

Aus der Klinik für
Hämatologie, Hämostaseologie,
Onkologie und Stammzelltransplantation
der
Medizinischen Hochschule Hannover

Etablierung und Evaluation einer hochsensitiven Chimärismusanalyse zum Monitoring von Leukämiepatienten nach allogener Stammzelltransplantation

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin in der
Medizinischen Hochschule Hannover

vorgelegt von
Kim Rabe
aus Hamburg

Hannover, 2021

Angenommen vom Senat am 13.06.2022

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Hochschule Hannover

Präsident:	Prof. Dr. med. Michael P. Manns
Betreuung der Arbeit:	Prof. Dr. med. Lothar Hambach
1. Referent:	Prof. Dr. med. Martin Sauer
2. Referentin:	Prof.'in Dr. med. rer. nat. Hildegard Büning

Tag der mündlichen Prüfung:	13.06.2022
-----------------------------	------------

Prüfungsausschuss:

Vorsitz:	Prof. Dr. med. Thorsten Witte
1. Prüfer/in:	Prof. Dr. med. Bernhard Schmidt
2. Prüfer/in:	Prof.'in Dr. med. Bettina Wedi

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
1. Einleitung.....	6
1.1. Prolog.....	6
1.2. Akute Leukämien.....	6
1.3. Allogene Stammzelltransplantation zur Therapie von akuten Leukämien	7
1.4. Methoden der Rezidivdetektion nach allogener Stammzelltransplantation	10
1.5. Analyse des Chimärismus nach allogener Stammzelltransplantation	12
1.6. Zielsetzung der Arbeit	14
1.7. Vorgehensweise.....	14
2. Material und Methoden	16
2.1. Patientenkollektiv	16
2.2. Verwendung genetischen Materials	17
2.3. Optimierung der DNA- Isolation	18
2.4. Etablierung der qPCR	19
2.5. Amplifikationskurve und Standardkurve	22
2.6. Typisierung von Spendern und Patienten	22
2.7. Quantifizierung des Empfängerchimärismus nach allogener SZT	23
2.8. Erhebung ausgewählter klinischer Ereignisse.....	25
2.9. Berechnung des Chimärismusverlaufs.....	26
2.10. Statistische Auswertungsverfahren	27
3. Ergebnisse.....	28
3.1. Typisierung der Spender und der Patienten vor allogener SZT	28
3.1.1. Markerverteilung in Patienten und Spendern	28
3.1.2. Analyse der Markerverteilung	29
3.1.3. Marker-Mismatches der Patienten-Spender-Paare	31

3.2. Amplifikation der Standardreihen	32
3.3. Niveau der Empfängerchimärismuswerte	34
3.3.1. Chimärismuswerte zu bestimmten Zeitpunkten nach Transplantation.....	35
3.3.1.1. Konditionierung	35
3.3.1.2. Remissionsstatus vor Transplantation	36
3.3.1.3. Rezidiv nach allogener SZT	37
3.3.1.4. Vergleich der Erkrankungen AML und ALL.....	38
3.3.1.5. Survival	40
3.3.2. Chimärismusverlauf nach klinischem Ereignis.....	41
3.3.2.1. Reduktion und Absetzen der Immunsuppression	43
3.3.2.2. GvHD	44
3.3.2.3. DLI	46
3.3.2.4. Virale Infekte	47
3.3.2.5. Pneumonie und FUO	49
3.3.2.6. Sonstige Infekte	50
3.3.3. Monotoner Anstieg des Empfängerchimärismus in Patienten mit und ohne klinisches Rezidiv	50
4. Diskussion	55
4.1. Etablierung und Optimierung der Methoden	55
4.1.1. Typisierung	55
4.1.2. Standardreihen	56
4.1.3. Chimärismus-Analyse.....	57
4.2. Wesentliche Einflussfaktoren auf die absoluten Empfängerchimärismus-Werte in den ersten 150 Tagen nach allogener SZT	58
4.2.1. Konditionierung.....	58
4.2.2. Remissionsstatus vor Transplantation	59
4.2.3. Rezidiv nach allogener SZT.....	59

4.2.4. Vergleich der Erkrankungen AML und ALL	60
4.2.5. Survival.....	60
4.3. Einfluss der klinischen Ereignisse auf den Chimärismusverlauf	61
4.3.1. Klinische nicht rezidiv-assoziierte Ereignisse mit einem Abfall des Empfängerchimärismus.....	61
4.3.1.1. Reduktion und Absetzen der Immunsuppression.....	62
4.3.1.2. GvHD	62
4.3.1.3. DLI	63
4.3.2. Klinische nicht rezidiv-assoziierte Ereignisse mit einem Anstieg des Empfängerchimärismus.....	64
4.3.3. Klinische nicht rezidiv-assoziierte Ereignisse ohne einen deutlichen Einfluss auf den Empfängerchimärismus	65
4.3.4. Chimärismusanstieg bei klinischen Rezidiven.....	66
4.4. Ausblick.....	67
5. Zusammenfassung	68
6. Abkürzungsverzeichnis	70
7. Bibliographie.....	71
8. Lebenslauf Kim Rabe	77
9. Erklärung	78
10. Danksagung	79

1. Einleitung

1.1. Prolog

Die allogene Stammzelltransplantation (SZT) ist eine kurative Behandlung maligner hämatopoetischer Erkrankungen. Akute Leukämien stellen die Hauptindikation für die allogene SZT dar¹. Der therapeutische Effekt der allogenen SZT beruht auf der zytoreduktiven Behandlung vor der Transplantation von Stammzellen meist HLA-gematchter Spender und auf dem sog. „Graft-versus-Leukämie Effekt“ (GvL-Effekt) der transplantierten Immunzellen². Trotzdem sind Rezidive der Grunderkrankung weiterhin der Hauptgrund für die Mortalität nach allogener SZT³⁻⁵: Sie machen die Hälfte aller letalen Ausgänge von akuten Leukämien nach allogener SZT aus⁶. Eine frühzeitige Detektion von Rezidiven könnte durch die frühzeitigere Einleitung von antileukämischen Therapien die Prognose von Rezidiven verbessern. Die Messung des sogenannten Chimärismus, d.h. des Verhältnisses von Spender- und Empfängerblutbildung, ist ein etabliertes Verfahren zur Rezidivdetektion nach allogener SZT. Herkömmliche Methoden wie die sogenannte „STR-Analyse“ haben jedoch nur eine geringe Sensitivität in der Detektion von Rezidiven^{7,8}. Die quantitative PCR (qPCR) erhöht die Sensitivität von Chimärismusanalysen beträchtlich^{9,10}. Bislang existieren jedoch nur wenige Daten zu den Vor- und Nachteilen von qPCR-basierten Chimärismusanalysen in der klinischen Anwendung.

1.2. Akute Leukämien

Akute Leukämien werden in zwei Hauptgruppen unterteilt; die akute myeloische Leukämie (AML) und die akute lymphatische Leukämie (ALL). Die AML entsteht durch somatische Mutationen in hämatopoetischen Vorläuferzellen¹¹. Bei der AML betrug die Gesamtinzidenz im Jahr 2014 4,33 Fälle pro 100.000 Einwohner¹², wobei der Häufigkeitsgipfel hier im höheren Alter liegt, bei einem Durchschnittsalter bei Diagnosestellung von 67 Jahren⁶. Sie wird weiter unterteilt in die de-novo-AML und die sekundäre AML¹³. Die sekundäre AML entsteht aus einem myelodysplastischen Syndrom, nach zytostatischen Therapien maligner Erkrankungen oder nach Strahlen- oder Benzol-Exposition^{14,15}.

Die Prognose der Patienten hängt entscheidend sowohl vom Alter des Patienten als auch von den genetischen Veränderungen in den Leukämiezellen ab. Für die

Prognose relevant sind hierbei sowohl chromosomale als auch molekulargenetische Veränderungen, welche in den Empfehlungen des sog. European Leukemia Net (ELN) näher beschrieben sind¹⁶.

Als ALL werden maligne Veränderungen des blutbildenden Systems bezeichnet, die von lymphatischen Vorläuferzellen aus Knochenmark, Thymus oder lymphatischem Gewebe ausgehen. Ätiologische Faktoren sind hier, wie bei der AML, Strahlenexposition sowie Exposition gegenüber myelotoxischen Substanzen wie Zytostatika oder Benzol¹⁷. Die Gesamtinzidenz betrug bei der ALL im Jahr 2014 1,57 Fälle pro 100.000 Einwohner¹² mit einem Häufigkeitsgipfel im Kindesalter und einem erneuten Anstieg der Häufigkeit nach dem 40. Lebensjahr¹².

In über 60% der erwachsenen ALL-Patienten werden zyto- oder molekulargenetische Abberationen in den Leukämiezellen nachgewiesen. Charakteristisch ist hier die Verlagerung von Protoonkogenen durch Translokationen wie z.B. die Verlagerung des c-MYC-Protoonkogens von Chromosom 8 auf Chromosom 14 bei der ALL-typischen t(8;14)(q24;q32)-Translokation¹⁸. Am häufigsten nachgewiesen wird die Translokation t(9;22) durch Fusion des c-ABL-Gens mit Teilen des BCR-Gens. Diese BCR-ABL-Translokation tragen 20-30% aller akuten lymphatischen Leukämien¹⁸. Ein gewisser Anteil von ALL entsteht auch durch nicht leukämietypische Deletionen und Punktmutationen¹⁸.

1.3. Allogene Stammzelltransplantation zur Therapie von akuten Leukämien

Die allogene SZT ist eine kurative Behandlungsoption bei akuten Leukämien und Myelodysplasien. Nach allogener SZT ist die Rezidivrate deutlich niedriger und das krankheitsfreie Überleben signifikant verbessert im Vergleich zur Postremissionschemotherapie¹⁹. Die allogene SZT basiert auf einer zytoreduktiven Therapie (die sogenannte „Konditionierung“), gefolgt von einer Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen von Spendern, welche meist weitgehend für humane Leukozyten Antigene (HLA) mit dem Patienten übereinstimmen³. Die Konditionierung, basierend auf einer Chemotherapie, teilweise kombiniert mit einer Ganzkörperbestrahlung, hat zum Ziel, verbliebene Leukämiezellen des Patienten zu zerstören und das Immunsystem des Patienten so weit zu depletieren, dass die transplantierten Stammzellen vom Immunsystem des Patienten nicht abgestoßen werden. Aus den transplantierten Stammzellen reifen neue hämatopoetische Zellen einschließlich Immunzellen des Spenders heran. Dieser Prozess wird als Engraftment

bezeichnet und wird v. a. anhand der steigenden Zahl neutrophiler Granulozyten im Organismus des Stammzellempfängers detektiert (bei Knochenmark: Im Mittel um Tag 21, bei peripheren Blutstammzellen um Tag 14)^{20,21}. Die Konditionierung ist meist nicht in der Lage, alle Leukämiezellen des Patienten zu zerstören. Der kurative Effekt der SZT basiert aus heutiger Sicht v.a. auf der Fähigkeit des transplantierten Immunsystems des Spenders, die verbliebenen Leukämiezellen des Patienten als fremd zu erkennen und zu zerstören (GvL-Effekt)²². Da die transplantierten Immunzellen des Spenders nicht zwischen den verbliebenen Leukämiezellen und normalen blutbildenden Zellen sowie epithelialen Zellen des Empfängers unterscheiden können, tritt der GvL-Effekt meist in Kombination mit einer sogenannten Graft-versus-Host-Erkrankung (Graft versus Host Disease, GvHD) auf^{22,23}, bei der insbesondere epitheliale Zellen (in Haut, Darm und Leber) des Patienten zerstört werden²⁴.

Im Folgenden werden die unterschiedlichen Parameter HLA-Matching, Konditionierung, Stammzellquellen und die Posttransplantationsphase näher beschrieben:

1. *HLA-Matching*

Um das Risiko einer Abstoßung der Stammzellen des Spenders durch das Immunsystem des Empfängers und einer GvHD durch die transplantierten Immunzellen des Spenders möglichst gering zu halten, müssen Spender und Empfänger für die sogenannten Human Leukocyte Antigen (HLA)-Merkmale weitgehend identisch sein. Die Übereinstimmung der HLA-Merkmale zwischen Spender und Empfänger wird üblicherweise für HLA-A, -B, -C, -DR und -DQ überprüft, wobei es ca. 16.000 bekannte Allele für die HLA-Genloci gibt²⁵. Da ein HLA-Mismatch ein erhöhtes Risiko für GvHD und Mortalität darstellt²⁶, wird somit versucht, für die 10 relevantesten HLA-Allele eine weitgehende genetische Übereinstimmung zwischen Spender und Empfänger zu finden. Als Spender kommen einerseits HLA-identische Geschwisterspender als auch unverwandte Fremdspender mit einem weitgehendem HLA-Match in Frage. Falls sich kein Familienspender findet, wird eine weltweite Fremdspendersuche eingeleitet. Für Fremdspender werden bei Mangel an Alternativen meist ein bis zwei HLA-Mismatches (9/10 und 8/10) akzeptiert³.

2. *Konditionierung*

Bei der Konditionierung vor der allogenen SZT werden myeloablative Schemata und nicht-myeloablative (d. h. dosisreduzierte) Schemata unterschieden. Bei der myeloablativen Konditionierung (MAC) wird das eigene blutbildende System des Patienten komplett zerstört, was zu einem bestmöglichen anti-leukämischen Effekt führt²⁷. Bei älteren oder geschwächten Patienten mit einer Vielzahl von Vortherapien ist eine myeloablative Konditionierung allerdings aufgrund der Vielzahl an Nebenwirkungen kaum möglich²⁷. In diesen Fällen werden nicht-myeloablative Konditionierungs-Schemata (Dosisreduzierte Konditionierung oder Reduced Intensity Conditioning, RIC) angewandt, welche zwar eine geringere anti-leukämische Wirkung haben als myeloablative Konditionierungen, aber ausreichen, um das Immunsystem des Patienten soweit zu depletieren, dass das Stammzelltransplantat nicht abgestoßen wird²⁷. Nach nicht-myeloablativer Konditionierung beruht der anti-leukämische Effekt der SZT somit im Wesentlichen auf dem immunologischen GvL-Effekt des transplantierten Spender-Immunsystems²⁸.

3. *Stammzellquellen*

Im Wesentlichen werden zwei Stammzellquellen unterschieden. Bei der klassischen Knochenmarkspende wird dem Spender operativ durch Punktion des Beckenkamms Knochenmark entnommen und dem Patienten in Form einer Transfusion übertragen. Bei der peripheren Blutstammzelltransplantation (PBSCT) werden die Stammzellen durch eine Stammzellapherese gewonnen, indem durch eine Behandlung des Spenders mit dem sogenannten „Granulozyten-Kolonie stimulierenden Faktor“ (G-CSF) eine Ausschwemmung hämatopoetischer Stammzellen aus dem Knochenmark (BM) in das periphere Blut hervorgerufen wird²⁹. Die Entnahme der Stammzellen erfolgt dabei über eine periphere Vene und somit ohne operativen Eingriff. Aufgrund des Wegfalls des Narkoserisikos spielt die Stammzellapherese als Weg der Stammzellgewinnung mittlerweile die vorherrschende Rolle²⁹. Klassische Knochenmarktransplantation werden von Seiten der Transplantationszentren meist nur noch bei besonderen Therapieindikationen (z.B. Aplastische Anämie, SZT bei Kindern) aufgrund des etwas geringeren GvHD-Risikos bevorzugt eingesetzt²⁹. Periphere Stammzellen haben für den Patienten jedoch auch Vorteile im Vergleich zu Knochenmark. Das Neutrophilen-Engraftment erfolgt ein bis sechs Tage früher und das Thrombozyten-Engraftment vier bis sieben Tage früher als bei der Verwendung

von Knochenmark³⁰. Insbesondere bei Patienten mit fortgeschrittenen hämatopoetischen Neoplasien zeigte sich nach Transplantation mit peripheren Blutstammzellen zudem ein niedrigeres Rezidivrisiko³⁰.

4. Posttransplantationsphase

Nach der Transplantation erfolgt zunächst die frühe Posttransplantationsphase bis ca. Tag 30 nach SZT, dann die Postengraftmentphase zwischen Tag 30 und Tag 100 nach SZT, und zuletzt die Spätphase nach Tag 100 bis zur vollständigen Immunrekonstruktion. Diese erfolgt bei unkompliziertem Transplantationsverlauf bis nach etwa einem Jahr³⁰.

Nach allogener SZT entwickelt sich zunächst eine Koexistenz der Spender- und Empfänger-Hämatopoese (gemischter Chimärismus). Üblicherweise wird die Empfänger-Hämatopoese im Verlauf vollständig durch die Hämatopoese des Spenders ersetzt, so dass dann ein sogenannter vollständiger Spenderchimärismus vorliegt.³⁰ Dies ist bei einer myeloablativen Konditionierung, bei der die Hämatopoese des Empfängers möglich vollständig zerstört wird, etwas früher der Fall als bei einer nicht-myeloablativen Konditionierung, bei der die vollständige Verdrängung der Empfänger-Hämatopoese oft erst innerhalb einiger Monate stattfindet³⁰.

1.4. Methoden der Rezidivdetektion nach allogener Stammzelltransplantation

Leukämiezellen (Blasten), welche die Konditionierung und die Bekämpfung durch das transplantierte Immunsystem des Spenders überleben, sind Ausgangspunkt für Rezidive nach allogener SZT¹⁹. Für eine frühzeitige therapeutische Intervention nach allogener SZT (z.B. durch eine rasche Reduktion der Immunsuppression oder die Gabe von Spenderlymphozyteninfusionen (Donor Lymphocyte infusions, DLI) zur Stärkung des GvL-Effektes) ist eine frühzeitige Detektion von Rezidiven erforderlich¹⁹. Zur Detektion von Rezidiven gibt es aktuell verschiedene Verfahren. Der derzeitige Goldstandard zur Bestätigung eines Rezidivs ist die direkte Untersuchung von Knochenmarkausstrichen, welche üblicherweise dann durchgeführt wird, wenn sich z.B. aufgrund eines unerklärten Thrombozytenabfalls oder des Auftretens von Blasten im peripheren Blut der dringende Verdacht auf ein Rezidiv ergibt¹⁹. Die zytologische Knochenmarkanalyse weist eine Sensitivität von 1-5% Leukämiezellen auf (siehe

Tabelle 1)¹⁹. Allerdings ist eine häufige Knochenmarkuntersuchung zu aufwändig und für den Patienten zu belastend, um regelhaft zur frühzeitigen Detektion von Rezidiven angewandt zu werden. Daher sind weniger invasive Methoden zur Rezidivdetektion aus dem peripheren Blut für das regelmäßige Monitoring von Patienten nach allogener SZT besser geeignet¹⁹.

Zur Detektion einer sogenannten „minimal residual disease“ (Minimale Resterkrankung, MRD) nach allogener SZT werden aktuell die Durchflusszytometrie (FC), die Detektion molekularer leukämiespezifischer Marker und die Chimärismusanalyse eingesetzt (siehe Tabelle 1). Die Durchflusszytometrie aus dem peripheren Blut erreicht bei einigen ALL-Patienten bei Vorliegen individueller leukämietypischer Oberflächenmarker eine Sensitivität von einer Leukämiezelle in 10.000 normalen Blutzellen (0,01%)³¹. Solche individuellen leukämietypischen Oberflächenmarker finden sich allerdings kaum bei der AML. Wesentlich sensitiver ist hier die Detektion molekularer leukämiespezifischer Marker, z.B. von Fusionsgenen wie bei der BCR-ABL-Translokation³², der Translokationen t(8;21), t(15;17) oder t(1;19)³³, sowie der Marker FLT3³⁴ und NPM1³⁵. Die Detektion molekularer leukämiespezifischer Marker erreicht eine Sensitivität von 0,01%-0,0001%¹⁹. Allerdings sind sowohl durchflusszytometrische als auch molekulare Marker bei einer Vielzahl von Leukämien nicht vorhanden oder gehen im Rezidiv verloren^{34,35}.

Tabelle 1. Möglichkeiten der MRD-Diagnostik bei AML- und ALL-Patienten. In der MRD-Diagnostik, die zur Detektion von Rezidiven nach allogener SZT eingesetzt wird, existieren verschiedene Methoden mit sehr unterschiedlicher Sensitivität. Die mikroskopische Untersuchung von Knochenmarkausstrichen findet weiterhin als Goldstandard eine breite Anwendung.

Name der Methode	Sensitivität
Mikroskopische Untersuchung von Knochenmarkausstrichen ¹⁹	1-5%
Durchflusszytometrie mit Verwendung von 6-Farben-Technik ³¹	0,01%
Chimärismusanalyse ^{9,10}	0,01%
PCR-Analysen von molekularen Markern, z.B. Fusionsgenen spezifischer Translokationen ¹⁹	0,01%-0,0001%

1.5. Analyse des Chimärismus nach allogener Stammzelltransplantation

Die Chimärismusanalyse ist eine alternative Methode zur frühzeitigen Detektion von Rezidiven. Bei der Chimärismusanalyse wird der Anteil patienteneigener Zellen bzw. der entsprechende Anteil Desoxyribonucleinsäure (DNA) an der gesamten Hämatopoese im peripheren Blut gemessen. Der Chimärismus wird üblicherweise prozentual angegeben. Wird sich auf den Anteil von Spenderzellen bezogen, so spricht man von Spenderchimärismus, beim Bezug auf Empfängerzellen dementsprechend von Empfängerchimärismus (EC). Da die Leukämiezellen Teil der Empfängerhämatopoese sind, ist ein Anstieg des Empfängeranteils nach allogener SZT indikativ für ein Rezidiv^{36,37}.

Methoden zur Chimärismusanalyse

Derzeit existieren mehrere Methoden zur Chimärismusanalyse (siehe Tabelle 2). Eine eher niedrige Sensitivität mit >5% Empfängerzellen weist die RFLP (Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus)-Methode auf³⁸. Am häufigsten eingesetzt wird die Messung von Short Tandem Repeats (STR) oder Mikrosatelliten-Methode, bei der längenpolymorphe DNA-Sequenzen durch eine Polymerasekettenreaktion vermehrt und durch Fragmentlängenanalyse dem Spender oder Empfänger zugeordnet werden können^{7,8}. Mit dieser Methode kann eine Empfängerzelle in 100 Spenderzellen nachgewiesen werden (entsprechend einer Sensitivität von 1%)^{7,8}. Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) zur Detektion des Y-Chromosoms kann zur Chimärismusanalyse mit einer Sensitivität von 1-2% Empfängerzellen genutzt werden. Allerdings ist diese Methode nur anwendbar, wenn Spender und Empfänger nicht dasselbe Geschlecht haben³⁰.

Zudem gibt es die Möglichkeit der qPCR-Analyse, die je nach analysierten Zielgen eine Sensitivität von 0,1-0,001% aufweist³⁹. Hiermit können unter anderem durch Detektion Y-Chromosom-spezifischer Gene wie dem Drosophila Fat Facets-Related Y-Linked Gen (DFFRY) oder DYS1 männliche von weiblichen Zellen unterschieden werden.

Tabelle 2. Methoden zur Chimärismusanalyse. Der Chimärismus nach allogener SZT kann auf mehrere Arten bestimmt werden, die sich in ihrer Sensitivität stark voneinander unterscheiden. Es werden die gebräuchlichsten Verfahren beschrieben und verglichen.

Name der Methode	Methodenbeschreibung	Sensitivität
RFLP (Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus) ³⁸	DNA wird durch Restriktionsenzyme geschnitten und mit Gelelektrophorese nach Länge aufgetrennt	>5%
STR (Short Tandem Repeats bzw. Mikrosatelliten) ^{7,8}	Analyse polymorpher DNA-Sequenzen mittels PCR	1-2%
FISH (Interphase-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) ³⁰	Markierung auf Abschnitten der Geschlechtschromosomen	1-2%
qPCR (Quantitative real-time-PCR) ^{9,10}	Analyse einzelner Nukleotid-Polymorphismen (SNP) oder Insertionen/Deletionen kurzer DNA-Abschnitte (In/Del-Polymorphismen)	0,1-0,001%

Im Jahr 2002 veröffentlichten Alizadeh et al. eine neue Methode zur Chimärismusanalyse mittels qPCR, die auf bis zu 19 biallelischen Insertion/Deletion (In/Del)-Polymorphismen basiert (siehe Tabelle 4)⁹. Die hierbei analysierten DNA-Abschnitte weisen eine relativ heterogene Verteilung in der Bevölkerung auf und sind auf verschiedene Chromosomen im Genom verteilt.

Das Verfahren wurde zwar seither in der Forschung immer wieder auf technischer Ebene mit der konventionellen STR-Analyse verglichen. Es gibt bisher wenige Untersuchungen zu den eventuellen klinischen Vorteilen einer Verbesserung der Sensitivität der Analyse⁴⁰. Zwar ist die genetische Verteilung der In/Del Polymorphismen beispielsweise für die USA⁹ und den taiwanesischen Raum bekannt, aber nicht für Deutschland⁴¹. Zudem existieren kaum Studien zum prospektiven Monitoring von qPCR-basierten Chimärismusanalysen nach allogener SZT in Bezug auf transplantationspezifische klinische Ereignisse wie z.B. Immunsuppression, GvHD oder Infektionen.

