

Aus dem Fachbereich Medizin
Der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin
Klinik III (Hämatologie/Onkologie und Hämostaseologie)
Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Klingebiel
Schwerpunkt Stammzelltransplantation
Leiter: Prof. Dr. med. Peter Bader

**Sequenz Polymorphismen in der Real-Time PCR als hochsensitive Marker für
die Analyse des hämatopoetischen Chimärismus in Kindern mit ALL nach
allogener Stammzelltransplantation**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs der Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von

Dr. phil. nat. Britta Sofia Reincke

aus Rüsselsheim

Frankfurt am Main, im Jahre 2009

Dekan:	Prof. Dr. Josef M. Pfeilschifter
Referent:	Prof. Dr. Peter Bader
Korreferent:	Prof. Dr. Ch. Seidl
2. Korreferent:	Prof. Dr. H Burkhardt
Vorsitzender:	Prof. Dr. S. Zielen
Tag der mündlichen Prüfung:	10.06.2010

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
2	Material und Methoden	12
2.1	Material	12
2.1.1	Patienten	12
2.1.2	Primer & Probes	12
2.1.3	PCR	14
2.1.3.1	Platten	14
2.1.3.2	Folien	14
2.1.3.3	Reaktionsmix	14
2.1.4	Kits	14
2.1.4.1	DNA Extraktion	14
2.1.4.2	Vervielfältigung genomischer DNA	14
2.1.5	Geräte	14
2.1.5.1	PCR	14
2.1.5.2	Real-Time PCR	14
2.2	Methoden	15
2.2.1	Isolierung genomischer DNA	15
2.2.2	Quantifizierung genomischer DNA	15
2.2.3	Vervielfältigung genomischer DNA	15
2.2.4	Screening nach Sequenz Polymorphismen	15
2.2.5	Standardreihen	17
2.2.6	Quantitative Real-Time PCR	18
2.2.6.1	Durchführung	18
2.2.6.2	Auswertung	19
2.2.7	Statistische Methoden	20
2.2.7.1	Software	20
2.2.7.2	Berechnung der kumulativen Informativität der genetischen Marker	20
2.2.7.3	Bewertung der Messgenauigkeit	21
2.2.7.4	Autologe Signale in Abhängigkeit von der eingesetzten DNA-Menge	22
3	Ergebnisse	23
3.1	Statistische Bewertung der Methode	23
3.1.1	Informativität der genetischen Marker	23

3.1.2	Kumulative Informativität der genetischen Marker	24
3.1.3	Validität und Sensitivität der Methode.....	25
3.1.4	Messgenauigkeit der Analysen.....	27
3.2	Auswertung der ALL-Patienten	29
3.2.1	Patienten	29
3.2.2	Unterteilung der Patienten in zwei Risikogruppen	29
3.2.3	Outcome der Patienten	30
3.2.4	Einteilung der Patienten in Chimärismusgruppen.....	30
3.2.4.1	Vollständiger Chimärismus (CC).....	30
3.2.4.2	Gemischter Chimärismus (MC)	31
3.2.4.3	Abnehmender gemischter Chimärismus (deMC).....	31
3.2.4.4	Ansteigender gemischter Chimärismus (inMC).....	31
3.2.5	Ergebnisse der ALL-Patienten	32
3.2.5.1	Unterschiedliches Outcome der Patienten aus den beiden Risikogruppen ..	33
3.2.5.2	Abnehmender Chimärismus (Decreasing Chimerism)	33
3.2.5.3	Ansteigender Chimärismus (Increasing Chimerism).....	35
3.2.5.4	Vollständiger Chimärismus (Complete Chimerism).....	37
3.2.5.5	Gemischter Chimärismus (Mixed Chimerism)	38
3.2.6	Vergleich mit der STR-Methode.....	40
3.2.7	Vergleich der Einteilung in die Chimärismusgruppen.....	40
3.2.7.1	Frühere Detektion der autologen Anteile mit Hilfe der RT-PCR-Methode?41	
3.3	Zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse	45
4	Diskussion	47
4.1	Statistische Bewertung der Methode.....	48
4.1.1	Informativität der genetischen Marker	48
4.1.2	Sensitivität der RT-PCR-Methode	48
4.1.3	Genauigkeit der Messung.....	49
4.2	Auswertung der ALL-Patienten	49
4.2.1	Einteilung der Patienten	50
4.3	Vergleich mit der STR-Methode.....	51
4.3.1	Lassen sich mit der RT-PCR-Methode autologe Signale früher detektieren? .	52
4.4	Anwendbarkeit der Real-Time PCR Methode in der täglichen Praxis	53
4.4.1	Vereinfachtes Markerscreening.....	53
4.4.2	Verwendung von Standardreihen	54

4.4.3	Einsatz einer bestimmten Menge an DNA-Lösung.....	54
5	Zusammenfassung.....	55
6	Abstract.....	57
7	Anhang.....	58

1 Einleitung

Leukämien im Kindes- und Jugendalter

Ungefähr 600 Kinder unter 18 Jahren erkranken in Deutschland jährlich an einer Leukämie. 80% der Leukämien im Kindesalter sind akute lymphatische Leukämien (ALL), 15% akute myeloische Leukämien (AML), 5% chronisch myeloische Leukämien (CML) oder myelodysplastische Syndrome (MDS). [1] Akute Leukämien sind durch fehlende Ausdifferenzierung und unregulierte Proliferation unreifer hämatopoetischer Vorläuferzellen gekennzeichnet. Durch die Verdrängung der normalen Blutbildung im Knochenmark kommt es zu Anämie mit Blässe und Müdigkeit, Thrombozytopenie mit Blutungsneigung, Leukopenie mit Infektionen und Mukositis. Über den Blutstrom kommt es zur Infiltration leukämischer Zellen in alle Organe und somit unter anderem zur Vergrößerung von Lymphknoten, Leber und Milz. Häufiges Leitsymptom sind wechselnde Knochenschmerzen. ZNS-Befall kann zu Kopfschmerzen, Erbrechen, Sehstörungen und Krampfanfällen führen. Es finden sich häufig Blasten im peripheren Blutaussstrich. Zur Diagnosestellung und Klassifikation der Leukämie ist eine Knochenmarkpunktion notwendig. Eine akute Leukämie liegt definitionsgemäß dann vor, wenn die Blastenpopulation über 30% der Gesamtzellzahl im Knochenmark beträgt.

