und bedarf weiterer Experimente.

3.3.3.2 Evaluation der Nachweisgrenze

Das LOD wird in dieser Arbeit gemäß „Clinical & Laboratory Standards Institute“ (CLSI) (64) definiert als die geringste DNA-Menge, die mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit mittels qPCR detektiert, wenn auch eventuell nicht exakt quantifiziert werden kann.

Demnach lag das LOD der qPCR des Allels rs713753_C bei 0,1 % allelpositiver DNA eines heterozygoten Individuums in 100 ng Gesamt-DNA (Stufe 1:1.000 der Standardreihe allelpositiver in allelnegativer DNA), was ca. 15 Allelkopien entspricht. Hier kam es in allen (9/9) Ansätzen zur Amplifikation mit Cq-Werten zwischen 48,86 und 43,93 (MW 41,21; SD 2,03), es war jedoch keine Linearität der Regressionsgeraden mehr gegeben. Das gesuchte Allel wurde hier also mit großer Sicherheit detektiert; eine genaue Quantifizierung wäre jedoch aufgrund der hohen Standardabweichung nicht möglich. Dieses Ergebnis entspricht dem von Gineikiene et al. (25) publizierten LOD.

Das LOQ – gemäß CLSI (64) die geringste Menge an DNA, die mit akzeptabler Genauigkeit detektiert und quantifiziert werden kann – lag bei Verdünnungsstufe 1:100, welche 1 ng allelpositive DNA bzw. ca. 150 Allelkopien enthielt. Bis zu dieser Stufe lag eine Linearität der Regressionsgeraden vor, die Cq-Werte der neun Ansätze schwankten zwischen 36,59 und 37,55 (MW 37,12; SD 0,41). Die geringe Variation der Cq-Werte würde durchaus eine präzise Quantifizierung erlauben.

Zusammengefasst lag in dieser Arbeit das LOD für das Allel C bei 0,1 % und das LOQ bei 1 % allelpositiver DNA eines heterozygoten Individuums in 100 ng Ausgangs-DNA. Zur Überprüfung dieser Ergebnisse für das Allel rs713753_C wäre es sinnvoll, weitere Standardreihen allelpositiver DNA eines homozygoten Individuums in allelnegativer DNA herzustellen und zu amplifizieren. Mit DNA eines Probanden/einer Probandin, der/die homozygot auf das Allel C ist, könnten zudem Standardreihen allelpositiver in allelnegativer DNA für das Allel T hergestellt werden, um auch für dieses LOD und LOQ evaluieren zu können.

3.3.4 Erstellung einer Formel zur Chimärismusberechnung

Zur Überprüfung der klinischen Anwendbarkeit der qPCR des SNP rs713753 in der Chimärismusdiagnostik wurden Verlaufskontrollen nach HSZT, die im Labor zur Diagnostik eingegangen waren, retrospektiv untersucht. Die Ergebnisse der Chimärismusanalyse mittels qPCR des SNP rs713753 wurden dann mit den Chimärismuswerten verglichen, die seinerzeit im Labor mit der dort etablierten Methode, nämlich qPCR von

„short-sized polymorphisms“ nach Alizadeh et al. (33) und von SNPs nach Maas et al. (9), ermittelt worden waren.

Im Gegensatz zu Gineikiene et al. (25), die den Chimärismus anhand der $\Delta\Delta Cq$ -Methode quantifizierten, wurde im Rahmen dieser Arbeit aus zwei Gründen die Standardkurvenmethode (siehe 1.3.4) angewandt: Erstens stand für die aktuellen Experimente nicht ausreichend Prä-Transplantations-DNA der Empfänger/-innen zur Verfügung; zweitens hatte man im Labor bewusst die Standardkurvenmethode etabliert, da die Prä-Transplantations-DNA-Proben der Empfänger/-innen bei der $\Delta\Delta Cq$ -Methode nicht selten einen limitierenden Faktor in der Durchführung von Verlaufskontrollen nach HSZT darstellen (36). Da das Ziel der Experimente die Etablierung eines neuen Genorts zur Verwendung im Rahmen der bereits im Labor etablierten diagnostischen Methoden war, wurde mit der dort üblichen Standardkurvenmethode gearbeitet.

Die Formel zur Chimärismusberechnung mittels Standardkurvenmethode wurde, wie in 2.3.8.4.1 beschrieben, aus den Standardreihen allelpositiver in allelnegativer DNA erstellt. Dabei wurde, wie auch bei der eigentlichen Chimärismusbestimmung, eine Normalisierung der DNA-Menge mittels interner Referenz durchgeführt, indem nicht die Cq -, sondern die ΔCq -Werte gegen die Verdünnungsstufe aufgetragen wurden. Abb. 40 zeigt die so erstellte Standardkurve für das Allel rs713753_C mit dazugehöriger Formel.

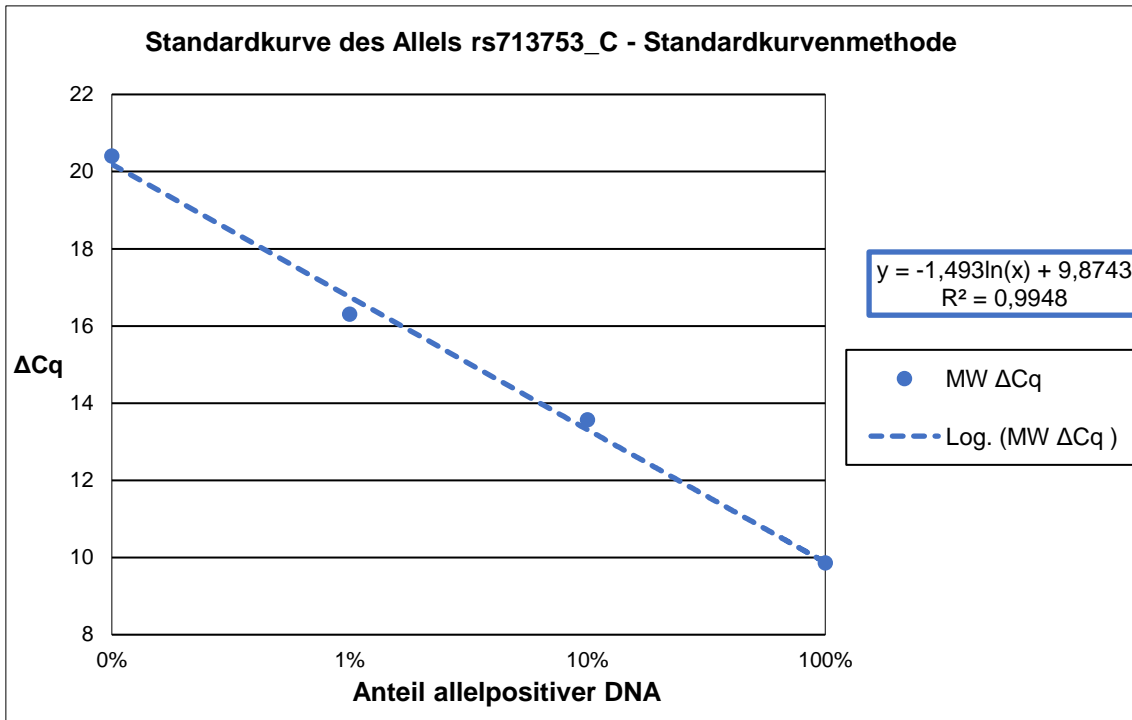


Abb. 40: Standardkurve aus ΔCq -Werten der Standardreihen allelpositiver in allelnegativer DNA des Allels rs713753_C. Die ΔCq -Mittelwerte aus drei Experimenten wurden logarithmisch gegen die Verdünnungsstufe aufgetragen. Die entstandene Trendlinie weist ein gutes R^2 auf sowie eine Steigung von -3,438 bei dekadischem Logarithmus. (MW = Mittelwert)

Die resultierende Trendlinienformel wurde nach x, also nach der Verdünnungsstufe, aufgelöst (vgl. Formel 13), sodass folgende Formel entstand (Formel 14):

$$y = -1,439 \ln(x) + 9,8743 \Leftrightarrow x = e^{\frac{y-9,8743}{-1,439}}$$

Formel 14: Auflösung der Trendlinienformel nach der Verdünnungsstufe. Es handelt sich um die Trendlinie der Standardkurve, die aus den ΔCq -Werten der Standardreihen allelpositiver in allelnegativer DNA für das Allel rs713753_C hergestellt wurde. Die resultierende Formel dient der Berechnung des Empfängerzellanteils eines unbekanntem Chimärismus bei gegebenem ΔCq -Wert. (x = Verdünnungsstufe bzw. Empfängerzellanteil; y = ΔCq)

Zur Errechnung des Donorchimärismus wurde die Formel wie folgt umgeformt (Formel 15):

$$\% \text{ Donorchimärismus} = 100 - e^{\frac{y-9,8743}{-1,439}}$$

Formel 15: Formel für das Allel rs713753_C zur Berechnung des Donorchimärismus bei gegebenem ΔCq -Wert und bei für das Allel C heterozygotem/heterozygoter Empfänger/-in. (y = ΔCq)

Da diese Formeln auf einer Standardverdünnung von allelpositiver DNA eines heterozygoten Individuums beruht, muss bei homozygotem/homozygoter Empfänger/-in zum Erhalt des Empfängerchimärismus der für x errechnete Wert halbiert werden, weil das

spezifische Allel hier in jeder Empfängerzelle zweifach vorhanden ist. Daraus ergibt sich zur Berechnung des Donorchimärismus bei homozygotem/homozygoter Empfänger/-in folgende Formel (Formel 16):

$$\% \text{ Donorchimärismus} = 100 - \frac{e^{\frac{y-9,8743}{-1,439}}}{2}$$

Formel 16: Formel für das Allel rs713753_C zur Berechnung des Donorchimärismus bei gegebenem ΔCq -Wert und bei für das Allel C homozygotem/homozygoter Empfänger/-in.
($y = \Delta Cq$)

3.3.5 Chimärismusberechnung bei Verlaufskontrollen

Bei zweien der 14 typisierten Spender-Empfänger-Paare war das Allel rs713753_C informativ für den Empfängerchimärismus. Davon stand nur bei einem ausreichend DNA aus Verlaufskontrollen zur Verfügung, um eine qPCR des SNP rs713753 vornehmen zu können. Von diesem Paar wurden vier Verlaufskontrollen wie in 2.3.8.4.2 beschrieben mittels qPCR analysiert. Der Empfänger des Paares war heterozygot für das Allel rs713753_C.

In der qPCR aller vier Verlaufskontrollen fand in beiden Ansätzen der lokusspezifischen Referenz eine Amplifikation statt. Der Cq-Wert dieser insgesamt acht Ansätze schwankte zwischen 21,26 und 21,74 (MW 21,49; SD 0,17). Diese geringe Variation entsprach den Erwartungen, da die Quantität der lokusspezifischen Referenz ausschließlich vom Gesamt-DNA-Input abhängt, welcher in allen Ansätzen 100 ng betrug.

Die resultierenden ΔCq -Werte wurden in Formel 15 eingesetzt. Tabelle 27 zeigt die errechneten Werte im Vergleich zu den seinerzeit im Labor per qPCR der Allele SRY und S02 bestimmten Chimärismuswerten. Es ist vorwegzunehmen, dass bei den Verlaufskontrollen 1, 3 und 4 seinerzeit im Labor mit 99,97 %, 99,95 % und 99,99 % Donorchimärismen bestimmt worden waren, die sich im Bereich des LOD des Allels rs713753_C befinden. Bei Verlaufskontrolle 2 wurde seinerzeit ein CC bestimmt. Demnach war in der qPCR des Allels rs713753_C bei keiner der Verlaufskontrollen eine verlässliche Amplifikation zur erwarten.

Tabelle 27: Ergebnisse der Chimärismusbestimmung von Verlaufskontrollen mittels qPCR des Allels rs713753_C. Der Chimärismusgrad wurde anhand der Standardkurvenmethode berechnet und mit den zuvor im Labor mittels qPCR der Allele S02 und SRY berechneten Werten verglichen. Bei Verlaufskontrolle 3 und 4 zeigte sich keine Amplifikation. (x = keine Amplifikation)

Verlaufskontrolle	Routinediagnostik mit S02 und SRY	Experiment mit rs713753	
	Donorchimärismus	Donorchimärismus	Empfängerchimärismus
1	99,97 %	100,00 %	0,00 %
2	100,00 %	99,88 %	0,12 %
3	99,95 %	x	x
4	99,99 %	x	x

Bei Verlaufskontrolle 1 kam es in 2/3 allelspezifischen Ansätzen zur Amplifikation mit relativ hohen Cq-Werten von 45 und 47,75, was ein Zeichen der Amplifikation im Bereich des LOD des qPCR-Ansatzes ist. Nach Einsetzen von ΔCq in die Formel zur Chimärismusbestimmung (vgl. Formel 15) resultierte hier mit 100 % ein CC. Dies geht einher mit dem Fehlen der Amplifikation in 1/3 Ansätzen, welches ebenfalls die Abwesenheit allelpositiver DNA anzeigt. In der Routinediagnostik wurde seinerzeit ein 99,97 %-Donorchimärismus berechnet, also ein Empfängerzellanteil von 0,03 %. Unter Berücksichtigung des in 3.3.3.2 eruierten LOD des Allel rs713753_C von 0,1 % allelpositiver DNA in 100 ng Ausgangs-DNA wäre solch ein Wert nicht nachweisbar, was den nun resultierenden CC erklärt. Bei den positiven Signalen, die dennoch nach > 45 Zyklen in 2/3 Ansätzen detektiert wurden, könnte es sich entweder um unspezifische Amplifikationen (47) handeln oder um spezifische Amplifikationen weniger Kopien allelpositiver DNA, die gemäß Poisson-Verteilung (43) in diesen Ansätzen vorhanden waren und an das LOD heranreichten.

Bei Verlaufskontrolle 2 kam es in nur 1/3 Ansätzen zur Amplifikation mit einem Cq-Wert von 41,67. Aus diesem konnte ein 99,88 %-Donorchimärismus berechnet werden. Seinerzeit war im Labor anhand der Allele SRY und S02 ein CC (100 %) bestimmt worden, was mit dem Fehlen der Amplifikation in 2/3 Ansätzen übereinstimmt. In Anbetracht dessen ist die Aussagekraft des aus dem positiven Ansatz errechneten Vorkommens von 0,12 % Empfängerzellen fraglich (siehe 4.3.4).

Bei Verlaufskontrolle 3 und 4, für die zuvor ein Donorchimärismus von 99,95 % bzw. 99,99 % bestimmt worden war, trat in keinem der Ansätze eine Amplifikation auf. Dies

ist gut vereinbar mit einem LOD von 0,1 % Empfängerzellen bei 100 ng DNA-Input, welches eine Detektion von 5/10.000 bzw. 1/10.000 Zellen nicht ermöglicht.

Sowohl für Verlaufskontrolle 1 als auch für Verlaufskontrolle 2 stellt sich nun die Frage, ob es sich bei den detektierten Signalen tatsächlich um spezifische Amplifikationen des Allels rs713753_C oder um unspezifische Hintergrundsignale handelt. Würde es sich um spezifische Amplifikationen handeln, wären insbesondere bei Verlaufskontrolle 2 die anhand der Allele SRY und S02 gewonnenen Ergebnisse eines CC zu überprüfen. Weitere Experimente sowohl zum LOD des Allels rs713753_C als auch zur Spezifität der eingesetzten Primer könnten darüber Aufschluss bringen. Überdies wäre die Definition eines Cq-Wertes sinnvoll, bis zu dem ein Signal als positiv für das spezifisch Allel zählt, um unspezifische Signale herauszufiltern. Auch hierfür wären weitere Experimente nötig.

Schließlich weist die qPCR des Allels rs713753_C bei den hier durchgeführten Chimärismusbestimmungen eine um eine 10er-Potenz geringere Sensitivität auf als die qPCR der Allele S02 und SRY. Das Allel rs713753_C ist somit in puncto Sensitivität zur Chimärismusbestimmung nicht so gut geeignet wie die bereits im Labor etablierten Allele. Ob dies auch für das Allel rs713753_T gilt, konnte nicht getestet werden, ist aber aufgrund der geringeren Sensitivität, die bei Amplifikation der Verdünnungsreihen in Wasser eruiert wurde, anzunehmen. Um eine definitive Aussage über die klinische Anwendbarkeit machen zu können, sollten weitere Verlaufskontrollen mittels qPCR beider Allele analysiert werden. Dabei sollten sowohl Proben gewählt werden, deren Chimärismusgrad laut vorheriger Bestimmung im Bereich des LOD liegt, als auch Proben mit einem Donorchimärismus zwischen 50 % und 98 %.

4 Diskussion

Die molekulare Chimärismusdiagnostik stellt einen essenziellen Teil der Therapieüberwachung nach HSZT dar. Dabei zählt die Chimärismusquantifizierung mittels qPCR mittlerweile neben der Analyse von STR/VNTR zu den Goldstandards. Sie zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität und eine gute Genauigkeit besonders bei Empfängerzellanteilen von unter 10 % sowie durch eine gute Reproduzierbarkeit aus. Der geringe Zeitaufwand ermöglicht überdies eine hohe Frequenz der Chimärismusuntersuchungen. Zuletzt kann durch eine ausreichend große, an die jeweilige Patientenpopulation angepasste Auswahl von Genorten eine Informativität von über 99 % erreicht werden (9).