1.6. Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit soll die mögliche klinische Bedeutung der hochsensitiven Chimärismusanalyse auf Basis von In/del-Polymorphismen untersucht werden. Unter anderem soll dabei untersucht werden, ob der Chimärismus von Patienten nach allogener SZT nicht nur von Rezidiven der Grunderkrankung, sondern auch von anderen klinischen Ereignissen wie Infektionen, Immunsuppression und GvHD beeinflusst wird und dies auf einem Sensitivitätsniveau bis 10^{-4} messbar ist. Die Herausforderung ist daher, nicht alle Anstiege des Empfängeranteils fälschlicherweise als Rezidive zu interpretieren. Daraus ergeben sich folgende Ziele für die vorliegende Arbeit:

- 1) Etablierung der hochsensitiven Chimärismusanalyse basierend auf In/del-Polymorphismen
- 2) Untersuchung der Häufigkeit des Vorkommens der In/del-Marker und des Markers DYS1 in Bezug auf die hiesige Bevölkerung
- 3) Beobachtung des Chimärismusverlaufs gemessen mittels hoch-sensitiver Chimärismusanalyse in Bezug auf nicht Rezidiv-bezogene klinische Ereignisse
- 4) Gewinnung erster Einblicke in die Effektivität der hochsensitiven Chimärismusanalyse bei der frühzeitigen Detektion von Leukämierезidiven

1.7. Vorgehensweise

Folgende Vorgehensweisen kamen zur Erreichung der genannten vier Ziele zur Anwendung:

1. Für die Etablierung der von Alizadeh et al. entwickelten Methode der Chimärismusanalyse mittels In/Del-Polymorphismus-Markern innerhalb der klinischen Praxis wurden mithilfe von Zelllinien aus immortalisierten B-Zellen insgesamt zehn geeignete Standardreihen für 15 Insertion/Deletion-Polymorphismen und DYS1 erstellt. Diese Standardreihen wurden mit zwei verschiedenen PCR-Mixen getestet und die quantitative PCR mittels eines StepOnePlus™ real-time-PCR-Gerätes (Applied Biosystems, Foster City, CA) als Single-Plex PCR etabliert.

2. Da die 15 In/Del-Polymorphismus-Marker bisher im amerikanischen Raum etabliert waren und sich die Verteilung der genetischen Marker in der Bevölkerung verschiedener Länder unterscheidet, musste zunächst die Häufigkeit des Vorkommens der Marker für die mitteleuropäische Bevölkerung überprüft werden. Zu diesem Zweck wurden 41 Patienten-Spender-Paare auf alle 15 In/del Marker getestet. Es wurde die Verteilungshäufigkeit der Marker, des männlichen Geschlechts sowie daraus resultierend das Vorkommen von Marker- und Sex-Mismatches mittels deskriptiver Statistik ausgewertet. Zugleich diente diese Typisierung der Patienten-Spender-Paare der Findung eines jeweils geeigneten Marker-Mismatches für das prospektive Monitoring des Empfängerchimärismus nach SZT.

3. Zum Monitoring des Empfängerchimärismus wurde bei allen Patienten, für die ein geeignetes Marker-Mismatch gefunden werden konnte, in prospektiv gesammelten peripheren Blutproben zu verschiedenen Zeitpunkten nach SZT der Empfängerzellanteil mittels quantitativer PCR bestimmt. Hieraus wurde die Kinetik der Veränderungen des Empfängerchimärismus analysiert. Es wurden spezifische klinische Ereignisse der überwachten Patienten im Sammlungszeitraum ermittelt und deren Einflüsse auf den Empfängerchimärismus überprüft.

4. Um erste Einblicke in die Anwendbarkeit der hochsensitiven Chimärismusanalyse für die frühzeitige Detektion von Rezidiven zu untersuchen, wurde bei denjenigen Patienten, die im Sammlungszeitraum ein Rezidiv der Grunderkrankung hatten, der Verlauf des Empfängerchimärismus vor und zum Zeitpunkt der klinischen Rezidivdiagnose analysiert.

2. Material und Methoden

2.1. *Patientenkollektiv*

Für die vorliegende Studie wurden im Zeitraum von Juni 2013 bis August 2014 insgesamt 566 Proben von 43 AML oder ALL Patienten nach allogener SZT gesammelt (siehe Tabelle 3), die in dem Zeitraum zwischen dem 12.03.2010 und dem 03.01.2014 transplantiert wurden. Hierfür wurden prospektiv Blutproben von ambulanten Blutbildkontrollen der Patienten in je 2,7 ml EDTA-Monovetten bei -80°C gelagert. Die Patienten wurden entsprechend der Therapieprotokolle der Medizinischen Hochschule Hannover stammzelltransplantiert. Die in die Studie eingeschlossenen Patienten und Spender willigten gemäß der Deklaration von Helsinki schriftlich ein. Die Studie wurde mit Zustimmung der Ethikkommission der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt (1769-2013).

Die Probenentnahmen erfolgten während der regelmäßigen Nachuntersuchungen der transplantierten Patienten, die in den ersten 100 Tagen nach allogener SZT wöchentlich, bis Tag 180 nach SZT alle zwei Wochen, bis 1 Jahr nach SZT monatlich und nach >1 Jahr alle drei Monate stattfanden, sodass die zeitlichen Abstände der gesammelten Proben mit zunehmendem zeitlichem Abstand zur Transplantation länger wurden. Zusätzlich lagen von jedem Patienten eine Blutprobe vor SZT sowie eine Blutprobe des zugehörigen Spenders vor. Die Beobachtungszeit war median 366 (range 81 - 616) nach allogener SZT.

Tabelle 3. Charakteristiken der Studienpatienten. Die 43 Studienpatienten wurden nach folgenden Kriterien eingeteilt: Alter zum Zeitpunkt der allogenen SZT, Geschlecht, Art der Erkrankung, myeloablative/reduzierte Konditionierung vor allogener SZT, Art der Stammzellspender, HLA-Matching, Art der Stammzellspende, Art der Immunsuppression nach allogener SZT.

	n = 43	%
Patientenalter		
Median	48,3	
Range	20 – 66	
Geschlecht		
männlich	24	55,8
weiblich	19	44,2
Grunderkrankung		
AML	33	76,7
ALL	10	23,3
Konditionierung		
Nicht-Myeloablativ *	22	51,2
Myeloablativ **	21	48,8
Spender		
Fremdspender	38	88,4
Familienspender	5	11,6
HLA-Matching		
Matched	32	74,4
Mismatched	11	25,6
Stammzellquelle		
Peripher	40	93,0
Knochenmark	3	7,0
Immunsuppression		
CsA/MTX	11	25,6
CsA/MMF	32	74,4

Abkürzungen: CsA: Ciclosporin A, MTX: Methotrexat, MMF: Mycophenolat-Mofetil
 *Busilvex/Cyclophosphamid (n=11), Etoposid/Cyclophosphamid (n=7), Fludarabine/TBI (n=2),
 Cyclophosphamid/TBI (n=1) **FLAMSA/Busilvex (n=13), BCNU/Fludarabine/Melphalan (n=5),
 Fludarabine/Tresulfan (n=2), FLAMSA/TBI (n=2).

2.2. Verwendung genetischen Materials

Es wurde DNA für standardisierte Verdünnungsreihen aus immortalisierten B-Zellen gewonnen. Als Grundlage für die In/Del-Polymorphismus-Marker dienten lymphoblastoide Zelllinien (sogenannte MiniLCLs, freundlicherweise bereitgestellt von

Dr. Andreas Moosmann, Helmholtz Zentrum München, Deutschland (Moosmann et al., 2002)). Als Grundlage für die Standardreihe des Y-Chromosomalen Markers DYS1 dienten Epstein-Barr-Virus (EBV) transformierte B-Zellen (freundlicherweise bereitgestellt von Prof. Dr. Els Goulmy, Leiden University Medical Center, Niederlande).

2.3. Optimierung der DNA- Isolation

Die DNA-Aufarbeitung der Vollblutproben erfolgte direkt aus aufgetauten EDTA-Monovetten mithilfe des QIAamp DNA Blood Mini Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) entsprechend den Angaben des Herstellers. Hierbei wurden je 200µl Material mit 20µl Protease, 1µl RNase und 200µl Lysepuffer versetzt und über einen Zeitraum von 30 Minuten bei 56°C inkubiert. Es fand eine Abweichung vom Protokoll in Form einer Verlängerung der Inkubationszeit von 10 Minuten auf 30 Minuten statt, um eine vollständige Lyse der Zellen zu gewährleisten. Nach erfolgter Lyse wurden 200µl 96-prozentiges Ethanol hinzugefügt. Die Suspension wurde gevortexet und 1,5 Minuten lang bei 13.200 U/min zentrifugiert.

Da laut Protokoll nur 200 µl Vollblut pro QIAamp Spin Column verwendet werden sollten und dies teilweise zu nicht ausreichend hohen Konzentrationen genomischer DNA führte, wurde das Protokoll des Herstellers modifiziert. Die ersten Schritte bis zur Hinzufügung des 96-prozentigen Ethanols wurden viermal hintereinander durchgeführt und diese Suspensionen nacheinander über dieselbe QIAamp Spin Column zentrifugiert, sodass insgesamt 800 µl Vollblut pro QIAamp Spin Column verwendet wurden. Die Konzentration der genomischen DNA wurde mit einem UV-Spektrophotometer bei 260 und 280 nm Wellenlänge gemessen. Je nach Zellzahl wurden so mediane DNA-Konzentrationen von 182,3 ng/µl pro Probe (range 1,5 – 776,3 ng/µl) erreicht.

Erzeugung von PHA-Blasten

Bei Nichtvorliegen einer EDTA-Blutprobe von Spender oder Empfänger vor SZT oder bei zu niedriger DNA-Konzentration (insgesamt bei 20 Proben) nach DNA-Isolation aus den EDTA-Proben wurde auf in flüssigem Stickstoff eingefrorene PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) zurückgegriffen. Diese PBMCs wurden aufgetaut und durch Stimulation mit Phytohämagglutinin (PHA) sogenannte „PHA-

Blasten“ erzeugt. Diese wurden in vitro expandiert, bis eine ausreichend hohe Zellzahl vorlag, um ausreichend DNA für die Markertypisierung isolieren zu können.

Hierzu wurde 1 ml einer Zellsuspension bestehend aus 6 PBMCs, 88% IMDM (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland), 10% HS (Lonza Biowhittaker, Köln, Deutschland), 1% Penicillin-Streptomycin (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland) und 1% Leuko A (Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland) in 37°C in einer Atmosphäre bei 5% CO₂ kultiviert⁴². Jeweils an Tag 5, 8 und 11 nach Beginn der Zellkultur wurde Interleukin 2 (IL-2, ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland) hinzugefügt, die Zellen gezählt und die Zellsuspension gegebenenfalls gesplittet. An Tag 14 wurde aus den erzeugten PHA-Blasten genomische DNA isoliert.

In 18 von 20 Fällen von EDTA-Proben mit unzureichender Zellzahl war die Generierung von PHA Blasten aus eingefrorenen PBMCs und die DNA-Isolation aus den PHA Blasten erfolgreich. In 4 von 20 Fällen reichte die Menge an isolierter genomischer DNA nicht aus, um eine Typisierung aller vorhandenen Marker durchzuführen. Stattdessen wurden zunächst diejenigen Marker getestet, bei denen sich in vorangegangenen Typisierungen am meisten Mismatches ergeben hatten, um somit die Chance auf ein Mismatch zwischen Spender und Empfänger zu erhöhen.

2.4. Etablierung der qPCR

Die Polymerase-Kettenreaktionen wurden mit einem Thermocycler „TaqMan StepOne Plus“ (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Die PCR wurde in einer 96-Well-Platte durchgeführt. Die Proben setzten sich jeweils zusammen aus:

- 300 ng genomischer DNA (10µl in einer Konzentration von 30ng/µl)
- 12,5 µl Mix (bestehend aus Pufferlösung, Desoxyribonukleosid-Triphosphaten (dNTPs), passive reference dye sowie thermostabiler hot-start DNA-Polymerase)
- je 0,25 µl Forward Primer, Reverse Primer und Probe
- 1,75 µl H₂O.

Für eine bessere Reliabilität der Ergebnisse wurden alle PCRs als SinglePlex durchgeführt, d.h. zur Abgleichung der Messergebnisse auf die Menge der pipettierten DNA wurde in den DNA-Proben parallel in separaten Wells der 96 Well-Platte das Referenzgen HCK (Hematopoetic Cell Kinase Gen) amplifiziert. Hierfür wurden je 0,25

µl HCK-Forward Primer und –Reverse Primer sowie 0,25 µl HCK-Sonde gesondert pipettiert. Parallel wurde zudem jeweils eine Negativkontrolle mit H₂O amplifiziert. Das PCR-Protokoll enthält zunächst 10 Minuten bei 95°C zur Aktivierung der Polymerase, gefolgt von 44 Zyklen mit je 15 Sekunden bei 95°C und 60 Sekunden bei 60°C.

Die Primer und Probes für die Polymerase-Kettenreaktion wurden übernommen aus der Publikation von Alizadeh et al.⁹ (siehe Tabelle 4). Als Mix wurde neben dem für den TaqMan StepOne Plus™ empfohlenen TaqMan™ Master Mix II (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) auch der IQ Supermix™ (BioRad, München, Deutschland) getestet, mit dem für einige Marker eine höhere Effektivität der PCRs erzielt werden konnte. Daraufhin wurde das Protokoll entsprechend geändert: Die Marker S01a, S01b, S05b, S07a, S08a, S08b, S09a, S11a wurden unter Verwendung des TaqMan™ Master Mix II und die Marker S03, S06, S07b, S09b, S10a, S10b, S11b und DYS1 mit dem IQ Supermix™ amplifiziert. Die Probes der In/Del-Polymorphismus-Marker waren mit 5'FAM und 3'BHQ1 gelabelt. Die Probes der HCK sowie des Markers DYS1 waren mit 5'FAM und 3'TAMRA gelabelt.

Die Marker S04a, S04b sowie S05a wurden aus der Studie ausgeschlossen, da für die Marker S04a und S04b keine Marker-positiven und für den Marker S05a keine Marker-negativen PBMCs zur Generierung von miniLCLs zur Erstellung der Standardreihen identifiziert werden konnten.

Tabelle 4. In/Del-Marker, DYS1 und HCK. Es wurden 15 In/Del-Marker zur Typisierung der Patienten und Spender verwendet⁹. In drei Fällen (bei männlichen Patienten mit weiblichen Spendern) wurde der Y-Chromosom-spezifische Marker DYS1 verwendet⁴³. Gezeigt werden die verwendeten Marker, Genlocus, Primerpositionen und -sequenzen sowie Probesequenzen wie sie zuvor publiziert wurden^{9,44}.

Marker	Genlocus	Primer- position	Primersequenz	Probe
S01a	17q	F	GGTACCGGGTCTCCACATGA	CTGGGCCAGAATCTT-GGTCCTCACA
		R	GGGAAAGTCACTCACCCAAGG	
S01b	17q	F	GTACCGGGTCTCCACCAGG	CTGGGCCAGAATCTT-GGTCCTCACA
		R	GGGAAAGTCACTCACCCAAGG	
S03	6q	F	CTTTTGCTTTCTGTTTCTTAAGGGC	CATACGTGCACAGGGTCCCCGAGT
		R	TCAATCTTTGGGCAGGTTGAA	
S05b	20	F	AGTTAAAGTAGACACGGCCTTCCC	CCCTGGACACTGAAAACAGGCAATCCT
		R	CATCCCCACATACGGAAAAGA	
S06	1p	F	CAGTCACCCCGTGAAGTCCT	CCCATCCATCTTCCCTACCAGACCAGG
		R	TGTACCCAAAACCTCAGCTGCA	
S07a	X	F	TGGTATTGGCTTTAAAATACTGGG	TCCTCACTTCTCCACCCCTAGTTAAACAG
		R	TGTACCCAAAACCTCAGCTGCA	
S07b	X	F	GGTAGGTTCTTTAAAATACTCAACC	TCCTCACTTCTCCACCCCTAGTTAAACAG
		R	CAGCTGCAACAGTTATCAACGTT	
S08a	1q	F	CTGGATGCCTCACTGATCCA	CACCCAACCCCATTTCTGCCTG
		R	TGGGAAGGATGCATATGATCTG	
S08b	1q	F	GCTGCACCCGTGTGAGTTTT	CACCCAACCCCATTTCTGCCTG
		R	TGGGAAGGATGCATATGATCTG	
S09a	17q	F	GGGCACCCGTGTGAGTTTT	TGGAGGATTTCTCCCCTGCTTCAGACAG
		R	TCAGCTTGCTGCTTTCTGGAA	
S09b	17q	F	GGGCACCCGTGTGAGTTTT	TGGAGGATTTCTCCCCTGCTTCAGACAG
		R	CAGCTTGCTGCGCTTTCTGTCC	
S10a	18	F	GCCACAAGAGACTCAG	CAGTGTCCCACTCAAGTACTCCTTTGGA
		R	TGGCTTCCTTGAGGTGGAAT	
S10b	18	F	TTAGAGCCACAAGAGACAACCAG	CAGTGTCCCACTCAAGTACTCCTTTGGA
		R	TGGCTTCCTTGAGGTGGAAT	
S11a	11	F	TAGGATTCAACCCTGGAAGC	CAAGGCTTCCTCAATTCTCCACCCTTCC
		R	CCAGCATGCACCTGACTAACA	
S11b	11	F	CCCTGGATCGCCGTGAA	CAAGGCTTCCTCAATTCTCCACCCTTCC
		R	CCAGCATGCACCTGACTAACA	
DYS1	Y	F	TCCTGCTTATCCAAATTCACCAT	AAGTCGCCACTGGATATCAGTTCCTTGT
		R	ACTTCCCTCTGACATTACCTGATAATTG	
HCK		F	TATTAGCACCATCCATAGGAGGCTT	TAACGCGTCCACCAAGGATGCGAA
		R	GTTAGGGAAAGTGGAGCGGAAG	

2.5. Amplifikationskurve und Standardkurve

Für die Quantifizierung des Empfängerchimärismus in Patientenproben wurde für jeden In/Del-Polymorphismus-Marker als externe Referenz Standardreihen erstellt, die in jeder qPCR mitanalysiert wurden. Für die Erstellung der Standardreihen wurden miniLCLs zunächst auf jeden In/del Marker hin getestet. Standardreihen wurden durch jeweils zehnfache Verdünnungen der positiv getesteten B-Zelllinien in negativ getesteten B-Zelllinien erstellt. Diese Verdünnungen enthielten positiv getestete B-Zellen in folgenden Anteilen: 100%, 10%, 1%, 0,1%, 0,01%, 0,001%, 0,0001%, 0,00001%. Daneben wurde eine NT („No Template“)-Kontrolle analysiert. Insgesamt wurden so zehn verschiedene Standardreihen hergestellt, die teilweise für die Analyse mit mehreren Markern geeignet waren. Insgesamt standen so für alle 15 unter 2.4. genannten genomischen Marker und für DYS1 geeignete Standardreihen zur Verfügung. Die Amplifikationskurven der Patientenproben und der Standardreihen wurden mithilfe des Programms *7500 Fast Real-Time PCR Systems Version 2.3* (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) analysiert. Durch einen Abgleich der Amplifikationskurven der Patientenproben mit den für den jeweiligen Marker relevanten Standardreihen wurde nun der Chimärismuswert (wie im Folgenden unter 2.7. erläutert) quantifiziert.

2.6. Typisierung von Spendern und Patienten

Es wurden nach Möglichkeit jeder Patient und jeder zugehörige Spender mittels real-time-PCR auf jeden der 15 In/Del-Marker getestet. Die Geschlechter von Spendern und Empfängern waren bekannt, so dass eine Typisierung für den Y-Chromosom kodierten Marker DYS1 nicht erforderlich war. Es wurde gemäß den Empfehlungen des Herstellers in der log-Ansicht der Amplifikationskurve ein geeigneter Threshold zum Zeitpunkt des Beginns der log-linearen Phase bestimmt. Positive Allele wurden daraufhin definiert bei einem Cycle Threshold (cT) von unter 26. Es wurde auf jeder 96-Well PCR-Platte für jeden verwendeten Marker eine Negativkontrolle mit H₂O pipettiert, um falsch-positive Ergebnisse durch Verunreinigungen auszuschließen. Ein Marker wurde als passend für die Chimärismusanalyse in einem Patienten erachtet, wenn der Spender negativ und der Empfänger positiv darauf getestet wurde.

Bei der Typisierung wurde nach mindestens einem Mismatch in Empfängerrichtung (d.h. Empfänger positiv und Spender negativ für den jeweiligen Marker) gesucht, um in den Verlaufsanalysen die Menge an Marker-positiver Empfänger-DNA prozentual

anzugeben. Bei vier Patienten war vor SZT nicht genügend genomische DNA für die Analyse aller Marker vorhanden. So wurde in diesen Fällen die genomische DNA der zugehörigen Spender zuerst analysiert und die genomische DNA der Patienten hiernach nur für die Marker mit Chance auf ein Mismatch in Empfängerrichtung analysiert.

Bei den Patienten-Spender-Paaren, die mehrere Markermismatches in Empfängerrichtung hatten, wurde einer der Marker ausgewählt, um die longitudinale Chimärismusanalyse durchzuführen.

Außerordentlich behandelt wurde der Y-Chromosom codierte Marker DYS1, der von vornherein nur für männliche Patienten mit weiblichen Spendern geeignet ist³⁹. Eine solche Spender-Empfänger-Konstellation lag bei 3 Patienten der Studiengruppe vor. In diesen Fällen war eine Typisierung der In/Del Marker nicht notwendig, da die Patienten für eine Analyse mittels DYS1 geeignet waren.

2.7. Quantifizierung des Empfängerchimärismus nach allogener SZT

Zur Erhebung des prozentualen Empfängerzellanteils der Patienten im Verlauf nach allogener SZT wurden für diejenigen Patienten, für die ein geeignetes Mismatch in Empfängerrichtung gefunden werden konnte, die gesammelten Proben genomischer DNA aus peripherem Vollblut mittels qPCR analysiert. Hierzu wurde das unter 2.3 erläuterte Protokoll angewandt. Jede Probe wurde doppelt (als sog. „Duplo“) sowohl für den jeweiligen In/Del Marker als auch für HCK als Housekeeping Gene pipettiert. Die Analyse jeder Patientenprobe wurde zudem um eine Negativkontrolle mit H₂O ergänzt. Zur Errechnung der jeweiligen absoluten Chimärismuswerte wurde parallel zu jedem qPCR-Lauf eine Standardreihe für den jeweils verwendeten Marker pipettiert. Eine zuverlässige Quantifizierung von mindestens 5 Verdünnungen war für alle 16 untersuchten Marker möglich. Die Quantifizierung der Ziel-DNA war über mindestens 4 Logstufen linear. Passend zu zuvor publizierten Daten ergab sich hierdurch für 14 der 15 In/Del-Marker ein Sensitivitätsniveau von 0,01%,^{9,40,41,44,45} und für DYS1 sogar ein Sensitivitätsniveau von 0,001%³⁹. Für den Marker S03 konnte nur ein Sensitivitätsniveau von 0,1% erreicht werden, weshalb longitudinale Chimärismusanalysen mit diesem Marker aus der statistischen Auswertung ausgeschlossen wurden.

Die Amplifikation einer exemplarischen Standardreihe ist für den Marker S09b in Abbildung 3 dargestellt.