Die Klassifikation der Leukämien erfolgt entsprechend der unreifsten Zellelemente der betroffenen Zellreihe. Die Blasten werden morphologisch beurteilt, zur Charakterisierung ihrer Oberflächenantigene immunhistochemisch untersucht und molekulargenetisch zum Nachweis von Chromosomenveränderungen analysiert. Vor allem den genetischen Veränderungen der Leukämiezelle kommt eine prognostische Bedeutung zu.

Akute lymphatische Leukämie (ALL)

Die überwiegende Zahl der akuten lymphatischen Leukämien im Kindesalter entsprechen einer Entwicklungsstufe der B-Vorläuferzellen, bei der das CD10-Antigen, aber noch kein zytoplasmatisches Immunglobulin exprimiert wird (common ALL). Bei zwei Drittel der ALL-Erkrankungen im Kindesalter finden sich in den Leukämiezellen spezifische genetische Veränderungen. Die Therapie der ALL erfolgt gemäß der Therapiestudien der ALL-BFM (Berlin, Frankfurt, Münster)- Studiengruppe, stratifiziert in Risikogruppen, die der Rückfallwahrscheinlichkeit des Patienten entsprechen. [2-4] Die 1976 von H. Riehm

gegründete BFM-Studiengruppe ist durch ihr Behandlungskonzept und die erreichten hohen Heilungsraten bei der ALL international bekannt geworden.

Bei Diagnosestellung gehören zu den bekannten Risikofaktoren: Das Alter des Patienten, die Anzahl der Leukozyten und die genetischen Veränderungen der Leukämiezellen. Der bedeutendste Risikofaktor jedoch ist das Ansprechen auf die Therapie.

Stammzelltransplantation

Obwohl die Heilungsrate der ALL Erkrankungen mit der ALL-BFM-Therapie ca. 75% beträgt, besteht die einzige Möglichkeit zur Heilung bei Hochrisikopatienten und bei Rezidiven in einer allogenen Stammzelltransplantation. [5]

Bei der allogenen Stammzelltransplantation werden hämatopoetische Stammzellen eines geeigneten Spenders nach einer Konditionierung auf den Empfänger übertragen. [6, 7] Hämatopoetische Stammzellen lassen sich aus Knochenmark, aus Nabelschnurblut und, nach einer Behandlung mit hämatopoetischen Wachstumsfaktoren, aus peripheren Blut isolieren. Diese hämatopoetischen Stammzellen sind in der Lage das Knochenmark des Empfängers wieder zu besiedeln und ermöglichen ihm somit die Bildung von Erythrozyten, Granulozyten und Thrombozyten, sowie die Ausbildung eines neuen Immunsystems. Dieses ist in der Lage, verbleibende Tumorzellen zu zerstören, was als „Graft-versus-Leukemia“ (GvL)-Reaktion bezeichnet wird. [8] Gleichzeitig können immunkompetente T-Lymphozyten aus dem Transplantat Entzündungsreaktionen in verschiedenen Organen des Empfängers auslösen, eine sogenannte Graft-versus-Host Disease (GvHD). Es wird beschrieben, dass Patienten mit einer ausgeprägten GvHD deutlich seltener ein Rezidiv erleiden. [9] Daher wird nach einer Transplantation eine mäßiggradige GvHD toleriert, um eine wirksame GvL-Reaktion zu unterhalten.

Die myeloischen Linien und das Immunsystem tragen nach dem Anwachsen der Spenderstammzellen im Knochenmark, was als Engraftment bezeichnet wird, die genetischen Merkmale des Spenders. Dadurch entsteht ein chimärer Organismus. Der hämatopoetische Chimarismus, sprich, das gleichzeitige Vorhandensein von Zellen des Spenders und des Empfängers im Blut und im Knochenmark, lässt sich durch verschiedene Methoden, wie beispielsweise Zytogenetik [10, 11], Phänotypisierung der roten Blutzellen [12, 13], Restriktionfragmentlängenpolymorphismus-Analyse (RFLP) [14-17] und Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) von Geschlechtschromosomen [18-23] feststellen. Den Durchbruch

brachte die Entwicklung der Polymerase Kettenreaktion (PCR) [24] und ihre Anwendung in der Chimärismusanalyse. [25-31]