Auch an der Uniklinik Würzburg, wo jährlich etwa 100 allogene HSZT durchgeführt werden (55), gehört die Chimärismusdiagnostik mittels qPCR zur täglichen Routine. Dabei wird, je nach verwendetem Allel, eine Sensitivität von 0,1-0,01 % erreicht. Durch den Test von insgesamt 21 Genorten wird in unserem Labor eine Informativität für Empfängerdiskriminierung von ca. 95 % erzielt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Ansätze entwickelt, die Sensitivität und Informativität der qPCR in unserem Labor zu optimieren: Zum einen wurde gezeigt, dass durch Steigerung des DNA-Inputs in die qPCR auf 250 ng die Sensitivität verbessert werden kann, ohne dass eine PCR-Inhibition auftritt. Zur Deckung des dadurch erhöhten DNA-Bedarfs wurde die DNA-Extraktion optimiert, um einen möglichst hohen DNA-Ertrag zu erzielen. Zum anderen wurde zur Erhöhung der Informativität die Anwendbarkeit eines Primersets für den SNP rs713753 evaluiert.

4.1 Verbesserung der DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion aus EDTA-Blut der Patienten/Patientinnen wurde im Labor routinemäßig mit dem QIAamp DNA Blood Mini-Kit durchgeführt. Dabei wurde mit 50 µl AE-Puffer eluiert und bei höherem DNA-Bedarf das Eluat erneut auf die Säule gegeben. Zwar wurden auf diese Weise hohe DNA-Konzentrationen im Eluat erreicht, allerdings fiel der Gesamt-DNA-Ertrag eher gering aus, sodass eine Erhöhung des DNA-Inputs in die qPCR nicht bei allen Proben möglich gewesen wäre. Insbesondere aus Blutproben mit geringer Leukozytenkonzentration, wie sie nach HSZT oft vorliegen, konnte mit der bisherigen Methode nicht genügend DNA gewonnen werden. Aus diesem Grund wurden Extraktionen mit Mini- und Midi-Kit mit jeweils verschiedenen Elutionsmethoden getestet, wie sie in den Handbüchern der Extraktionskits (57, 65) vorgeschlagen werden, und auf ihren Ertrag hin analysiert. Beim Mini-Kit wurden fünf verschiedene Elutionsmethoden

an je vier Blutproben gesunder Probanden/Probandinnen getestet, beim Midi-Kit zwei Elutionsmethoden an je drei Blutproben gesunder Probandinnen/Probanden. Die Anzahl an Extraktionen war zwar zu gering, um statistisch relevante Aussagen treffen zu können, allerdings reichte sie aus, um den Nutzen der verschiedenen Methoden hinsichtlich DNA-Ertrag und -Konzentration abschätzen zu können. Da die Leukozytenkonzentration im Blut der einzelnen Probanden/Probandinnen voneinander abwich, konnten die absoluten Zahlen von Konzentration und Ertrag zwischen den einzelnen Probandinnen/Probanden nicht direkt miteinander verglichen werden, sondern nur die über alle Probandinnen/Probanden gemittelten Werte. Eine bessere Vergleichbarkeit hätte man durch mehrere Extraktionen aus derselben Blutprobe erreicht; die Verwendung verschiedener Proben erlaubte indessen eher eine Generalisierung der Ergebnisse. Eine Schwäche der Methodik lag in der Abmessung des Volumens des finalen Eluats, welches mangels Alternativen nur grob mit einer Pipette abgeschätzt werden konnte.

Die Ergebnisse der Experimente mit dem Mini-Kit stimmten nur teilweise mit den Aussagen im Handbuch (57) überein. Wie erwartet, wurde die maximale Konzentration von durchschnittlich 96,7 ng/ μ l bei Elution mit 100 μ l + Reelution erreicht. Dies beruht auf der Tatsache, dass die DNA durch die doppelte Elution zweimal aus dem Filter gelöst wurde, und zwar in einem relativ geringen Volumen von insgesamt 100 μ l. Der höchste Ertrag hingegen wurde wider Erwarten nicht bei Elution mit 2 x 200 μ l erreicht; er betrug hier durchschnittlich 6,5 μ g. Stattdessen wurde der höchste Ertrag von durchschnittlich 9,0 μ g bei Elution mit 200 μ l + Reelution gewonnen. Nur bei einer von vier Blutproben fiel der Ertrag bei Elution mit 2 x 200 μ l am höchsten aus. Es fiel auf, dass das Eluat bei einer Elution mit 2 x 200 μ l durchschnittlich weniger als halb so konzentriert war wie bei 200 μ l + Reelution, das Gesamtvolumen des Eluats aber nicht doppelt so groß. Erwartet wurden indessen ähnliche Ergebnisse wie beim Midi-Kit, also ein mehr als doppelt so hohes Volumen und eine circa halb so starke Konzentration bei Elution mit 2 x 200 μ l in Vergleich zu 200 μ l + Reelution. Eine Erklärung für diese Divergenz konnte nicht gefunden werden. Da die Konzentrationsunterschiede zwischen den einzelnen Duplikaten teilweise recht hoch waren und fünf Eluate eine schlechte Reinheit aufwiesen, sind Verunreinigungen der Proben nicht auszuschließen. Weitere Extraktionsexperimente könnten darüber Aufschluss geben. Da allerdings bei hohem DNA-Bedarf schließlich die Extraktion mit dem Midi-Kit als bessere Methode evaluiert wurde, war eine Aufklärung der Divergenzen in den Ergebnissen des Mini-Kits nicht weiter relevant.

Beim Midi-Kit entsprachen die Ergebnisse den Erwartungen, beziehungsweise den Angaben im Handbuch (58). Die größte Konzentration von durchschnittlich 107,7 ng/ μ l resultierte bei Elution mit 200 μ l + Reelution, da dabei die DNA in zwei Durchgängen in einem Gesamtvolumen von nur 200 μ l aus dem Filter gelöst wird. Der größte Ertrag in Höhe von 22,3 μ g resultierte bei Elution mit 2 x 200 μ l AE-Puffer, da in einem größeren Volumen auch mehr DNA gelöst werden kann.

Da der durchschnittliche DNA-Ertrag bei Extraktion mit dem Midi-Kit mehr als doppelt so hoch war wie bei Extraktion mit dem Mini-Kit, empfiehlt sich bei hohem DNA-Bedarf die Verwendung des Midi-Kits mit Elution von 2 x 200 μ l AE-Puffer. Zwar wurde hier auch mehr als doppelt so viel Probenvolumen eingesetzt wie beim Mini-Kit, sodass man durch mehrfache Extraktion mit dem Mini-Kit eventuell einen ähnlichen Ertrag erzielen könnte. Dies wäre allerdings arbeitsaufwendiger und würde aufgrund der erhöhten Anzahl an Ansätzen ein größeres Risiko für Pipettierfehler und Verunreinigungen beinhalten. Zudem empfiehlt sich die Verwendung des Midi-Kits bei Proben mit geringer Leukozytenkonzentration, da Probenvolumina bis zu 2 ml eingesetzt werden können (im Gegensatz zu 400 μ l beim Mini-Kit), was mit einer höheren absoluten Leukozytenzahl einhergeht. Benötigt man vergleichsweise geringe DNA-Mengen oder möchte Proben mit hoher Leukozytenkonzentration extrahieren, empfiehlt sich die Extraktion mit dem Mini-Kit und Elution mit 200 μ l + Reelution, da dies kostengünstiger und weniger zeitaufwendig ist (ca. 30 Minuten vs. 50 Minuten).

Sollte auch der Ertrag des Midi-Kits nicht ausreichen, könnte man, wie im Handbuch (58) beschrieben, das Maxi-Kit verwenden, welches am besten für Blutproben mit geringer Leukozytenkonzentration geeignet ist, wie sie beispielsweise nach HSZT gehäuft vorliegen. Laut Beschreibung können damit selbst aus Blutproben, die nur ca. $2,5 \times 10^2$ Leukozyten/ μ l enthalten (Normwert ca. 5×10^3 Leukozyten/ μ l), ca. 16 μ g DNA gewonnen werden. Ein Nachteil des Maxi Kits ist, dass dafür ein Probenvolumen von 10 ml EDTA-Blut benötigt wird, was insbesondere bei Kindern einen limitierenden Faktor darstellt.

4.2 Optimierung des DNA-Inputs in die quantitative Real-Time-PCR

Ein Ansatz zur Optimierung der Sensitivität der Chimärismusdiagnostik in unserem Labor bestand in der Erhöhung des DNA-Inputs in die qPCR (32). Bislang wurde mit dem Einsatz von 100 ng DNA pro Well eine Sensitivität von mindestens 0,1 % erreicht, was dem Nachweis von 1/1.000 Zellen entspricht. Einige Allele ermöglichten zwar den Nach-

weis von 1/10.000 Zellen, allerdings mit abnehmender Reproduzierbarkeit. Vergleichbare Nachweisgrenzen mit den gleichen Allelen erreichten auch andere Autoren (9, 19, 32, 33). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung des DNA-Inputs in die qPCR durchaus einen sicheren Nachweis von 0,01 % Empfängerzellen ermöglicht, ohne dass es zur PCR-Inhibition kommt. Dabei fiel auf, dass die dazu benötigte DNA-Menge abhängig vom gewählten Allel ist.

4.2.1 Methodik

Um den Einfluss des DNA-Inputs auf die qPCR zu evaluieren, wurden Experimente mit artifiziell hergestellten Chimärismen der drei in unserem Labor am häufigsten zur Chimärismusdiagnostik verwendeten Allele S02, S07b und SRY durchgeführt. Durch die Auswahl dieser Allele konnte eine hohe Relevanz für unser Labor gewährleistet werden. Da es um den Einfluss der DNA-Menge auf die Sensitivität der Quantifizierung ging, wurden lediglich Experimente mit artifiziellen 99,90 %- und 99,99 %-Donorchimärismen durchgeführt, sodass keine Aussage über den Einfluss eines höheren DNA-Inputs bei höheren Empfängerzellanteilen gemacht werden kann. Pro Chimärismusgrad und Allel wurden Experimente mit DNA-Input von 100 ng bis 500 ng in 50 ng-Schritten durchgeführt, was eine gute Abschätzung der minimal notwendigen DNA-Menge ermöglichte. Dies ist bei oft limitiertem DNA-Angebot von Vorteil. Das Vorliegen einer Inhibition wurde anhand der Effizienz, genauer anhand des Verhaltens von Cq- und Δ Cq-Werten, und deren Vergleich zwischen den einzelnen DNA-Mengen und Chimärismusgraden ausführlich überprüft. Eine Schwäche der Untersuchung bestand darin, dass für die Allele SRY und S07b jeweils nur zwei Experimente und für das Allel S02 mangels ausreichender DNA-Proben nur ein Experiment ausgeführt werden konnte, sodass eine Aussage über die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse nur eingeschränkt möglich ist. Zudem wurde aus DNA-Mangel pro Triplikate eines spezifischen Allels nur ein Ansatz auf das Referenzgen HCK getestet, sodass Pipettierfehler bei HCK-Ansätzen nicht durch Bildung eines Cq-Mittelwertes minimiert werden konnten.

Um verlässlichere Aussagen über die Präzision der Chimärismusbestimmung zu gewährleisten, wurden zur Errechnung des Chimärismusgrades anhand der Cq-Werte und der in der Routinediagnostik etablierten Formeln nur Ansätze mit Standardabweichung der Triplikate unter 1,5 herangezogen. Dieser Cut-Off ist im Vergleich zu anderen Autoren relativ hoch (9), jedoch ist eine Zunahme der Cq-Standardabweichung im Bereich

der Detektionsgrenze nicht unüblich (32), unter anderem aufgrund der vorliegenden Poisson-Verteilung geringer Kopienzahlen (43).

Im Hinblick auf die Methodik ist weiterhin zu diskutieren, ob die Herstellung von Standardreihen mittels Leukozytenisolation und Zellzählung (siehe 2.3.5.1) eventuell durch eine genauere Methode ersetzt werden könnte. Anlass für diese Überlegung war unter anderem die Beobachtung, dass die Höhe der berechneten Chimärismuszerte vor allem beim artifiziellen 99,99 %-Donorchimärismus zwischen den einzelnen Experimenten mehr variierte als innerhalb eines Experiments. Als Ursache wären Ungenauigkeiten in der Herstellung der Standardreihen nicht auszuschließen, da es sich um eine vergleichsweise komplexe Methode handelt (siehe 2.3.5.1). Vor allem bei der Zellzählung und beim Verdünnen und Mischen der Leukozyten sind Ungenauigkeiten schwer zu vermeiden (32). Masmias et al. (32) sprachen aus diesem Grund von einer begrenzten Aussagekraft des so hergestellten artifiziellen 0,01 %-Chimärismus und legten die Sensitivität ihres qPCR-Ansatzes auf 0,1 % fest. Es ist zu überlegen, die Standardreihen in zukünftigen Experimenten auf gleiche Weise herzustellen wie in den Experimenten für den SNP rs713753 (siehe 2.3.8.2); sprich, die DNA der Probanden/ Probandinnen erst nach der Extraktion im gewünschten Verhältnis zu mischen.

4.2.2 Einfluss auf Nachweisgrenze und Sensitivität der qPCR

Die Ergebnisse der Experimente zeigten, dass die Erhöhung des DNA-Inputs durchaus zu einer besseren Sensitivität der qPCR führt, wobei allelspezifische Unterschiede festgestellt wurden. Zum Erreichen einer Nachweisgrenze von 0,01 % Empfängerzellen genügten beim Allel SRY schon 100 ng DNA, beim Allel S07b hingegen waren 150 ng DNA und beim Allel S02 sogar 250 ng DNA erforderlich. Zwar kam es auch bei Letzteren in einigen Wells mit geringerem DNA-Input zur Amplifikation, allerdings war diese aufgrund sehr hoher Standardabweichung ($SD > 1,5$), sehr hoher Cq-Werte oder des Vorliegens einer Amplifikation in lediglich 1/3 Ansätzen eines Triplikats zu ungenau für eine Quantifizierung. Eine Nachweisgrenze von 0,1 % allelpositiver Zellen wurde bei den Allelen SRY und S07b mit 100 ng DNA erreicht, beim Allel S02 erst mit 200 ng DNA. Ähnliche Nachweisgrenzen und allelspezifische Unterschiede wurden auch von anderen Autoren dargelegt (9, 33, 36, 47). Alizadeh et al. (33) beschreiben bei einem DNA-Input von 250 ng eine Sensitivität von mindestens 0,1 %, je nach Allel auch bis zu 0,05 %. Willasch et al. (36) weisen sogar explizit eine höhere Sensitivität des Allels S07b gegenüber dem Allel S02 nach. Insgesamt erreichten sie eine Sensitivität von mindestens

0,1 % bei einem DNA-Input von nur 25 ng. Dies ist insofern mit unseren Ergebnissen kompatibel, da eine Vervielfachung des DNA-Inputs um eine 10er-Potenz auch zur Erhöhung der Sensitivität um eine 10er-Potenz führt (9), wonach ein DNA-Input von 250 ng in einer Sensitivität von 0,01 % resultiert. Diese Tatsache wurde auch von Maas et al. (9) konstatiert, die das Detektionslimit zwischen 50 ng und 500 ng DNA-Input verglichen. Sie erreichten mit 500 ng DNA-Input je nach Allel eine Sensitivität von 0,01-0,09 %.

Dass die qPCR des Allels S02 in unseren Experimenten deutlich schlechtere Ergebnisse erbrachte als die der Allele SRY und S07b ist diskutabel. Zwar scheint es plausibel, dass 250 ng DNA-Input nötig sind, um eine Sensitivität von 0,01 % zu erreichen; Auch Willasch et al. berichteten von einer schlechteren Sensitivität des Allels S02 im Vergleich zu anderen Allelen (36). Jedoch weist die Tatsache, dass sowohl beim artifiziellen 99,99 %- als auch beim 99,90 %-Chimärismus erst ab 200 ng DNA-Input eine Amplifikation von HCK detektiert wurde, zusätzlich auf einen Fehler in der Durchführung des Experiments hin, da die Amplifikation von HCK unabhängig vom gewählten spezifischen Allel passieren sollte. Zudem traten auch bei höherem DNA-Input teilweise hohe Standardabweichungen der allelspezifischen Cq-Werte von S02 auf. Um eine valide Aussage über die Sensitivität und den nötigen DNA-Input des Allels S02 machen zu können, sollte das Experiment wiederholt werden.