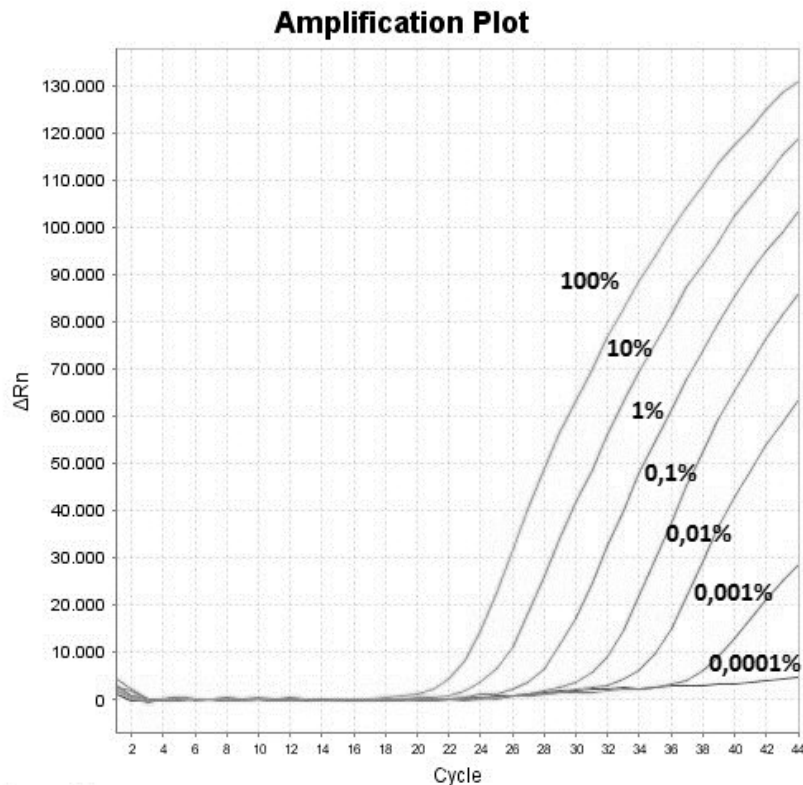


Abbildung 3. Exemplarischer qPCR-Lauf für eine Standardreihe des Markers S09b. Die Standardreihe wurde mit den Standards 100%, 10%, 1%, 0,1%, 0,01%, 0,001% und 0,0001% pipettiert. Dargestellt sind auf der X-Achse die Anzahl der qPCR-Zyklen (bis 44 Zyklen) und auf der Y-Achse die Menge an generierter genomischer DNA (in ΔRn).

Die absoluten Chimärismuswerte in den Patientenproben nach allogener SZT wurden wie vorbeschrieben mittels der ΔCt -Methode berechnet³⁹.

Zur besseren Vergleichbarkeit aller In/Del-Marker (außer S03) sowie des Markers DYS1 wurden alle Chimärismuswerte auf einem Niveau von 0,01% angegeben. Empfängerchimärismuswerte, die unterhalb dieses Niveaus gemessen wurden, wurden für die mathematischen Berechnungen auf das Niveau von 0,01% gesetzt. Bei Chimärismusverläufen, die über mindestens zwei aufeinanderfolgende Proben auf einem Niveau von 0,01% verblieben, wurde diese Art des Verlaufs gesondert angegeben.

2.8. Erhebung ausgewählter klinischer Ereignisse

Zur Überprüfung des Einflusses klinischer Ereignisse auf den Chimärismusverlauf der Patienten wurden Angaben zu regelmäßigen ärztlichen Kontrollen in der SZT-Ambulanz der Medizinischen Hochschule Hannover, Dokumentationen stationärer Aufenthalte sowie mikrobiologische, virologische und radiologische Befunde ausgewertet. Hieraus wurden Angaben zum Auftreten klinischer Ereignisse gesammelt und in folgende Kategorien eingeteilt:

- Dosisreduktion und Absetzen der Immunsuppression mit Ciclosporin A
- akute sowie chronische GvHD
- Donor Lymphozyten Infusionen (DLI)
- virale Infekte (Cytomegalievirus, Epstein-Barr-Virus)
- Pneumonie und Fieber unbekanntes Ursprungs (Fever of Unknown Origin, „FUO“)
- Sonstige Infekte (Varizella-Zoster-Virus, Harnwegsinfekte, Infekte der oberen Atemwege, Soor, Herpes-Simplex-Virus, Helicobacter-pylori-Gastritis, pseudomembranöse Kolitis, Norovirus-Infektionen)

Es wurde jeweils der Chimärismusverlauf ab Beginn der Ereignisse beobachtet. Im Fall von Infekten und GvHD wurde hierbei das erste Auftreten von Symptomen zur Bestimmung des Auswertungszeitraums herangezogen. Es wurden nur klinische Ereignisse berücksichtigt, die zum jeweiligen Zeitpunkt isoliert vorlagen.

Im Fall der Immunsuppression wurden nur diejenigen Patienten betrachtet, die ausschließlich mit Ciclosporin A immunsupprimiert waren und daneben keine weitere Immunsuppression (einschließlich Corticosteroide) erhielten. Es wurden ausschließlich diejenigen Fälle ausgewertet, bei denen die Reduktion und das Absetzen der Immunsuppression leitliniengerecht geplant nach allogener SZT erfolgten.

Im Fall von GvHD wurde zwischen akuter und chronischer GvHD differenziert⁴⁶. Als akute GvHD wurden alle vor Tag 100 nach SZT aufgetretenen Fälle eingeteilt und nach dem Glucksberg-Score klassifiziert⁴⁷. Als chronische GvHD wurden alle nach Tag 100 nach SZT aufgetretenen Fälle eingeteilt und nach der Seattle-Klassifikation klassifiziert⁴⁸. Fälle von GvHD, die infolge einer DLI auftraten, wurden nicht analysiert.

Für die Fälle von Pneumonie und FUO wurden klinische Berichte sowie mikrobiologische und röntgenologische Befunde zur Einordnung herangezogen. Pneumonie wurde definiert als neuauftretendes, mittels Röntgen-Thorax oder CT-Thorax gesehenes Infiltrat, welches keine alternative Ursache wie Herzversagen oder Flüssigkeitsretention zuließ. FUO wurde definiert als ein einmalig auftretendes Fieber von $\geq 38,3^{\circ}\text{C}$ über eine Stunde oder zweimalig auftretend innerhalb von 24 Stunden³⁰. Im Fall der Viruserkrankungen mit dem Cytomegalievirus wurde die klinische Messung des pp65-Werts genutzt. Als klinisches Ereignis wurde jeweils ein CMV pp65-Anstieg von >15 CMV pp65 positiver Zellen/400.000 analysierter Zellen gewertet. Im Fall der Virusreaktivierungen mit dem Epstein-Barr-Virus wurde die Angabe der EBV-PCR genutzt. Als klinisches Ereignis wurde jeweils ein Anstieg >2000 IU/ml gewertet. Davon abgrenzend wurden Rezidive definiert als ein im peripheren Blut oder Knochenmark neu aufgetretener Blastenanteil von über 5%.

2.9. Berechnung des Chimärismusverlaufs

Es wurden sowohl Chimärismus-Absolutwerte als auch die Veränderungen der Chimärismuswerte über die Zeit analysiert. Für die Analyse der Chimärismuskinetik nach allogener SZT wurde die Veränderung des Empfängerchimärismus zwischen zwei Messpunkten als Exponentialfunktion beschrieben. Zur mathematischen Beschreibung der Veränderungen zweier Chimärismuswerte wurde daher mittels folgender Formel jeweils der Wachstumsfaktor a für die untersuchten Intervalle berechnet.

$$a = \sqrt[\Delta t]{\frac{(\text{Wert } 2)}{(\text{Wert } 1)}}$$

Der Wachstumsfaktor a ist derjenige Faktor, mit dem Wert 1 bis zur Messung eines zeitlich nachfolgenden Wertes 2 pro gewählte Zeiteinheit (in diesem Fall pro Tag) multipliziert werden muss, um Wert 2 zu erhalten. Eine Zunahme des Empfängerchimärismus entspricht dementsprechend einem Wachstumsfaktor >1 , eine Abnahme einem Wachstumsfaktor <1 , ein gleichbleibender Chimärismus ergibt einen Wachstumsfaktor von 1.

2.10. Statistische Auswertungsverfahren

Die statistische Auswertung der Chimärismusverläufe auf Grundlage der errechneten Wachstumsfaktoren erfolgte mittels SPSS Statistics 22.0 (SPSS GmbH Software, München, Deutschland). Dabei wurden deskriptive Statistiken aufgestellt und nicht parametrische Tests durchgeführt. Die statistische Auswertung der mittels quantitativer PCR generierten Chimärismuswerte erfolgte durch Rangsummentests. Es wurden der Wilcoxon-Test für abhängige Stichproben und der Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben angewendet. Als Signifikanzniveau wurde $p \leq 0.05$ gewählt. Dabei wurde kontrolliert, ob es statistisch signifikante Unterschiede des Empfängerchimärismus zu festgesetzten Zeitpunkten nach allogener SZT im Hinblick auf verschiedene Grundvoraussetzungen sowie auf das Ergebnis der Patienten gab (vgl. Kapitel 3.3.1.). Zudem wurde überprüft, ob es eine statistisch signifikante Tendenz des Chimärismusverlaufs bei verschiedenen klinischen Ereignissen gab, indem die Empfängerchimärismuswerte zu Beginn eines Ereignisses mit denen zum jeweils nächsten Extremwert nach Ereignisbeginn mittels des Wilcoxon-Tests verglichen wurden (vgl. Kapitel 3.3.2.). Im Vergleich von Patienten mit und ohne klinisches Rezidiv wurden Unterschiede sowohl in der Dauer des Chimärismanstiegs als auch der Höhe des Wachstumsfaktors betrachtet, um zu untersuchen, ob sich der Chimärismusverlauf im Fall eines Rezidivs abgrenzen lässt.

Als Berechnungsgrundlage für die Untersuchungen des Chimärismusverlaufs dienten jeweils der letzte Chimärismuswert vor (oder, falls vorhanden, zu) Beginn des Ereignisses und der darauffolgende Extremwert. Bei einem monotonen Anstieg über mehrere Messungen wurde der Wachstumsfaktor auf Grundlage des ersten und letzten Messwertes errechnet.

3. Ergebnisse

3.1. Typisierung der Spender und der Patienten vor allogener SZT

3.1.1. Markerverteilung in Patienten und Spendern

Insgesamt 47 Patienten und ihre jeweiligen Spender (d.h. 94 Individuen) wurden auf das Vorhandensein der 15 Marker S01a, S01b, S03, S05b, S06, S07a, S07b, S08a, S08b, S09a, S09b, S10a, S10b, S11a und S11b getestet (siehe Tabelle 5). Bei Vorliegen eines Sex Mismatches mit weiblicher Spenderin und männlichem Empfänger wurde auf einen Test aller Marker verzichtet, da diese Patienten nach SZT mithilfe des auf dem Y-Chromosom lokalisierten Markers DYS1 analysiert werden konnten. In Tabelle 5 dargestellt sind ausschließlich diejenigen Patienten-Spender-Paare, bei denen ausreichend genomische DNA für die Analyse In/Del-Polymorphismus-Marker sowohl beim Spender als auch beim Empfänger vorhanden war. Da vorherige Studien gezeigt haben, dass hoch-sensitive Chimärismusanalysen die höchste Reproduzierbarkeit bei einem Empfängeranteil von unter 10% aufweisen^{49,50}, wurde im Folgenden der Schwerpunkt auf Mismatches in Empfängerrichtung gelegt.

Tabelle 5. Übersicht über die In/Del-Polymorphismus-Marker sowie Geschlecht der getesteten Individuen. Angegeben ist die Häufigkeit (n, %) der jeweiligen Marker bei den getesteten Patienten und Spendern. Zudem ist für alle Spender-Empfänger-Paare für jeden Marker die Anzahl der gefundenen Mismatches in Spender- und in Empfängerrichtung (n) als auch der jeweilige Anteil von Mismatches in Empfängerrichtung (in %) angegeben.

Marker	n	Markerpositive Individuen (n, %)	Gefundene Mismatches in Spender- und Empfängerrichtung (n)	Anteil der Mismatches in Empfängerrichtung (in % aller Mismatches)
S01a	80	53 (66,3%)	19	42,1
S01b	80	63 (87,8%)	11	63,6
S03	80	41 (51,3%)	21	23,8
S05b	80	45 (56,3%)	21	57,1
S06	80	36 (45,0%)	22	31,8
S07a	80	51 (63,8%)	14	42,9
S07b	80	42 (52,5%)	20	60,0
S08a	80	62 (77,5%)	11	45,5
S08b	80	61 (76,3%)	12	50,0
S09a	80	72 (90,0%)	5	60,0
S09b	80	30 (37,5%)	22	54,6
S10a	80	54 (67,5%)	18	44,4
S10b	80	58 (72,5%)	16	50,0
S11a	80	40 (50,0%)	22	36,4
S11b	80	73 (91,3%)	7	14,3
Männliches Geschlecht	94	51 (54,3%)	12	33,3

3.1.2. Analyse der Markerverteilung

Es wurde die Häufigkeit des Vorkommens der einzelnen In/Del-Polymorphismus-Marker im Patienten- und Spenderkollektiv ermittelt (siehe Tabelle 6). Mit Ausnahme der Marker S06, S09b und S11a kam jeder Marker in über 50% der getesteten Individuen vor. Der Marker S11b war sogar in 91,7% der Individuen vorhanden. Dieses Ergebnis weicht erheblich von einer vergleichbaren Untersuchung durch Chen et al.⁴¹ bei zufällig ausgewählten Individuen aus der taiwanesischen Bevölkerung ab, bei der für keinen Marker eine Häufigkeit über 45% festgestellt wurde.

Tabelle 6. Vergleich der Häufigkeiten der In/Del-Polymorphismus-Marker mit zuvor publizierten Daten. Aufgeführt ist jeweils die Häufigkeit sowohl in Spendern als auch Empfängern der vorliegenden Studiengruppe. Zum Vergleich sind die von Chen et al⁴¹ ermittelten Werte (in zufällig ausgewählten Individuen aus der taiwanesischen Bevölkerung) angegeben. Jeder der Marker kam in der vorliegenden Studiengruppe deutlich häufiger als in der von Chen et al⁴¹ publizierten Kohorte vor.

Marker	Häufigkeit der Marker (in %)	Häufigkeit der Marker laut Chen et al ⁴¹ (in %)
S01a	66,3	33
S01b	78,8	13
S03	51,3	0
S05b	65,3	44
S06	45,0	44
S07a	63,8	21
S07b	52,5	36
S08a	77,5	9
S08b	76,3	45
S09a	90,0	2
S09b	37,5	34
S10a	67,5	7
S10b	72,5	29
S11a	50,0	36
S11b	91,3	9

Es wurde für die einzelnen In/Del-Polymorphismus-Marker die Häufigkeit eines Mismatches für einen Marker im vorliegenden Patientenkollektiv bestimmt (siehe Tabelle 7). Diese ist im Vergleich zu den Angaben von Alizadeh et al. deutlich verändert und die einzelnen Marker weisen untereinander sehr unterschiedliche Verteilungen auf. In der vorliegenden Arbeit sind aufgrund der praktischen Verwendung der Marker-Mismatches nur die Mismatches in Empfängerrichtung von Relevanz, bei denen der Empfänger positiv und der Spender negativ für den jeweiligen Marker ist und die somit als Grundlage für die Analyse des Empfängerchimerismus infrage kommen. Am meisten Mismatches in Empfängerrichtung (je 30%) wiesen die Marker S05b, S07b und S09b heraus. Am wenigsten Mismatches in Empfängerrichtung wies mit 5% der Marker S11b auf, weil fast alle getesteten Individuen positiv für diesen Marker waren.

Tabelle 7. Vergleich der Häufigkeiten von Marker-Mismatches mit zuvor publizierten Daten. Aufgeführt ist jeweils die Häufigkeit von Mismatches in Patientenrichtung (Spender - / Patient +) und Mismatches in Spenderrichtung (Spender + / Patient -) im vorliegenden deutschen Patientenkollektiv. Zum Vergleich sind die von Alizadeh et al.⁹ ermittelten Werte angegeben, die ein US-amerikanisches Patientenkollektiv abbilden und insbesondere in Hinblick auf S06, S07a und S09b stark von den für diese Arbeit ermittelten Werten abweichen. Die drei Marker mit den meisten gefundenen Mismatches wurden jeweils fett hervorgehoben.

Marker	Mismatches in Spenderrichtung (in %)	Mismatches in Patientenrichtung (in %)	Mismatches in Patientenrichtung laut Alizadeh et al. ⁹ (in %)
S01a	27,5	20,0	23,6
S01b	10,0	17,5	n.a.
S03	40,0	12,5	16,4
S05b	22,5	30,0	27,3
S06	37,5	17,5	31,0
S07a	20,0	15,0	31,0
S07b	20,0	30,0	21,8
S08a	15,0	12,5	16,4
S08b	15,0	15,0	20,2
S09a	5,0	7,5	7,3
S09b	25,0	30,0	14,5
S10a	25,0	20,0	25,5
S10b	20	20,0	20,2
S11a	35,0	20,0	25,5
S11b	12,5	5,0	7,3
DYS1	17,0	6,4	n.a.

3.1.3. Marker-Mismatche der Patienten-Spender-Paare

Die Chimärismusanalyse basiert auf der Detektion von Markern, die im Patienten, aber nicht im Spender vorhanden sind. Es wurde daher erhoben, wie viele Patienten-Spender-Paare jeweils wie viele Marker-Mismatche hatten und wie häufig diese Mismatche in Empfängerrichtung vorkamen (siehe Abbildung 2). Ausgenommen von den analysierten 47 Patienten-Spender-Paaren wurden diejenigen vier Paare, bei denen aufgrund zu geringer gewonnener Mengen an genomischer DNA eine vollständige Typisierung mit allen Markern nicht durchgeführt werden konnte, sowie diejenigen drei Paare, bei denen eine HY-Typisierung aufgrund der Geschlechtskonstellation möglich war. Folglich wurde die Zahl der Marker-Mismatche

in beide Richtungen bei 40 Patienten-Spender-Paaren erhoben. Im Fall von mehreren gefundenen Marker-Mismatches in Patientenrichtung konnte einer der Marker zur Chimärismusanalyse ausgewählt werden. Bei einem Patienten in der Studiengruppe war aufgrund fehlender Mismatches in Patientenrichtung die Chimärismusanalyse mittels In/Del-Polymorphismus-Markern nicht möglich. Die Analyse ergab, dass pro Patienten-Spender Paar im Median 6 Marker-Mismatches (range 2-9) in beide Richtungen sowie im Median 2 (range 0-6) zur Chimärismusanalyse verwendbare Marker-Mismatches in Patientenrichtung vorlagen.

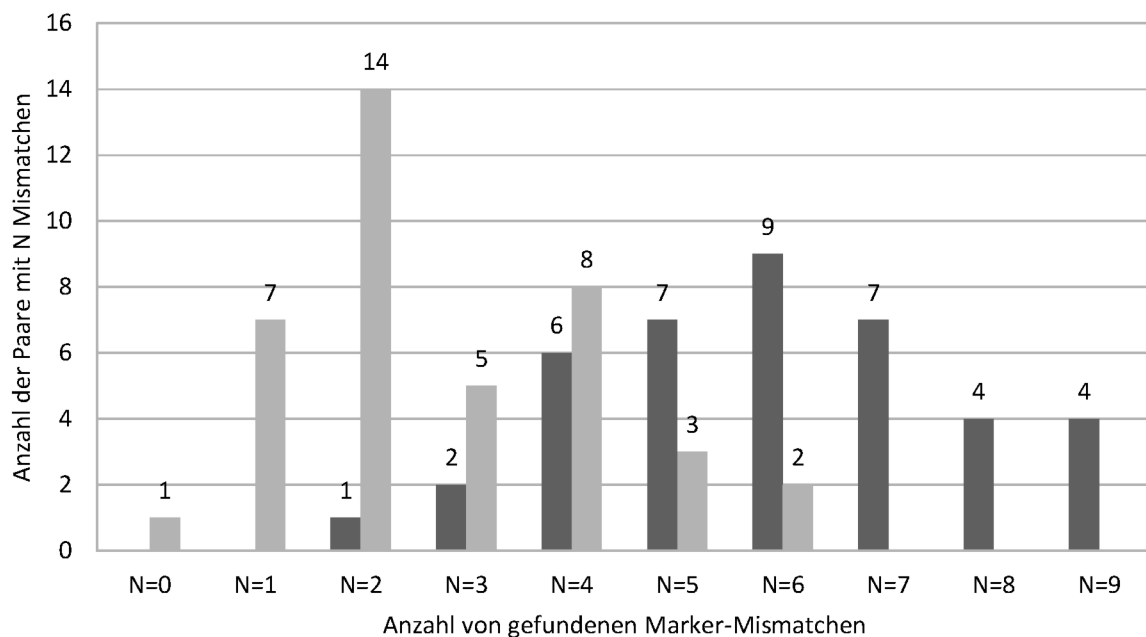


Abbildung 2. Häufigkeitsverteilung von Marker-Mismatches bei 40 Patienten-Spender-Paaren. Dargestellt sind die Marker-Mismatches in beide Richtungen (median 6, range 2-9) in Dunkelgrau, sowie anteilig davon die zur Chimärismusanalyse verwendbaren Marker-Mismatches in Patientenrichtung (median 2, range 0-6) in Hellgrau.

3.2. Amplifikation der Standardreihen

Nach erfolgter Typisierung der Patienten-Spender-Paare wurden qPCRs zur longitudinalen Chimärismusanalyse nach allogener SCT durchgeführt. Insgesamt erfolgten hierfür 48 qPCR-Läufe.

In den Messbereichen >1% Empfängerchimärismus, in denen die klinische Chimärismusanalyse mittels STR-PCR erfolgte, zeigt sich exemplarisch in zwei unterschiedlichen Patienten eine weitgehende Übereinstimmung des Verlaufs der

mittels hochsensitiver qPCR gemessenen Chimärismuswerte mit den klinisch mittels STR-PCR gemessenen Chimärismuswerten (siehe Abbildungen 4 und 5).

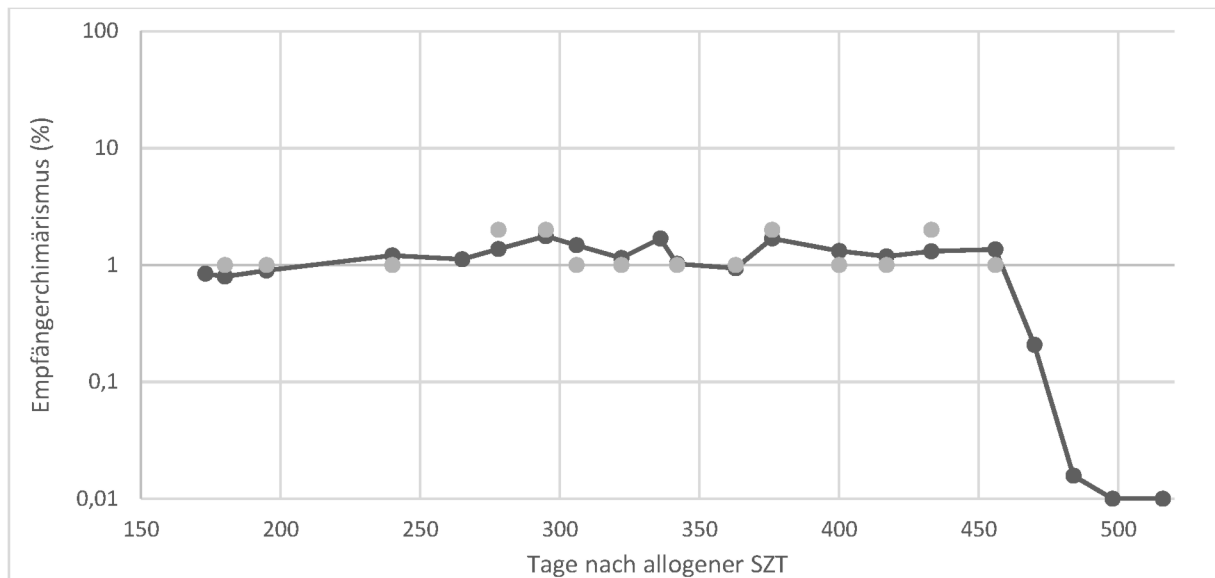


Abbildung 4. Exemplarischer Chimärismusverlauf eines Patienten (Patient Nr. 06) nach allogener SZT. Dargestellt sind die longitudinal mittels hochsensitiver PCR ermittelten Empfängerchimärismuswerte (in %) in Schwarz im Vergleich mit den klinisch mittels STR-PCR gemessenen Werten in Grau. Auf der X-Achse befindet sich die Skala der Tage nach allogener SZT, auf der Y-Achse der entsprechende Empfängerchimärismus.