Chimärismusanalyse

Auch nach einer allogenen Stammzelltransplantation besteht das Risiko eines Rezidivs [32], einer Abstoßung des Transplantats oder einer unzureichenden Knochenmarkfunktion. Daher sollte nach einem solchen Eingriff der hämatopoetische Chimärismus regelmäßig untersucht werden, während der ersten 100 Tage danach wöchentlich, anschließend monatlich [33, 34]. Dabei wird aus dem peripheren Blut DNA isoliert und auf autologe Anteile überprüft. Finden sich ausschließlich Merkmale des Spenders, wird dies als vollständiger Chimärismus (complete chimerism, CC) bezeichnet. Finden sich autologe Anteile, werden diese quantifiziert und gemäß ihres prozentualen Anteils als gemischter Chimärismus (mixed chimerism, MC) klassifiziert. Ist nur noch autologe DNA nachzuweisen, bezeichnet man das als autologe Rekonstitution (AR). Es konnte gezeigt werden, dass bei einem Anstieg des autologen Anteils die Gefahr eines Rezidivs stark erhöht ist. [33, 35-37] Bei den Patienten mit steigenden autologen Anteilen, die keine Immuntherapie erhalten haben, lag die Wahrscheinlichkeit innerhalb der nächsten drei Jahre ohne ein unerwünschtes Ereignis zu überleben bei 0 %. [33] Durch eine rechtzeitige Therapie, wie zum Beispiel dem Absetzen der Immunsuppression [38, 39] oder der Gabe von Zytokinen [8, 40, 41] oder Donorlymphozyten [42, 43], ist es häufig möglich einen Rückfall zu verhindern, daher ist es wünschenswert eine Methode zu finden, die ein Ansteigen des autologen Anteils und somit die Gefahr eines Rezidivs möglichst sensitiv erfassen kann. Da eine solche Immuntherapie mit Risiken und Nebenwirkungen, vor allem der Gefahr einer Graft versus Host Disease behaftet ist [44], sollen möglichst die Patienten ganz spezifisch erfasst werden, die tatsächlich Gefahr laufen, ein Rezidiv zu entwickeln. Bisher wird der hämatopoetische Chimärismus durch die Analyse von Short Tandem Repeats als genetische Marker untersucht. [45-48] Durch die Verwendung fluoreszenz-gelabelte Primer und die Trennung der PCR-Produkte mittels Kapillarelektrophorese lässt eine akkurate reproduzierbare Quantifizierung gemischter autologer Anteile durchführen. Durch Verwendung semiautomatisierter PCR Analyse ist dabei der Durchsatz großer Probenmengen möglich. [30, 46, 49-51] Somit können autologe Anteile von ca. 1% zuverlässig nachgewiesen werden, diese Methode stellt den derzeitigen Goldstandard dar. Es sind jedoch in den letzten Jahren mehrere Veröffentlichungen erschienen [52-55], in denen postuliert wurde, dass mit Hilfe der quantitativen Real-Time PCR eine Sensitivität von 0,1% erreicht werden kann.

Quantitative Real-Time PCR

Die Real-Time PCR bietet parallel zur PCR die Möglichkeit der Quantifizierung mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen. [56] Bei der in dieser Arbeit verwendeten Methode wird neben dem Forward und dem Reverse Primer eine Hydrolysesonde eingesetzt, die an einem Ende mit einem Quencher und am anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff versehen ist. [57, 58] Auf Grund der räumlichen Nähe zwischen diesen beiden komplementären Fluorophoren wird durch den Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) die Energie des angeregten Reporter-Fluoreszenzfarbstoffs auf den Quencher übertragen. Durch die Taq-Polymerase, die gleichzeitig Exonuclease Aktivität besitzt, wird die Sonde während der Synthese des Gegenstrangs vom 5'-Ende abgebaut. Das führt dazu, dass sich Quencher und Reporterfarbstoff voneinander entfernen, und das exponentiell steigende Fluoreszenzsignal des Reporters gemessen werden kann. Basierend auf dem Hintergrundsignal wird ein Schwellenwert für ein spezifisches Fluoreszenzsignal definiert. Dieser Schwellenwert wird benutzt um den C_T -Wert (cycle threshold) zu berechnen, er entspricht dem PCR Zyklus, in dem das Fluoreszenzsignal erstmalig das Hintergrundsignal übersteigt. Der C_T -Wert ist direkt proportional zur eingesetzten Menge an Target DNA.

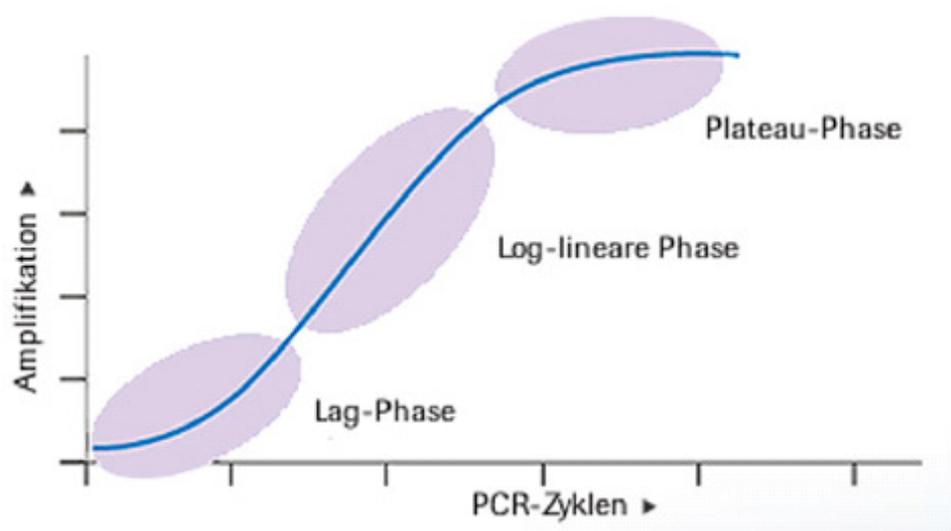


Abbildung 1-1: Die drei Phasen der Real-Time PCR Kurve.

Die Log-lineare Phase beginnt mit dem Threshold Cycle bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz übersteigt

Zur Quantifizierung der DNA-Ausgangsmenge (N_0) wird eine Verdünnungsreihe mit DNA-Lösungen bekannter Konzentration verwendet und die erhaltenen C_T -Werten gegen die logarithmierten Ausgangskonzentrationen aufgetragen.