Bei Bewertung unserer Ergebnisse und beim Vergleich mit denen anderer Autoren muss außerdem beachtet werden, dass das jeweils getestete Allel in allen fünf Experimenten nur in hemi- bzw. heterozygoter Form vorlag: SRY und S02 liegen auf dem Y-Chromosom, sodass sie per se nur in hemizygoter Form vorliegen. S07b liegt auf dem X-Chromosom, kann also bei Frauen auch in homozygoter Form vorliegen. Unsere Probandin war zwar weiblich, wurde allerdings auch positiv auf das Allel S07a getestet; unter Berücksichtigung der Tatsache, dass es sich um einen biallelischen Polymorphismen handelt, lag hier also Heterozygotie und somit nur eine Kopie des Allels S07b pro Chromosomensatz vor. Dies bedeutet, dass bei einem DNA-Input von 100 ng und einem Empfängerzellanteil von 0,01 % nur ca. 1,5 Kopien des getesteten Allels pro Ansatz vorliegen. In Anbetracht der Poisson-Verteilung geringer Kopienzahlen ist es nicht verwunderlich, dass selbst bei qPCR des Allels SRY, welche in unseren Experimenten die höchste Sensitivität erreichte, bei 100 ng DNA-Input eine Amplifikation in nur 2/3 Ansätzen und mit Cq-Werten > 40 auftrat. Da bereits häufiger beobachtet wurde, dass es in späteren Zyklen zu spontanen Signalmessungen kommen kann (47), die mit spezifischen Amplifikationen in späten Zyklen verwechselt werden könnten, ist hier das Risiko

falsch-positiver Ergebnisse zu beachten. Dies ist umso relevanter angesichts der Tatsache, dass eine Kontamination einer Probe aus Knochenmark oder peripherem Blut mit autologen Zellen (z. B. Endothel- und Stromazellen) nur schwer vermeidbar ist (19). Das davon ausgehende Signal kann folglich nicht vom spezifischen Signal unterschieden werden, das von der DNA von nur ein bis zwei malignen autologen Zellen ausgeht. Bei einem DNA-Input von 250 ng liegen statistisch gesehen 3,75 Allelkopien pro Well vor, was eine etwas präzisere Amplifikation zulässt, aber immer noch ein relativ hohes Risiko falsch-positiver Signale birgt. Nichtsdestotrotz erreicht unser qPCR-Ansatz eine höhere Sensitivität als der von Alizadeh et al. (33), die eine Nachweisgrenze von 37 Allelkopien beschrieben. Angesichts dieser hohen Sensitivität und des damit einhergehenden Risikos falsch-positiver Ergebnisse empfiehlt sich für die klinische Routine die Definition eines Schwellenwertes, der die Diagnose eines MC zulässt, um unnötige therapeutische Interventionen aufgrund eines Rezidivverdachts zu vermeiden (19). Einige Autoren definieren beispielsweise den CC, bei dem keine therapeutische Konsequenz folgt, als autologen Restanteil von weniger als 0,01 % (19). Dieser klinische Aspekt war jedoch nicht Thema dieser Arbeit und soll hier nicht weiter diskutiert werden.

4.2.3 Grenzen einer qPCR-Optimierung durch Erhöhung des DNA-Inputs

Die Sensitivität des qPCR-Assays ist unter anderem dadurch begrenzt, dass eine einzige Allelkopie schwierig zu pipettieren und detektieren ist (20, 32). Um trotz Poisson-Verteilung eine verlässliche Detektion einer Kopie zu gewährleisten, wäre eine große Anzahl an Replikaten nötig (43), was in der klinischen Routinediagnostik mit einem erhöhten Material- und Zeitaufwand einhergeht. Überdies kann der DNA-Input nicht endlos erhöht werden. Geht man von einer Sensitivität von 0,01 % (bzw. 3,75 Allelkopien) bei 250 ng DNA-Input aus, so würde eine Steigerung des DNA-Inputs auf 500 ng – was laut unseren Ergebnissen durchaus ohne PCR-Inhibition möglich wäre – die Nachweisgrenze lediglich auf 0,005 % erhöhen. Inwiefern jedoch eine solche Steigerung klinische Konsequenzen mit sich bringt, ist die Frage, nicht zuletzt, weil sie eine erhöhte Rate falsch-positiver Ergebnisse und somit eine Übertherapie bewirken könnte (20).

Ein Vorteil eines DNA-Inputs von 500 ng wäre theoretisch ein exakterer Nachweis von 0,01 % Empfängerzellen, da die Quantifizierung einer Ausgangsmenge von 7,5 Allelkopien sicherer scheint als von 3,75 Allelkopien. Unsere Experimente zeigten jedoch, dass ab einer DNA-Menge von 250 ng eine Erhöhung der DNA-Menge bei keinem der getesteten Allele zu einer Steigerung der Präzision der Chimärismusbestimmung führte.

Somit überwiegt beim Einsatz von 500 ng DNA der Nachteil eines höheren DNA-Verbrauchs. Zudem beschrieben einige Autoren (32, 36) das Risiko eines hohen Hintergrundsignals bei steigendem DNA-Input, dessen Überschneidung mit dem Signal der spezifischen Amplifikation die Sensitivität einschränkt. Auch Maas et al. (9) konstatierten, dass eine Erhöhung der DNA-Menge auf 500 ng nur bei entsprechend geringen Hintergrundsignalen möglich ist. Masmias et al. (32) stellten zwar keinen Unterschied der Hintergrundsignale zwischen dem Einsatz von 100 ng und 300 ng DNA fest, nannten diese jedoch als einen der Hauptgründe für die Begrenzung des LOD. In unseren Experimenten wurde das Vorhandensein von Hintergrundsignalen zwar nicht speziell mittels einer Negativkontrolle überprüft, allerdings konnte in keinem der Experimente mit 0,01 % Empfängerzellen eine Überschneidung der Signale von Basislinie und spezifischer Amplifikation beobachtet werden. Auch eine Inhibition durch erhöhte DNA-Mengen konnte in dieser Arbeit in keinem der Experimente festgestellt werden, obgleich einige Autoren diese als limitierenden Faktor der DNA-Erhöhung sehen (32). Was die Reproduzierbarkeit betrifft, so ist auch diese laut Willasch et al. (36) bei einem Anteil allelpositiver DNA unter 5 % unabhängig von der DNA-Menge.

4.2.4 Einfluss auf Präzision und Sensitivität der Quantifizierung

Obwohl die Sensitivität der qPCR selbst durch einen DNA-Input von 250 ng auf 0,01 % gesteigert werden kann, scheint die Sensitivität des gesamten Assays zur Chimärismusbestimmung mittels qPCR der Allele S02, S07b und SRY eher etwas schlechter zu sein: Bei Quantifizierung der artifiziellen Chimärismen durch Einsetzen der gewonnenen ΔC_q -Werte in die im Labor etablierten Formeln wurde bei 22/34 Ansätzen des artifiziellen 99,99 %-Donorchimärismus – unabhängig vom DNA-Input – ein CC errechnet. Eine präzise Quantifizierung von 0,01 % Empfängerzellen war demnach in diesen Experimenten nicht möglich. Beim artifiziellen 99,90 %-Donorchimärismus wurde der Empfängerzellanteil ebenfalls eher unterschätzt: 66 % der errechneten Werte lagen über 99,95 %; auch hier zeigte sich keine Abhängigkeit vom DNA-Input. Diese in insgesamt über 62,7 % der Experimente auftretende Unterschätzung des Empfängerzellanteils könnte Ausdruck der Sensitivitätsgrenze des Assays sein oder auch auf Ungenauigkeiten bei Herstellung der artifiziellen Chimärismen mittels Leukozytenisolation beruhen. Wie zuvor erwähnt ist zu hinterfragen, wie genau hierbei ein 0,01 %-Chimärismus pipettiert werden kann und wie groß die Aussagekraft der Experimente mit den auf diese Weise hergestellten artifiziellen 99,99 %-Donorchimärismen ist (32, 44). Ein Vergleich mit der in 2.3.5.2 beschriebenen Methode zur Herstellung von Standardreihen ist zu empfehlen.

Da sich allerdings keine Abhängigkeit der berechneten Chimärismuswerte vom DNA-Input zeigte, wurde die Ursache dieses verminderten LOQ an dieser Stelle nicht weiter untersucht.

Die klinische Relevanz eines solchen Sensitivitätsdefizites ist diskutabel und unter anderem abhängig von der jeweiligen Grunderkrankung und dem entsprechenden Grenzwert, ab dem eine Behandlung vorgesehen ist. Zwar könnte eine Unterschätzung des Empfängerzellanteils dazu führen, dass eventuelle Rezidive zu spät erkannt werden; andererseits könnte sie – insbesondere in Donorchimärismus-Bereichen zwischen 99,99 % und 100 % – vor einer möglichen Übertherapie schützen, zumal immer auch eine Kontamination durch andere Empfängerzellen in Erwägung gezogen werden muss (36). Im Bereich eines 99,90 %-Donorchimärismus wäre die klinische Relevanz einer Unterschätzung des Empfängerzellanteils größer als im Bereich eines 99,99 %-Donorchimärismus. Nicht selten wird jedoch erst ab einem Empfängerzellanteil über 0,1 % (19, 22) von einem behandlungsbedürftigen MC gesprochen, womit die eindeutige Unterscheidung zwischen einem 99,90 %- und einem 99,99 %-Donorchimärismus an Relevanz verliert. Wichtiger im Hinblick auf die frühzeitige Diagnose eines Rezidivs ist wohl die Evaluation der Chimärismuswerte im zeitlichen Verlauf (9, 11).

4.2.5 Fazit zum DNA-Input

Trotz der Unklarheit bezüglich des Allels S02 kann im Hinblick auf die Ergebnisse zusammenfassend empfohlen werden, die Chimärismusdiagnostik künftig mit einem DNA-Input von 250 ng durchzuführen, sofern ausreichend DNA vorhanden ist. Dies ermöglicht eine zuverlässigere Detektion von 0,01 % allelpositiver Zellen und reduziert das Risiko falsch-positiver Ergebnisse durch Vermischung des spezifischen Signals mit unspezifischen Hintergrundsignalen. Um den DNA-Bedarf dennoch zu minimieren, könnte man zwischen homozygoten und hetero- bzw. hemizygoten Empfängerinnen/ Empfängern unterscheiden: Handelt es sich um eine homozygote Empfängerin/einen homozygoten Empfänger, würde man mit halb so viel Ausgangs-DNA die gleiche Sensitivität erreichen. Theoretisch könnte man den DNA-Input auch an die jeweilige Sensitivität der einzelnen Allele anpassen. Dies scheint jedoch für den klinischen Alltag zu kompliziert. Bei allen Experimenten zur Erhöhung der Sensitivität bleibt die klinische Relevanz zu berücksichtigen. Die Definition eines Schwellenwertes zur Diagnose eines CC bzw. MC scheint sinnvoll, um insbesondere bei sehr hoher Sensitivität falsch-positive Ergebnisse herauszufiltern. Fehse et al. (22) beispielsweise sprachen schon bei weniger

als 0,1 % Empfängerzellen von einem CC und Willasch et al. konnten noch mit einer Grenze zum MC von 0,5 % alle Patientinnen/Patienten herausfiltern, die anschließend rezidiert sind (19). Zuletzt ist die Dynamik der Chimärismuswerte aussagekräftiger, als eine Steigerung der Sensitivität von 0,1 % auf 0,01 % (9, 11).

Natürlich wird die Sensitivität der qPCR nicht nur durch den DNA-Input, sondern auch maßgeblich durch die Primerauswahl und die PCR-Bedingungen (wie beispielsweise die Mastermix-Zusammensetzung, die Primerkonzentration und die Annealingtemperatur) beeinflusst (32, 47). Diese Faktoren tragen dazu bei, dass verschiedene Autoren für eine qPCR-Amplifikation der gleichen Allele leicht abweichende Sensitivitäten konstatierten (32, 33, 36). Gleichzeitig bieten diese Faktoren einen Ansatz für weitere Optimierungen des qPCR-Ansatzes. So konnten beispielsweise Masmias et al. (32) die Sensitivität durch Justierung von Primerkonzentration und Annealingtemperatur unter Minimierung des Hintergrundsignals verbessern. Auch in unserem Labor könnte im Rahmen zukünftiger Arbeiten versucht werden, Sensitivität und Spezifität der Chimärismusdiagnostik mittels Optimierung zuvor genannter Faktoren zu erhöhen.

4.3 Anwendbarkeit des „Single Nucleotide Polymorphism“ rs713753

Bisher waren in unserem Labor zur Chimärismusdiagnostik 21 Genorte etabliert, die mittels qPCR amplifiziert werden können. Dabei handelt es sich um einige der von Alizadeh et al. publizierten „short-sized polymorphisms“ (33) und der von Maas et al. (9) publizierten SNPs, welche aufgrund ihrer Informativität für unsere Patientenpopulation und der mit unserem qPCR-Ansatz erreichten Sensitivität ausgewählt wurden. Allerdings konnte mittels dieser 21 Genorte lediglich eine Gesamtinformativität von ca. 95 % für Empfängerdiskriminierung erreicht werden, sodass die Chimärismusanalyse bei ca. 5 % der in Würzburg stammzelltransplantierten Patienten/Patientinnen in einem externen Labor durchgeführt werden musste. Um dies zu vermeiden, wurden im Rahmen dieser Arbeit neue Genorte getestet. Dazu wurde ein von Gineikiene et al. (25) beschriebener SNP ausgewählt und auf Allelfrequenz und Informativität in unserer Population getestet. Überdies wurden Effizienz, Nachweisgrenze und Sensitivität des auf der ARMS-Technologie basierenden Primersatzes für die qPCR des gewählten SNP evaluiert.

Zur Auswahl neuer Genorte wurde aus verschiedenen Gründen auf die Publikation von Gineikiene et al. (25) zurückgegriffen: Erstens beschreiben sie die publizierten SNPs als sinnvolle Ergänzung zur Erhöhung der Informativität des von Alizadeh et al. (33)

vorgeschlagenen Genpanels. Zweitens arbeiten sie mit einer Quantifizierungsmethode, bei der auf die regelmäßige Herstellung von Standardkurven allelpositiver in allelnegativer DNA verzichtet werden kann. Zuletzt verwenden sie zur Normalisierung der DNA-Menge eine lokusspezifische Referenz anstelle eines Haushaltsgens, was mit zusätzlichen Vorteilen einhergeht (siehe 4.3.5). Von den sieben von Gineikiene et al. (25) publizierten SNPs wurde der biallelische SNP rs713753 auf Chromosom 22q13 gewählt, da dessen Allele mit 30 % und 23 % die höchste Informativität unter den sieben SNPs aufwiesen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die qPCR des SNP rs713753 aufgrund einer guten qPCR-Effizienz und akzeptablen Informativität prinzipiell für die Chimärismusdiagnostik geeignet wäre. Angesichts der Eigenschaft von ARMS-Primern, grundsätzlich höhere Cq-Werte zu generieren, ist jedoch nicht auszuschließen, dass sich mit ihnen selbst bei Steigerung des DNA-Inputs nicht die gleiche Sensitivität erreichen ließe wie mit „perfectly matched primers“, wie sie beispielsweise für die von Alizadeh et al. (33) publizierten „short-sized polymorphisms“ verwendet werden. In diesem Fall wäre es dennoch vorstellbar, den SNP rs713753 in der Routinediagnostik in die Gruppe der vier anderen bereits etablierten SNPs einzuordnen und ihn nur zu testen, wenn sich kein anderes Allel informativ zeigt. Schließlich nutzten Gineikiene et al. selbst die sieben SNPs zur Ergänzung der bis dahin verwendeten „short-sized polymorphisms“ (25) und konnten so die Informativität für ihre Population von 86,6 % auf 96,6 % steigern.

4.3.1 Allelfrequenz und Informativität

Im Gegensatz zu Gineikiene et al. (25) führten wir die qPCR zur Typisierung nicht mit 100 ng DNA-Input, sondern mit 10 ng DNA-Input durch. Dies hatte zur Folge, dass der Cq-Bereich positiver Proben mit Werten zwischen 32 und 39 zu höheren Werten verschoben war. Angesichts der theoretischen Cq-Verschiebung um 3,3 bei Veränderung des DNA-Inputs um ein 10-faches ist dies in etwa kompatibel mit den Ergebnissen von Gineikiene et al. (25), die Cq-Werte zwischen 25 und 36 erhielten. Sollte der SNP rs713753 zukünftig in unserem Labor etabliert werden, wäre eine Durchführung der Typisierung mit 10 ng DNA-Input ausreichend und sinnvoll, da Proben von Patienten/Patientinnen vor allogener HSZT ohnehin oft nur eine geringe DNA-Konzentration aufweisen und mit Cq-Werten bis 39 eine verlässliche Typisierung möglich ist.

Es wurden zwölf gesunde Probanden/Probandinnen sowie 14 Spender-Empfänger-Paare, also insgesamt 40 Personen, auf den biallelischen SNP rs713753 typisiert. Die

Heterozygotenfrequenz betrug 42,5 %. Die ist insofern relevant, als die Informativität eines SNP mit seiner Heterozygotenfrequenz steigt (9). Im Vergleich zu den von Maas et al. (9) publizierten SNPs mit einer Heterozygotenfrequenz von 42-55 % ist der SNP rs713753 demnach in unserer Population in puncto Informativität eher mäßig geeignet zur Chimärismusdiagnostik. Bei Betrachtung der einzelnen Allelfrequenzen ergibt sich eine ähnliche Schlussfolgerung: Zum Erreichen einer hohen Informativität wären Allelfrequenzen von 0,4-0,6 optimal (25, 66). In der hier getesteten Population liegen die Allelfrequenzen mit 0,34 für das Allel C und 0,66 für das Allel T leicht außerhalb dieses optimalen Bereichs. Sie weichen zudem von den Daten des „Allele Frequency Aggregator“(ALFA)-Projekts (67) ab, welches für die europäische Bevölkerung eine Frequenz von 0,41 für das Allel C und von 0,59 für das Allel T angibt. Diese Abweichungen können einestteils von der relativ geringen Größe unserer Stichprobe herrühren. Andernteils muss beachtet werden, dass es auch innerhalb Europas verschiedene Subpopulationen gibt. So erwiesen sich beispielsweise die von Maas et al. (9) publizierten SNPs als wenig geeignet für die Studienpopulation von Gineikiene et al. (25). Die Informativität des SNP rs713753 für unser Patientenkollektiv wurde anhand der 14 Spender-Empfänger-Paare evaluiert. Erstaunlicherweise war die individuelle Informativität für Spender- und Empfängerdiskriminierung der Allele höher als bei Gineikiene et al. (25): Diese beschrieben eine Informativität von 30 % für das Allel C und von 23 % für das Allel T, wohingegen sich bei unseren 14 Paaren eine Informativität von 43 % für das Allel C und von 36 % für das Allel T ergab. Laut Maas et al. (9) weist jeder SNP mit hoher Heterozygotenfrequenz eine Informativität von 30 % - 50 % auf – dies trifft also auch auf den SNP rs713753 zu. Allerdings handelt es sich hierbei um Informativität für Spender- oder Empfängerdiskriminierung. Für unser Labor ist zur Chimärismusdiagnostik nach HSZT hauptsächlich die Empfängerdiskriminierung relevant: Hierfür ergab sich für das Allel C eine Informativität von 14 % und für das Allel T von 21 %. Zwar wurde mit nur 14 Paaren eine Vergleichsweise geringe Stichprobe getestet und das Testen weiterer Paare wäre durchaus sinnvoll, allerdings scheinen die Ergebnisse akzeptabel hinsichtlich einer klinischen Anwendbarkeit, da mit beiden Allelen gemeinsam eine Empfängerdiskriminierung bei mehr als einem Drittel der Paare möglich war (35,7 %). In puncto Informativität ist der SNP rs713753 also durchaus geeignet, die 21 Genorte, die in unserem Labor bereits etabliert sind, zu ergänzen. Allerdings bleibt zu überprüfen, ob er bei den 5 % der Spender-Empfänger-Paare, für die bisher in unserem Labor kein passender Genort gefunden werden konnte, eine Empfängerdiskriminierung zulässt.