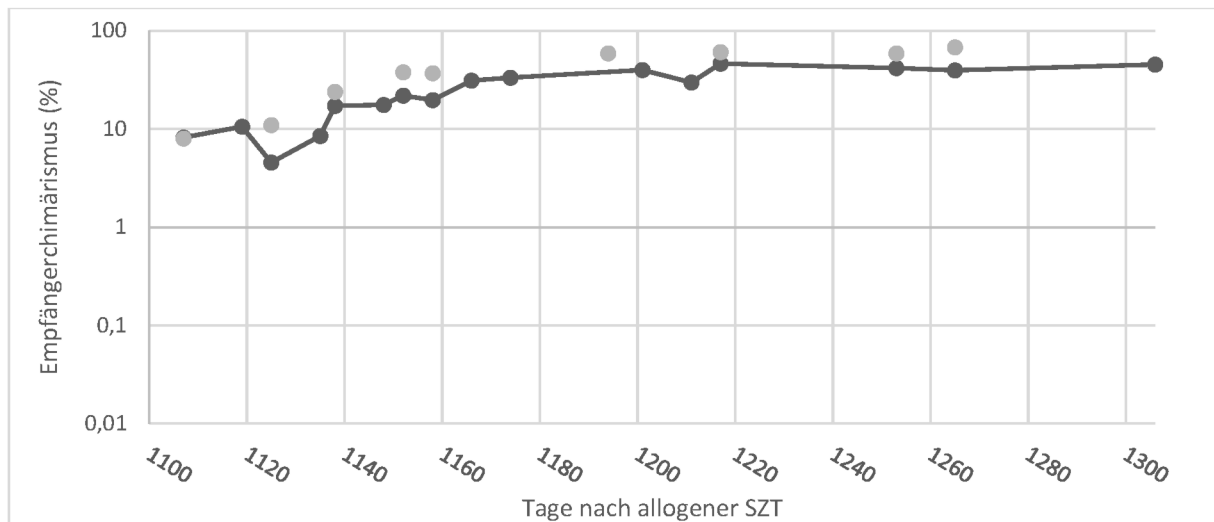


Abbildung 5. Exemplarischer Chimärismusverlauf eines Patienten (Patient Nr. 36) nach allogener SZT. Dargestellt sind die longitudinal mittels hochsensitiver PCR ermittelten Empfängerchimärismuswerte (in %) in Schwarz im Vergleich mit den klinisch mittels STR-PCR gemessenen Werten in Grau. Auf der X-Achse befindet sich die Skala der Tage nach allogener SZT, auf der Y-Achse der entsprechende Empfängerchimärismus.

3.3. Niveau der Empfängerchimärismuswerte

Von allen 561 mittels hochsensitiver PCR gemessenen Chimärismuswerten lagen 28% (N=158) unterhalb des Detektionsniveaus von 0,01% (und waren somit formal negativ), während 72% (N=403) der gemessenen Chimärismuswerte oberhalb des Detektionsniveaus der hochsensitiven PCR lagen. 53% der Werte befanden sich zwischen 0,01% und 1% (n=296) und 19% (n=107) der gemessenen Werte lagen über einem Niveau von 1%. Die Werte, die das Detektionsniveau unterschritten, wurden für die weitere Analyse der Chimärismusverläufe auf einen Wert von 0,01% angeglichen. Die Veränderung der Chimärismuswerte wurden anhand des Wachstumsfaktors berechnet, wie in Material und Methoden beschrieben. Bei denjenigen Patienten, deren Messwerte des Empfängerchimärismus über mindestens zwei Messzeitpunkte hinweg unterhalb des Detektionsniveaus von 0,01% lagen mussten, betrug der Wachstumsfaktor dementsprechend 1.

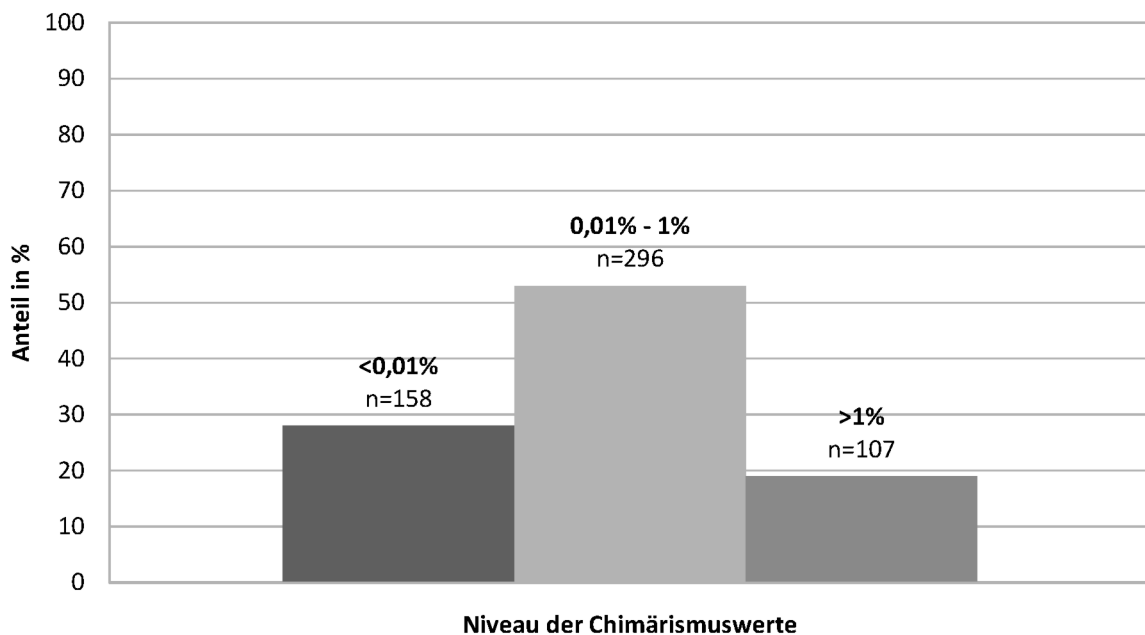


Abbildung 6. Prozentuale Verteilung der gemessenen Chimärismuswerte. Von allen gemessenen Chimärismuswerten (n=561) befanden sich 28% unterhalb des Detektionsniveaus von 0,01% (n=158), 53% der Werte befanden sich zwischen 0,01% und 1% (n=296), sowie 19% der Werte oberhalb des Niveaus von 1% (n=107). Auf der Y-Achse sind die entsprechenden prozentualen Anteile ablesbar.

3.3.1. Chimärismuswerte zu bestimmten Zeitpunkten nach Transplantation

Es wurden Messwerte des Empfängerchimärismus zu bestimmten Zeitpunkten nach allogener SZT erhoben. Als Zeitpunkte wurden hierzu die Tage 50, 100 und 150 ausgewählt. Eingeschlossen wurden alle Messwerte, die nicht mehr als 10% der Tage vor oder nach diesen Zeitpunkten lagen, also von Tag 45 bis Tag 55, von Tag 90 bis Tag 110 sowie von Tag 135 bis Tag 165. Statistische Vergleiche erfolgten mittels Mann-Whitney-U-Test.

3.3.1.1. Konditionierung

Es wurde der Einfluss der Intensität der Konditionierung (myeloablativ vs. nicht-myeloablativ) auf die medianen absoluten Empfängerchimärismuswerte untersucht. Der Empfängerchimärismus an den Tagen 50, 100 und 150 wurde bei Patienten nach myeloablativer und nicht-myeloablativer Konditionierung miteinander verglichen (siehe Tabelle 8). An Tag 50, 100 und 150 nach allogener SZT hatten die myeloablativ behandelten Patienten jeweils einen medianen Empfängerchimärismus von 0,02%

(range 0,01% - 3,96%), 0,07% (range 0,01% - 0,99%) und 0,08% (range 0,01% - 83,06%). Die Patienten mit nicht-myeloablativer Konditionierung hatten jeweils einen medianen Empfängerchimärismus von 0,07% (range 0,01% - 8,65%), 0,01% (range 0,01% - 1,08%) und 0,01% (range 0,01% - 68,50%). Insgesamt waren die Empfängerchimärismuswerte der myeloablativ konditionierten Patienten nur an Tag 50 niedriger als die der Patienten nach dosis-reduzierter Konditionierung, während die Werte an Tag 100 und 150 höher lagen. Die Unterschiede zwischen beiden Gruppen waren allerdings nur an Tag 100 signifikant ($p=0,018$).

Tabelle 8. Vergleich von Patienten mit myeloablativen und nicht-myeloablativen Konditionierungs-Schemata vor SZT. Es wurden jeweils an Tag 50, Tag 100 und Tag 150 nach allogener SZT (+/- 10% der Zeit) die vorhandenen Chimärismuswerte der Patienten miteinander verglichen. Insgesamt erhielten von 43 Patienten 21 eine myeloablative Konditionierung (48,8%) und 22 ein reduced intensity conditioning (51,2%).

	Tag 50	Tag 100	Tag 150
Myeloablativ			
N	13	14	16
Median	0,02%	0,07%	0,08%
range	0,01% - 3,96%	0,01% - 0,99%	0,01% - 83,06%
Nicht-Myeloablativ			
N	12	15	12
Median	0,07%	0,01%	0,01%
range	0,01% - 8,65%	0,01% - 1,08%	0,01% - 68,50%
p-Wert	0,295	0,018	0,074

3.3.1.2. Remissionsstatus vor Transplantation

Es wurden die medianen Empfängerchimärismuswerte derjenigen Patienten, die sich zum Zeitpunkt der allogenen SZT im Status der kompletten Remission befanden, mit denen von Patienten verglichen, die sich in partieller Remission befanden (siehe Tabelle 9). Die Patienten in kompletter Remission hatten an Tag 50, 100 und 150 nach allogener SZT jeweils einen medianen Empfängerchimärismus von 0,02% (range 0,01% - 3,96%), 0,03% (range 0,01% - 0,99%) und 0,08% (range 0,01% - 83,06%). Patienten in partieller Remission zeigten einen medianen Empfängerchimärismus von 0,04% (range 0,01% - 8,65%), 0,01% (range 0,01% - 1,08%) und 0,01% (range 0,01% -

68,5%). Der Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen war für jeden der drei Zeitpunkte nicht signifikant ($p=0,511$, $p=0,356$ und $p=0,074$).

Tabelle 9. Vergleich von Patienten mit und ohne Komplettremission* vor SZT. Es wurden jeweils an Tag 50, Tag 100 und Tag 150 nach allogener SZT (+/- 10% der Zeit) die vorhandenen Chimärismuswerte der Patienten miteinander verglichen. Insgesamt befanden sich von 43 Patienten 32 im Status der Komplettremission vor SZT (74,4%), bei 11 Patienten wurde keine Komplettremission* erreicht (25,6%). *partielle Remission (n=5), induction failure (n=3), Rezidiv (n=3)

	Tag 50	Tag 100	Tag 150
Komplettremission			
N	15	20	16
Median	0,02%	0,03%	0,08%
range	0,01% - 3,96%	0,01% - 0,99%	0,01% - 83,06%
Keine Komplettremission*			
N	8	9	7
Median	0,04%	0,01%	0,01%
range	0,01% - 8,65%	0,01% - 1,08%	0,01% - 68,50%
p-Wert	0,511	0,356	0,074

3.3.1.3. Rezidiv nach allogener SZT

Es wurden an Tag 50, 100 und 150 die medianen Empfängerchimärismuswerte derjenigen Patienten, die nach allogener SZT ein Rezidiv der Grunderkrankung hatten, mit denen von Patienten verglichen, die nicht rezidierten (siehe Tabelle 10). Die Patienten mit Rezidiv nach allogener SZT hatten an Tag 50, 100 und 150 jeweils einen medianen Empfängerchimärismus von 0,03% (range 0,02% - 8,65%), 0,21% (range 0,01% - 1,08%) und 68,50% (range 0,07% - 83,06%). Patienten mit anhaltender Remission nach allogener SZT zeigten einen medianen Empfängerchimärismus von 0,03% (range 0,01% - 8,24%), 0,02% (range 0,01% - 0,82%) und 0,01% (range 0,01% - 2,36%). Zu allen analysierten Zeitpunkten war der mediane Chimärismus derjenigen Patienten mit Rezidiv gleich oder höher als derjenigen Patienten ohne Rezidiv. Nur an Tag 150 nach SZT zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ($p=0,010$).

Tabelle 10. Vergleich von Patienten mit und ohne Rezidiv nach SZT. Es wurden jeweils an Tag 50, Tag 100 und Tag 150 nach allogener SZT (+/- 10% der Zeit) die vorhandenen Chimärismuswerte der Patienten miteinander verglichen. Insgesamt hatten von 43 Patienten 6 ein Rezidiv nach SZT (86,1%), bei 6 Patienten trat ein Rezidiv auf (13,9%). Hiervon lagen bei 3 Patienten Chimärismuswerte an Tag 50, 100 und 150 nach SZT vor.

	Tag 50	Tag 100	Tag 150
Rezidiv			
N	3	3	3
Median	0,03%	0,21%	68,50%
range	0,02% - 8,65%	0,01% - 1,08%	0,07% - 83,06%
Kein Rezidiv			
N	22	26	25
Median	0,03%	0,02%	0,01%
range	0,01% - 8,24%	0,01% - 0,82%	0,01% - 2,36%
p-Wert	0,497	0,472	0,010

3.3.1.4. Vergleich der Erkrankungen AML und ALL

Es wurden die medianen Empfängerchimärismuswerte derjenigen Patienten mit einer AML (de-novo und sekundär) mit denen von Patienten mit einer ALL verglichen (siehe Tabelle 11). Die Patienten mit AML hatten an Tag 50, 100 und 150 jeweils einen medianen Empfängerchimärismus von 0,03% (range 0,02% - 8,65%), 0,02% (range 0,01% - 1,08%) und 0,01% (range 0,07% - 83,06%). Patienten mit ALL zeigten einen medianen Empfängerchimärismus von 0,04% (range 0,01% - 3,96%), 0,02% (range 0,01% - 0,10%) und 0,03% (range 0,01% - 0,22%). Zu allen analysierten Zeitpunkten war der mediane Empfängerchimärismus derjenigen Patienten mit ALL gleich oder höher als derjenige der Patienten mit AML. Der Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen war für jeden der drei Zeitpunkte nicht signifikant ($p=1,000$, $p=1,000$ und $p=0,466$).

Tabelle 11. Vergleich von Patienten mit AML und ALL. Es wurden jeweils an Tag 50, Tag 100 und Tag 150 nach allogener SZT (+/- 10% der Zeit) die vorhandenen Chimärismuswerte der Patienten miteinander verglichen. Insgesamt hatten von 43 Patienten 34 eine AML (79,1%) und 6 eine ALL (20,9%).

	Tag 50	Tag 100	Tag 150
AML			
N	17	21	20
Median	0,03%	0,02%	0,01%
range	0,02% - 8,65%	0,01% - 1,08%	0,07% - 83,06%
ALL			
N	8	8	7
Median	0,04%	0,02%	0,03%
range	0,01% - 3,96%	0,01% - 0,10%	0,01% - 0,22%
p-Wert	1,000	1,000	0,466

3.3.1.5. Survival

Es wurden die medianen Empfängerchimärismuswerte der Patienten, die den Beobachtungszeitraum überlebten, mit denen der Patienten, die am Ende des Beobachtungszeitraums verstarben, an den Tagen 50, 100 und 150 verglichen (siehe Tabelle 12). Die überlebenden Patienten mit hatten an Tag 50, 100 und 150 jeweils einen medianen Empfängerchimärismus von 0,04% (range 0,02% - 8,65%), 0,02% (range 0,01% - 1,08%) und 0,02% (range 0,07% - 68,50%). Die am Ende des Beobachtungszeitraum verstorbenen Patienten zeigten einen medianen Empfängerchimärismus von 0,03% (range 0,01% - 0,03%), 0,02% (range 0,01% - 0,03%) und 1,46% (range 0,01% - 83,06%). Einen deutlichen Unterschied zwischen den medianen Empfängerchimärismuswerten der überlebenden und der verstorbenen Patienten gab es nur an Tag 150 (0,02% und 1,46%). Der Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen war für jeden der drei Zeitpunkte nicht signifikant ($p=0,550$, $p=0,667$ und $p=0,280$).

Tabelle 12. Vergleich von Patienten die den Beobachtungszeitraum überlebten mit denen die bis zum Ende verstarben. Es wurden jeweils an Tag 50, Tag 100 und Tag 150 nach allogener SZT (+/- 10% der Zeit) die vorhandenen Chimärismuswerte der Patienten miteinander verglichen. Insgesamt lebten am Ende des Beobachtungszeitraums von 43 Patienten 39 (90,7%,) 4 Patienten waren verstorben (9,3%).

	Tag 50	Tag 100	Tag 150
lebt			
N	22	27	25
Median	0,04%	0,02%	0,02%
range	0,02% - 8,65%	0,01% - 1,08%	0,07% - 68,50%
tot			
N	3	2	3
Median	0,03%	0,02%	1,46%
range	0,01% - 0,03%	0,01% - 0,03%	0,01% - 83,06%
p-Wert	0,550	0,667	0,280

3.3.2. Chimärismusverlauf nach klinischem Ereignis

Als nächstes wurde der Einfluss von typischen transplantations-assoziierten klinischen Ereignissen (Reduktion sowie Absetzen der Immunsuppression mit Ciclosporin A, akute sowie chronische GvHD, DLI, Virusinfekte, Pneumonie und Fever of Unknown Origin, sonstige Infekte) auf den Verlauf des Empfängerchimärismus untersucht (siehe Tabelle 13). Dafür wurden in jeder Patientengruppe die Unterschiede des Empfängerchimärismus zwischen dem Zeitpunkt des Auftretens des jeweiligen Ereignisses (t_1) und dem Zeitpunkt des nächsten darauffolgenden Extremwertes des Empfängerchimärismus (t_2) mittels Wilcoxon-Tests analysiert.

Hierbei zeigte sich im Fall von Reduktion und Absetzen der Immunsuppression, von akuter und chronischer GvHD sowie bei DLIs ein Abfall des medianen Empfängerchimärismus. Im Fall von Virusinfekten sowie Pneumonie und FUO stieg der mediane Empfängerchimärismus an. Im Fall sonstiger Infektionen war ein leichter Abfall zu beobachten.

Tabelle 13. Verlauf des Empfängerchimärismus nach klinischen Ereignissen. Dargestellt ist die Einteilung des Chimärismusverlaufs in Abfall und Anstieg des Empfängerchimärismus sowie Gleichbleiben bei 0,01% infolge verschiedener klinischer Ereignisse. Relevante Werte sind der Wachstumsfaktor, der den relativen Chimärismusverlauf im zeitlichen Zusammenhang anzeigt, sowie der absolute Empfängerchimärismus zum Messzeitpunkt t_2 (EC(t_2), in %), der das Maximum eines Abfalls oder Anstiegs markiert. * nur GvHD in Individuen ohne DLI **Infekte der oberen Atemwege (n=6), Varizella-Zoster-Virus (n=6), Zystitis (n=2), Soor (n=2), Herpes-Simplex-Virus (n=1), Norovirus (n=1), Helicobacter-pylori-Gastritis (n=1), pseudomembranöse Kolitis (n=1) ***Es wurden Wilcoxon-Rangsummentests auf Basis der absoluten Chimärismuswerte EC(t_1) und EC(t_2) durchgeführt.

Ereignis	n	Empfängerchimärismus			Wachstumsfaktor Median (range)	EC(t_2) (in %) Median (range)	P ***
		Abfall %	Anstieg %	Gleichbleibend bei 0.01% %			
Reduktion der Immun-Suppression	10	50	40	10	0.98 (0.93-1.05)	0.02 (0.01-1.37)	0,953
Absetzen der Immun-suppression	15	53	27	20	0.98 (0.71-1.10)	0.02 (0.01-0.79)	0,099
GvHD gesamt*	20	70	5	25	0.97 (0.78-1.01)	0.01 (0.01-0.90)	0,008
Akute GvHD	10	90	0	10	0.96 (0.77-0.10)	0.01 (0.01-0.02)	0,008
Chronische GvHD	10	50	10	40	0.99 (0.90-1.01)	0.01 (0.01-0.90)	0,249
DLI	11	82	9	9	0.98 (0.90-1.20)	1.15 (0.01-81.83)	0,059
Virusinfekte gesamt	18	11	50	39	1.04 (0.95-1.77)	0.03 (0.01-9.43)	0,075
CMV	11	0	55	45	1.09 (1.01-1.77)	0.01 (0.01-3.96)	0,028
EBV	7	29	43	29	1.03 (0.95-1.17)	0.08 (0.01-9.43)	0,686
FUO, Pneumonie	10	20	40	40	1.01 (0.98-1.09)	0.02 (0.01-2.89)	0,600
Sonstige Infekte**	20	35	30	35	0.99 (0.84-1.09)	0.02 (0.01-10.60)	0,507

3.3.2.1. Reduktion und Absetzen der Immunsuppression

Nach Reduktion der Immunsuppression zeigte sich in 5 von 10 Fällen (50%) ein Abfall oder Gleichbleiben des Empfängerchimärismus (exemplarisch in Abbildung 7 dargestellt). Der Vergleich der Chimärismuswerte zu den Zeitpunkten t_1 und t_2 ergab keinen Unterschied ($p=0,953$, Tab. 13).

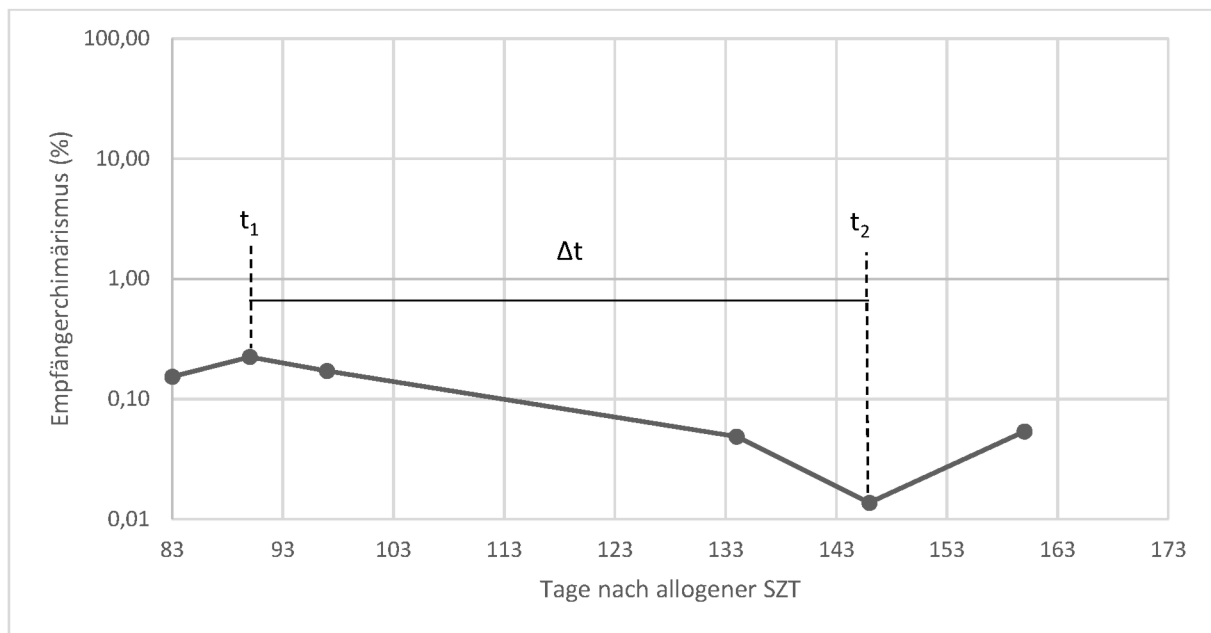


Abbildung 7. Fallbeispiel des Chimärismusverlaufs nach Reduktion der Immunsuppression. Die Reduktion der Immunsuppression begann zum Zeitpunkt t_1 . In der Folge sank der Empfängerchimärismus von 0,17% bis auf 0,01% zum Zeitpunkt t_2 ($\Delta t = 49$ Tage). Dargestellt sind auf der X-Achse die Tage nach allogener SZT und auf der Y-Achse der entsprechende Empfängerchimärismus in %.

Nach vollständigem Absetzen der Immunsuppression zeigte sich in 8 von 15 Fällen (53%) ein sinkender Empfängerchimärismus (exemplarisch in Abbildung 8 dargestellt). Der Vergleich der Chimärismuswerte zu den Zeitpunkten t_1 und t_2 ergab keinen Unterschied ($p=0,099$, Tab. 13).