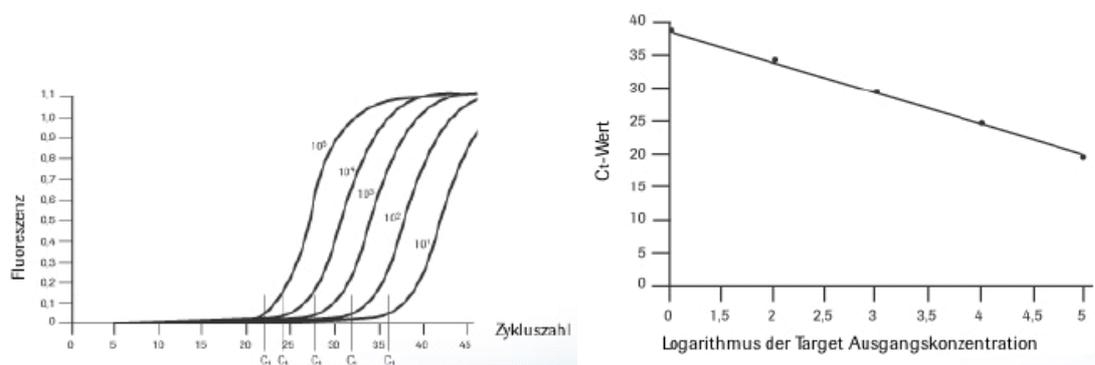


Abbildung 1-2: Links: Real Time - PCR-Kurven für verschiedene DNA - Ausgangskonzentrationen Je höher die Konzentration an Target um so niedriger der C_T-Wert. Rechts: Standard Amplifikationskurve

Aus der Steigung der erhaltenen Gerade lässt sich die Effizienz (E) der PCR-Amplifikation bestimmen.

$$C_T = (-1/\lg E) \lg N_0 + (-1/\lg E) \lg N_{C_T} \rightarrow C_T \sim -\lg N_0$$

Gleichung 1.1

wobei $-1/\lg E$ der Steigung entspricht. Eine Steigung $m = -3,32$ entspräche einer theoretischen idealen Effizienz von 100% und somit einer Verdopplung des PCR-Produkts in jedem Amplifikationszyklus.

Mit Hilfe der Standardgeraden lässt sich die Ausgangskonzentration an Target-DNA aus dem C_T-Wert einer beliebigen Probe bestimmen.

Sequenz Polymorphismen

Sequenz Polymorphismen (SPs) sind genetische Variationen, die durchschnittlich alle 200 – 1000 Basenpaare auftreten. [59-61] Die Sequenz unterscheidet sich an diesen Stellen oft nur um wenige Basen oder sogar nur ein einziges Nukleotid, was dann als Single Nucleotide Polymorphism (SNP) bezeichnet wird. Die meisten Sequenz Polymorphismen sind biallel und werden von beiden Eltern vererbt. Daher werden sie auch häufig zur Identitäts- oder Verwandtschaftsanalyse herangezogen. Sie können als genetische Marker in quantitativen Real-Time PCR Reaktionen zur Chimärismusanalyse dienen. [52-55, 62]

Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es die neue Methode der Real-Time PCR zur quantitativen Chimärismusanalyse mit Hilfe von bekannten Sequenz Polymorphismen in unserem Labor zu etablieren und mit der derzeit verwendeten Methode der STR-Analyse, die den Goldstandard darstellt, zu vergleichen. Dazu sollten die Proben von 163 Kindern mit einer ALL, die eine allogener Stammzelltransplantation erhalten haben und die bereits mit der STR-Methode untersucht worden waren, mit der Methode der quantitativen Real-Time PCR reevaluiert werden.

Folgende Fragestellungen sollen dabei untersucht werden:

1. Ist es möglich für alle Empfänger-/Spender-Paare einen informativen Sequenz Polymorphismus zu finden?
2. Wie ist die Anwendbarkeit der Real-Time PCR Methode in der täglichen Praxis?
3. Wie ist die Sensitivität der informativen Marker?
4. Kann man mit der Real-Time PCR Methode eine höhere Sensitivität als mit der STR-Analyse erzielen, ohne dabei an Spezifität zu verlieren? Ist es damit möglich einen ansteigenden Chimärismus früher zu diagnostizieren und somit früher darauf zu reagieren?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patienten

Von Januar 1996 bis Dezember 2001 erhielten 163 ALL Patienten in 13 pädiatrischen Transplantationszentren eine Stammzelltransplantation [33]. Zwei der Patienten wurden ein weiteres Mal transplantiert.

2.1.2 Primer & Probes

Sämtliche Primer und Probes (Tabelle 2.1) wurden von der Firma SIGMA Aldrich bezogen.