4.3.2 Effizienz, Bestimmtheitsmaß und Sensitivität – Standardverdünnungen in Wasser

Für die Tauglichkeit eines Primersatzes zur Chimärismusdiagnostik ist weiterhin die jeweilige qPCR-Effizienz relevant, welche aus Standardverdünnungen in Wasser errechnet wurde.

Sowohl die Standardkurven der spezifischen Allele als auch die der internen Referenz zeigten eine gute Reproduzierbarkeit. Auch R^2 lag bei allen Kurven zwischen 0,99 und 1. Eine Schwäche der Daten liegt jedoch in der Tatsache, dass zwar Verdünnungen über sechs Log-Stufen hergestellt wurden, die Standardreihen aber lediglich aus den drei höchsten Stufen 1:1 bis 1:100 kalkuliert wurden, da das Allel T nur eine geringe Sensitivität aufwies; damit war eine lineare Korrelation zwischen Cq-Wert und Anteil allelpositiver DNA nur bis zur Stufe 1:100 gegeben. In den stärker verdünnten Stufen des Allels T trat entweder keine Amplifikation auf oder lediglich eine Amplifikation mit Cq-Werten über 44 und sehr hoher Standardabweichung. Um die Kurven der Allele und der lokusspezifischen Referenz vergleichbar zu halten, wurden bei Erstellung der Standardkurven des Allels C und der Referenz ebenfalls nur die Stufen 1:1 bis 1:100 einbezogen. Zum Vergleich wurden jedoch für das Allel C und die lokusspezifische Referenz Standardkurven aus vier Log-Stufen erstellt (siehe Appendix V); diese generierten vergleichbare Werte.

Trotz der dadurch eingeschränkten Aussagekraft der Standardkurven konnte eine orientierende Evaluation der Effizienzen vorgenommen werden. Dabei gilt eine Effizienz von 1, also eine Verdoppelung der Kopienzahl pro Zyklus in der exponentiellen Phase, als ideal. Zudem ist bei Normalisierung mittels Referenzgen eine hohe Vergleichbarkeit der Effizienzen von spezifischem Allel und Referenz essenziell. Laut Gineikiene et al. liegt diese bei $\Delta E \leq 0,1$ vor (25). Anhand unserer Standardkurven wurde für das Allel C eine Effizienz von 1,02, für das Allel T eine Effizienz von 0,87 und für die lokusspezifische Referenz eine Effizienz von 0,96 kalkuliert. Die qPCR-Effizienzen des Allels C und der Referenz sind folglich beide nahezu optimal und mit einer Differenz von 0,06 durchaus vergleichbar. Die qPCR-Effizienz des Allels T hingegen ist grenzwertig, gleiches gilt für die Differenz von 0,09 zur qPCR-Effizienz der Referenz.

Die genannten Unterschiede in Effizienz und Sensitivität projizieren sich auch auf die Schnittpunkte der Standardkurven mit der Y-Achse. Diese geben den theoretischen, interpolierten Cq-Wert bei einer Ausgangsmenge von einer Allelkopie wieder und

werden von Effizienz und Sensitivität beeinflusst: Je besser Effizienz und Sensitivität, desto geringer ist der Schnittpunkt mit der Y-Achse. Für die lokusspezifische Referenz liegt der Schnittpunkt bei 36,33, für das Allel C bei 43,96 und für das Allel T bei 48,91. Eine Differenz zwischen der lokusspezifischen Referenz und den spezifischen Allelen war zu erwarten, da es sich beim Forward-Primer der Referenz um einen „perfectly matched primer“ ohne Fehlpaarung handelt, bei den allelspezifischen Primern hingegen um ARMS-Primer mit Fehlpaarungen am 3'-Ende, welche zu einer Abnahme der Effizienz der Taq-DNA-Polymerase bei der Elongation führen (68). Dies führt ähnlich einer PCR-Inhibition zu einer geringeren Sensitivität und zu höheren Cq-Werten, was auch Gineikiene et al. beobachteten (25). Der Unterschied zwischen den Kurven der spezifischen Allele, deren Forward-Primer beide zwei Fehlpaarungen am 3'-Ende aufweisen, ist Zeugnis einer besseren Sensitivität und Effizienz der qPCR des Allels C gegenüber der des Allels T.

Die qPCR des Allels rs713753_T wies folglich nicht nur eine mäßige Effizienz, sondern auch eine mäßige Sensitivität auf mit einer Detektionsgrenze von 300 Allelkopien in Wasser. Somit ist sie zur Chimärismusdiagnostik weniger gut geeignet, da unerwünschte Ereignisse im Vergleich zu den bereits bei uns etablierten qPCR-Ansätzen erst später detektiert würden. Die qPCR des Allels C wies neben einer besseren Effizienz und einem geringeren ΔE auch eine bessere Sensitivität auf; hier konnten 15 Allelkopien in Wasser nachgewiesen werden.

4.3.3 Nachweisgrenze – Standardreihen allelpositiver in allelnegativer DNA

Aussagekräftiger in Hinblick auf die Nachweisgrenze sind die artifiziell hergestellten Chimärismen in Form von Standardreihen allelpositiver in allelnegativer DNA. Diese konnten nur für das Allel C hergestellt werden, da unter den getesteten gesunden Probanden/Probandinnen keine/-r negativ für das Allel T war. Zur Evaluation der Nachweisgrenze des Allels T sollten also weitere Experimente durchgeführt werden. Überdies konnten für die Standardverdünnungen des Allels C nur heterozygote DNA-Proben gewonnen werden. Zwar kann die Chimärismusanalyse bei heterozygoten Patienten/Patientinnen vorgenommen werden, dennoch wären zur vollständigen Evaluation des Ansatzes weitere Experimente mit homozygoten Probanden/Probandinnen sinnvoll.

Die Standardreihen wurden wie bei Gineikiene et al. (25) mit einem Gesamt-DNA-Input von 100 ng amplifiziert. Es ergab sich ein LOD von 0,1 %, was ca. 15 Allelkopien

entspricht. Da hier recht hohe Cq-Werte bis 44 mit hohen Standardabweichungen (> 2) auftraten, welche keine genaue Quantifizierung erlaubten, wurde zusätzlich ein LOQ von 1 % bzw. ca. 150 Allelkopien definiert. Gineikiene et al. ermittelten auf die gleiche Weise eine Detektionsgrenze von 0,1 % homozygoter allelpositiver DNA. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen war ihnen auch eine Quantifizierung von bis zu 0,1 % allelpositiver DNA möglich (25). Dieser Unterschied könnte dadurch begründet sein, dass unsere Standardreihen mit heterozygoter DNA hergestellt wurden, sodass pro Ansatz jeweils nur halb so viele DNA-Kopien enthalten waren wie bei Gineikiene et al. Es ist nicht auszuschließen, dass mit unserem Ansatz bei Standardreihen mit homozygoter DNA ebenfalls ein LOQ von 0,1 % (bzw. 30 Allelkopien) erreicht werden könnte. Dies bleibt zu überprüfen. Ein exakter Vergleich unserer Ergebnisse mit denen von Gineikiene et al. ist aufgrund der abweichenden PCR-Bedingungen ohnehin nicht möglich. Geringe Differenzen in der Sensitivität können zudem durch populationsbezogene Unterschiede bedingt sein (21, 47).

Im Vergleich zu den im Labor etablierten, von Alizadeh et al. (33) publizierten „short-sized polymorphisms“ liegt bei qPCR des Allels rs713753_C ein schlechteres LOD vor. In den unter 3.2 beschriebenen Standardreihen der Allele SRY und S07b, welche ebenfalls beide aus hemi- bzw. heterozygoter DNA hergestellt wurden, wäre bei 100 ng Gesamt-DNA gemäß CLSI (64) eine verlässliche Quantifizierung noch bis 0,1 % allelpositiver DNA möglich gewesen. Die Cq-Werte dieser Chimärismusstufe der Allele SRY und S07b waren kleiner (35-40 versus 38,9-43,9) und wiesen deutlich geringere Standardabweichungen auf als die der gleichen Stufe des Allels rs713753_C. Es ist davon auszugehen, dass dieser Unterschied vorwiegend auf der generell schlechteren Sensitivität von ARMS-Primern im Vergleich zu „perfectly matched primern“ beruht, was bereits von Gineikiene et al. beobachtet wurde (25).

Dafür spricht zudem, dass in unserem Labor auch die qPCR der von Maas et al. (9) publizierten SNPs HAI A-C, ICAMI A, ICAMI C und PECAMI C eine geringere Sensitivität aufweist als die der verwendeten „short-sized polymorphisms“ (33). Die Primer für die genannten SNPs beinhalten ebenfalls zwei Fehlpaarungen am 3'-Ende (9) und führen somit zu höheren Cq-Werten. Darum werden diese SNPs in unserem Labor nur zur Chimärismusdiagnostik verwendet werden, wenn sich keines der anderen Allele als informativ erweist. Maas et al. (9) selbst erreichten eine Sensitivität von 0,01-0,09 % nur bei einem DNA-Input von 500 ng. Angesichts dieses DNA-Inputs bleibt zu eruieren, ob eine solche Sensitivität auch mit qPCR des Allels rs713753_C erreicht werden könnte,

wenn der DNA-Input entsprechend erhöht wird. Immerhin wurde auch in den Experimenten mit den Allelen SRY, S07b und S02 (siehe 3.2.1) einzig beim Allel SRY eine Detektionsgrenze von 0,01 % bei nur 100 ng DNA-Input erreicht. Es ist durchaus vorstellbar, dass eine Erhöhung des DNA-Inputs in die qPCR des SNP rs713753_C die Sensitivität genauso steigern würde, wie es für die qPCR der Allele S07b und S02 beobachtet wurde. Dies sollte in weiteren Experimenten getestet werden. Hierbei sollten Negativkontrollen mit 100 % allelnegativer DNA mitgeführt werden, um unspezifische Amplifikationen insbesondere des nicht-komplementären Allels zu kontrollieren (9). Diese hängt von der Spezifität der Primer und der DNA-Gesamtmenge ab (69), sodass eine Zunahme unspezifischer Amplifikation bei steigender DNA-Menge (und ohnehin vorhandener Fehlpaarungen am 3'-Ende der Primer) nicht unwahrscheinlich ist.

Über LOD und LOQ der qPCR des Allels T kann wie erwähnt keine Aussage gemacht werden. Allerdings ist in Anbetracht der schlechten Sensitivität und Effizienz bei der Verdünnungsreihe in Wasser nicht auszuschließen, dass beide Parameter schlechter ausfallen würden als beim Allel C, zumal eine geringere Effizienz mit einer schlechteren Sensitivität und Nachweisgrenze einhergeht (43). Dies bleibt jedoch zu überprüfen.

Aufgrund der aufgeführten Nachteile der ARMS-Mismatch-Primer sollte erwogen werden, zur Ergänzung unseres Genpanels eventuell Genorte zu wählen, deren Allele sich nicht wie bei SNPs in nur einer Base unterscheiden, sondern in längeren Sequenzen, wie es beispielsweise bei Nullallelen oder längeren Indels der Fall ist (44). Je größer die Abweichung zwischen zwei Allelen, desto höher ist die diskriminative Fähigkeit und desto niedriger sind unspezifische Hintergrundsignale, ergo desto höher ist die Spezifität (16). Darüber hinaus würde die Anwendung von „perfectly matched primern“ eine höhere Sensitivität erlauben (25, 44).

4.3.4 Quantifizierung von Verlaufskontrollen

Auch bei Quantifizierung der vier Verlaufskontrollen mittels Standardkurvenmethode (siehe 3.3.5) fiel eine leicht verminderte Sensitivität des SNP rs713753 im Vergleich zu den bereits im Labor etablierten Allelen auf. Hier wurde bei drei Verlaufskontrollen (Verlaufskontrollen 1, 3 und 4), für die zuvor mittels qPCR der Allele S02 und SRY Donorchimärismen zwischen 99,95 % und 99,99 % bestimmt worden waren, nun mittels Amplifikation des SNP rs713753_C ein CC bestimmt. Dabei trat einzig bei Verlaufskontrolle 1 eine Amplifikation mit hohen C_q-Werten > 45 auf, welche dann bei Einsetzen in die Formel einen CC ergaben. Über die Relevanz der Ergebnisse dieser drei

Verlaufskontrollen lässt sich diskutieren. Da die drei zuvor bestimmten Werte im Bereich des in dieser Arbeit ermittelten LOD für das Allel rs713753_C liegen, war mit einer präzisen Quantifizierung von Vorneherein nicht zu rechnen. Außerdem ist die Differenz zwischen CC und den zuvor errechneten Chimärismuszahlen mit 0,01-0,05 % sehr gering, sodass insbesondere bei einer solch kleinen Anzahl an Experimenten nicht auszuschließen ist, dass sie auf Pipettier- oder PCR-Ungenauigkeiten zurückzuführen ist. Weiterhin sind bei der Standardkurvenmethode interassay-spezifische Ungenauigkeiten nicht auszuschließen (siehe 4.3.6). Hier wären weitere Experimente nötig, um genauere Aussagen machen zu können. Auch eine klinisch-praktische Relevanz ist fraglich. Zwar ist eine hohe Sensitivität wünschenswert, um beispielweise Rezidive frühzeitig erkennen zu können. Allerdings würde die Messung eines 99,95 %-Donorchimärismus in der Regel keine direkte therapeutische Konsequenz mit sich ziehen, da zur Erhöhung der Spezifität, und damit zur Vermeidung unnötiger Therapien inklusive Nebenwirkungen, häufig ein Schwellenwert zur Abgrenzung eines therapiebedürftigen MC definiert wird, welcher unter 99,95 % liegt (19, 22). In Anbetracht dessen scheint das Allel rs713753 trotz einer im klinischen Vergleich leicht reduzierten Sensitivität für die Routinediagnostik geeignet zu sein.

Warum in einer Verlaufskontrolle (Verlaufskontrolle 2), für die zuvor mittels Amplifikation von S02 und SRY ein CC bestimmt wurde, nun mittels Amplifikation von rs713753_C aus einem der drei Ansätze mit einem Cq-Wert von 41,67 ein Donorchimärismus von 99,88 % ermittelt wurde, bleibt zu diskutieren. Für eine Poisson-Verteilung oder eine unspezifische Amplifikation, wie sie manchmal in hohen Zyklen beobachtet wird (47), wäre ein Cq-Wert von 41,67 relativ niedrig. Verunreinigungen im PCR-Ansatz sind als Ursache nicht auszuschließen, zumal es nur in 1/3 Ansätzen der Verlaufskontrolle zur Amplifikation kam. Dennoch stellt sich die Frage nach der Spezifität der Primer für das Allel rs713753_C, insbesondere des ARMS-Mismatch-Primers. Eine unspezifische Amplifikation durch Bindung des ARMS-Mismatch-Primers an das andere Allel, rs713753_T, wird durch die vorliegende 3'-Fehlpaarung des Primers begünstigt und durch den Überschuss des anderen Allels verstärkt (30). Dafür spräche die Beobachtung, dass bei der qPCR der Standardreihen des Allels C die Verdünnung in DNA bei Stufe 1:10.000 in 5/9 Ansätzen zur Amplifikation führte, wohingegen dies bei der Verdünnung in Wasser nur in 1/9 Ansätzen der Fall war. Dagegen spräche allerdings, dass in 4/9 Ansätzen der Stufe 1:10.000 der Standardreihe in allelnegativer DNA bzw. in 2/3 Ansätzen der entsprechenden Verlaufskontrolle keine Amplifikation aufgetreten ist; eine unspezifische Amplifikation durch Bindung an das andere Allel wäre jedoch in

allen Ansätzen zu erwarten. Weitere Experimente sowohl zum LOD des Allels rs713753_C als auch zur Spezifität der eingesetzten Primer könnten hier hilfreich sein.

Ähnliche Erwägungen, ob es sich bei den detektierten Signalen tatsächlich um spezifische Amplifikation des Allels rs713753_C oder um unspezifische Hintergrundsignale handelt, kann man auch bei Verlaufskontrolle 1 anstellen, wo zuvor ein 99,97 %-Donorchimärismus berechnet wurde und nun mittels qPCR des Allels rs713753_C lediglich in 2/3 zwei Ansätzen eine Amplifikation mit Cq-Werten > 45 auftrat.

Angesichts dieser Überlegungen ist weiterhin zu diskutieren, bis zu welchem Zyklus Signale als positiv gewertet werden können. Alizadeh et al. (33) und Bach et al. (21) beispielsweise legten einen Cq-Wert von 36 als Obergrenze für ein positives Signal eines spezifischen Allels fest. Um einen solchen Grenzwert definieren zu können, wären zusätzliche Experimente nötig. Dabei ist zu beachten, dass mit einer höheren Grenze zwar die Sensitivität zu-, die Spezifität hingegen abnimmt und vice versa.