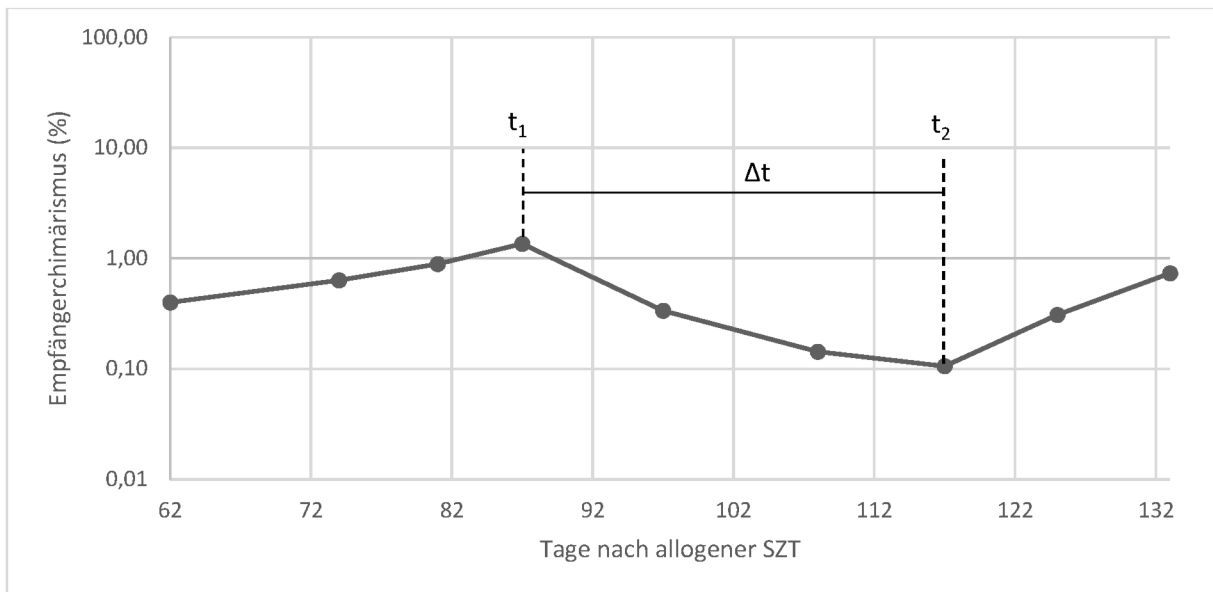


Abbildung 8. Fallbeispiel des Chimärismusverlaufs nach vollständigem Absetzen der Immunsuppression. Die Immunsuppression wurde zum Zeitpunkt t_1 abgesetzt. In der Folge sank der Empfängerchimärismus von 0,36% bis auf 0,11% zum Zeitpunkt t_2 ($\Delta t = 30$ Tage). Dargestellt sind auf der X-Achse die Tage nach allogener SZT und auf der Y-Achse der entsprechende Empfängerchimärismus in %.

3.3.2.2. GvHD

In der folgenden Analyse wurden nur diejenigen Fälle von GvHD in Patienten berücksichtigt, welche keine DLI erhalten hatten.

Im Fall von GvHD zeigte sich bei Berücksichtigung von sowohl akuter als auch chronischer GvHD in 14 von 20 Fällen (70%) ein sinkender Empfängerchimärismus. Der Vergleich der Chimärismuswerte zu den Zeitpunkten t_1 und t_2 ergab einen signifikanten Abfall ($p=0,008$, Tab 13).

Bei Betrachtung der Fälle akuter GvHD zeigte sich in 9 von 10 Fällen (90%) ein sinkender Empfängerchimärismus (exemplarisch in Abbildung 9 dargestellt). Es war in keinem Fall ein Chimärisanstieg zu beobachten. Der Vergleich der Chimärismuswerte zu den Zeitpunkten t_1 und t_2 ergab einen signifikanten Abfall ($p=0,008$, Tab. 13).

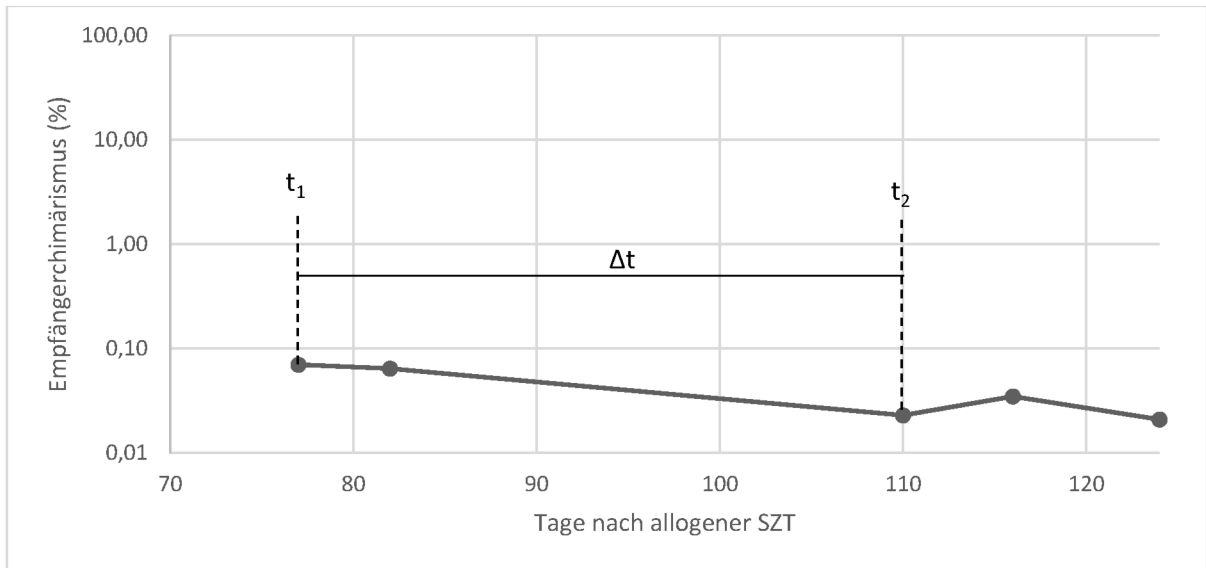


Abbildung 9. Fallbeispiel des Chimärismusverlaufs infolge akuter GvHD. Die akute GvHD wurde zum Zeitpunkt t_1 diagnostiziert. In der Folge sank der Empfängerchimärismus von 0,07% bis auf 0,02% zum Zeitpunkt t_2 ($\Delta t = 33$ Tage). Dargestellt sind auf der X-Achse die Tage nach allogener SZT und auf der Y-Achse der entsprechende Empfängerchimärismus in %.

Bei Betrachtung der Fälle chronischer GvHD zeigte sich in 5 von 10 Fällen (50%) ein sinkender Empfängerchimärismus (exemplarisch in Abbildung 10 dargestellt). Der Vergleich der Chimärismuswerte zu den Zeitpunkten t_1 und t_2 ergab keinen Unterschied ($p=0,249$, Tab 13).

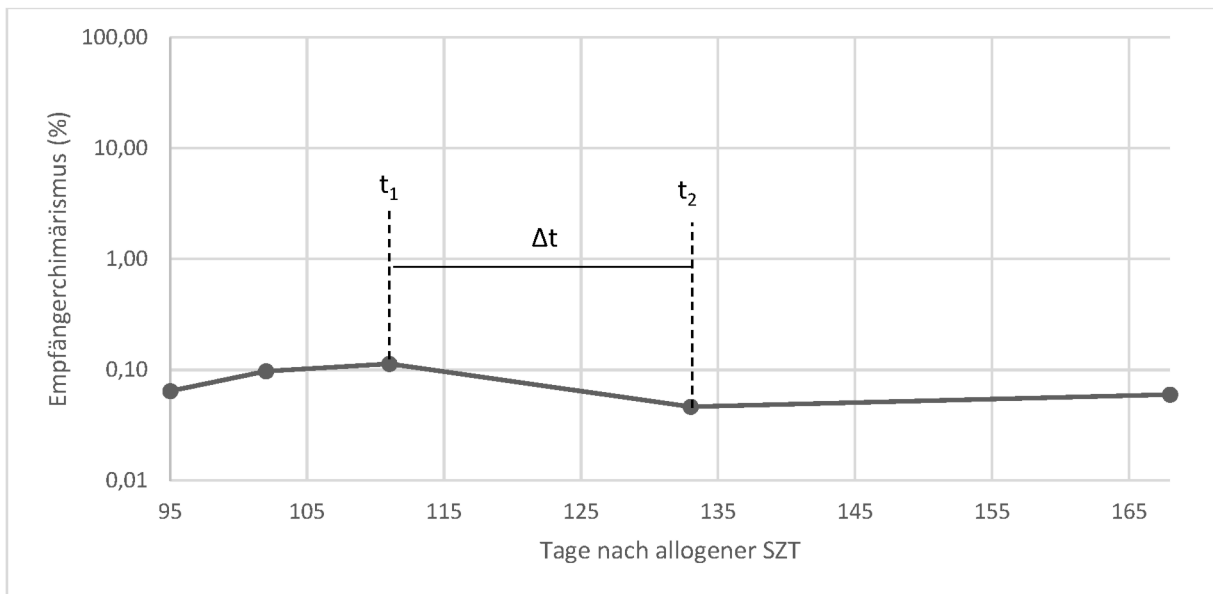


Abbildung 10. Fallbeispiel des Chimärismusverlaufs infolge chronischer GvHD. Die chronische GvHD wurde zum Zeitpunkt t_1 diagnostiziert. In der Folge sank der Empfängerchimärismus von 0,11% bis auf 0,05% zum Zeitpunkt t_2 ($\Delta t = 22$ Tage). Dargestellt sind auf der X-Achse die Tage nach allogener SZT und auf der Y-Achse der entsprechende Empfängerchimärismus in %.

3.3.2.3. DLI

Nach Verabreichung von DLI zeigte sich in 9 von 11 Fällen (82%) ein sinkender Empfängerchimärismus (siehe Abbildung 11). In einem einzigen Fall stieg nach einer DLI der Empfängerchimärismus an. Der Vergleich der Chimärismuswerte zu den Zeitpunkten t_1 und t_2 ergab keinen Unterschied ($p=0,059$, Tab. 13).

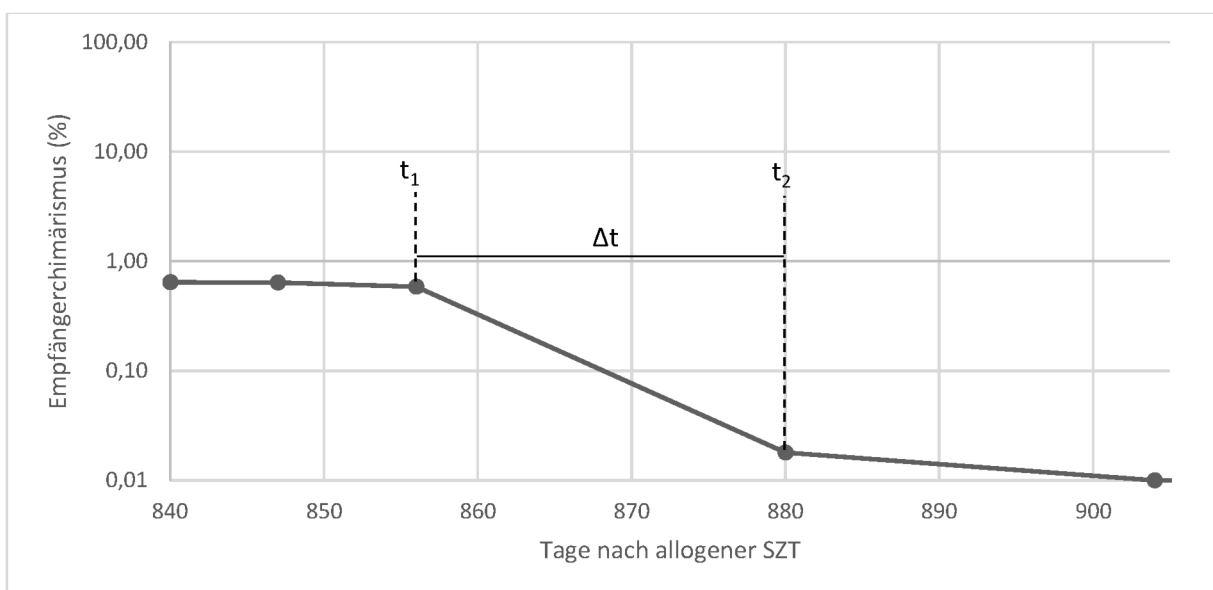


Abbildung 11. Fallbeispiel des Chimärismusverlaufs nach DLI. Die DLI wurde zum Zeitpunkt t_1 verabreicht. In der Folge sank der Empfängerchimärismus von 0,64% bis auf 0,01% zum Zeitpunkt t_2 ($\Delta t = 57$ Tage). Dargestellt sind auf der X-Achse die Tage nach allogener SZT und auf der Y-Achse der entsprechende Empfängerchimärismus in %.

Bei erfolgten DLI trat in 4 von 11 Fällen (36,4%) eine nachfolgende GvHD auf (siehe Abbildung 12). Alle mit GvHD assoziierten DLIs zeigten einen sinkenden oder bei 0,001% verbleibenden Empfängerchimärismus. In 6 Fällen (54,6% der DLIs) sank der Empfängerchimärismus oder verblieb bei 0,01% auch ohne eine nachfolgende GvHD. In einem von 11 Fällen (9,09%) stieg der Chimärismus an; hier trat keine GvHD auf.

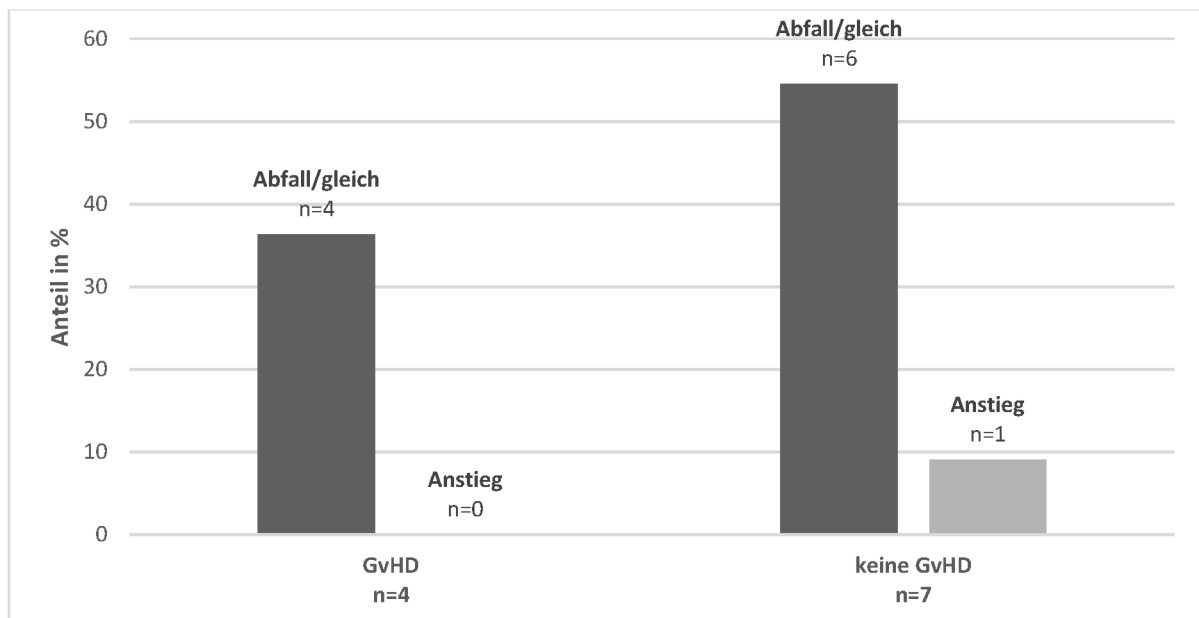


Abbildung 12. Chimärismusverlauf und Assoziation mit GvHD nach DLI. Von allen ausgewerteten DLIs ($n=11$) folgte auf 36,4% eine GvHD ($n=4$). Jeder dieser Fälle war mit einem sinkenden oder einem gleichbleibenden Chimärismus assoziiert (siehe Kategorie links). Von den DLIs, auf die keine GvHD folgte (63,6%), waren alle bis auf eine ebenfalls mit einem sinkenden oder gleichbleibenden Chimärismus assoziiert (siehe Kategorie rechts). Fälle mit sinkendem/gleichbleibendem Chimärismus sind in dunkelgrau und mit steigendem Chimärismus in hellgrau dargestellt. Auf der Y-Achse sind die entsprechenden prozentualen Anteile ablesbar.

3.3.2.4. Virale Infekte

Nach dem Auftreten von viralen Infektionen mit CMV oder EBV zeigte sich in 9 von 18 Fällen (50%) ein steigender Empfängerchimärismus, in weiteren 7 Fällen (39%)

verblieb der Empfängerchimärismus bei 0,01%. Der Vergleich der Chimärismuswerte zu den Zeitpunkten t_1 und t_2 ergab keinen Unterschied ($p=0,075$, Tab 13).

Einzel betrachtet zeigte sich nach dem Auftreten von CMV in 6 von 11 Fällen (55%) ein steigender Empfängerchimärismus (siehe Abbildung 13). In den übrigen Fällen verblieb er bei 0,01%. Es war kein sinkender Empfängerchimärismus zu beobachten. Der Vergleich der Chimärismuswerte zu den Zeitpunkten t_1 und t_2 ergab einen signifikanten Anstieg ($p=0,028$, Tab 13).

Nach dem Auftreten von EBV zeigte sich in 3 von 7 Fällen (43%) ein steigender Empfängerchimärismus. (siehe Abbildung 14). In weiteren 2 Fällen (29%) verblieb er bei 0,01%. Der Vergleich der Chimärismuswerte zu den Zeitpunkten t_1 und t_2 ergab keinen Unterschied ($p=0,686$, Tab. 13).

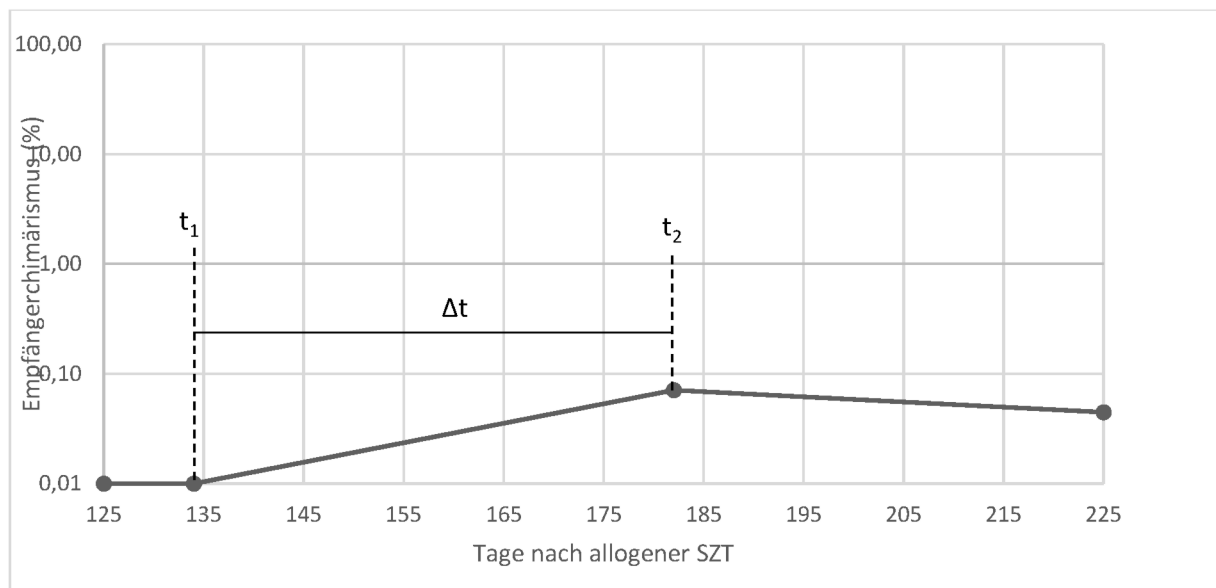


Abbildung 13. Fallbeispiel des Chimärismusverlaufs infolge von CMV- Reaktivierung. Die CMV-Reaktivierung wurde zum Zeitpunkt t_1 diagnostiziert. In der Folge stieg der Empfängerchimärismus von 0,01% bis auf 0,07% zum Zeitpunkt t_2 ($\Delta t = 48$ Tage). Dargestellt sind auf der X-Achse die Tage nach allogener SZT und auf der Y-Achse der entsprechende Empfängerchimärismus in %.

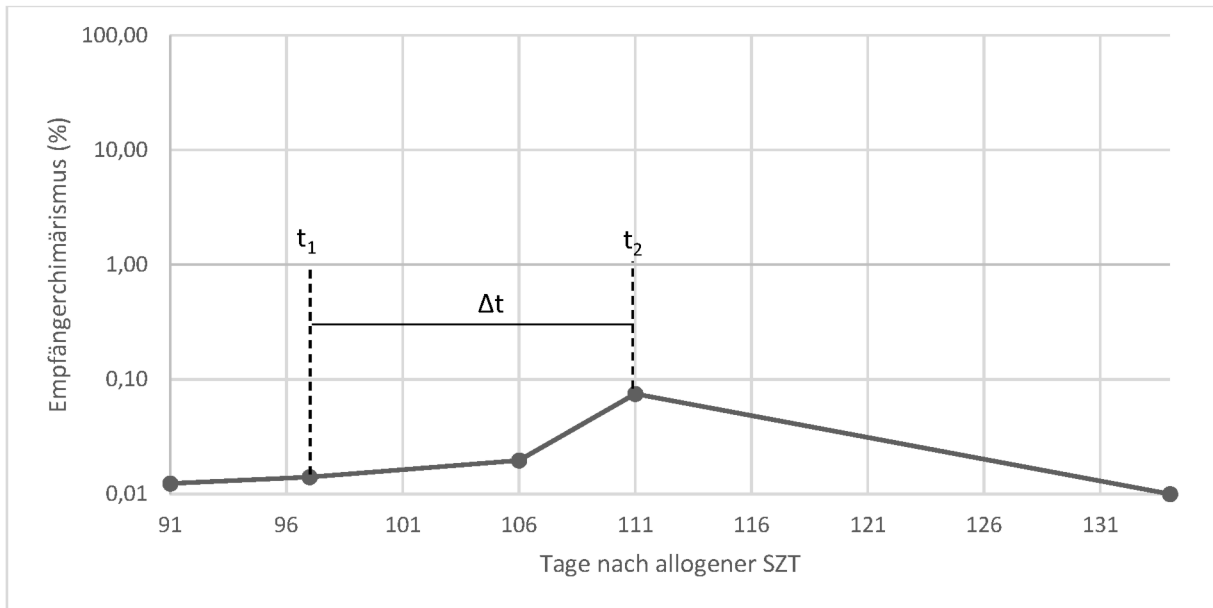


Abbildung 14. Fallbeispiel des Chimärismusverlaufs infolge von EBV Reaktivierung. Die EBV-Reaktivierung wurde zum Zeitpunkt t_1 diagnostiziert. In der Folge stieg der Empfängerchimerismus von 0,02% bis auf 0,08% zum Zeitpunkt t_2 ($\Delta t = 14$ Tage). Dargestellt sind auf der X-Achse die Tage nach allogener SZT und auf der Y-Achse der entsprechende Empfängerchimerismus in %.

3.3.2.5. Pneumonie und FUO

Infolge von Pneumonien und FUO zeigte sich in 4 von 10 Fällen (40%) ein steigender Empfängerchimerismus (siehe Abbildung 15). In weiteren 4 Fällen (40%) verblieb der Empfängerchimerismus bei 0,01%. Der Vergleich der Chimärismuswerte zu den Zeitpunkten t_1 und t_2 ergab keinen Unterschied ($p=0,600$, Tab. 13).

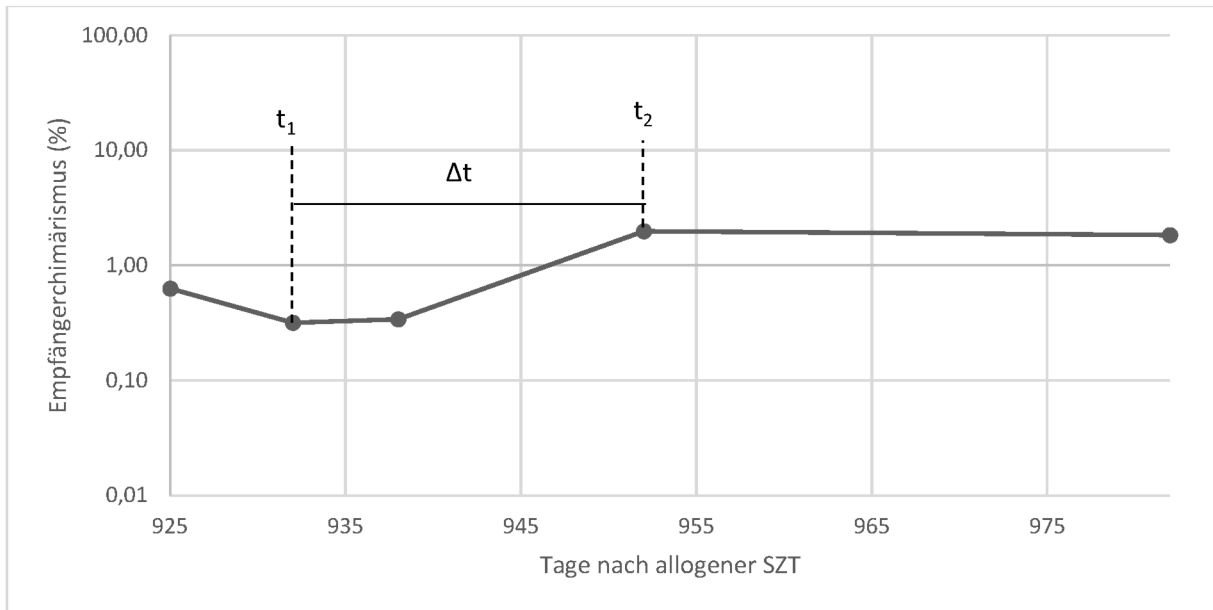


Abbildung 15. Fallbeispiel des Chimärismusverlaufs infolge von Pneumonie. Die Pneumonie wurde zum Zeitpunkt t_1 diagnostiziert. In der Folge stieg der Empfängerchimärismus von 0,32% bis auf 1,99% zum Zeitpunkt t_2 ($\Delta t = 20$ Tage). Dargestellt sind auf der X-Achse die Tage nach allogener SZT und auf der Y-Achse der entsprechende Empfängerchimärismus in %.