Marker	Sequenz 5'-3'	(FAM-TAMRA) Probe	Chromosom
S01a ^a	F GGTACCGGGTCTCCACATGA R* GGGAAAGTCACTCACCCAAGG	CTGGGCCAGAATCTTGGTCCTCACA	17q
S01b ^a	F GTACCGGGTCTCCACCAGG		
S02 ^a	F GCTTCTCTGGTTGGAGTCACG R GCTTGCTGGCGGACCCT	CTGCACCACCAAATCATCCCCGTG	Y
S03 ^a	F CTTTTGCTTTCTGTTTCTTAAGGGC R TCAATCTTTGGGCAGGTTGAA	CATACGTGCACAGGGTCCCCGAGT	6q
S04a ^a	F* CTGGTGCCACAGTTACGCT R AAGGATGCGTGACTGCTATGG	TCCTGGCAGTGTGGTCCCTTCAGAA	9
S04b ^a	R AGGATGCGTGACTGCTCCTC		
S05a ^a	F AAAGTAGACACGGCCAGACTTAGG R* CATCCCCACATACGGAAAAGA	CCCTGGACACTGAAAACAGGCAATCCT	20
S05b ^a	F AGTTAAAGTAGACACGGCCTCCC		
S06 ^a	F CAGTCACCCCGTGAAGTCCT R TTTCCCCCATCTGCCTATTG	CCCATCCATCTTCCCTACCAGACCAGG	1p
S07a ^a	F TGGTATTGGCTTTAAAATACTGGG R TGTACCCAAAACCTCAGCTGCA	TCCTCACTTCTCCACCCTAGTTAAACAG	X
S07b ^a	F GGTATTGGCTTTAAAATACTCAACC R CAGCTGCAACAGTTATCAACGTT		
S08a ^a	F CTGGATGCCTCACTGATCCA R* TGGGAAGGATGCATATGATCTG	CTCCAACCCCATTTTCTGCCTG	1q
S08b ^a	F GCTGGATGCCTCACTGATGTT		
S09a ^a	F* GGGCACCCGTGTGAGTTTT R TCAGCTTGTCTGCTTTCTGGAA	TGGAGGATTTCTCCCCTGCTTCAGACAG	17q

S09b ^a	R CAGCTTGTCTGCTTTCTGCTG		
S10a ^a	F GCCACAAGAGACTCAG R* TGGCTTCCTTGAGGTGGAAT	CAGTGTCCCACTCAAGTACTCCTTTGGA	18
S10b ^a	F TTAGAGCCACAAGAGACAACCAG		
S11a ^a	F TAGGATTCAACCCTGGAAGC R* CCAGCATGCACCTGACTAACA	CAAGGCTTCCTCAATTCTCCACCCTCC	11
S11b ^a	F CCCTGGATCGCCGTGAA		
PECAM1G ^b	F GGATCTATGACTCAGGGACATATAAATG R* AGGACTCACCTTCCACCAACCTC	TGTGAACAACAAAGAGAAAACCACTGCA GAGT	17
PECAM1C ^b	F AGGACTCACCTTCCACCAACCCG		
ICAM1G ^b	F* GCACTTTCCTCACTGCCCCAT R AGAGCACATTCACGGTCACCCAC	CAGTGACTGTCCTCGAGATCTTAGGGC	19
ICAM1A ^b	R AGAGCACATTCACGGTCACCATT		
HA1G-T ^b	F TGCTGGCGGACGTGG R GCTCTCACCGTCACGCAA	CCGCTTCGCTGAGGGCCTTGA	19
HA1A-C ^b	R GCTCTCACCGTCATGCCG		
MLH1C ^b	F* GAGACCCAGCAACCCACAGA R TCGTGCTCACGTTCTTCTCC	ATTCAAGCTGTCCAATCAATAGCTGCCG	3
MLH1T ^b	R TCGTGCTCACGTTCTTCTCC ATT		
SUR1C ^b	F TGCCACCCTCCCTCCCTAC R* GTCTTCCAGAGTCCCCGACAG	CAGGTGGGCTGCGGCAAGTCC	11
SUR1T ^b	F TGCCACCCTCCCTCCCTAT		
Albumin	F TGAAACATACGTTCCCAAAGAGTTT R CTCTCCTTCTCAGAAAGTGTGCATAT	TGCTGAAACATTCACCTTCCATGCAGA	4

Tabella 2-1: Verwendete Primer und Probes

* gemeinsamer Primer, **F** = Forward Primer, **R** = Reverse Primer

^aAlizadeh et al.2002[52]

^bMaas et al.2003, 2004[53, 54]

Die lyophilisierten Oligonucleotide wurden vor der Verwendung in H₂O zu einer Konzentration von 100 pM/L gelöst, aliquotiert und als Stammlösung bei -80°C aufbewahrt.

Als Arbeitslösungen wurden die Aliquots der Forward und Reverse Primer direkt verwendet, die Probes wurden 1:20 verdünnt.

Zur Durchführung der PCR Reaktionen wurden jeweils 600 nM Forward und Reverse Primer und 200 nM Probe, für die Albumin Assays wurden je 900 nM Forward und Reverse Primer und 100 nM Albumin TaqMan-Probe eingesetzt.

Als Reporter-Fluorophor wurde FAM (6-carboxyfluorescein) und als Quencher TAMRA (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine) verwendet.

2.1.3 PCR

2.1.3.1 Platten

Thermo Fast ®96, semi skirted für den iCycler iQ5 (ABgene)

PP PCR Plate 96 well semi skirted for ABI (greiner bio-one)

2.1.3.2 Folien

Optical Adhesive Covers (Applied Biosystems)

2.1.3.3 Reaktionsmix

2x TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)

2x Absolute QPCR Rox Mix (ABgene)

2.1.4 Kits

2.1.4.1 DNA Extraktion

QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen)

QIAamp® DNA Blood Midi Kit (Qiagen)

2.1.4.2 Vervielfältigung genomischer DNA

GenomiPhi™ DNA Amplification Kit (Amersham Biosciences)

GenomePlex™ Whole Genome Amplification (WGA) Kit (SIGMA)

GenElute™ PCR Clean-up Kit (SIGMA)

2.1.5 Geräte

2.1.5.1 PCR

GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)

2.1.5.2 Real-Time PCR

ABI Prism 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems)

iCycler iQ5 Multicolor Real-time PCR Detection System (Bio Rad)

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung genomischer DNA

Die DNA aus peripheren Blut (PB) und Knochenmark (BM) wurde mit Hilfe des QIAamp® DNA Blood Midi Kit (Qiagen) für die Vorproben des Empfängers und des Spenders oder des QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen) für die Proben nach der Transplantation gemäß dem Protokoll des Herstellers extrahiert.