Um eine definitive Aussage über die klinische Anwendbarkeit des SNP rs713753 machen zu können, sollten letztlich weitere Analysen von Verlaufskontrollen mittels Amplifikation der Allele rs713753_C und rs713753_T durchgeführt werden und die Ergebnisse mit den Chimärismuswerten verglichen werden, welche durch Amplifikation der bisher in unserem Labor etablierten Genorte gewonnen wurden.

4.3.5 Vorteile der lokusspezifischen Referenz

Zum Test neuer Allele wurde unter anderem deshalb auf die Publikation von Gineikiene et al. (25) zurückgegriffen, weil dort ein anderer Ansatz zur Normalisierung der DNA verfolgt wird. Anstelle eines Haushaltsgens wie HCK wird eine lokusspezifische Referenz verwendet, deren Position mit der Sequenz des jeweiligen SNP überlappt. Der Forward-Primer der Referenz ist im Vergleich zu denen der spezifischen Allele um einige Nucleotide stromaufwärts verschoben. Es werden der gleiche Reverse-Primer und die gleiche Sonde verwendet wie für die spezifischen Allele. So kann eine hohe Vergleichbarkeit der qPCR-Effizienzen von interner Referenz und spezifischem Allel erzielt werden, da die qPCR-Effizienz unter anderem von den gewählten Primern sowie von Sequenz und Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments abhängt (25). Je ähnlicher die qPCR-Effizienzen von Referenz und spezifischem Allel sind, desto verlässlicher ist die anschließende Quantifizierung (25). Folglich bietet in der Theorie eine Normalisierung mittels lokusspezifischer Referenz in puncto Reliabilität durchaus Vorteile

gegenüber einer Normalisierung mittels HCK, da sich bei Letzterer nicht nur Primer und Sonden zwischen Allelen und Referenz unterscheiden, sondern auch DNA-Sequenz und Fragmentlänge mitunter stark voneinander abweichen.

In den hier durchgeführten Experimenten konnte dies bestätigt werden. Durch die Spezifität der Referenz für den Lokus des SNP konnte eine hohe Vergleichbarkeit der qPCR-Effizienzen von Referenz und Allelen nachgewiesen werden. Zudem wies die qPCR der lokusspezifischen Referenz eine sehr gute Effizienz und eine hohe Reproduzierbarkeit auf. Gineikiene et al. (25) entwickelten solche lokusspezifischen Referenzen auch für die von Alizadeh et al. publizierten Allele (25, 33), da die qPCR-Effizienz des dort als Referenz verwendeten Haushaltsgens GAPDH signifikant niedriger war als die der spezifischen Allele. In Anbetracht dessen wäre es interessant, in zukünftigen Experimenten die qPCR-Effizienzen der in unserem Labor verwendeten, von Alizadeh et al (33) publizierten Allele mit der qPCR-Effizienz des in unserem Labor zur Normalisierung verwendeten Referenzgens HCK zu vergleichen und bei signifikanten Unterschieden die Normalisierung mittels der entsprechenden von Gineikiene et al. publizierten lokusspezifischen Referenzen zu erwägen (25), um die Chimärismusquantifizierung zu optimieren.

4.3.6 Überlegungen zur Quantifizierungsmethode

Ein weiterer Grund für die Auswahl der Publikation von Gineikiene et al. (25) liegt darin, dass diese eine Quantifizierungsmethode anwenden, für die auf die Herstellung von Standardkurven allelpositiver in allelnegativer DNA verzichtet werden kann. Gineikiene et al. wenden wie einige andere Autoren die $\Delta\Delta Cq$ -Methode an (11, 16, 20, 22, 44). Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass man Standardkurven nur braucht, um die qPCR-Effizienz zu bestimmen. Zwar müssen diese für jede neue Mastermix-Charge erneuert werden; es ist jedoch ausreichend, Standardkurven allelpositiver DNA in Wasser herzustellen, da diese – wie in dieser Arbeit gezeigt – die gleiche qPCR-Effizienz ergeben wie Standardkurven allelpositiver in allelnegativer DNA. Dies ist vorteilhaft, da die Herstellung von Verdünnungsreihen in Wasser deutlich weniger arbeits- und zeitaufwendig ist und eine geringere Fehlerquote aufweist, was folglich mit einer höheren Genauigkeit einhergeht. Ein Nachteil der $\Delta\Delta Cq$ -Methode liegt darin, dass bei jeder Chimärismusbestimmung zusätzlich zur zu quantifizierenden Probe auch eine Prä-Transplantationsprobe der Empfängerin/des Empfängers als Kalibratorprobe getestet werden muss. Dadurch können zwar interassay-spezifische Veränderungen als Fehlerquelle bei der

Kalibrierung ausgeschlossen werden, was bei der Standardkurvenmethode nicht möglich ist. Allerdings wird dazu eine große Menge Prä-Transplantations-DNA benötigt, was im schlimmsten Falle die Anzahl an durchführbaren Verlaufskontrollen limitiert. In diesem Punkt erweist sich die aktuell in unserem Labor angewendete Standardkurvenmethode als vorteilhaft. Die Kalibrierung geschieht hier anhand von Standardkurven allelpositiver in allelnegativer DNA, welche aus Blutproben gesunder Probanden/Probandinnen hergestellt werden können, sodass kein DNA-Mangel auftritt; Prä-Transplantations-DNA wird somit nicht benötigt. Überdies weist die Auswertung eines Markers zur Chimärismusdiagnostik eine höhere Reliabilität auf, wenn sie immer anhand der gleichen Standardkurve geschieht (36). Allerdings müssen auch diese Standardkurven gesunder Probanden/Probandinnen für jede neue Mastermix-Charge erneuert werden. Dies ist arbeitsintensiv und erfordert ein sehr hohes Maß an Präzision, um eine korrekte Quantifizierung zu gewährleisten. Ein Ersatz durch eine Standardverdünnung in Wasser ist hier trotz gleicher Effizienz nicht möglich, da die Standardkurven basierend auf ΔCq erstellt werden, welches man nicht aus Verdünnungsreihen in Wasser erhält. Die Herstellung der Standardkurven allelpositiver in allelnegativer DNA in unserem Labor könnte aber erleichtert und in puncto Präzision optimiert werden, indem, wie bereits angesprochen, nicht Leukozyten gezählt und gemischt werden, sondern die zuvor extrahierte DNA gemischt wird (siehe 2.3.5.2). Vor dem Hintergrund, dass Masmus et al. (32) bei Vergleich der Quantifizierungsergebnisse der Standardkurvenmethode mit denen der $\Delta\Delta Cq$ -Methode identische Ergebnisse erhielten, scheinen letztlich die Vorteile der Standardkurvenmethode gegenüber denen der $\Delta\Delta Cq$ -Methode zu überwiegen. Eine Umstellung der Methode in unserem Labor kann somit an dieser Stelle nicht empfohlen werden. Aus diesem Grund sowie mangels ausreichend Prä-Transplantations-DNA der Empfänger/-innen wurde auch in den hier vorgenommenen Experimenten mit dem SNP rs713753 mit der Standardkurvenmethode gearbeitet.

4.4 Ausblick und andere Untersuchungsmethoden

Zusammenfassend stehen mehrere Optionen zur Diskussion, die Chimärismusdiagnostik in unserem Labor zu optimieren. Zur Erhöhung der Sensitivität ist sicherlich die Erhöhung des DNA-Inputs in die qPCR am einfachsten durchführbar. Dabei hat sich in dieser Arbeit ein DNA-Input von 250 ng als geeignet erwiesen. Der damit einhergehende erhöhte DNA-Bedarf kann, wenn nötig, durch Extraktion mit dem QIAamp DNA Blood Midi-Kit gedeckt werden.

Zur Optimierung der Präzision der Quantifizierung ist zu erwägen, die qPCR-Effizienzen von HCK mit denen der spezifischen Allele zu vergleichen und bei zu großen Abweichungen eventuell die von Gineikiene et al. (25) beschriebenen lokusspezifischen Referenzen zu testen.

Zur Verbesserung der Informativität ist es sicherlich sinnvoll, ein bis zwei zusätzliche Allele zu etablieren. Der SNP rs713753 weist zwar eine gute Effizienz und Informativität auf, durch die ARMS-Mismatch-Primer sind Einschränkungen in Sensitivität und Spezifität jedoch nicht ausgeschlossen. Er wäre zur routinemäßigen Testung nur dann geeignet, falls durch eine Erhöhung des DNA-Inputs in die qPCR eine Sensitivitätssteigerung erzielt werden kann. Sollte dies nicht der Fall sein, wäre eine Anwendung als Reserveallel mit eingeschränkter Sensitivität denkbar, wenn sich kein anderes Allel als informativ erweist. Alternativ lassen sich in der Literatur noch weitere Allele finden: Kletzel et al. (20) beschreiben ein Set aus 34 biallelischen Indels für qPCR. Sie erreichten eine Sensitivität von 0,01 % und mit nur 18 der 34 Indels eine Informativität von 100 % in einer nordamerikanischen Patientenpopulation. Überdies beschreiben Jiménez et al. (44) vier Nullallele und sechs Indels, die auf längeren genomischen Sequenzen beruhen. Diese weisen gegenüber kurzen Sequenzvarianten, wie sie bei SNPs und den von Alizadeh et al. (33) beschriebenen „short-sized polymorphisms“ vorliegen, größere Unterschiede zwischen zwei Varianten und somit eine größere diskriminative Fähigkeit auf. Dies reduziert die Hintergrundamplifikation (69) und erhöht die Präzision der Quantifizierung (44). Mittels LightCycler-basierter qPCR dieser Allele erreichten Jiménez et al. (44) eine Sensitivität von 0,01-0,001 % und eine Informativität für Empfängerdiskriminierung von 80 % für eine europäische Population. Dieser Ansatz könnte nicht nur eine gute Alternative zum SNP rs713753 darstellen, um die Informativität zu erhöhen, sondern in puncto Sensitivität sogar den bisher in unserem Labor angewendeten Allelen überlegen sein, sodass Krankheitsrezidive noch verlässlicher und früher detektiert werden könnten (70). Zur Vermeidung unnötiger Therapien aufgrund falsch-positiver Ergebnisse bei erhöhter Sensitivität empfiehlt sich nichtsdestotrotz auch hier die Definition eines Schwellenwerts für das autologe Signal, der die Diagnose eines MC erlaubt (19).

Zur Verbesserung der Sensitivität und früheren Detektion eines MC wird von einigen Autoren die kombinierte Analyse von Proben aus peripherem Blut und Knochenmark empfohlen (19). Allerdings kann eine potenzielle Kontaminierung der Knochenmarkprobe durch autologe Stromazellen (22) zu Reduktion der Spezifität und einer höheren Rate falsch-positiver Ergebnisse führen, als bei es bei Proben aus peripherem Blut allein

der Fall ist. Um Patienten/Patientinnen vor verzichtbaren therapeutischen Interventionen und dem damit einhergehenden Risiko einer GvHD zu schützen, sollten auch bei Analyse von Knochenmarkproben Schwellenwerte des autologen Signals für die Diagnose eines MC definiert und serielle Untersuchungen vorgenommen werden (19).

Weiterhin kann eine vorherige Anreicherung von Zellsubpopulationen, zum Beispiel durch magnetische oder fluoreszenzaktivierte Zellsortierung, bei allen zuvor genannten Methoden zu einer Optimierung der Chimärismusanalyse beitragen (13). Die spezifische Chimärismusbestimmung einzelner Subpopulationen kann Sensitivität und Spezifität des Monitorings nach HSZT erhöhen und somit die Detektion von MC ermöglichen, die bei Analyse aller Leukozyten unentdeckt geblieben wären (71). So zeigten Prinz et al., dass durch Chimärismusanalyse des CD34+-Chimärismus ein Rezidiv früher detektiert werden kann als durch Analyse nicht-separierter Zellen (72). Kinsella et al. beschreiben überdies einen hohen Prognosewert der Zusammensetzung des zelllinienspezifischen Chimärismus für Patientinnen/Patienten mit malignen Erkrankungen (73). Im Vergleich zu nicht-separierten Zellen liegt bei sortierten Subpopulationen keine Kontamination mit anderen Empfängerzellen vor, was Mikrochimärismen eine höhere Aussagekraft verleiht und die Spezifität der Untersuchung erhöht (74). Darüber hinaus ist die Analyse von Subpopulationen teilweise mit einer höheren Sensitivität verbunden. Nachteilig ist jedoch, dass zur Zelltrennung Oberflächenmarker unabdingbar sind, die zum Beispiel bei AML-Rezidiven oft verloren gehen oder hinzugewonnen werden (21). Zudem ist die Zelltrennung sehr zeitaufwendig und erfordert hohe Zellmengen (15, 21), sodass eine Anwendung in der Routinediagnostik kritisch zu betrachten ist. Einige Fragen lassen sich hingegen nur durch zelllinienspezifische Analyse klären, so zum Beispiel die Differenzierung zwischen lymphatischem und myeloischem Transplantatanwachsen in AML oder ALL (21). Außerdem wurde beschrieben, dass durch longitudinales Monitoring des CD3+-T-Zell-Chimärismus eine Aussage über das Risiko einer GvHD getroffen werden kann (75). Ebenso wurde ein Zusammenhang zwischen dem Chimärismus der myeloiden Zelllinie und dem Auftreten von Rezidiven sowie dem Therapieansprechen nach Transplantation und DLI bei Patienten/Patientinnen mit myeloischer Leukämie beschrieben (9). Zusammenfassend ist die Chimärismusanalyse einzelner Subpopulationen eine äußerst sensitive und spezifische Methode, deren Anwendung im klinischen Alltag aufgrund ihrer Komplexität vornehmlich auf bestimmte Fragestellungen oder das Monitoring von Hochrisikopatientinnen/-patienten limitiert ist (13).

Darüber hinaus spielt bei malignen Erkrankungen die MRD-Diagnostik eine große Rolle in der frühzeitigen Diagnose und Prävention von Rezidiven (76) (siehe 1.1.7). Sie basiert auf der Detektion krankheitsspezifischer Marker mittels (q)PCR und erreicht dadurch eine hohe Spezifität, da im Gegensatz zur Chimärismusdiagnostik jeder Nachweis Marker-positiver Zellen einem Nachweis maligner Zellen gleichkommt; Benigne Empfängerzellen werden nicht detektiert. Einige der hier beschriebenen Ansätze zur Optimierung der Chimärismusdiagnostik könnten auch zur Optimierung der MRD-Bestimmung nützlich sein. Dies war jedoch nicht Thema dieser Arbeit, weshalb an dieser Stelle nicht näher darauf eingegangen werden soll.

Eine relativ neue Technik zur Chimärismusdiagnostik ist die digitale PCR (dPCR). Sie ermöglicht sowohl absolute als auch relative Quantifizierung über einen großen dynamischen Bereich (77) und vereint die Sensitivität der qPCR mit der Präzision und Reproduzierbarkeit der STR-PCR (74). Die dPCR beruht auf der tröpfchenweisen Kompartimentierung des PCR-Ansatzes in viele kleine Mini-Reaktionen die keine, eine oder mehrere Kopien des Allels enthalten, was nach der Amplifikation durch eine Endpunktanalyse gemessen wird (69, 74). Dadurch ist die dPCR unempfindlicher gegenüber PCR-Inhibitoren (62) und Differenzen in Amplifikations-Effizienzen als die qPCR (69, 78). Aufgrund der hohen Präzision kann zudem auf die Anfertigung mehrerer Replikate und Standardkurven verzichtet werden (70, 78), was die Mehrkosten ausgleicht, die zurzeit noch mit dPCR verbunden sind (23). In puncto Sensitivität ist die dPCR vergleichbar mit den sensitivsten qPCR-Ansätzen: So erreichten Kliman et al. ein LOD von 0,008 % sowie ein LOQ von 0,023 %, und sie wiesen Mikrochimärismen mit einem DNA-Input von weniger als 5 ng nach (77). Waterhouse et al. beschreiben sogar, dass die Detektion eines MC mit dPCR früher möglich war als mit qPCR (79). Allerdings ist auch hier eine Sensitivität von 10^{-5} insofern kritisch zu betrachten, als Blutproben meist mit anderen Zellen des Empfängers/der Empfängerin, beispielsweise mit Endothelzellen, kontaminiert sind (23). Die Informativität ist mit über 99 % ebenfalls mit der der qPCR vergleichbar (74). Zu den größten Vorteilen der dPCR gegenüber der qPCR gehören die größere Unabhängigkeit der Ergebnisse vom getesteten Allel (74) und die präzise und reproduzierbare Quantifizierung auch von MC mit Empfängerzellanteilen von über 10 % (23). Die Präzision der Analyse nimmt erst in Empfängerzellanteil-Bereichen von 70-80 % so stark ab, dass der Fehler relevant wird und zur genauen Quantifizierung die Amplifikation eines zusätzlichen Allels zur Spenderdiskriminierung nötig wird (74). Zwar gibt es erst wenige klinische Daten über die Chimärismusbestimmung per dPCR; dennoch schätzen viele Autoren, dass dPCR andere Methoden zur

Chimärismusbestimmung nach HSZT bald ersetzen wird (69, 70). Es wäre zu überlegen, auch in unserem Labor zur dPCR zu wechseln, sobald sie sich vollends etabliert hat.