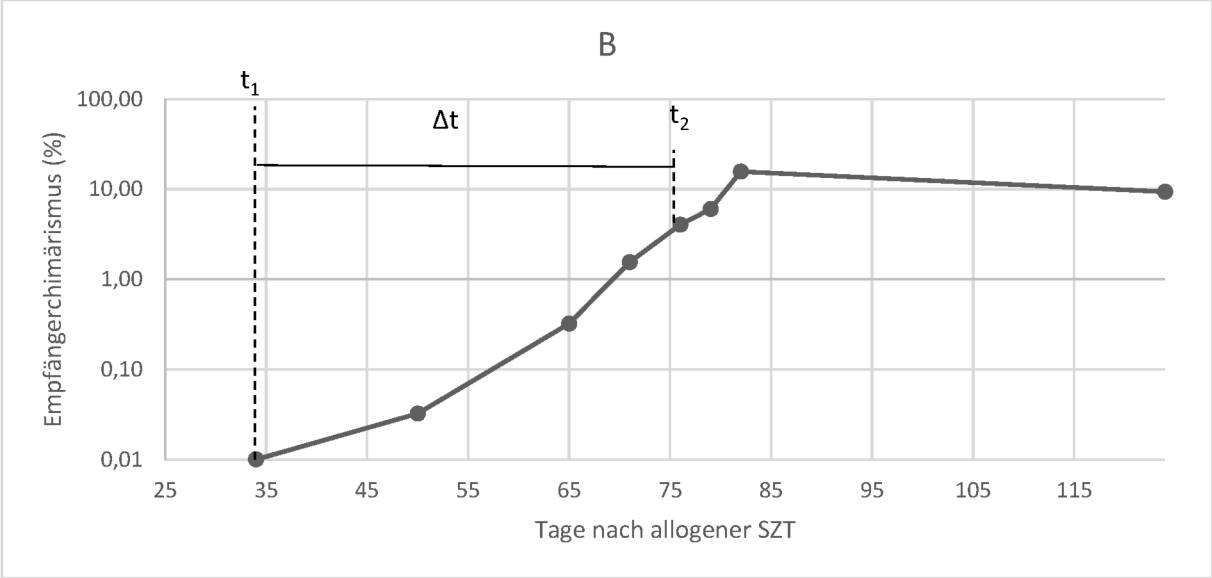
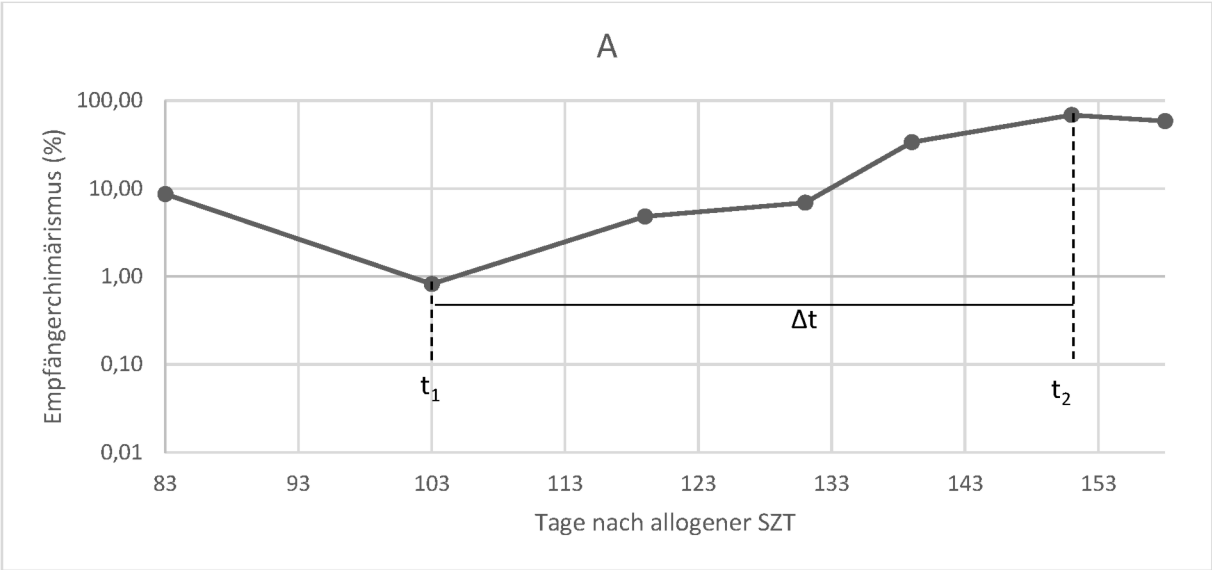
3.3.2.6. Sonstige Infekte

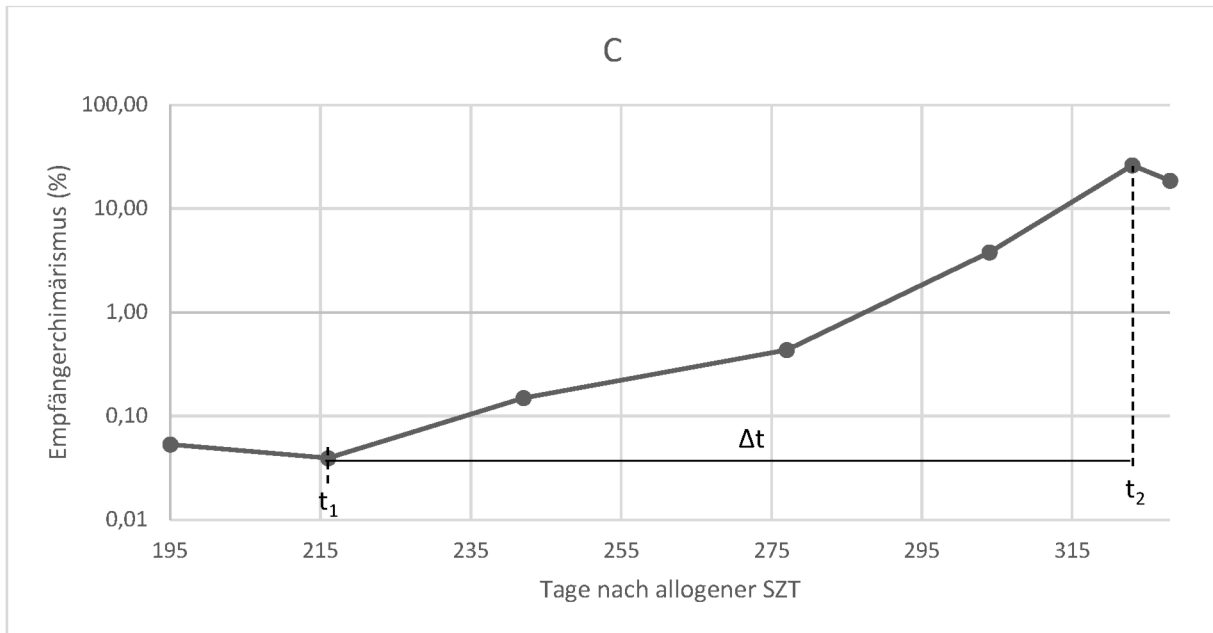
Im Fall sonstiger Infekte (Infekte der oberen Atemwege (n=6), Varizella-Zoster-Virus (n=6), Zystitis (n=2), Soor (n=2), Herpes-Simplex-Virus (n=1), Norovirus (n=1), Helicobacter-pylori-Gastritis (n=1), pseudomembranöse Kolitis (n=1)) zeigte sich in 6 von 20 Fällen (30%) ein steigender und in 7 Fällen (35%) ein sinkender Empfängerchimärismus. Der Vergleich der Chimärismuswerte zu den Zeitpunkten t_1 und t_2 ergab keinen Unterschied ($p=0,507$, Tab. 13).

3.3.3. Monotoner Anstieg des Empfängerchimärismus in Patienten mit und ohne klinisches Rezidiv

Bei drei Patienten wurde im Beobachtungszeitraum ein Rezidiv der Grunderkrankung klinisch diagnostiziert. In allen drei Fällen wurde im vorangehenden Zeitraum ein starker und sog. „monotoner“ Anstieg des Empfängerchimärismus beobachtet (siehe Abbildungen 16 A-C). Als Zeiträume mit monotonem Anstieg des Empfängerchimärismus wurden diejenigen Messintervalle definiert, innerhalb derer kein zwischenzeitiger Abfall des Chimärismus zu verzeichnen war. War dies

ausschließlich zwischen zwei unmittelbar aufeinanderfolgenden Proben der Fall, wurden diese nicht gewertet. Die monotonen Anstiege dauerten 35, 36 und 107 Tage.





Abbildungen 16 A-C. Chimärismusverläufe dreier Patienten mit Rezidiv nach allogener SZT. Im Gesamtverlauf des jeweiligen Chimärismus markiert t_1 den Zeitpunkt des initialen Anstiegs des Empfängerchimärismus vor der klinischen Rezidivdiagnose und t_2 den Diagnosezeitpunkt. Dargestellt sind auf der X-Achse die Tage nach allogener SZT und auf der Y-Achse der entsprechende Empfängerchimärismus in %.

Es wurde untersucht, ob sich im Falle eines Rezidivs Messintervalle mit steigendem Empfängerchimärismus statistisch über mehr aufeinanderfolgende Proben erstreckten. Hierfür wurde die maximale Zahl der Proben innerhalb des die meisten Proben umfassenden Zeitraums mit monotonem Anstieg des Empfängerchimärismus von Patienten mit klinischem Rezidiv im Sammlungszeitraum (N=3) mit derjenigen von Patienten ohne klinisches Rezidiv im Sammlungszeitraum (N=38) verglichen (siehe Tabelle 14). Der Chimärismusanstieg, der der klinischen Rezidivdiagnose vorausging, erstreckte sich über eine höhere Zahl analysierter Proben (median 5, range 4-6) als der jeweils längste Chimärismusanstieg im Beobachtungszeitraum bei Patienten ohne Rezidiv (median 3, range 2-5). Während 16 von 38 Patienten ohne Rezidiv keinen oder nur einen Chimärismusanstieg nach einer Probe aufwiesen (42,1%), war bei jedem Patienten mit Rezidiv ein monotoner Anstieg über mehrere Proben zu beobachten. Ein monotoner Anstieg über 4 oder mehr Proben kam bei 100% der Rezidivpatienten vor, aber nur bei 13,2% der Patienten ohne Rezidiv.

Tabelle 14. Monotoner Empfängerchimärismusanstieg über mehrere aufeinanderfolgende Proben in Patienten mit und ohne klinisches Rezidiv. Dargestellt ist die maximale Anzahl von Proben innerhalb eines Zeitraums mit monotonem Anstieg des Empfängerchimärismus. Es wurden monotone Anstiege ab zwei aufeinanderfolgenden Proben berücksichtigt. Die Verteilung auf die maximale Probenanzahl ist sowohl absolut (n) als auch prozentual angegeben.

Zahl der Proben mit monotonem Anstieg	Patienten mit Rezidiv N=3		Patienten ohne Rezidiv N=38	
	n	%	n	%
2 Proben	0	0	6	15,8
3 Proben	0	0	11	28,9
4 Proben	1	33,3	3	7,9
5 Proben	1	33,3	2	5,3
6 Proben	1	33,3	0	0

Zusätzlich wurde der Wachstumsfaktor zwischen dem ersten und dem letzten Messwert dieser Zeiträume von Patienten mit Rezidiv mit demjenigen von Patienten ohne Rezidiv verglichen (siehe Abbildung 17). Der durchschnittliche Wachstumsfaktor des jeweils längsten monotonen Chimärismusanstiegs bei Rezidivpatienten (n=3) betrug 1,11 (range 1,06 – 1,17). Bei Patienten ohne Rezidiv (n=22) betrug er 1,07 (range 1,00 – 1,36). Es zeigten sich somit bei rezidivierenden Patienten im Trend sowohl mehr Proben umfassende Zeiträume mit monotonem Anstieg des Empfängerchimärismus, als auch ein höherer Wachstumsfaktor in diesen Intervallen.

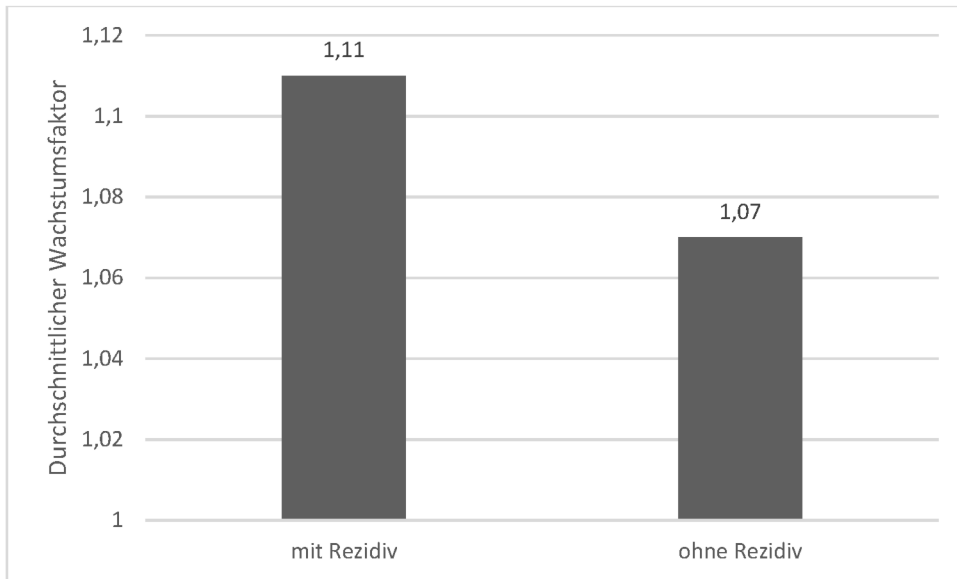


Abbildung 17. Durchschnittlicher Wachstumsfaktor innerhalb monotoner Anstiege in Patienten mit (n=3) und ohne klinisches Rezidiv (n=22).

4. Diskussion

Die frühzeitige Detektion von Leukämierезидивen nach allogener SZT ist entscheidend für die frühzeitige Einleitung von Therapien (z.B. Absetzen der Immunsuppression oder Gabe von Spenderlymphozyten), stellt aber weiterhin eine große technische Herausforderung dar. In der vorliegenden Arbeit wurde eine von Alizadeh et. al.⁹ beschriebene hochsensitive Chimärismusanalyse etabliert, welche auf der Detektion von In/Del-Polymorphismen im Patienten mittels Singleplex-qPCR basiert. Die Häufigkeit des Vorkommens der verwendeten In/Del-Marker und des Markers DYS1 in Bezug auf die hiesige Bevölkerung wurde untersucht. Der Verlauf des hochsensitiv gemessenen Empfängerchimärismus wurde analysiert in Bezug auf nicht Rezidiv-bezogene klinische Ereignisse. Ferner zeigt die Arbeit erste Ergebnisse zur Effektivität der hochsensitiven Chimärismusanalyse zur frühzeitigen Detektion von Leukämierезидивen.

4.1. Etablierung und Optimierung der Methoden

4.1.1. Typisierung

Von 40 Patienten-Spender-Paaren, die vollständig auf Mismatche der In/Del-Polymorphismus-Marker getestet wurden, wurde unter Verwendung von 15 In/Del Markern und DYS1 bei 39 Patienten-Spender-Paaren mindestens ein Mismatch in Empfängerrichtung identifiziert. Dies entspricht einem Anteil von 97,5%. Dieses Ergebnis übersteigt leicht die von Alizadeh et al. publizierte Angabe, es könne in 90% der Fälle ein Marker-Mismatch in Empfängerrichtung gefunden werden⁹.

Ferner ergab sich, dass die vorliegenden Ergebnisse sich bezüglich der Verteilung der Marker sehr von den von Chen et al. publizierten Daten einer taiwanesischen Kohorte unterscheiden (siehe Tab. 6). Dies lässt den Schluss zu, dass die In/Del-Polymorphismus-Marker in unterschiedlichen Patientenkollektiven verschieden häufig vorkommen und somit auch unterschiedlich häufig zur klinischen Anwendung für Chimärismusanalysen kommen können.

Insgesamt ergab die die vorliegende Analyse, dass in den Fällen, in denen aufgrund von zu geringer gewonnener Menge genomischer DNA eine vollständige Typisierung mit allen Markern nicht möglich ist, eine Priorisierung derjenigen Marker empfehlenswert ist, die aufgrund der hier erhobenen Daten die höchste

Wahrscheinlichkeit für ein Marker-Mismatch aufweisen. Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit sind dies die Marker S05b, S07b, S09b und S10a.

4.1.2. Standardreihen

In der vorliegenden Arbeit wurde – wie auch in der Arbeit von Alizadeh – jedes Messergebnis mit den Ergebnissen einer gleichzeitig gelaufenen Standardverdünnungsreihe abgeglichen, um den endgültigen Empfängerchimärismuswert zu errechnen. Bei der Anfertigung von Standardreihen wurde in der vorliegenden Arbeit keine eigene Verdünnungsreihe aus PBMCs für jedes Patienten-Spender-Paar generiert⁹. Stattdessen wurden immortalisierte B-Zellen in Form von MiniLCLs oder EBV-transformierten B-Zellen verwendet, um eine unbegrenzte Quelle für die Herstellung von Standardreihen zu haben⁵¹. Auf diese Art war es zudem nicht notwendig, auf individuelles und häufig knappes Material von Patienten und Spendern zurückzugreifen. Dies bedeutet einen wesentlich reduzierten Arbeitsaufwand und eine hohe Reproduzierbarkeit, somit auch einen besseren Vergleich verschiedener Chimärismusverläufe, die mit demselben In/Del-Polymorphismus-Marker analysiert wurden.

Die breitere klinische Anwendung der hoch-sensitiven Chimärismusanalyse ist abhängig von möglichst wenigen Arbeitsschritten. Die hochsensitive Chimärismusanalyse lässt sich in der Zukunft auf mindestens zwei Arten vereinfachen: 1) Durch die Verwendung von Multiplex- anstatt Singleplex-PCRs unter Einschluss des Referenzgens und 2) durch die Verwendung externer Standards anstatt von Standardreihen zur Abgleichung der Messwerte.

Zu 1): Die Messung des Referenzgens (housekeeping gene) im selben Well wie das gesuchte Gen (Multiplex-PCR statt Singleplex-PCR) würde eine Halbierung der benötigten Wells erlauben.

Zu 2): Aktuell ist es noch notwendig, pro PCR jeweils Standardreihen von Marker-Positiven DNAs aus miniLCLs mit zu pipettieren, um mittels der ΔCt -Werte den exakten Chimärismuswert der Patientenproben zu errechnen. Diese Standardreihe erfordert bei 7 Standardverdünnungen unter Verwendung einer Singleplex PCR 28 Wells bzw.

bei Verwendung einer Multiplex PCR einschließlich Referenzgen 14 Wells. Die prozentuale Berechnung des Empfängerchimärismus gegen einen einmalig kalibrierten einzelnen Standard anstelle einer gesamten Standardreihe analog zur Pfaffl-Methode^{52,53} würde beim Pipettieren eines externen Standards als Duplo bei einer Singleplex Methode nur 4 Wells und bei einer Multiplex Methode nur 2 Wells erfordern.

Der Ersatz von Referenzzellen durch rekombinante DNA stellt einen weiteren wichtigen Schritt zur Vereinfachung und Standardisierung der hochsensitiven Chimärismusanalyse dar. Dieser Ansatz wurde in kommerziell erhältlichen qPCR-Tests dem *Mentype DIPscreen/DIPquant* (Biotype Diagnostic GmbH, Dresden, Germany) oder den *KMR Track Chimerism Assay* (GenDx, 3584 CM Utrecht, The Netherlands)⁵⁴ bereits erfolgreich angewendet.

4.1.3. Chimärismus-Analyse

Im Vergleich zur am häufigsten genutzten Methode der klinischen Chimärismusanalyse mittels STR-PCR weist die Analyse mittels quantitativer real-time PCR unter Verwendung von In/Del-Polymorphismus-Markern eine deutlich höhere Sensitivität auf, was darauf hindeutet, dass hiermit steigende Empfängerchimärismuswerte und das damit einhergehende Rezidivrisiko früher erkannt werden können⁵⁵. Eine Sensitivität von 0,01% wurde für alle verwendeten Marker (außer Marker S03 mit einer Sensitivität von 0,1%) erreicht, so dass die Sensitivität der Analysemethode in der vorliegenden Arbeit diejenige der STR-Analyse (Sensitivität 1%) deutlich übertrifft. Es lagen 53% der bei der Analyse der Patientenproben gemessenen Werte zwischen 0,01% und 1% Empfängerchimärismus. Somit lag über die Hälfte der Werte im Sensitivitätsbereich der hochsensitiven PCR, wäre jedoch beim Detektionsniveau von 1% der konventionellen Chimärismusanalyse nicht detektierbar gewesen.

Gerade in diesem Bereich, den die hochsensitive Chimärismus-PCR, nicht jedoch die STR-PCR abdeckt, ist häufig eine starke Undulation des Empfängerchimärismus zu beobachten. Diese Undulationen können trotz eines kompletten Engraftments der Spenderhämatopoese vorkommen und haben nicht zwangsläufig einen

Krankheitswert⁵⁶. Ein offensichtlicher Grund für diese Undulationen des Empfängerchimärismus kann nicht immer ausgemacht werden. Daher stellt sich die Frage nach der korrekten Interpretation einer Undulation des Empfängerchimärismus meist knapp oberhalb des Sensitivitätsniveaus der hochsensitiven Chimärismusanalyse. Daher war es wichtig, zu verstehen, wie sich der Empfängerchimärismus bei typischen klinischen Ereignissen in der Post-Transplantationsperiode verhält.

4.2. Wesentliche Einflussfaktoren auf die absoluten Empfängerchimärismuswerte in den ersten 150 Tagen nach allogener SZT

4.2.1. Konditionierung

Die Konditionierung der Patienten vor allogener Stammzelltransplantation dient sowohl der Myeloablation, damit die transplantierten Stammzellen ausreichend Platz haben, als auch der Immunsuppression und der Bekämpfung der Leukämiezellen³⁰. Insbesondere für ältere oder intensiv vorbehandelte, meist rezidierte Patienten kommt jedoch eine myeloablative Konditionierung kaum infrage, sodass nicht-myeloablative Konditionierungsschemata mit geringerer Zytotoxizität eingesetzt werden^{57,58}. Der antileukämische Effekt wird dabei hauptsächlich durch den T-Zell-vermittelten GvL-Effekt nach allogener SZT erreicht^{23,59}. Dies würde erwarten lassen, dass sich in der frühen Phase nach allogener SZT bei reduziert konditionierten Patienten ein höherer Empfängerchimärismus zeigt, der sich dann im Verlauf demjenigen myeloablativ konditionierter Patienten annähert. In dieser Arbeit konnte ein solcher Effekt überraschenderweise jedoch nicht beobachtet werden: Während sich an den Tagen 50 und 150 kein klarer Trend abzeichnete, waren die Chimärismuswerte der nicht-myeloablativ konditionierten Patienten an Tag 100 sogar signifikant niedriger als diejenigen der myeloablativ konditionierten Patienten ($p=0,018$). Dies könnte darauf hindeuten, dass die Depletion der Empfängerhämatoiese weniger – wie die Bezeichnung der Konditionierungsregime vermuten ließe – durch die Chemotherapie bzw. Ganzkörperbestrahlung hervorgerufen wird, sondern v. a. durch das transplantierte Spenderimmunsystem, welches bei beiden Konditionierungsregimearten vergleichbar ist. Dies könnte erklären, warum klinische Studien zunehmend zu dem Schluss kommen, dass das Gesamtüberleben

und das rezidivfreie Überleben in myeloablativ und nicht-myeloablativ konditionierten Patienten vergleichbar ist⁶⁰. Insgesamt ist die Studienlage zu nicht-myeloablativen Konditionierungs-Schemata uneindeutig. Es besteht sowohl ein angenommener Vorteil in Bezug auf das Gesamtüberleben durch die geringere Toxizität als auch ein befürchteter Nachteil durch ein höheres Rezidivrisiko nach allogener SZT⁶¹.