2.2.2 Quantifizierung genomischer DNA

Konzentration und Reinheit der DNA Proben, die bis zum 31.12.1999 isoliert worden waren, wurde durch Messung der optischen Dichte bei 260 und 280 nm mit Hilfe eines UV Spektrometers (BioPhotometer Eppendorf) bestimmt. Die Konzentration der späteren Proben wurde durch ein Albumin-Real Time PCR Assay bestimmt [63]. Als Standardreihe für das Albumin Assay wurden DNA Proben bekannter Konzentration von 300 ng DNA, 60 ng DNA und 12 ng DNA eingesetzt. Die Konzentration der Vorproben von Empfänger und Spender wurde mit beiden Methoden kontrolliert.

2.2.3 Vervielfältigung genomischer DNA

Falls die Vorproben von Spender und Empfänger nicht mehr ausreichend Material enthielten um ein Screening nach Sequenz Polymorphismen durchzuführen wurde die DNA mit Hilfe des GenomiPhi™ DNA Amplification Kits (Amersham Biosciences) oder des GenomePlex™ Whole Genome Amplification (WGA) Kits (SIGMA) nach dem Protokoll des Herstellers vervielfältigt. Im Falle der Verwendung des GenomePlex™ Whole Genome Amplification (WGA) Kits (SIGMA) musste eine Reinigung des PCR Produkts mit Hilfe des GenElute™ PCR Clean-up Kit (SIGMA) erfolgen.

Die Bestimmung der Ausbeute erfolgte spektrometrisch und durch das Albumin-Real Time PCR Assay.

2.2.4 Screening nach Sequenz Polymorphismen

Elf biallelische Sequenz Polymorphismen (S01- S11) [52] wurden als genetische Marker für das initiale Primerscreening verwendet. Drei davon (S02, S03, S06) sind sogenannte

Nullallele [55], was bedeutet, dass sie entweder in einem Individuum vorhanden sind oder fehlen. S02 liegt auf dem Y-Chromosom und ist in allen männlichen Individuen vorhanden.

Für das initiale Primerscreening wurden PCR Platten vorbereitet, die Mischungen der jeweiligen SP Forward und Reverse Primer (je 600 nM) sowie der dazugehörigen Probe (200 nM) nach einem festen Schema enthielten (siehe Abb. 2.1). Diese Platten wurden mit Folie abgedeckt und waren so bis zu zwei Wochen im Kühlschrank haltbar. Zum Primerscreening wurde die DNA von Spender und Empfänger jeweils zu einer Konzentration von 40 ng/well mit 2 x TaqMan Universal PCR Master Mix und H₂O vermischt und zu einem Endvolumen von 20 µl auf die vorbereiteten Platten verteilt. So konnten auf einer vorbereiteten Platte zwei Spender/Empfänger-Paare getestet werden. Falls die Vorprobe des Spenders nicht mehr ausreichend DNA enthielt, wurde eine Nachprobe verwendet, die mit der STR Methode als CC klassifiziert worden war und somit den genetischen Merkmalen des Spenders entsprach.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S01a	S06	S10b									
B	S01b	S07a	S11a									
C	S02	S07b	S11b									
D	S03	S08a										
E	S04a	S08b										
F	S04b	S09a										
G	S05a	S09b										
H	S05b	S10a										

Abbildung 2-1: Pipettierschema für das SP Screening

Wenn kein informativer Marker gefunden wurde, wurden fünf weitere biallelische Sequenz Polymorphismen (PECAM1, ICAM1, HA1, MLH1, SUR1) [53] getestet, so dass insgesamt 29 Marker zur Verfügung standen.

Die PCR Reaktion erfolgte für 2 Minuten bei 50°C, anschließend für 10 Minuten bei 95°C, 40 bzw. 50 Amplifikationszyklen bei 95°C für 15 Sekunden (Denaturierung) und 60°C für 60 Sekunden (Annealing).

Ein Allel wurde als positiv für einen Sequenz Polymorphismus betrachtet, wenn der C_T -Wert < 30 betrug und als negativ wenn der C_T -Wert je nach Gerät 40 bzw. 50 betrug. Für S01a, PECAM1, ICAM1, HA1, MLH1 und SUR1 wurde ein C_T -Wert > 36 bereits als negativ betrachtet, da die hier verwendeten Primer ein beträchtliches Hintergrundsignal generierten. Ein Marker wurde als informativ bezeichnet, wenn der Empfänger positiv und der Spender negativ für diesen war.

2.2.5 Standardreihen

Als Standardreihen wurden künstliche DNA Mischungen gesunder freiwilliger Spender verwendet. Die DNA freiwilliger Spender wurde auf die verwendeten Sequenz Polymorphismen hin untersucht. Aus zwei geeigneten DNA Proben, einer, die den Marker besitzt und als Recipient (R) bezeichnet wird und einer, die negativ für den fraglichen Marker ist und Donor (D) genannt wird, werden künstliche DNA Mischungen in folgenden Mischungsverhältnissen verwendet:

100% R / 0% D

10% R / 90% D

1% R / 99% D

0,1 % R / 99,9 % D

0,01% R / 99,99% D

0,001% R / 99,999% D

0% R / 100% D.