5 Zusammenfassung

Die molekulare Chimärismusdiagnostik stellt, besonders seit Einführung des RIC, einen essenziellen Teil der Therapieüberwachung nach allogener HSZT dar, um unerwünschte Ereignisse frühzeitig detektieren und rechtzeitig therapeutisch intervenieren zu können. In unserem Labor der Uniklinik Würzburg werden täglich Chimärismusanalysen mittels qPCR durchgeführt. Dabei wird mit einem Genpanel von 21 Allelen eine Informativität von ca. 95 % und je nach getestetem Allel eine Sensitivität von 0,1-0,01 % erreicht. Ziel der Arbeit war es, die in unserem Labor angewendete Methode zur Chimärismusanalyse in puncto Sensitivität und Informativität zu optimieren.

Hierfür wurde mittels qPCR artifiziell hergestellter Chimärismen der drei am häufigsten verwendeten Allele untersucht, ob durch Steigerung des DNA-Inputs in die qPCR eine Erhöhung der Detektionsgrenze erreicht werden kann, ohne dass es zu PCR-Inhibition durch erhöhte DNA-Mengen kommt. Auch der Einfluss des DNA-Inputs auf die Quantifizierungsergebnisse wurde evaluiert. Um den anfallenden erhöhten DNA-Bedarf zu decken, wurden verschiedene Elutionsmethoden der DNA-Extraktion in Hinblick auf einen maximalen DNA-Ertrag verglichen. Zur Erhöhung der Informativität wurde die Anwendbarkeit eines Primersets für qPCR des SNP rs713753 hinsichtlich Informativität, Effizienz und Sensitivität evaluiert. Dazu wurden gesunde Probandinnen/Probanden und Spender-Empfänger-Paare mittels qPCR typisiert, Standardverdünnungsreihen aus DNA gesunder Probanden/Probandinnen quantifiziert sowie Verlaufskontrollen von Patienten/Patientinnen nach HSZT analysiert.

Die Experimente zeigten, dass eine Erhöhung des DNA-Inputs in die qPCR durchaus eine Verbesserung der Sensitivität respektive eine verlässlichere Detektion einer Empfängerzelle unter 10.000 Spenderzellen zulässt, ohne dass es zur PCR-Inhibition kommt. Dabei hat sich ein DNA-Input von 250 ng als sinnvoll erwiesen, wenngleich allelspezifische Unterschiede bei der Sensitivität auftraten. Die Ergebnisse der Chimärismusquantifizierung mittels Standardkurvenmethode waren bei Vorliegen verlässlicher Cq-Werte unabhängig von der DNA-Menge. Zur erforderlichen Erhöhung des DNA-Ertrags zeigte sich bei Patientinnen/Patienten mit geringer Leukozytenkonzentration eine Extraktion mit dem Midi-Kit und Elution mit 2 x 200 µl AE-Puffer als geeignetste Methode, wohingegen bei Patienten/Patientinnen mit hoher Leukozytenkonzentration eine Extraktion mit dem Mini-Kit und Elution mit 200 µl + Reelution ausreicht.

Die Evaluierung der qPCR des SNP rs713753 zeigte eine mäßige Eignung für unser Labor: Beide Allele gemeinsam wiesen in unserer Population eine Informativität für Empfängerdiskriminierung von 37,5 % auf. Die qPCR-Effizienzen der lokusspezifischen Referenz und des Allels C waren nahezu optimal, die des Allels T mit 0,87 weniger gut. Die Sensitivität der spezifischen Allele lag nur bei maximal 0,1 %. Sofern auch hier eine Sensitivitätssteigerung durch Erhöhung des DNA-Inputs in die qPCR ohne Auftreten unspezifischer Amplifikation möglich ist, wäre es vorstellbar, die Allele des SNP rs713753 als „Ersatzallele“ in die Routinediagnostik aufzunehmen und nur zu testen, wenn sich kein anderes Allel informativ zeigt.

Zusammenfassend ist eine Optimierung der in unserem Labor verwendeten Methode zur Chimärismusdiagnostik hinsichtlich Sensitivität und Informativität durchaus möglich. Eine Erhöhung des DNA-Inputs ist dabei am einfachsten umsetzbar; zur Etablierung eines neuen Genortes bedarf es noch einiger zusätzlicher Experimente.

6 Literaturverzeichnis

1. Yeşilipek MA. Hematopoietic stem cell transplantation in children. *Turk pediatri arsivi* 2014; **49**: 91–98.
2. Quaiser A, Köhl U. Was ist gesichert bei den Zelltherapien? Möglichkeiten und Grenzen in der Immunonkologie. *Der Internist* 2018; **59**: 1230–1238.
3. Storb R. Edward Donnall Thomas (1920-2012). *Nature* 2012; **491**: 334.
4. Appelbaum FR. Retrospective. E. Donnall Thomas (1920-2012). *Science (New York, N.Y.)* 2012; **338**: 1163.
5. Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. *The New England journal of medicine* 2006; **354**: 1813–1826.
6. Niemeyer C, Eggert A. *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2018.
7. Carreras E, Dufour C, Mohty M, Kröger N. *The EBMT Handbook*. Springer International Publishing: Cham, 2019.
8. Speer CP, Gahr M, Dötsch J. *Pädiatrie*. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2019.
9. Maas F, Schaap N, Kolen S, Zoetbrood A, Buño I, Dolstra H, et al. Quantification of donor and recipient hemopoietic cells by real-time PCR of single nucleotide polymorphisms. *Leukemia* 2003; **17**: 621–629.
10. Vogel MN, Goepfert B, Maximovic O, Bethge W, Claussen CD, Horger M. Das Idiopathische Pneumoniesyndrom. *Fortschr Röntgenstr* 2008; **180**.
11. Sellmann L, Rabe K, Bünting I, Dammann E, Göhring G, Ganser A, et al. Diagnostic value of highly-sensitive chimerism analysis after allogeneic stem cell transplantation. *Bone marrow transplantation* 2018; **53**: 1457–1465.
12. Khan F, Agarwal A, Agrawal S. Significance of chimerism in hematopoietic stem cell transplantation: new variations on an old theme. *Bone marrow transplantation* 2004; **34**: 1–12.
13. Prof. Dr. med. Peter Bader, Prof. Dr. med. Martin Bornhäuser, Dr. med. Ulrich Grigoleit, Prof. Dr. med. Nicolaus Kröger. *LEITLINIEN zur allogenen Stammzelltransplantation: 10. MONITORING NACH ALLOGENER STAMMZELLTRANSPLANTATION - CHIMÄRISMUSANALYSE UND BESTIMMUNG DER MINIMALEN RESTERKRANKUNG (MRD)*, 1st edn., 2016.
14. Bacher U, Zander AR, Haferlach T, Schnittger S, Fehse B, Kröger N. Minimal residual disease diagnostics in myeloid malignancies in the post transplant period. *Bone marrow transplantation* 2008; **42**: 145–157.
15. Bacher U, Haferlach T, Fehse B, Schnittger S, Kröger N. Minimal residual disease diagnostics and chimerism in the post-transplant period in acute myeloid leukemia. *TheScientificWorldJournal* 2011; **11**: 310–319.
16. Jacque N, Nguyen S, Golmard J-L, Uzunov M, Garnier A, Leblond V, et al. Chimerism analysis in peripheral blood using indel quantitative real-time PCR is a useful tool to predict post-transplant relapse in acute leukemia. *Bone marrow transplantation* 2015; **50**: 259–265.
17. Gressner AM, Arndt T. *Lexikon der medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*, 2nd edn. Springer: Berlin, 2013.
18. Lackermair M. *Hybride und Chimären: Die Forschung an Mensch-Tier-Mischwesen aus verfassungsrechtlicher Sicht*. Mohr Siebeck: Tübingen, 2017.

19. Willasch AM, Kreyenberg H, Shayegi N, Rettinger E, Meyer V, Zabel M, et al. Monitoring of hematopoietic chimerism after transplantation for pediatric myelodysplastic syndrome: real-time or conventional short tandem repeat PCR in peripheral blood or bone marrow? *Biology of blood and marrow transplantation journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 2014; **20**: 1918–1925.
20. Kletzel M, Huang W, Olszewski M, Khan S. Validation of chimerism in pediatric recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) a comparison between two methods: real-time PCR (qPCR) vs. variable number tandem repeats PCR (VNTR PCR). *Chimerism* 2013; **4**: 1–8.
21. Bach C, Tomova E, Goldmann K, Weisbach V, Roesler W, Mackensen A, et al. Monitoring of hematopoietic chimerism by real-time quantitative PCR of micro insertions/deletions in samples with low DNA quantities. *Transfusion medicine and hemotherapy offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft fur Transfusionsmedizin und Immunhamatologie* 2015; **42**: 38–45.
22. Fehse B, Chukhlovin A, Kuhlcke K, Marinetz O, Vorwig O, Renges H, et al. Real-time quantitative Y chromosome-specific PCR (QYCS-PCR) for monitoring hematopoietic chimerism after sex-mismatched allogeneic stem cell transplantation. *Journal of hemotherapy & stem cell research* 2001; **10**: 419–425.
23. Stahl T, Böhme MU, Kröger N, Fehse B. Digital PCR to assess hematopoietic chimerism after allogeneic stem cell transplantation. *Experimental hematology* 2015; **43**: 462-8.e1.
24. Bader P, Niethammer D, Willasch A, Kreyenberg H, Klingebiel T. How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation? *Bone marrow transplantation* 2005; **35**: 107–119.
25. Gineikiene E, Stoskus M, Griskevicius L. Single nucleotide polymorphism-based system improves the applicability of quantitative PCR for chimerism monitoring. *The Journal of molecular diagnostics JMD* 2009; **11**: 66–74.
26. Schaap N, Schattenberg A, Bär B, Mensink E, Man A de, van Geurts Kessel A, et al. Red blood cell phenotyping is a sensitive technique for monitoring chronic myeloid leukaemia patients after T-cell-depleted bone marrow transplantation and after donor leucocyte infusion. *British journal of haematology* 2000; **108**: 116–125.
27. Sreenan JJ, Pettay JD, Tbakhi A, Totos G, Sandhaus LM, Miller ML, et al. The use of amplified variable number of tandem repeats (VNTR) in the detection of chimerism following bone marrow transplantation. A comparison with restriction fragment length polymorphism (RFLP) by Southern blotting. *American journal of clinical pathology* 1997; **107**: 292–298.
28. Schreiner T, Prochnow-Calzia H, Maccari B, Erne E, Kinzler I, Wölpl A, et al. Chimerism analysis after allogeneic bone marrow transplantation with nonradioactive RFLP and PCR-AFLP using the same DNA. *Journal of Immunological Methods* 1996; **196**: 93–96.
29. Mülhardt C. *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2013.
30. Oliver DH, Thompson RE, Griffin CA, Eshleman JR. Use of Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) and Real-Time Polymerase Chain Reaction for Bone Marrow Engraftment Analysis. *The Journal of molecular diagnostics JMD* 2000; **2**: 202–208.
31. Schmidt O. *Genetik und Molekularbiologie*. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2017.

32. Masmas TN, Madsen HO, Petersen SL, Ryder LP, Svejgaard A, Alizadeh M, et al. Evaluation and automation of hematopoietic chimerism analysis based on real-time quantitative polymerase chain reaction. *Biology of blood and marrow transplantation journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 2005; **11**: 558–566.
33. Alizadeh M, Bernard M, Danic B, Dauriac C, Birebent B, Lapart C, et al. Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Blood* 2002; **99**: 4618–4625.
34. Eshel R, Vainas O, Shpringer M, Naparstek E. Highly sensitive patient-specific real-time PCR SNP assay for chimerism monitoring after allogeneic stem cell transplantation. *Laboratory hematology official publication of the International Society for Laboratory Hematology* 2006; **12**: 39–46.
35. Kristt D, Stein J, Yaniv I, Klein T. Assessing quantitative chimerism longitudinally: technical considerations, clinical applications and routine feasibility. *Bone marrow transplantation* 2007; **39**: 255–268.
36. Willasch A, Schneider G, Reincke BS, Shayegi N, Kreyenberg H, Kuci S, et al. Sequence polymorphism systems for quantitative real-time polymerase chain reaction to characterize hematopoietic chimerism-high informativity and sensitivity as well as excellent reproducibility and precision of measurement. *Laboratory hematology official publication of the International Society for Laboratory Hematology* 2007; **13**: 73–84.
37. Deepak S, Kottapalli K, Rakwal R, Oros G, Rangappa K, Iwahashi H, et al. Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes. *Current genomics* 2007; **8**: 234–251.
38. Garibyan L, Avashia N. Polymerase chain reaction. *The Journal of investigative dermatology* 2013; **133**: 1–4.
39. Müller H-J, Prange DR. *PCR - Polymerase-Kettenreaktion*. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2016.
40. Green MR, Sambrook J. The Basic Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harbor protocols* 2018; **2018**.
41. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/technology (Nature Publishing Company)* 1993; **11**: 1026–1030.
42. Applied Biosystems TS. *TaqMan® Gene Expression Master Mix: Protocol*. Foster City, 2010.
43. Applied Biosystems TS. *Real-time PCR: understanding Ct*. Carlsbad, 2016.
44. Jiménez-Velasco A, Barrios M, Román-Gómez J, Navarro G, Buño I, Castillejo JA, et al. Reliable quantification of hematopoietic chimerism after allogeneic transplantation for acute leukemia using amplification by real-time PCR of null alleles and insertion/deletion polymorphisms. *Leukemia* 2005; **19**: 336–343.
45. Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins AR, Day IN. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic acids research* 2001; **29**: E88-8.
46. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 2001; **409**: 928–933.
47. Beyerle D. *Etablierung einer PCR-Methode zur Chimärismusdiagnostik*. Dissertation: Würzburg, 2017.
48. Biele C, Horton HR. *Biochemie*, 4th edn. Pearson Studium: München, 2008.

49. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry* 2009; **55**: 611–622.
50. Fraga D, Meulia T, Fenster S. Real-Time PCR. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques* 2014; **8**: 10.3.1-10.3.40.
51. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic acids research* 1989; **17**: 2503–2516.
52. Little S. Amplification-refractory mutation system (ARMS) analysis of point mutations. *Current protocols in human genetics* 2001; **Chapter 9**: Unit 9.8.
53. Ye S, Humphries S, Green F. Allele specific amplification by tetra-primer PCR. *Nucleic acids research* 1992; **20**: 1152.
54. Dr Tushar Chauhan. ARMS or Allele-Specific PCR: Principle, Procedure, Protocol, Applications and Limitations. <https://geneticeducation.co.in/arms-or-allele-specific-pcr-principle-procedure-protocol-applications-and-limitations/>.
55. Medizinische Klinik II, Universitätsklinikum Würzburg. *Zentrum für allogene Stammzelltherapien*.
56. Quintrell N, Lebo R, Varmus H, Bishop JM, Pettenati MJ, Le Beau MM, et al. Identification of a human gene (HCK) that encodes a protein-tyrosine kinase and is expressed in hemopoietic cells. *Molecular and cellular biology* 1987; **7**: 2267–2275.
57. QUIAGEN. QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook: <https://www.qiagen.com/be/resources/resourcedetail?id=62a200d6-faf4-469b-b50f-2b59cf738962&lang=en> 2016.
58. QUIAGEN. QIAamp DNA Blood Midi/Maxi Handbook 2015. <https://www.qiagen.com/be/resources/resourcedetail?id=bf32146a-77fd-40c2-8743-c28974f7935b&lang=en>.
59. Graw J. *Genetik*. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2015.
60. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of applied microbiology* 2012; **113**: 1014–1026.
61. Opel KL, Chung D, McCord BR. A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR. *Journal of forensic sciences* 2010; **55**: 25–33.
62. Sidstedt M, Rådström P, Hedman J. PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS-mechanisms and solutions. *Analytical and bioanalytical chemistry* 2020; **412**: 2009–2023.
63. Huggett JF, Novak T, Garson JA, Green C, Morris-Jones SD, Miller RF, et al. Differential susceptibility of PCR reactions to inhibitors: an important and unrecognised phenomenon. *BMC research notes* 2008; **1**: 70.
64. Forootan A, Sjöback R, Björkman J, Sjögreen B, Linz L, Kubista M. Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR). *Biomolecular detection and quantification* 2017; **12**: 1–6.
65. Applied Biosystems TS. *TaqMan® Gene Expression Assays (single-tube assays): User guide*: Carlsbad, 2017.
66. Harries LW, Wickham CL, Evans JC, Rule SA, Joyner MV, Ellard S. Analysis of haematopoietic chimaerism by quantitative real-time polymerase chain reaction. *Bone marrow transplantation* 2005; **35**: 283–290.