4.2.2. Remissionsstatus vor Transplantation

Der Remissionsstatus vor allogener SZT spielt insofern eine prognostisch wichtige Rolle für das Outcome der Patienten nach der SZT, als dass Patienten im Status der Komplettremission seltener ein Rezidiv der Grunderkrankung erleiden als solche mit noch messbarer Resterkrankung^{62,63}.

In der vorliegenden Arbeit waren die medianen Empfängerchimärismuswerte der Patienten mit Komplettremission (CR) vor SZT nur an Tag 50 niedriger, an Tag 100 und Tag 150 sogar etwas höher als bei Patienten mit nur partieller Remission (PR) vor SZT. Allerdings zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den Empfängerchimärismuswerten bis Tag 150 zwischen in CR bzw. PR transplantierten Patienten. Dies könnte darauf hinweisen, dass sich die Tiefe der Remission nach allogener SZT nicht vollständig in den Absolutwerten der hochsensitiven Chimärismusanalyse abbildet und zusätzliche Analysen mittels MRD-Markern zur Evaluation der Remissionstiefe nach SZT erforderlich sind⁶³. Entsprechende Studien zur Beurteilung des Rezidivrisikos anhand von MRD-Markern nach allogener SZT laufen zurzeit in der Abteilung für Hämatologie (MHH).

4.2.3. Rezidiv nach allogener SZT

Da die malignen Zellen Teil der Empfängerhämatopoese sind, ist im Falle eines Rezidivs der malignen Grunderkrankung im Vorfeld einer Rezidivdiagnose mit erhöhten Empfängerchimärismuswerten zu rechnen⁶⁴. Um diesen Zusammenhang zwischen einem hohen Niveau des Empfängerchimärismus und einem Rezidiv zu überprüfen, wurde das Chimärismuskniveau der Patienten mit und ohne Rezidiv im Beobachtungszeitraum zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach allogener SZT verglichen. Es zeigte sich bereits an Tag 100 ein Trend in Richtung höherer Chimärismuswerte bei Patienten mit Rezidiv im Beobachtungszeitraum. An Tag 150 war der mediane Empfängerchimärismus in dieser Patientengruppe deutlich und

statistisch signifikant ($p=0,01$) höher als bei Patienten ohne Rezidiv. Dieses Ergebnis legt nahe, dass sich ein drohendes Rezidiv der Grunderkrankung an höheren absoluten Chimärismuswerten bereits frühzeitig zeigt. Zur weiteren Diskussion des Zusammenhangs zwischen Rezidiv und relativem Chimärismusverlauf siehe 4.3.4.

4.2.4. Vergleich der Erkrankungen AML und ALL

Ausgehend davon, dass ein höherer Empfängerchimärismus auch ein höheres Rezidivrisiko nach allogener SZT bedeutet⁶⁴, wurde überprüft, ob sich in dieser Hinsicht die beiden Grunderkrankungen AML und ALL unterscheiden^{65,66}. Ein Vergleich des Chimärismustniveaus der AML-Patienten mit demjenigen der ALL-Patienten an den Zeitpunkten Tag 50, 100 und 150 nach allogener SZT ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Grunderkrankungen. Diese Daten sind vereinbar mit den für beide Erkrankungen vergleichbaren Rezidivraten nach allogener SZT (jeweils etwa 25%).

4.2.5. Survival

Todesfälle nach allogener SZT können neben einem Rezidiv der Grunderkrankung verschiedene Komplikationen und Erkrankungen als Ursache haben⁶⁷, von denen einige mit einem Chimärisanstieg, andere jedoch mit einem Chimärismusabfall assoziiert sind oder keinen Einfluss auf den Empfängerchimärismus haben. Eine Studie von Barrett et al. ergab, dass unter Patienten mit Fremdspendern lediglich 33% der Todesfälle auf ein Rezidiv zurückzuführen waren, 19% waren hingegen auf eine Infektion und 13% auf eine GvHD zurückzuführen⁶⁸. Eine GvHD geht typischerweise mit einem sinkenden Empfängerchimärismus einher (zur Diskussion dieses Zusammenhangs siehe 4.3.2.2.).

Ein Vergleich des Empfängerchimärismus an den Tagen 50, 100 und 150 nach allogener SZT zeigte keinen deutlichen Zusammenhang zwischen absoluten Chimärismuswerten und Überleben der Patienten. An Tag 150 nach SZT war jedoch der mediane Empfängerchimärismus der Patienten, die am Ende des Beobachtungszeitraumes noch lebten, mit 0,02% deutlich, aber statistisch nicht signifikant niedriger als derjenige der Patienten, die im Beobachtungszeitraum verstarben (1,46%). Dies ist am ehesten zurückzuführen auf den deutlich höheren

Empfängerchimärismus der an einem Rezidiv verstorbenen Patienten, da 5 von 13 der bis zum Ende des Beobachtungszeitraum verstorbenen Patienten ein Rezidiv entwickelten. Dass die Chimärismuswerte der verstorbenen Patienten nicht signifikant höher waren, ist vermutlich auf die zahlreichen anderen Todesursachen mit teilweise gegenläufigem Einfluss auf den Chimärismus (z. B. GvHD, DLI, Chemotherapie) zurückzuführen.

4.3. Einfluss der klinischen Ereignisse auf den Chimärismusverlauf

Die klinische Verlaufsbeobachtung des Chimärismus nach allogener SZT dient der frühzeitigen Erkennung von Rezidiven der malignen Grunderkrankung. Die in dieser Arbeit behandelten nicht rezidiv-assoziierten klinischen Ereignisse sind für die Beurteilung des Chimärismusverlaufs nach allogener SZT relevant, da sie den Chimärismus ihrerseits beeinflussen und damit deren Interpretation erschweren können. So könnten Ereignisse, die einen Abfall des Empfängerchimärismus verursachen, sofern sie parallel zu einem beginnenden Rezidiv der Grunderkrankung auftreten, dieses verschleiern. Umgekehrt könnten Ereignisse, die einen Anstieg des Empfängerchimärismus verursachen, fälschlicherweise für ein beginnendes Rezidiv der Grunderkrankung gehalten werden. Daher war es wichtig, den Einfluss typischer transplantations-bedingter Komplikationen auf den Verlauf des Empfängerchimärismus nach allogener SZT zu untersuchen. Dabei ergab sich, dass sich klinische nicht-Rezidiv bedingte Ereignisse unterteilen ließen in solche die mehrheitlich mit 1) einem Anstieg, 2) einem Abfall des Empfängerchimärismus oder solche die 3) ohne eindeutige Zuordnung der Veränderung des Empfängerchimärismus einhergingen.

4.3.1. Klinische nicht rezidiv-assoziierte Ereignisse mit einem Abfall des Empfängerchimärismus

Entsprechend der klinischen Erfahrung ist nach Reduktion der Dosis von Immunsuppressiva,^{42,69} bei Auftreten einer GvHD⁷⁰ und nach einer DLI⁷¹ ein Sinken des Empfängerzellanteils zu erwarten.

4.3.1.1. Reduktion und Absetzen der Immunsuppression

Die Gabe von Immunsuppressiva nach allogener SZT dient der Vermeidung von Transplantatabstoßung und lebensbedrohlicher Formen von GvHD³⁰. Sie richtet sich somit gegen das transplantierte Spender-Immunsystem, um es in der Zeit nach Transplantation zu hemmen⁴⁶. Je nach Konditionierungsprotokoll wird die Immunsuppression etwa ab Tag 60 oder Tag 90 nach allogener SZT ausgeschlichen. Dies hat zum Ziel, das Infektrisiko für den Patienten zu minimieren und durch die resultierende Stärkung des Spender-Immunsystems einen Graft-versus-Leukemia-Effekt zu erzielen und damit das Rezidivrisiko zu senken⁴. Im Fall eines ansteigenden Empfängerchimärismus wird die Dosis der Immunsuppression schneller und stärker reduziert⁷² und eine erwartbare GvHD in Kauf genommen⁷³.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich unter Ausschleichen der Immunsuppression in 6 von 10 Fällen ein Abfall oder Gleichbleiben des Empfängerchimärismus verbunden mit einem medianen Wachstumsfaktor von 0.98 (range 0.93-1.05). Zum Zeitpunkt des Absetzens zeigte sich in 8 von 15 Fällen ein Abfall oder Gleichbleiben des Empfängerchimärismus verbunden mit einem medianen Wachstumsfaktor von 0.98 (range 0.71-1.10).

Der Vergleich des Chimärismus zum Beginn des Ausschleichens und zum Zeitpunkt der Beendigung der Immunsuppression war jedoch nicht statistisch signifikant, vermutlich bedingt durch die relativ kleine Fallzahl an Patienten. Eine Erweiterung der Patientenzahl ist erforderlich, um definitive Aussagen zum Verlauf des Empfängerchimärismus unter Ausschleichen und endgültigem Absetzen der Immunsuppression treffen zu können.

4.3.1.2. GvHD

Die akute und chronische GvHD sind Ausdruck einer starken Immunantwort des Spenderimmunsystems gegen Strukturen auf den Zelloberflächen von Zellen des Empfängers v.a. der Epithelien (Haut, Leber, Darm) und der Hämatopoese. Daher ist eine GvHD typischerweise mit einem Abfall der Empfängerhämatopoese verbunden, was bereits in der konventionellen STR Analyse sichtbar ist. Auch in der vorliegenden Arbeit zeigte sich unter akuter GvHD in 10 von 10 Fällen ein Abfall oder Gleichbleiben des Empfängerchimärismus, verbunden mit einem medianen Wachstumsfaktor von 0,96 (range 0,77-1,10). Ähnlich zeigte sich bei der chronischen GvHD in 9 von 10

Fällen ein Abfall oder Gleichbleiben des Empfängerchimärismus verbunden mit einem medianen Wachstumsfaktor von 0,99 (range 0,90-1,01).

Im Gegensatz zur akuten GvHD waren bei der chronischen GvHD die Veränderungen der Chimärismus-Absolutwerte zum Beginn der GvHD bis zum nachfolgenden Minimum des Empfängerchimärismus jedoch statistisch nicht signifikant. Dies beruhte vor allem auf dem mit 40% hohen Anteil an auf dem Niveau von 0,01% verharrenden Empfängerchimärismuswerte, d.h. dass die Chimärismuswerte häufig bereits vor dem Auftreten der chronischen GvHD unter das Detektionsniveau von 0,01% gefallen waren, so dass ein mögliches Absinken nicht mehr dargestellt werden konnte. Der Grund hierfür könnte sein, dass der chronischen GvHD sehr häufig eine akute GvHD vorausgeht, die wiederum mit einem Abfall des Empfängeranteils einhergeht.

4.3.1.3. DLI

Bei einer DLI werden dem Patienten nach erfolgter allogener SZT Lymphozyten des Stammzellspenders übertragen, um einen GvL-Effekt zu erzielen und ein Rezidiv zu vermeiden oder zu behandeln⁷⁴. Es werden zur Rezidivprävention sog. Prophylaktische (basierend auf dem Risikoprofil vor SZT gegebene) DLIs und präemptive (aufgrund steigenden Empfängerchimärismus oder MRD-Markern gegebene) DLIs unterschieden. Zur Behandlung von Rezidiven werden therapeutische DLIs verabreicht, meist in Kombination mit vorhergehender Chemotherapie.

Bei Patienten mit AML-Rezidiv nach allogener SZT erreicht die DLI Remissionen in 15-30% der Fälle, wobei diese oftmals unvollständig oder nur temporär auftreten⁷⁴. In Patienten mit ALL werden noch geringere Erfolgsraten um 5% beobachtet⁷⁵.

In der vorliegenden Studiengruppe erhielten 11 Patienten während des Beobachtungszeitraums eine Behandlung mit Spenderlymphozyten. Aufgrund der niedrigen Fallzahl wurde der Grund für die DLI-Gabe nicht priorisiert und alle Fälle von DLIs zusammengefasst ausgewertet. In dieser Arbeit wurde nach DLI-Gabe in 90,9% der Fälle ein Abfall des Empfängerchimärismus beobachtet. Dies weist darauf hin, dass die beabsichtigte Stärkung des Spender-Immunsystems mit dem Ziel des Graft-versus-Leukemia-Effekts in fast allen Fällen tatsächlich stattfand. In allen Fällen, in denen nach DLI-Gabe eine GvHD auftrat, fiel auch der Empfängerchimärismus ab. In dieser Studie traten GvHDs jedoch nur in 36% der Fälle nach DLI Gabe auf (und somit

etwas seltener als die 40-60%, die in nordamerikanischen Multicenter-Studien angegeben werden⁷⁶), was in etwa der publizierten Zahl an GvHDs nach DLI entsprach. 55% der Patienten zeigten nach DLI zwar einen Abfall des Empfängerchimärismus, aber keine GvHD. Dies weist darauf hin, dass DLIs auch ohne das Auftreten von GvHD zu einem messbaren GvL-Effekt führen können. Da der Beobachtungszeitraum nach der DLI-Gabe jedoch nur eingeschränkt war, erlaubt die vorliegende Arbeit nur einen Rückschluss auf die kurzfristige Wirkung von DLIs auf den Empfängerchimärismus und Auftreten von GvHDs nach DLIs.

4.3.2. Klinische nicht rezidiv-assoziierte Ereignisse mit einem Anstieg des Empfängerchimärismus

Durch die Konditionierung vor allogener SZT wird für gewöhnlich das hämatopoetische System des Patienten nicht vollständig zerstört, sondern es verbleiben meist wenige blutbildende Stammzellen des Patienten, die nach allogener SZT zur Hämatopoese beitragen. Dies ist insofern relevant, als dass ein gemischter Chimärismus nicht zwangsläufig das Vorhandensein von Leukämiezellen („Minimal residual disease“, MRD) bedeuten muss, sondern auch das Vorhandensein von gesunden blutbildenden Empfängerzellen anzeigen kann.⁷⁷ So können z.B. gesunde persistierende Immunzellen des Empfängers nach allogener SZT bei Infektionen expandieren und einen messbaren Anstieg des Empfängerchimärismus verursachen. Insbesondere konnte bei CMV-Reaktivierungen nach allogener SZT eine deutliche Expansion von CMV spezifischen T Zellen des Empfängers nachgewiesen werden ^{78,79}.

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob sich dieser durch mehrere Studien belegte Zusammenhang zwischen CMV-Reaktivierungen und einem steigenden Empfängerchimärismus im Monitoring mittels hochsensitiver qPCR bestätigt. CMV Reaktivierungen treten meist zwischen Tag 30 und Tag 100 nach allogener SZT auf.³⁰ Die Diagnose einer CMV-Reaktivierung wurde bei den beobachteten Patienten bei einem entsprechenden Anstieg des regelmäßig klinisch gemessenen pp65-Wertes^{30,80} gestellt.

Die Untersuchung ergab, dass der Empfängerchimärismus in allen Fällen einer CMV-Reaktivierung anstieg oder gleichblieb (medianer Wachstumsfaktor 1,09; p=0,028). Dies entspricht den durch vorherige Studien gewonnenen Erkenntnissen⁷⁹.

Ferner wurde der Einfluss von EBV-Reaktivierungen auf den Empfängerchimärismus analysiert. EBV-Reaktivierungen können zu EBV-Erkrankungen mit allgemeinen Krankheitssymptomen, Fieber und generalisierter Lymphadenopathie führen, welche unbehandelt mit einer hohen Mortalität verbunden sind. Daher werden Patienten regelmäßig auf EBV-DNA im Blut mittels PCR untersucht. Die vorliegende Untersuchung ergab, dass der Empfängerchimärismus nur in 72% der EBV-Reaktivierungen anstieg (medianer Wachstumsfaktor 1,03), der Anstieg des Empfängerchimärismus verfehlte jedoch das Signifikanzniveau. Die fehlende statistische Signifikanz könnte darauf beruhen, dass EBV-Reaktivierungen meist zu einer Proliferation von Spender-B-Zellen führen⁸¹ und somit sowohl Spender-B-Zellen als auch Empfänger-EBV-spezifische T-Zellen zu den Chimärismusveränderungen beitragen können.

Insgesamt ergab die gemeinsame Auswertung der untersuchten Fälle von CMV- und EBV-Reaktivierungen keine statistische Signifikanz, vermutlich bedingt durch die relativ kleine Fallzahl an Patienten. Eine Erweiterung der Patientenzahl ist erforderlich, um definitive Aussagen zum Verlauf des Empfängerchimärismus sowohl im Fall von CMV- als auch von EBV-Reaktivierungen zu treffen.

Zusammenfassend liegt es nahe, dass systemische Viruserkrankungen für die Einordnung eines steigenden Empfängerchimärismus nach allogener SZT relevant sind und dass im Fall eines plötzlichen Anstiegs des Empfängerchimärismus zur Abgrenzung von einem drohenden Rezidiv der Grunderkrankung eine Virusinfektion somit möglichst gesichert werden sollte.

4.3.3. Klinische nicht rezidiv-assoziierte Ereignisse ohne einen deutlichen Einfluss auf den Empfängerchimärismus

Es wurde weiterhin der Einfluss von FUI und Pneumonie auf den Verlauf des Empfängerchimärismus untersucht. FUI tritt meist innerhalb der ersten vier Wochen nach allogener SZT auf und ist – basierend auf das häufige Ansprechen auf Antibiotika – meist bakteriell bedingt, weshalb es zusammen mit Pneumonie als vermutete oder gesicherte bakterielle Infektion eingeordnet wurde.

Der Empfängerchimärismus stieg in 40% der Fälle an, fiel in 20% der Fälle, blieb aber in 40% der Fälle unverändert, mit einem medianen Wachstumsfaktor von 1,01 ohne

statistische Signifikanz. Auch bei sonstigen Infekten, meist lokalen Pilz- oder Virusinfektionen, konnte kein nennenswerter Einfluss auf den Chimärismus beobachtet werden.

4.3.4. Chimärismusanstieg bei klinischen Rezidiven

Da die malignen Zellen des Patienten Teil der Empfängerhämatoopoese sind, ist im Falle eines Rezidivs der malignen Grunderkrankung ein Anstieg des Empfängerchimärismus zu erwarten⁶⁴. Daher ist davon auszugehen, dass der Rezidivdiagnose ein deutlicher Anstieg des Empfängerchimärismus vorausgeht und sich so die Chance einer frühzeitigen Rezidivprädiktion ergibt⁷⁷.

In der Studiengruppe gab es drei Patienten, die während des Beobachtungszeitraums ein klinisches Rezidiv der Grunderkrankung entwickelten. Aufgrund dieser niedrigen Anzahl wurde auf eine statistische Analyse verzichtet. Stattdessen wurden deskriptive Vergleiche angestellt. Der durch ein Rezidiv der Grunderkrankung verursachte Anstieg des Empfängerchimärismus zeichnete sich in allen drei Patienten durch einen hohen Wachstumsfaktor (s. u.), und durch seine sog. Monotonie aus. Für die Betrachtung der Monotonie des Anstiegs des Empfängerchimärismus wurde als Kriterium die Anzahl der aufeinander folgenden Proben mit jeweils höheren Empfängerchimärismuswerten als in der vorherigen Probe festgelegt. So umfasste dieser monotone Chimärismusanstieg bei Rezidivpatienten in allen Fällen mindestens vier Proben, was bei Patienten ohne Rezidiv nur in 13,2% der Fälle vorkam. Auch der durchschnittliche Wachstumsfaktor innerhalb dieser Messintervalle lag im Durchschnitt in Rezidivpatienten vor einem Rezidiv höher (median 1,11, range 1,06-1,17) im Vergleich zu Nicht-Rezidivpatienten (median 1,07, range 1,00-1,36). Dies weist darauf hin, dass die Kontinuität aufeinanderfolgender Chimärismusanstiege sowie die relative Zunahme in diesen Intervallen wichtige Parameter für die Interpretation eines Chimärismusanstiegs als Rezidiv sein können. Zur Bestätigung dieser Hypothese sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig.

Durchschnittlich stieg der Empfängerchimärismus bei den Rezidivpatienten 64,3 Tage lang kontinuierlich an, bis die klinische Rezidivdiagnose gestellt wurde. Dies eröffnet die Chance einer frühzeitigen Rezidivprädiktion unter Verwendung der hoch-sensitiven

Chimärismusanalyse. Die Beobachtung, dass im Mittel 53% der ansteigenden Empfängerchimärismuswerte unter dem Sensitivitätsniveau von STR-Analysen (10^{-2}) lagen, zeigt, dass konventionelle Chimärismusanalysen Rezidive erst deutlich später erkennen lassen als die in dieser Arbeit vorgestellte hochsensitive Chimärismusanalyse. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um den genauen Zeitvorteil in der Rezidivprädiktion bei der hochsensitiven gegenüber der konventionellen Chimärismusanalyse zu ermitteln.

4.4. Ausblick

Zusammenfassend gibt die vorliegende Arbeit erste Hinweise, dass die hochsensitive Chimärismusanalyse nach allogener SZT eine Möglichkeit bietet, Leukämierезidive frühzeitig zu detektieren. Insbesondere war es möglich, Schwankungen des Chimärismus noch weit unterhalb des Sensitivitätsniveaus konventioneller Chimärismusanalysen zu detektieren und diese bestimmten klinischen Ereignissen wie z.B. der GvHD oder Virusinfektionen zuzuordnen. Weitere Studien sind erforderlich, um die gewonnenen Ergebnisse weiter zu präzisieren. Die vorliegende Arbeit hat jedoch auch gezeigt, dass das verwendete Verfahren der Singleplex-PCR in Kombination mit Standardreihen mit einem sehr hohen Zeit- und Materialaufwand verbunden ist. Weitere Entwicklungen der hochsensitiven Chimärismusanalyse werden sich somit auf technische Vereinfachungen konzentrieren müssen, um deren breitere klinische Anwendung zur Rezidivdetektion zu ermöglichen.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig die auf In/Del Polymorphismen basierende hochsensitive Chimärismusanalyse in einem größeren Kollektiv von Patienten nach allogener SZT strukturiert untersucht. Hierbei wurden folgende Aspekte untersucht:

1. Etablierung der hochsensitiven Chimärismusanalyse

Die Chimärismusanalyse mittels In/Del-Polymorphismen und DYS1 ist anhand der verwendeten 16 Marker für annähernd alle Patienten anwendbar, da für über 90% der Patienten-Spender-Paare geeignete Marker-Mismatche in Patientenrichtung gefunden wurden, auf deren Basis longitudinale Verlaufsanalysen des Empfängerchimärismus erfolgen konnten. Mittels sog. miniLCLs wurden unbegrenzt reproduzierbare und hinsichtlich ihrer Marker definierte Standards und Standard-Verdünnungsreihen hergestellt mit denen die gemessenen Chimärismuswerte in Patientenproben verglichen und absolut quantifiziert werden konnten. Es wurde für alle verwendeten Marker eine Sensitivität von 10^{-4} (d.h. 1 Empfängerzelle in 10.000 Spenderzellen) erreicht, was einer 100 fach höheren Sensitivität als die der konventionellen STR Analyse entspricht.

2. Untersuchung der Häufigkeit des Vorkommens der genetischen Marker in Bezug auf die hiesige Bevölkerung

Die in dieser Arbeit verwendeten In/Del-Polymorphismus-Marker sind in der vorliegenden Studiengruppe anders verteilt als in der französischen Studiengruppe, die der Untersuchung von Alizadeh et al. zugrunde liegt oder in der Studie von Chen et al. aus dem taiwanesischen Raum. Ob es sich tatsächlich um eine statistisch signifikant andere Verteilung der Marker handelt, müsste ggf. in einer größer angelegten Studie zu dieser Fragestellung eruiert werden⁴¹. Auf Grundlage der Markerverteilung und der Häufigkeit der Marker-Mismatche in Patientenrichtung konnte eine Priorisierung der Marker erfolgen, die für die Typisierung von Spender-Empfänger-Paaren mit geringer verfügbarer Menge genomischer DNA geeignet sind. Dies sind auf Grundlage der vorliegenden Arbeit vor allem die Marker S05b, S07b und S09b.

3. Beobachtung des Chimärismusverlaufs in Bezug auf transplantationsspezifische klinische Ereignisse

Es wurde ein prospektives Monitoring des Chimärismus für 43 AML- und ALL-Patienten nach allogener SZT durchgeführt. In Bezug auf die meisten transplantationsspezifischen klinischen Ereignisse ergab sich ein Abfall des Empfängerchimärismus bei Ausschleichen der Immunsuppression, bei akuten sowie chronischen GvHD sowie nach DLI-Gabe. Bei viralen Infekten ergab sich ein Anstieg des Empfängerchimärismus. Kein Trend des Chimärismusverlaufs konnte hingegen während bakterieller Infektionen identifiziert werden. Als statistisch signifikant erwiesen sich dabei die Verläufe bei GvHD und bei Virusinfekten. Für die übrigen festgestellten Trends sind weitere Untersuchungen in größeren Patientengruppen erforderlich.