Die Gesamt DNA Menge betrug jeweils 12,5 ng/ μ l, so dass für jede PCR Reaktion 2 μ l eingesetzt wurden, um eine DNA Menge von 25 ng pro Well zu erreichen. Wann immer es möglich war, wurden homozygote Standardreihen hergestellt. Heterozygote Standardreihen wurden nur dann verwendet, wenn der Empfänger auch heterozygot für den Sequenz-Polymorphismus war, und wenn kein homozygoter Marker zur Verfügung stand.

Da für den Marker S09a bisher keine Standardreihe aus gesunden, freiwilligen Spendern gefunden werden konnte, wurde hier eine Standardreihe aus der DNA eines betreffenden Patienten und seines Spenders hergestellt.

Als Standardreihe für das Albumin Assay wurden DNA Proben bekannter Konzentration von 200 ng DNA, 60 ng DNA und 10 ng DNA eingesetzt.

2.2.6 Quantitative Real-Time PCR

Alle Real-Time PCRs wurden entweder mit dem ABI PRISM 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems) oder dem iCycler iQ5 Multicolor Real-time PCR Detection System (Bio Rad) durchgeführt.

Wenn für ein Empfänger/Spender-Paar mehrere informative Marker gefunden worden waren, wurde einer davon für die Quantifizierung ausgewählt.

2.2.6.1 Durchführung

Die quantitativen Real-Time PCR Reaktionen wurden in einem Reaktionsvolumen von 15 μ l durchgeführt. Zunächst wurden 8 μ l 2x PCR Master Mix in jedem verwendenden Well vorgelegt und mit 5 μ l Primer/ Probe Mix versetzt. Anschließend wurden 25 ng DNA zu jedem Well zugegeben, die Platte mit Folie verschlossen und bei 900 Umdrehungen 5 min zentrifugiert.

Zur Quantifizierung der autologen Anteile wurde eine geeignete Standardreihe aufgetragen und von jeder Probe Doppelbestimmungen durchgeführt. Zur Bestimmung der DNA Menge wurde in einem dritten Well das Albumin Signal bestimmt und, mit Hilfe einer Albumin Standardreihe, die DNA Konzentration überprüft. Die Vorproben von Empfänger und Spender, sowie eine Negativkontrolle (Non Template Control – NTC), wurden ebenfalls aufgetragen.

Die PCR Reaktion erfolgte für 2 Minuten bei 50°C, anschließend für 10 Minuten bei 95°C, dann folgten 50 Amplifikationszyklen bei 95°C für 15 Sekunden (Denaturierung) und bei 60°C für 60 Sekunden (Annealing). Für PECAM 1 betrug die Annealing Temperatur 63°C.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	V 100%	V 100%	V Pr.-Nr.	V Pr.-Nr.	V Pr.-Nr. Alb.	Pr.-Nr	Pr.-Nr.	Pr.-Nr Alb.	Pr.-Nr	Pr.-Nr	Pr.-Nr Alb.	Pr.-Nr
B	V 10%	V 10%	D Pr.-Nr.	D Pr.-Nr.	D Pr.-Nr. Alb.	Pr.-Nr	Pr.-Nr.	Pr.-Nr Alb.	Pr.-Nr	Pr.-Nr	Pr.-Nr Alb.	Pr.-Nr
C	V 1%	V 1%	N Pr.-Nr.	N Pr.-Nr.	N Pr.-Nr. Alb.	Pr.-Nr	Pr.-Nr.	Pr.-Nr Alb.	Pr.-Nr	Pr.-Nr	Pr.-Nr Alb.	Alb. 300ng
D	V 0.1%	V 0.1%	Pr.-Nr.	Pr.-Nr	Pr.-Nr Alb.	Pr.-Nr	Pr.-Nr.	Pr.-Nr Alb.	Pr.-Nr	Pr.-Nr	Pr.-Nr Alb.	Alb. 300ng
E	V 0.01%	V 0.01%	Pr.-Nr.	Pr.-Nr	Pr.-Nr Alb.	Pr.-Nr	Pr.-Nr.	Pr.-Nr Alb.	Pr.-Nr	Pr.-Nr	Pr.-Nr Alb.	Alb. 60ng
F	V 0.001%	V 0.001%	Pr.-Nr.	Pr.-Nr	Pr.-Nr Alb.	Pr.-Nr	Pr.-Nr.	Pr.-Nr Alb.	Pr.-Nr	Pr.-Nr	Pr.-Nr Alb.	Alb. 60ng
G	D 100%	D 100%	Pr.-Nr.	Pr.-Nr	Pr.-Nr Alb.	Pr.-Nr	Pr.-Nr.	Pr.-Nr Alb.	Pr.-Nr	Pr.-Nr	Pr.-Nr Alb.	Alb. 12ng
H	NTC	NTC	Pr.-Nr.	Pr.-Nr	Pr.-Nr Alb.	Pr.-Nr	Pr.-Nr.	Pr.-Nr Alb.	Pr.-Nr	Pr.-Nr	Pr.-Nr Alb.	Alb. 12ng

Abbildung 2-2: Pipettierschema Quantifizierung

2.2.6.2 Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit der ABI PRISM 7700 Sequence Detector Software und der Bio-Rad iQ5 Optical System Software.

Zur Analyse der Daten wurde zunächst die Standardkurve betrachtet: Trägt man den C_T -Wert gegen den logarithmischen Wert der Verdünnung auf, so sollte die Steigung der Standardkurve theoretisch -3,32 betragen, da die autologen Anteile in jedem Schritt um den Faktor 10 verdünnt werden. Allerdings wurden in der Praxis Werte zwischen -3,0 und -3,9 akzeptiert, solange der Korrelationskoeffizient $> 0,95$ betrug [64]. Aus dieser Standardkurve und dem C_T -Wert der zu messenden Proben wurde dann der prozentuale Anteil autologer DNA berechnet.