67. L. Phan, Y. Jin, H. Zhang, W. Qiang, E. Shekhtman, D. Shao, D. Revoe, R. Villamarin, E. Ivanchenko, M. Kimura, Z. Y. Wang, L. Hao, N. Sharopova, M. Bihan, A. Sturcke, M. Lee, N. Popova, W. Wu, C. Bastiani, M. Ward, J. B. Holmes, V. Lyoshin, K. Kaur, E. Moyer, M. Feolo, and B. L. Kattman. *ALFA: Allele Frequency Aggregator*, 2020.
68. Ayyadevara S, Thaden JJ, Shmookler Reis RJ. Discrimination of primer 3'-nucleotide mismatch by taq DNA polymerase during polymerase chain reaction. *Analytical biochemistry* 2000; **284**: 11–18.
69. George D, Czech J, John B, Yu M, Jennings LJ. Detection and quantification of chimerism by droplet digital PCR. *Chimerism* 2013; **4**: 102–108.
70. Valero-Garcia J, González-Espinosa MDC, Barrios M, Carmona-Antoñanzas G, García-Planells J, Ruiz-Lafora C, et al. Earlier relapse detection after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation by chimerism assays: Digital PCR versus quantitative real-time PCR of insertion/deletion polymorphisms. *PloS one* 2019; **14**: e0212708.
71. Clemente I, Goncalo A, Faria C, Dias M, Barbosa I, Mendes C. Relevance of Chimerism Analysis After Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Transplantation proceedings* 2017; **49**: 890–892.
72. Prinz E, Keil F, Kalhs P, Mitterbauer M, Rabitsch W, Rosenmayr A, et al. Successful immunotherapy in early relapse of acute myeloid leukemia after nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation. *Annals of hematology* 2003; **82**: 295–298.
73. Kinsella FAM, Inman CF, Gudger A, Chan YT, Murray DJ, Zuo J, et al. Very early lineage-specific chimerism after reduced intensity stem cell transplantation is highly predictive of clinical outcome for patients with myeloid disease. *Leukemia research* 2019; **83**: 106173.
74. Stahl T, Rothe C, Böhme MU, Kohl A, Kröger N, Fehse B. Digital PCR Panel for Sensitive Hematopoietic Chimerism Quantification after Allogeneic Stem Cell Transplantation. *International journal of molecular sciences* 2016; **17**.
75. Rupa-Matysek J, Lewandowski K, Nowak W, Sawiński K, Gil L, Komarnicki M. Correlation between the kinetics of CD3+ chimerism and the incidence of graft-versus-host disease in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transplantation proceedings* 2011; **43**: 1915–1923.
76. Bader P, Kreyenberg H, Stackelberg A von, Eckert C, Salzmann-Manrique E, Meisel R, et al. Monitoring of minimal residual disease after allogeneic stem-cell transplantation in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia allows for the identification of impending relapse: results of the ALL-BFM-SCT 2003 trial. *Journal of clinical oncology official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2015; **33**: 1275–1284.
77. Kliman D, Castellano-Gonzalez G, Withers B, Street J, Tegg E, Mirochnik O, et al. Ultra-Sensitive Droplet Digital PCR for the Assessment of Microchimerism in Cellular Therapies. *Biology of blood and marrow transplantation journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 2018; **24**: 1069–1078.
78. Okano T, Tsujita Y, Kanegane H, Mitsui-Sekinaka K, Tanita K, Miyamoto S, et al. Droplet Digital PCR-Based Chimerism Analysis for Primary Immunodeficiency Diseases. *Journal of clinical immunology* 2018; **38**: 300–306.
79. Waterhouse M, Pfeifer D, Duque-Afonso J, Follo M, Duyster J, Depner M, et al. Droplet digital PCR for the simultaneous analysis of minimal residual disease and hematopoietic chimerism after allogeneic cell transplantation. *Clinical chemistry and laboratory medicine* 2019; **57**: 641–647.

I Abkürzungsverzeichnis

μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
CC	Kompletter (Donor-)Chimärismus
CD	Cluster of Differentiation
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
CML	Chronisch myeloische Leukämie
Cq	Cycle threshold
DLI	Donorlymphozyteninfusion
DNA	Desoxyribonucleic Acid
dPCR	Digital Polymerase Chain Reaction
dsDNA	Double-stranded Desoxyribonucleic Acid
e	Eulersche Zahl
E	Effizienz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EL-Puffer	Erythrocyte Lysis-Puffer
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
g	Relative Zentrifugalkraft
GvHD	Graft-versus-Host Disease
GvL	Graft-versus-Leukemia
HCK	Hematopoietic Cell Kinase

HLA	Human Leukocyte Antigen
HSZT	Hämatopoetische Stammzelltransplantation
Indel	Insertion and Deletion Polymorphism
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantification
MC	Mixed Chimerism
ml	Milliliter
MW	Mittelwert
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
PCR	Polymerase Chain Reaction
qPCR	Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction
R ²	Bestimmtheitsmaß
RIC	Reduced-Intensity Conditioning (Intensitätsreduzierte Konditionierung)
SD	Standard Deviation (Standardabweichung)
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
STR	Short Tandem Repeats
Taq	Thermus aquaticus
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats
Δ	Delta

II Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Schematische Darstellung des Funktionsprinzips einer PCR.	16
Abb. 2:	Schematische Darstellung der qPCR mittels TaqMan™-System.....	18
Abb. 3:	Schematische Darstellung der qPCR mittels SYBR™ Green.	22
Abb. 4:	Veranschaulichung des „Amplification Refractory Mutation Systems“.	23
Abb. 5:	Pipettierschema einer 96-Well-Platte zur Chimärismusquantifizierung anhand des Allels SRY.	39
Abb. 6:	Pipettierschema einer 48-Well-Platte zur Typisierung gesunder Probandinnen/Probanden auf den SNP rs713753.	42
Abb. 7:	Streuung der gemessenen DNA-Konzentrationen in Abhängigkeit von der Elutionsmethode beim Mini-Kit.....	48
Abb. 8:	Streuung der resultierenden DNA-Erträge in Abhängigkeit von der Elutionsmethode beim Mini-Kit.....	49
Abb. 9:	Streuung der gemessenen DNA-Konzentrationen in Abhängigkeit von der Elutionsmethode beim Midi-Kit.....	51
Abb. 10:	Streuung der resultierenden DNA-Erträge in Abhängigkeit von der Elutionsmethode beim Midi-Kit.....	51
Abb. 11:	Amplifikationsplot des Experiments SRY/2.	52
Abb. 12:	Notwendiger DNA-Input für eine verlässliche Amplifikation in Abhängigkeit vom getesteten Allel und vom Chimärismusgrad.	54
Abb. 13:	Cq-Werte von SRY und HCK bei qPCR des artifiziellen 99,99 %-Chimärismus unter Variation des DNA-Inputs.	55
Abb. 14:	Cq-Werte von SRY und HCK bei qPCR des artifiziellen 99,90 %-Chimärismus unter Variation des DNA-Inputs.	55
Abb. 15:	Cq-Mittelwerte von SRY bei qPCR der artifiziellen 99,99 %- und 99,90 %-Chimärismen unter Variation des DNA-Inputs.....	56
Abb. 16:	ΔCq von SRY bei qPCR der artifiziellen 99,99 %- und 99,90 %-Chimärismen unter Variation des DNA-Inputs.....	56
Abb. 17:	Differenz der allelspezifischen Cq-Werte zwischen den beiden Chimärismusgraden (99,90 % und 99,99 %).	59
Abb. 18:	Differenz der ΔCq -Werte zwischen den beiden Chimärismusgraden (99,90 % und 99,99 %).	60
Abb. 19:	Ausschnitt aus der Amplifikationskurve von S07b/2, 99,90 %.	61
Abb. 20:	Multicomponent-Plots des Experiments SRY/2, 99,99 %.	62
Abb. 21:	Aus Cq-Werten berechnete Chimärismuswerte des artifiziell hergestellten 99,99 %-Donorchimärismus in Abhängigkeit vom DNA-Input und vom getesteten Allel.	63
Abb. 22:	Aus Cq-Werten berechnete Chimärismuswerte des artifiziell hergestellten 99,90 %-Donorchimärismus in Abhängigkeit vom DNA-Input und vom getesteten Allel.	64

Abb. 23:	Aus Cq-Werten errechnete Chimärismuswerte des Allels SRY in Abhängigkeit vom DNA-Input.....	65
Abb. 24:	Genotypenverteilung des SNP rs713753.	67
Abb. 25:	Informativität des SNP rs713753.....	68
Abb. 26:	Amplifikationsplot einer Standardreihe in Wasser für das Allel rs713753_C.....	69
Abb. 27:	Standardkurven der drei Verdünnungsreihen in Wasser für das Allel rs713753_T.	70
Abb. 28:	Standardkurven der drei Verdünnungsreihen in Wasser für das Allel rs713753_C.....	72
Abb. 29:	Standardkurven von drei Verdünnungsreihen in Wasser für die lokusspezifische Referenz des SNP rs713753.....	73
Abb. 30:	Standardkurven von drei Verdünnungsreihen in Wasser für die lokusspezifische Referenz des SNP rs713753.....	75
Abb. 31:	Vergleich der beiden Standardkurven der lokusspezifischen Referenz.	76
Abb. 32:	Vergleich der Standardkurven des Alleles rs713753_T und der lokusspezifischen Referenz.	77
Abb. 33:	Vergleich der Standardkurven des Alleles rs713753_C und der lokusspezifischen Referenz.	78
Abb. 34:	Vergleich der Standardkurven der Allele rs713753_C und T.....	79
Abb. 35:	Differenz der kalkulierten Cq-Werte der Allele rs713753_C und T bei gegebener Kopienzahl.....	80
Abb. 36:	Vergleich der Standardkurven der Allele rs713753_C und T und der lokusspezifischen Referenz.	81
Abb. 37:	Amplifikationsplot einer Standardreihe allelpositiver in allelnegativer DNA des Allels rs713753_C.....	82
Abb. 38:	Standardkurven der drei Standardreihen allelpositiver in allelnegativer DNA für das Allel rs713753_C.....	84
Abb. 39:	Vergleich der beiden Standardkurven für das Allel rs713753_C aus den Standardreihen allelpositiver DNA in Wasser und in allelnegativer DNA.....	85
Abb. 40:	Standardkurve aus ΔCq -Werten der Standardreihen allelpositiver in allelnegativer DNA des Allels rs713753_C.....	88
Abb. 41:	Standardkurven der drei Verdünnungsreihen in Wasser für das Allel rs713753_C aus vier Verdünnungsstufen.	
Abb. 42:	Standardkurve aus den Cq-Mittelwerten der drei Verdünnungsreihen für das Allel C.	
Abb. 43:	Standardkurven von drei Verdünnungsreihen in Wasser für die lokusspezifische Referenz des SNP rs713753.	
Abb. 44:	Standardkurven von drei Verdünnungsreihen in Wasser für die lokusspezifische Referenz des SNP rs713753.	

Abb. 45: Vergleich der beiden Standardkurven der lokusspezifischen Referenz des SNP rs713753.

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die häufigsten Indikationen für eine allogene HSZT (5, 7, 8).	4
Tabelle 2: Übersicht über die häufigsten Indikationen für eine autologe HSZT (5, 8).	4
Tabelle 3: Verschiedene Formen des hämatopoetischen Chimärismus.....	10
Tabelle 4: Übersicht über verschiedene Methoden zur Chimärismusdiagnostik.	12
Tabelle 5: Auflistung verwendeter Geräte und Softwares.	26
Tabelle 6: Auflistung verwendeter Labormaterialien.	27
Tabelle 7: Auflistung verwendeter Reagenzien, Lösungsmittel und Kits.	28
Tabelle 8: Auflistung verwendeter Primer.	28
Tabelle 9: Auflistung verwendeter Sonden.	29
Tabelle 10: Häufigkeit der Anwendung der Allele SRY, S02 und S07b zur Chimärismusanalyse.....	30
Tabelle 11: Überblick über die bei der DNA-Extraktion getesteten Elutionsmethoden.	32
Tabelle 12: Übersicht über die mittels Leukozytenisolation hergestellten artifiziellen Chimärismen.....	33
Tabelle 13: Auszutauschende Volumina in Abhängigkeit von den gewünschten Chimärismen.....	34
Tabelle 14: DNA-Mengenverhältnisse der Standardreihen für die Allele des SNP rs751753.....	35
Tabelle 15: Zusammensetzung des Mastermixes für die SYBR™ Green-PCR.....	36
Tabelle 16: Programm für die SYBR™ Green-PCR.....	36
Tabelle 17: Pipettierschema für die Real-Time-PCR mit TaqMan™-Sonde.	37
Tabelle 18: Programm für die Real-Time-PCR mit TaqMan™-Sonde.	38
Tabelle 19: Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit verwendeten allespezifischen ΔR_n -Schwellenwerte zur Bestimmung des Cq-Wertes.	38
Tabelle 20: Pro Ansatz enthaltene Kopienzahl eines Allels in Abhängigkeit von der Gesamt-DNA-Masse.....	43
Tabelle 21: Übersicht der Ergebnisse des Extraktionsexperiments mit dem Mini-Kit.	49
Tabelle 22: Übersicht der Ergebnisse des Extraktionsexperiments mit dem Midi-Kit.	51
Tabelle 23: ΔCq -Mittelwerte und Standardabweichungen der Triplikate pro Experiment und Chimärismusgrad.	57
Tabelle 24: Differenz der Cq-Werte zwischen den Ansätzen mit 200 ng und 400 ng DNA-Input ($\Delta_{200-400}$).....	58

Tabelle 25: Mittelwerte und Standardabweichungen der errechneten Chimärismuswerte pro Experiment.	66
Tabelle 26: Übersicht über die Eigenschaften der aus den Standardverdünnungsreihen in Wasser abgeleiteten Standardkurven. ...	81
Tabelle 27: Ergebnisse der Chimärismusbestimmung von Verlaufskontrollen mittels qPCR des Allels rs713753_C.	90
Tabelle 28: Ergebnisse der Standardkurven des Allels rs713753_T.	
Tabelle 29: Ergebnisse der Standardkurven des Allels rs713753_C.	
Tabelle 30: Übersicht und Vergleich der Eigenschaften der aus den Standardverdünnungsreihen in Wasser abgeleiteten Standardkurven aus drei bzw. vier Verdünnungsstufen.	

IV Formelverzeichnis

Formel 1:	Berechnung des normalisierten Cq-Wertes ΔCq	19
Formel 2:	Berechnung von $\Delta\Delta Cq$	20
Formel 3:	Berechnung des Empfängerchimärismus in Prozent.....	20
Formel 4:	Aufbau der Formel zur Chimärismusberechnung mittels Standardkurvenmethode.....	20
Formel 5:	Berechnung der Leukozytenzahl im Puffer bei Leukozytenisolation.....	34
Formel 6:	Berechnung des benötigten Volumens an HBSS-Puffer zum Erreichen einer Leukozytenkonzentration von $5 \times 10^6/ml$	34
Formel 7:	Berechnung von ΔCq bei Normalisierung mittels dem Haushaltsgen HCK.....	39
Formel 8:	Berechnung der Differenz der Cq-Werte zwischen den Ansätzen mit 200 ng und 400 ng DNA-Input (= $\Delta_{200-400}$).....	40
Formel 9:	Berechnung der Differenzen der allelspezifischen Cq-Werte (= $\Delta_{\log 10}$) und der ΔCq -Werte (= $\Delta_{\Delta \log 10}$) zwischen 99,99 %- und 99,90 %- Chimärismus bei gleichem DNA-Input.	40
Formel 10:	Formeln zur Chimärismusberechnung für die Allele S02, S07b und SRY.....	41
Formel 11:	Berechnung der qPCR-Effizienz eines Primersatzes anhand zuvor erstellter Standardkurven.....	44
Formel 12:	Umrechnung der auf einem natürlichen Logarithmus basierenden Steigung einer Standardkurve in eine auf dekadischem Logarithmus basierende Steigung.....	44
Formel 13:	Auflösung der Formel der Standardkurven-Trendlinie für das Allel rs713753_C nach dem Anteil allelpositiver DNA.....	45
Formel 14:	Auflösung der Trendlinienformel nach der Verdünnungsstufe.....	88
Formel 15:	Formel für das Allel rs713753_C zur Berechnung des Donorchimärismus bei gegebenem ΔCq -Wert und bei für das Allel C heterozygotem/heterozygoter Empfänger/-in.....	88
Formel 16:	Formel für das Allel rs713753_C zur Berechnung des Donorchimärismus bei gegebenem ΔCq -Wert und bei für das Allel C homozygotem/homozygoter Empfänger/-in.....	89

V Weitere Tabellen und Diagramme

Tabelle 28: Ergebnisse der Standardkurven des Allels rs713753_T.
Die Werte stammen aus einer Verdünnungsreihe in Wasser und basieren auf einer logarithmischen Formel zur Basis e. „Steigung nach log₁₀“ gibt die Steigung umgerechnet auf einen Logarithmus zur Basis 10 an.

rs713753_T	Steigung nach log _e	y-Achsenabschnitt	R ²	Effizienz	Steigung nach log ₁₀
Reihe 1	-1,623	49,356	0,9996	0,8518	-3,737
Reihe 2	-1,542	48,237	0,9953	0,9127	-3,551
Reihe 3	-1,636	49,127	0,9957	0,8427	-3,767
MW	-1,601	48,907	0,9974	0,8675	-3,685
SD	0,051	0,591	0,002	0,038	0,117

rs713753_Ref _T	Steigung nach log _e	Y-Achsenabschnitt	R ²	Effizienz	Steigung nach log ₁₀
Reihe 1	-1,507	36,427	0,9994	0,9417	-3,470
Reihe 2	-1,509	36,444	0,9995	0,9400	-3,475
Reihe 3	-1,508	36,395	0,9999	0,9409	-3,472
MW	-1,508	36,422	0,9997	0,941	-3,472
SD	0,001	0,025	0,000	0,001	0,002

Tabelle 29: Ergebnisse der Standardkurven des Allels rs713753_C.
 Die Werte stammen aus einer Verdünnungsreihe in Wasser und basieren auf einer logarithmischen Formel zur Basis e. „Steigung nach log₁₀“ gibt die Steigung umgerechnet auf einen Logarithmus zur Basis 10 an.

rs713753_C	Steigung nach log _e	y-Achsenabschnitt	R ²	Effizienz	Steigung nach log ₁₀
Reihe 1	-1,43	44,058	0,9999	1,0123	-3,293
Reihe 2	-1,337	43,357	0,9952	1,1127	-3,079
Reihe 3	-1,488	44,463	0,997	0,9582	-3,426
MW	-1,418	43,958	0,9974	1,0243	-3,265
SD	0,076	0,560	0,002	0,078	0,175

rs713753_Refc	Steigung nach log _e	Y-Achsenabschnitt	R ²	Effizienz	Steigung nach log ₁₀
Reihe 1	-1,475	36,336	0,9997	0,9699	-3,396
Reihe 2	-1,444	36,09	0,9996	0,9987	-3,325
Reihe 3	-1,465	36,273	1	0,9790	-3,373
MW	-1,461	36,233	0,9998	0,9827	-3,364
SD	0,016	0,128	0,000	0,015	0,036