4. Prospektives Monitoring nach allogener SZT und Untersuchung der Effektivität der Methode zur frühzeitigen Detektion von Leukämierезидивen

In drei Fällen von Leukämierезидивen konnte ein der klinischen Diagnose vorausgehender rapider und kontinuierlicher Anstieg des Empfängerchimärismus gezeigt werden. Der jeweils hohe Wachstumsfaktor und die sog. Monotonie des Anstiegs stellten sich hierbei als vielversprechende Kriterien zur Einschätzung eines Chimärismusanstiegs im Hinblick auf die Möglichkeit eines Rezidivs der Grunderkrankung dar. Aufgrund der niedrigen Fallzahl war eine statistische Auswertung dieser Fälle jedoch nicht möglich. In der Zwischenzeit wurde von unserer Arbeitsgruppe eine Nachfolgestudie publiziert, welche in einer deutlich größeren Patientenkohorte die Fähigkeit einer weiterentwickelten – nun Multiplex - PCR bei der Rezidivprädiktion gezielt untersuchte. Diese Studie konnte letztlich zeigen, dass mit einer hoch-sensitiven Chimärismusanalyse Leukämierезидивe im Median bis zu 45 Tage vor ihrer klinischen Diagnose vorausgesagt werden können.⁸²

Insgesamt ergab die vorliegende Arbeit erste Hinweise, dass mithilfe der hochsensitiven Chimärismusanalyse nach allogener SZT Leukämierезидивe frühzeitig detektiert und von anderen transplantationsbezogenen Ereignissen wie GvHD oder Virusinfektionen unterschieden werden können. Nachfolgende Studien sind erforderlich, um die gewonnenen Ergebnisse weiter zu präzisieren und das Verfahren der hochsensitiven Chimärismusanalyse technisch weiter zu vereinfachen.

6. Abkürzungsverzeichnis

ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
ATW	Atemwegsinfekt
BKV	BK-Virus (Humanes Polyomavirus 1)
BM	Knochenmark
CMV	Cytomegalievirus
cT	Cycle Threshold
DFFRY	Drosophila Fat Facets-Related Y-Linked Gen
DLI	Donorlymphozyteninfusion
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
EBV	Epstein-Barr-Virus
EC	Empfängerchimärismus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELN	European Leukemia Net
FC	Durchflusszytometrie
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FUO	Fieber unbekanntes Ursprungs
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
GvHD	Graft versus Host Disease
aGvHD	Akute Graft versus Host Disease
cGvHD	Chronische Graft versus Host Disease
GvL	Graft versus Leukemia
HCK	Hämatopoetische Zellkinase
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
In/Del	Insertion/Deletion
MAC	Myeloablative Konditionierung
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MRD	Minimale Resterkrankung
NT	No Template
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBSCT	Periphere Blutstammzell-Transplantation
PCR	Polymerasekettenreaktion
qPCR	Quantitative Polymerasekettenreaktion
PHA	Phytohämagglutinin
RFLP	Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus
RIC	Dosisreduzierte Konditionierung
SNP	Einzelne Nukleotid-Polymorphismen
STR	Short Tandem Repeat
SZT	Stammzelltransplantation
VZV	Varizella-Zoster-Virus
ZVK	Zentraler Venenkatheter

7. Bibliographie

1. de Witte T, Hagemeijer A, Suci S, et al. Value of allogeneic versus autologous stem cell transplantation and chemotherapy in patients with myelodysplastic syndromes and secondary acute myeloid leukemia. Final results of a prospective randomized European Intergroup Trial. *Haematologica*. Oct 2010;95(10):1754-1761.
2. Bourlon C, Lacayo-Lenero D, Inclan-Alarcon SI, Demichelis-Gomez R. Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Adult Philadelphia-Negative Acute Lymphoblastic Leukemia in the First Complete Remission in the Era of Minimal Residual Disease. *Curr Oncol Rep*. Mar 26 2018;20(4):36.
3. Rubio MT, Savani BN, Labopin M, et al. The impact of HLA-matching on reduced intensity conditioning regimen unrelated donor allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia in patients above 50 years-a report from the EBMT acute leukemia working party. *J Hematol Oncol*. Aug 3 2016;9(1):65.
4. Koenecke C, Gohring G, de Wreede LC, et al. Impact of the revised International Prognostic Scoring System, cytogenetics and monosomal karyotype on outcome after allogeneic stem cell transplantation for myelodysplastic syndromes and secondary acute myeloid leukemia evolving from myelodysplastic syndromes: a retrospective multicenter study of the European Society of Blood and Marrow Transplantation. *Haematologica*. 2015;100(3):400-408.
5. Nishiwaki S, Inamoto Y, Sakamaki H, et al. Allogeneic stem cell transplantation for adult Philadelphia chromosome-negative acute lymphocytic leukemia: comparable survival rates but different risk factors between related and unrelated transplantation in first complete remission. *Blood*. Nov 18 2010;116(20):4368-4375.
6. Ehninger G, Aul C. *Akute myeloische Leukämie: Pathophysiologie, Diagnostik, Therapie, Prognose ; mit 29 Tabellen*. Köln: Dt. Ärzte-Verl.; 2008.
7. Kristt D, Israeli M, Narinski R, et al. Hematopoietic chimerism monitoring based on STRs: quantitative platform performance on sequential samples. *Journal of biomolecular techniques : JBT*. 2005;16(4):380-391.
8. Fan H, Chu JY. A brief review of short tandem repeat mutation. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. Feb 2007;5(1):7-14.
9. Alizadeh M, Bernard M, Danic B, et al. Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Blood*. 2002;99(12):4618-4625.
10. Thiede C, Bornhauser M, Ehninger G. Strategies and clinical implications of chimerism diagnostics after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Acta Haematologica*. 2004;112(1-2):16-23.
11. Frohling S, Schlenk RF, Kayser S, et al. Cytogenetics and age are major determinants of outcome in intensively treated acute myeloid leukemia patients older than 60 years: results from AMLSG trial AML HD98-B. *Blood*. Nov 15 2006;108(10):3280-3288.
12. Howlader N NA, Krapcho M, Miller D, Bishop K, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2014, National Cancer Institute. Bethesda,

- MD, https://seer.cancer.gov/csr/1975_2014/, based on November 2016 SEER data submission. 2017.
13. Brunner AMG, T. A. Pathobiology of Acute Myeloid Leukemia. In: Hoffmann RB, E. J.; Silberstein, L. E.; Heslop, H. E.; Weitz, J. I.; Anastasi, J.; Salama, M. E.; Abutalib, S. A., ed. *Hematology - Basic Principles and Practice, 7th Edition*: Elsevier; 2018:P. 913-923.
 14. Sengsayadeth S, Labopin M, Boumendil A, et al. Transplant Outcomes for Secondary Acute Myeloid Leukemia: ALWP of the EBMT Study. *Biol Blood Marrow Transplant*. Apr 17 2018.
 15. Raaschou-Nielsen O, Hvidtfeldt UA, Roswall N, Hertel O, Poulsen AH, Sorensen M. Ambient benzene at the residence and risk for subtypes of childhood leukemia, lymphoma and CNS tumor. *Int J Cancer*. Apr 6 2018.
 16. Dohner H, Estey E, Grimwade D, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. Jan 26 2017;129(4):424-447.
 17. Carlos-Wallace FM, Zhang L, Smith MT, Rader G, Steinmaus C. Parental, In Utero, and Early-Life Exposure to Benzene and the Risk of Childhood Leukemia: A Meta-Analysis. *Am J Epidemiol*. Jan 1 2016;183(1):1-14.
 18. Haferlach T. *Labordiagnostik in der Hämatologie: vom Symptom zur Diagnose ; mit 36 Tabellen*. Köln: Dt. Ärzte-Verl.; 2011.
 19. Seeber S. *Therapiekonzepte Onkologie: mit 370 Tabellen*. 4., vollst. überarb. und erw. Aufl. ed. Berlin u.a.: Springer; 2003.
 20. Lanzkowsky P. *Lanzkowsky's manual of pediatric hematology and oncology*. Boston, MA: Elsevier; 2016.
 21. Ogonek J, Kralj Juric M, Ghimire S, et al. Immune Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol*. 2016;7:507.
 22. van Bergen CA, van Luxemburg-Heijs SA, de Wreede LC, et al. Selective graft-versus-leukemia depends on magnitude and diversity of the alloreactive T cell response. *J Clin Invest*. Feb 1 2017;127(2):517-529.
 23. Weiden PL, Flournoy N, Thomas ED, et al. Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *N Engl J Med*. May 10 1979;300(19):1068-1073.
 24. Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet*. May 2 2009;373(9674):1550-1561.
 25. Alizadeh M, Walencik A, Frassati C, et al. Evidence for a higher resolution of HLA genotyping by a new NGS-based approach. *Transfus Clin Biol*. Sep 2017;24(3):120-123.
 26. Morishima Y, Kashiwase K, Matsuo K, et al. Biological significance of HLA locus matching in unrelated donor bone marrow transplantation. *Blood*. Feb 12 2015;125(7):1189-1197.
 27. Baron F, Little MT, Storb R. Kinetics of engraftment following allogeneic hematopoietic cell transplantation with reduced-intensity or nonmyeloablative conditioning. *Blood reviews*. 2005;19(3):153-164.
 28. Riddell SR, Berger C, Murata M, Randolph S, Warren EH. The graft versus leukemia response after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood Rev*. Sep 2003;17(3):153-162.
 29. Couban S, Simpson DR, Barnett MJ, et al. A randomized multicenter comparison of bone marrow and peripheral blood in recipients of matched

- sibling allogeneic transplants for myeloid malignancies. *Blood*. 2002;100(5):1525-1531.
30. Kröger N, Zander AR. *Allogene Stammzelltherapie: Grundlagen, Indikationen und Perspektiven*. 4. Auflage ed2015.
 31. Kern W. D, H., Haferlach, T. Immunphänotypisierung in der modernen Leukämiediagnostik. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*. 2005;130(5):215-219.
 32. Radich JP, Gehly G, Gooley T, et al. Polymerase chain reaction detection of the BCR-ABL fusion transcript after allogeneic marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: results and implications in 346 patients. *Blood*. May 1 1995;85(9):2632-2638.
 33. Elmaagacli AH. Real-time PCR for monitoring minimal residual disease and chimerism in patients after allogeneic transplantation. *International journal of hematology*. 2002;76 Suppl 2:204-205.
 34. Beretta C, Gaipa G, Rossi V, et al. Development of a quantitative-PCR method for specific FLT3/ITD monitoring in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. Aug 2004;18(8):1441-1444.
 35. Gorello P, Cazzaniga G, Alberti F, et al. Quantitative assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia carrying nucleophosmin (NPM1) gene mutations. *Leukemia*. Jun 2006;20(6):1103-1108.
 36. Bader P, Kreyenberg H, Hoelle W, et al. Increasing mixed chimerism is an important prognostic factor for unfavorable outcome in children with acute lymphoblastic leukemia after allogeneic stem-cell transplantation: possible role for pre-emptive immunotherapy? *J Clin Oncol*. May 1 2004;22(9):1696-1705.
 37. Barrios M, Jimenez-Velasco A, Roman-Gomez J, et al. Chimerism status is a useful predictor of relapse after allogeneic stem cell transplantation for acute leukemia. *Haematologica*. Jul 2003;88(7):801-810.
 38. Nadimi M, Rahgozar S, Moafi A, Tavassoli M, Mesrian Tanha H. Evaluation of rs62527607 [GT] single nucleotide polymorphism located in BAALC gene in children with acute leukemia using mismatch PCR-RFLP. *Cancer Genet*. Jul-Aug 2016;209(7-8):348-353.
 39. Fehse B, Chukhlovin A, Kuhlcke K, et al. Real-time quantitative Y chromosome-specific PCR (QYCS-PCR) for monitoring hematopoietic chimerism after sex-mismatched allogeneic stem cell transplantation. *Journal of hematology & stem cell research*. 2001;10(3):419-425.
 40. Jacque N, Nguyen S, Golmard JL, 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 Transplant*. Feb 2015;50(2):259-265.
 41. Chen D-P, Tseng C-P, Wang W-T, Wang M-C, Tsai S-H, Sun C-F. Real-time biallelic polymorphism–polymerase chain reaction for chimerism monitoring of hematopoietic stem cell transplantation relapsed patients. *Clinica Chimica Acta*. 2011;412(7–8):625-630.
 42. van der Torren CR, van Hensbergen Y, Luther S, et al. Possible role of minor H antigens in the persistence of donor chimerism after stem cell transplantation; relevance for sustained leukemia remission. *PLoS One*. 2015;10(3):e0119595.
 43. van Halteren AG, Jankowska-Gan E, Joosten A, et al. Naturally acquired tolerance and sensitization to minor histocompatibility antigens in healthy family members. *Blood*. Sep 10 2009;114(11):2263-2272.

44. Maas F, Schaap N, Kolen S, et al. Quantification of donor and recipient hemopoietic cells by real-time PCR of single nucleotide polymorphisms. *Leukemia*. 2003;17(3):630-633.
45. Jimenez-Velasco A, Barrios M, Roman-Gomez J, 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(3):336-343.
46. Reddy PF, J. L. M. Graft-Versus-Host Disease and Graft-Versus-Leukemia Response. In: Hoffmann RB, E. J.; Silberstein, L. E.; Heslop, H. E.; Weitz, J. I.; Anastasi, J.; Salama, M. E.; Abutalib, S. A., ed. *Hematology - Basic Principles and Practice, 7th Edition*: Elsevier; 2018:P. 1650-1668.
47. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation*. Oct 1974;18(4):295-304.
48. Shulman HM, Sullivan KM, Weiden PL, et al. Chronic graft-versus-host syndrome in man. A long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. *Am J Med*. Aug 1980;69(2):204-217.
49. Stahl T, Bohme MU, Kroger N, Fehse B. Digital PCR to assess hematopoietic chimerism after allogeneic stem cell transplantation. *Exp Hematol*. Jun 2015;43(6):462-468 e461.
50. Willasch A, Schneider G, Reincke BS, 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. *Lab Hematol*. 2007;13(3):73-84.
51. Moosmann A, Khan N, Cobbold M, et al. B cells immortalized by a mini-Epstein-Barr virus encoding a foreign antigen efficiently reactivate specific cytotoxic T cells. *Blood*. Sep 1 2002;100(5):1755-1764.
52. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*. 2001;29(9):e45.
53. Bustin SA. *A-Z of quantitative PCR*. La Jolla, CA: International University Line; 2004.
54. Kim SY, Jeong MH, Park N, et al. Chimerism monitoring after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation using quantitative real-time PCR of biallelic insertion/deletion polymorphisms. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 2014;16(6):679-688.
55. Koldehoff M, Steckel NK, Hlinka M, Beelen DW, Elmaagacli AH. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by real-time polymerase chain reaction with single nucleotide polymorphisms, standard tandem repeats, and Y-chromosome-specific sequences. *American Journal of Hematology*. 2006;81(10):735-746.
56. Schilham MW, Balduzzi A, Bader P, EBMT P-Wot. Is there a role for minimal residual disease levels in the treatment of ALL patients who receive allogeneic stem cells? *Bone marrow transplantation*. 2005;35 Suppl 1:S49-52.
57. McSweeney PA, Niederwieser D, Shizuru JA, et al. Hematopoietic cell transplantation in older patients with hematologic malignancies: replacing high-dose cytotoxic therapy with graft-versus-tumor effects. *Blood*. Jun 1 2001;97(11):3390-3400.
58. Slavin S, Nagler A, Naparstek E, et al. Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow

- transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases. *Blood*. Feb 1 1998;91(3):756-763.
59. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood*. Feb 1 1990;75(3):555-562.
 60. Kroger N, Iacobelli S, Franke GN, et al. Dose-Reduced Versus Standard Conditioning Followed by Allogeneic Stem-Cell Transplantation for Patients With Myelodysplastic Syndrome: A Prospective Randomized Phase III Study of the EBMT (RICMAC Trial). *J Clin Oncol*. Jul 1 2017;35(19):2157-2164.
 61. Hamadani MH, P. Indications and Outcomes of Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation for Hematologic Malignancies in Adults. In: Hoffmann RB, E. J.; Silberstein, L. E.; Heslop, H. E.; Weitz, J. I.; Anastasi, J.; Salama, M. E.; Abutalib, S. A., ed. *Hematology - Basic Principles and Practice, 7th Edition*: Elsevier; 2018:P. 1596-1607.
 62. Oyekunle AA, Kroger N, Zabelina T, et al. Allogeneic stem-cell transplantation in patients with refractory acute leukemia: a long-term follow-up. *Bone Marrow Transplant*. Jan 2006;37(1):45-50.
 63. Thol F, Gabdoulline R, Liebich A, et al. Measurable residual disease monitoring by NGS before allogeneic hematopoietic cell transplantation in AML. *Blood*. Oct 18 2018;132(16):1703-1713.
 64. Najfeld V. Conventional and Molecular Cytogenomic Basis of Hematologic Malignancies. In: Hoffmann RB, E. J.; Silberstein, L. E.; Heslop, H. E.; Weitz, J. I.; Anastasi, J.; Salama, M. E.; Abutalib, S. A., ed. *Hematology - Basic Principles and Practice, 7th Edition*: Elsevier; 2018:P. 774-848.
 65. Kiehl MG, Kraut L, Schwerdtfeger R, et al. Outcome of allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation in adult patients with acute lymphoblastic leukemia: no difference in related compared with unrelated transplant in first complete remission. *J Clin Oncol*. Jul 15 2004;22(14):2816-2825.
 66. Sayer HG, Kroger M, Beyer J, et al. Reduced intensity conditioning for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with acute myeloid leukemia: disease status by marrow blasts is the strongest prognostic factor. *Bone Marrow Transplant*. Jun 2003;31(12):1089-1095.
 67. Saber W, Opie S, Rizzo JD, Zhang MJ, Horowitz MM, Schriber J. Outcomes after matched unrelated donor versus identical sibling hematopoietic cell transplantation in adults with acute myelogenous leukemia. *Blood*. Apr 26 2012;119(17):3908-3916.
 68. Barrett AJ, Battiwalla M. Relapse after allogeneic stem cell transplantation. *Expert Rev Hematol*. Aug 2010;3(4):429-441.
 69. Dey BR, McAfee S, Colby C, et al. Impact of prophylactic donor leukocyte infusions on mixed chimerism, graft-versus-host disease, and antitumor response in patients with advanced hematologic malignancies treated with nonmyeloablative conditioning and allogeneic bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. May 2003;9(5):320-329.
 70. Radujkovic A, Guglielmi C, Bergantini S, et al. Donor Lymphocyte Infusions for Chronic Myeloid Leukemia Relapsing after Allogeneic Stem Cell Transplantation: May We Predict Graft-versus-Leukemia Without Graft-versus-Host Disease? *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2015;21(7):1230-1236.

71. Bar M, Flowers MED, Storer BE, et al. Reversal of Low Donor Chimerism after Hematopoietic Cell Transplantation Using Pentostatin and Donor Lymphocyte Infusion: A Prospective Phase II Multicenter Trial. *Biol Blood Marrow Transplant*. Feb 2018;24(2):308-313.
72. Petersen SL. Alloreactivity as therapeutic principle in the treatment of hematologic malignancies. Studies of clinical and immunologic aspects of allogeneic hematopoietic cell transplantation with nonmyeloablative conditioning. *Danish medical bulletin*. 2007;54(2):112-139.
73. Bar M, Sandmaier BM, Inamoto Y, et al. Donor lymphocyte infusion for relapsed hematological malignancies after allogeneic hematopoietic cell transplantation: prognostic relevance of the initial CD3+ T cell dose. *Biol Blood Marrow Transplant*. Jun 2013;19(6):949-957.
74. Koreth JAJHC, C. Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndrome in Adults. In: Hoffmann RB, E. J.; Silberstein, L. E.; Heslop, H. E.; Weitz, J. I.; Anastasi, J.; Salama, M. E.; Abutalib, S. A., ed. *Hematology - Basic Principles and Practice, 7th Edition*: Elsevier; 2018:P. 970-980.
75. Diotti GB, M. K. T-Cell Therapy of Haematologic Diseases. In: Hoffmann RB, E. J.; Silberstein, L. E.; Heslop, H. E.; Weitz, J. I.; Anastasi, J.; Salama, M. E.; Abutalib, S. A., ed. *Hematology - Basic Principles and Practice, 7th Edition*: Elsevier; 2018:P. 1568-1574.
76. Frey NV, Porter DL. Graft-versus-host disease after donor leukocyte infusions: presentation and management. *Best Pract Res Clin Haematol*. Jun 2008;21(2):205-222.
77. Bader P, Niethammer D, Willasch A, Kreyenberg H, Klingebiel T. How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation? *Bone Marrow Transplant*. Jan 2005;35(2):107-119.
78. Sellar RS, Vargas FA, Henry JY, et al. CMV promotes recipient T-cell immunity following reduced-intensity T-cell-depleted HSCT, significantly modulating chimerism status. *Blood*. 2015;125(4):731-739.
79. Borchers S, Weissinger EM, Pabst B, et al. Expansion of recipient-derived antiviral T cells may influence donor chimerism after allogeneic stem cell transplantation. *Transpl Infect Dis*. Dec 2013;15(6):627-633.
80. Holtan SGM, N. S.; Weisdorf, D. J. Complications After Hematopoietic Cell Transplantation. In: Hoffmann RB, E. J.; Silberstein, L. E.; Heslop, H. E.; Weitz, J. I.; Anastasi, J.; Salama, M. E.; Abutalib, S. A., ed. *Hematology - Basic Principles and Practice, 7th Edition*: Elsevier; 2018:P. 1669-1683.
81. Brissot E, Alsuliman T, Gruson B, et al. [How to manage EBV reactivation and EBV-PTLD, CMV and human herpesvirus 6 reactivation and infection after allogeneic stem cell transplantation: A report of the SFGM-TC (update)]. *Bull Cancer*. Dec 2017;104(12S):S181-S187.
82. Sellmann L, Rabe K, Bunting I, et al. Diagnostic value of highly-sensitive chimerism analysis after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. Nov 2018;53(11):1457-1465.

9. Erklärung

Nach § 2 Abs. 2 Nr. 5 und 6 Promotionsordnung

Ich erkläre, dass ich in der Medizinischen Hochschule Hannover zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

**Etablierung und Evaluation einer
hochsensitiven Chimärismusanalyse zum Monitoring von Leukämiepatienten
nach allogener Stammzelltransplantation**

aus der

**Klinik für
Hämatologie, Hämostaseologie,
Onkologie und Stammzelltransplantation**

unter der Betreuung von

Prof. Dr. med. Lothar Hambach

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen Hilfsmittel verwendet habe.

Insbesondere habe ich keine Organisation eingeschaltet, welche gegen Entgelt Betreuer oder Betreuerinnen für die Anfertigung einer Promotionsarbeit sucht oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich vollständig oder teilweise erledigt. Ich habe bisher weder an einer in- oder ausländischen medizinischen Fakultät ein Gesuch um eine Zulassung zur Promotion eingereicht noch diese oder eine andere Arbeit vorgelegt.

Köln, den

10. Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Betreuer Prof. Dr. med. Lothar Hambach herzlich für die Zusammenarbeit bei der Erstellung der Arbeit danken. Nicht nur war ihm die Etablierung einer klinisch anwendbaren Chimärismusanalyse eine Herzensangelegenheit, die er mit ansteckender Begeisterung voranbrachte, sondern ebenso die zuverlässige Betreuung der daraus entstehenden wissenschaftlichen Arbeiten. Ich danke ihm für seine ständige und freundliche Unterstützung bei allen aufkommenden Fragen, für seine präzisen Korrekturen und konstruktiven Verbesserungsanregungen im Schreibprozess meiner Arbeit.

Ebenfalls danken möchte ich Ivonne Bünting, die als MTA im Forschungsbereich maßgeblich zur klinischen Anwendung der Methode beigetragen hat und mit viel Ehrgeiz und exzellenter Fachkenntnis der Dreh- und Angelpunkt aller technischen Aspekte der klinischen Chimärismusanalyse war und ist. Durch ihre Einarbeitung in die quantitative PCR sowie ihre Unterstützung bei der Strukturierung der Arbeitsschritte konnte das Fundament für die vorliegende Arbeit gelegt werden.

Sehr dankbar bin ich außerdem allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der KMT-Ambulanz für die stetige Unterstützung des Projekts durch die Entnahme und das Bereitstellen von Blutproben, für geduldige Hilfe bei allen Fragen und nicht zuletzt für ein kooperatives und herzliches Arbeitsklima.

Weiterer Dank gebührt Jasper Lohmar für die regelmäßige geduldige Unterstützung und Hilfe beim wissenschaftlichen Schreiben, für das Korrekturlesen und für die Entlastung in der Kinderbetreuung, sowie natürlich meiner Familie und meinen Freundinnen und Freunden, die mich immer wieder ermutigt und motiviert haben, diese Arbeit zu Ende zu bringen.