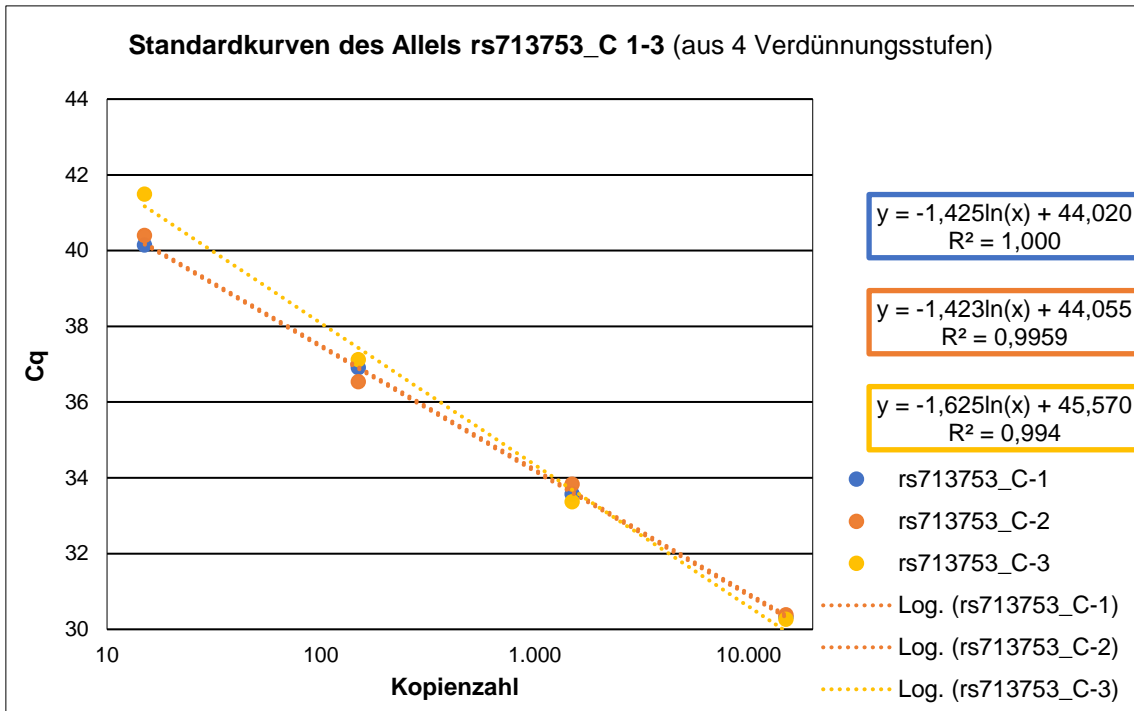


Abb. 41: Standardkurven der drei Verdünnungsreihen in Wasser für das Allel rs713753_C aus vier Verdünnungsstufen.
 Alle drei Verdünnungsreihen wurden aus der gleichen DNA-Probe eines homozygoten Individuums erstellt. Die Kurven unterscheiden sich nur gering von denen aus nur drei Verdünnungsstufen (vgl. 3.3.2.2).

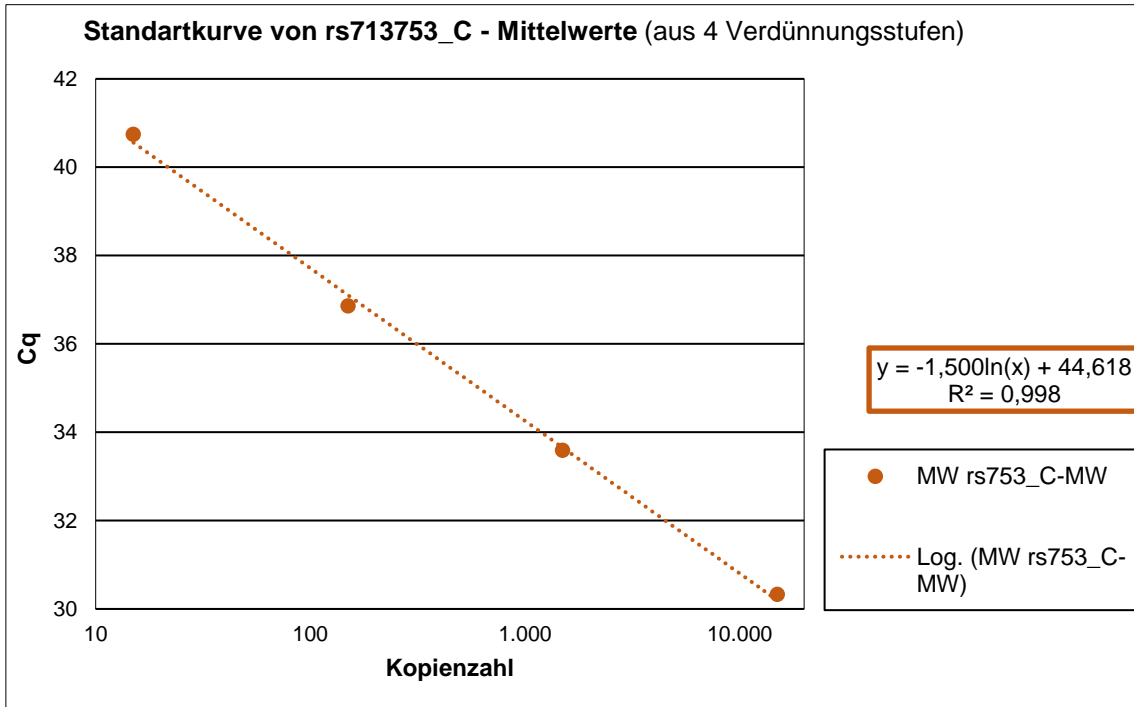


Abb. 42: Standardkurve aus den Cq-Mittelwerten der drei Verdünnungsreihen für das Allel C.
 Die Kurve wurden aus vier Verdünnungsstufen (1:1 bis 1:1.000) gebildet und unterscheidet sich nur gering von der aus nur drei Verdünnungsstufen (vgl. 3.3.2.4).
 (MW = Mittelwert)

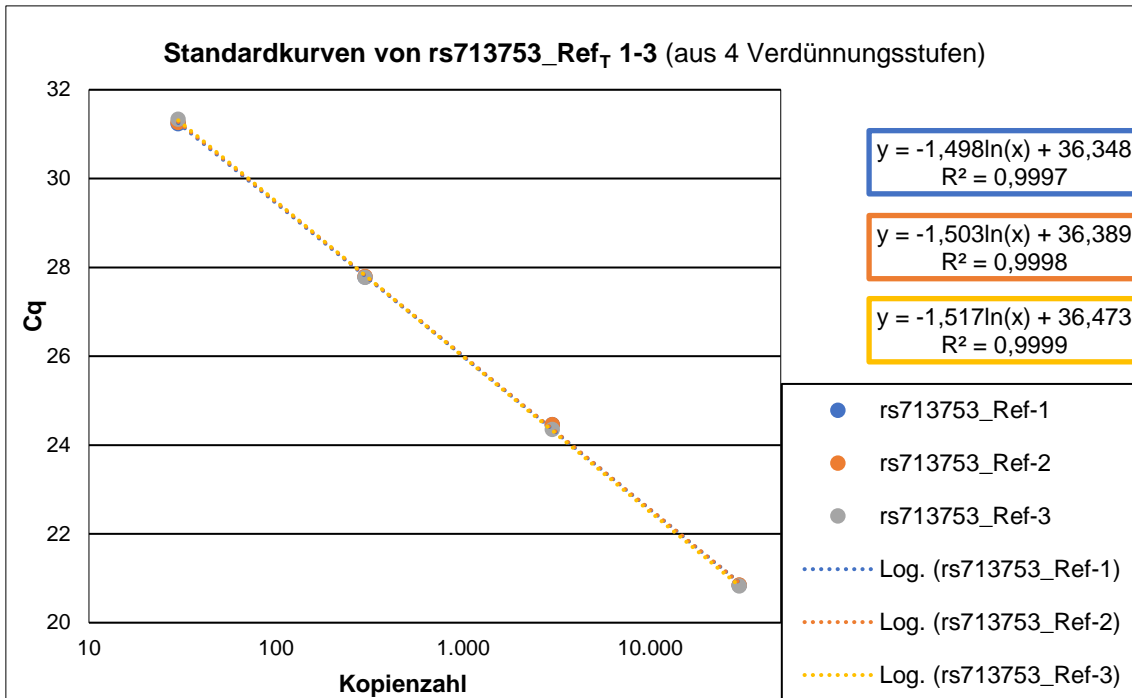


Abb. 43: Standardkurven von drei Verdünnungsreihen in Wasser für die lokusspezifische Referenz des SNP rs713753.

Es handelt sich um die drei Verdünnungsreihen, die zur Standardisierung des Allels C hergestellt wurden. Die Kurven wurden aus den C_q-Werten von vier Verdünnungsstufen (1:1 bis 1:1.000) generiert und unterscheiden sich nur gering von denen aus nur drei Verdünnungsstufen (vgl. 3.3.2.3).

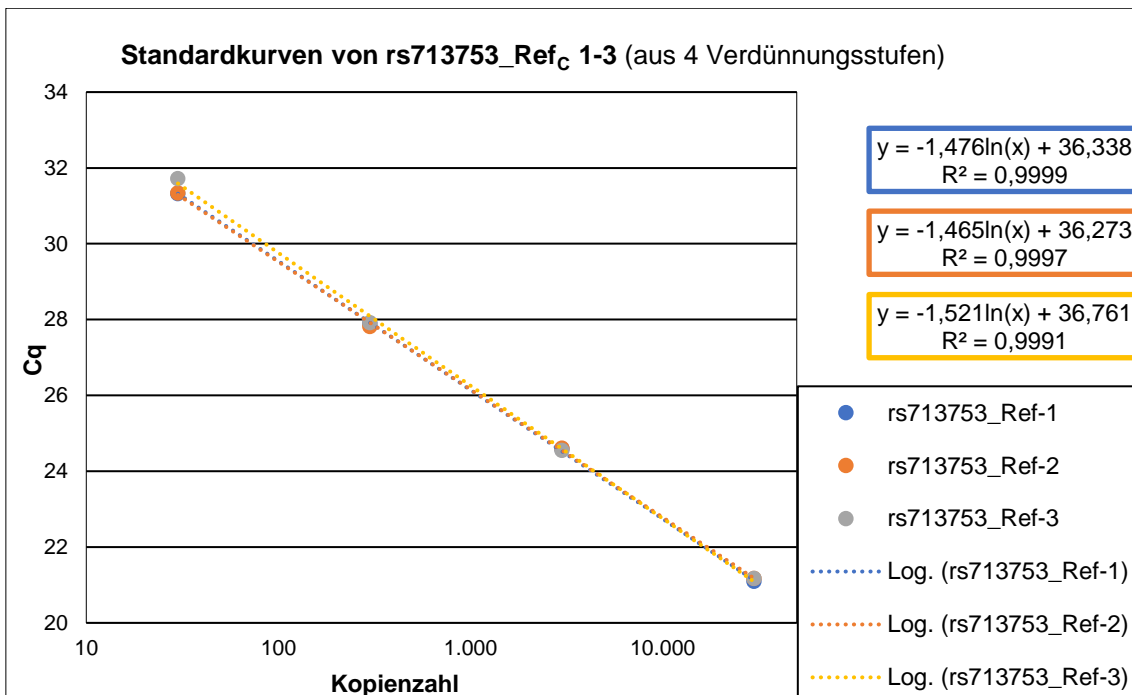


Abb. 44: Standardkurven von drei Verdünnungsreihen in Wasser für die lokusspezifische Referenz des SNP rs713753.

Es handelt sich um die drei Verdünnungsreihen, die zur Standardisierung des Allels C hergestellt wurden. Die Kurven wurden aus den C_q-Werten von vier Verdünnungsstufen (1:1 bis 1:1.000) generiert und unterscheiden sich nur gering von denen aus nur drei Verdünnungsstufen (vgl. 3.3.2.3).

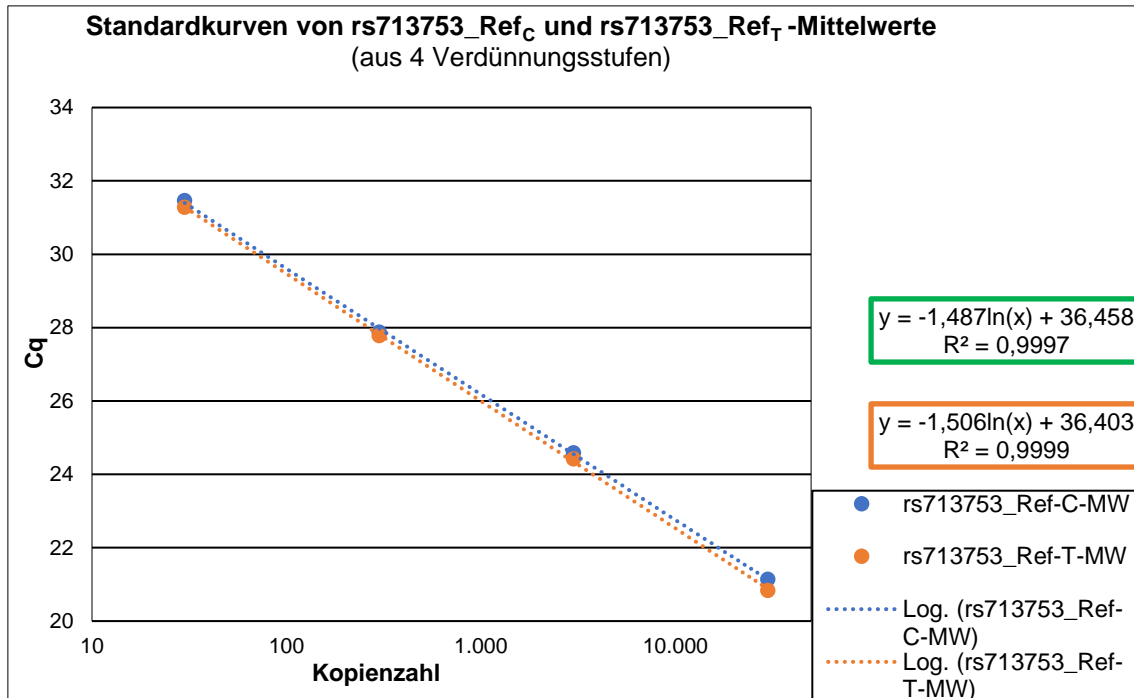


Abb. 45: Vergleich der beiden Standardkurven der lokusspezifischen Referenz des SNP rs713753. Es sind die Standardkurven zu sehen, die für die lokusspezifische Referenz aus den Mittelwerten der jeweils für die Allele T und C hergestellten Verdünnungsreihen entstanden sind. Die Kurven wurden aus den Cq-Werten von vier Verdünnungsstufen (1:1 bis 1:1.000) generiert und unterscheiden sich nur gering von denen aus nur drei Verdünnungsstufen (vgl. 3.3.2.3). (MW = Mittelwert)

Tabelle 30: Übersicht und Vergleich der Eigenschaften der aus den Standardverdünnungsreihen in Wasser abgeleiteten Standardkurven aus drei bzw. vier Verdünnungsstufen. Es fällt auf, dass die Eigenschaften der Standardkurven aus drei Verdünnungsstufen denen aus vier sehr ähnlich. Die Werte der lokusspezifischen Referenz stellen das arithmetische Mittel aller insgesamt sechs beschriebenen Standardkurven der Referenz dar (ergo die Mittelwerte aller Standardkurven der lokusspezifischen Referenz, die aus den für die Allele C und T hergestellten Standardverdünnungsreihen abgeleitet wurden).

Allel	Anzahl Verdünnungsstufen	R ²	Effizienz	Steigung bei log ₁₀	Y-Schnittpunkt
T	3	0,9974	0,8675	-3,6864	48,907
C	3	1,0000	1,0243	-3,2658	43,958
	4	0,9980	0,9477	-3,4539	44,618
Referenz	3	0,9998	0,9609	-3,4190	36,328
	4	1,0000	0,9512	-3,4447	36,4310

VI Danksagung

Herzlichst bedanken möchte ich mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

- Bei Prof. Dr. med. H. Einsele, Direktor der medizinischen Klinik und Poliklinik II, für die Möglichkeit, diese Doktorarbeit in seiner Klinik durchführen zu können.
- Bei Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Löffler, der mir das Thema dieser Doktorarbeit zur Verfügung gestellt hat, die Arbeit hervorragend betreut und mir mit aufbauenden Worten geduldig zur Seite gestanden hat.
- Bei Denise Michel und Anna-Lena Schmitt für die gute Betreuung und die zuverlässige Unterstützung bei der Einarbeitung in die Methodik.
- Bei Dr. Jan Springer für die hervorragende Betreuung und die zuverlässige Unterstützung bis hin zur Korrektur der Entwürfe.
- Bei der gesamten AG Löffler für die ständige Hilfsbereitschaft bei jederlei Fragen und Problemen.
- Bei allen Blutspenderinnen und Blutspendern, darunter meine Freunde Miriam, Svenja, Annika, Karl, Markus und Flora.
- Bei meiner Familie und meinen Freunden, da sie immer für mich da waren und mich unterstützt haben. Mit ihrer Liebe, Geduld und Hartnäckigkeit waren sie zu einem wesentlichen Teil am Abschluss dieser Arbeit beteiligt