Wenn ein heterozygoter oder ein hemizygoter Marker mit einer homozygoten Standardreihe für die Quantifizierung verwendet worden war, wurde das erhaltene Ergebnis mit dem Faktor 2 multipliziert.

Außerdem wurde das Ergebnis mit Hilfe des gemessenen DNA Gehaltes normalisiert, so dass Fehler in der Quantifizierung, die durch den Einsatz unterschiedlicher DNA Mengen zustande kamen, korrigiert wurden.

Das normalisierte autologe Signal der Empfänger-Vorprobe sollte 100%, das der Spenderprobe 0% betragen. Wir haben für den Empfänger ein autologes Signal zwischen 50% und 200% akzeptiert, was einer Differenz von einem C_T -Wert von 1, verglichen mit dem 100% R/ 0% D Standard, entspricht. Das autologe Signal der Spenderprobe betrug in der Regel 0%, bei einigen Markern (siehe oben) gab es ein Signal, das ignoriert wurde, wenn es unter dem Limit der Sensitivität von 0,1% lag, bzw. einen C_T von größer 36.

2.2.7 Statistische Methoden

Diese Arbeit war Teil einer größeren Studie, in welcher, außer den Proben der ALL-Patienten, noch die von 70 AML-Patienten, 60 MDS-Patienten und 31 Patienten mit einer JMML nach allogener Stammzelltransplantation betrachtet wurden. Zur statistischen Bewertung der Methode wurden sinnvollerweise die Ergebnisse aus der gesamten Studie verwendet [65].

Die statistische Auswertung der Methode wurde von Frau Dr. Gaby Schneider vom Institut für Computerwissenschaften und Mathematik der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt durchgeführt.

2.2.7.1 Software

Die statistische Analyse wurde mit dem Softwarepaket „R“ durchgeführt, welches eine Sprache und Umgebung für statistische Auswertungen und die Erstellung von Graphiken darstellt [66]

2.2.7.2 Berechnung der kumulativen Informativität der genetischen Marker

In einem Satz von n genetischen Markern M_1, M_2, \dots, M_n entspricht die Informativität I der Wahrscheinlichkeit für jeden Marker M für ein willkürlich gewähltes Empfänger-/Donorpaar informativ zu sein. Nimmt man an, dass die Wahrscheinlichkeit, dass ein bestimmter Primer informativ für ein Empfänger-/Donorpaar unabhängig davon ist, dass irgendein anderer

Marker ebenfalls informativ für dieses Empfänger-/Donorpaar ist, dann gilt für die Informativität $I_{[M1, M2, \dots, Mn]}$:

$$I_{[M1, M2, \dots, Mn]} = 1 - [(1 - I_1) \cdot (1 - I_2) \cdot \dots \cdot (1 - I_n)]$$

Gleichung 2.1

2.2.7.3 Bewertung der Messgenauigkeit

Die Messgenauigkeit der empfängerspezifischen Signale wurde auf Basis von $n = 3942$ doppelt durchgeführter Bestimmungen normalisierter autologer Anteile der entsprechenden Proben nach Transplantation beurteilt. Die Doppelbestimmungen werden mit $X_i^{(1)}$, $X_i^{(2)}$ mit $i = 1, \dots, 3942$ bezeichnet und das autologe Signal entspricht dem Mittelwert der Einzelmessungen $A_i = \frac{1}{2}(X_i^{(1)} + X_i^{(2)})$. Die Differenzen zwischen den Einzelmessungen $D_i = |X_i^{(1)} - X_i^{(2)}|$ werden herangezogen, um die Genauigkeit zu bestimmen, mit der ein autologes Signal gemessen wird. Da diese Genauigkeit sinkt, wenn die Höhe des autologen Signals ansteigt, wurde die Messgenauigkeit als Funktion der autologen Signale selbst bestimmt.

In dem vorliegenden Datensatz stieg $\log_{10}(D)$ linear zu dem $\log_{10}(A)$ an. Diese Beziehung kann durch lineare Regression mit folgender Gleichung quantifiziert werden:

$$\log_{10}(D) = 0.77 \log_{10}(A) - 0.58 + F$$

Gleichung 2.2

wobei F einen Fehlerterm mit einem Mittel von 0 und einer Varianz von 0.19 bezeichnet.

Basierend auf dieser Relation zwischen $\log_{10}(A)$ und $\log_{10}(D)$ kann die erwartete Differenz zwischen Messungen $E(D)$ als Funktion des mittleren autologen Signals ausgedrückt werden:

$$E(D) \approx 10^{-0.58 + \ln(10) \cdot 0.19/2} \approx 0.44 \cdot A^{0.77}$$

Gleichung 2.3

Dementsprechend wird die Präzision, mit der ein autologes Signal A gemessen werden kann, geschätzt als:

$$\hat{\sigma}_A = E(D)/2 = 0.22 \cdot A^{0.77}$$

Gleichung 2.4

Die Werte, die sich daraus für $\hat{\sigma}_A$ als Funktion von A ergeben, sind als durchgezogene Linie in Abbildung 3-3 dargestellt. Um diese Ergebnisse zu unterstützen wurde $\hat{\sigma}_A$ separat für verschiedene Bereiche von A abgeschätzt, dies zeigen die Intervalle auf der x-Achse. Für jedes Intervall wurde die erwartete Differenz $E(D)$ als Mittel aller Differenzen zwischen den Doppelbestimmungen ermittelt. Die dadurch resultierenden Werte von $\hat{\sigma}_A$ wurden als

gestrichelte Kurve in Abbildung 3-3 dargestellt, die sich sehr gut mit der durchgezogenen Kurve der linearen Regressionsanalyse deckt.

In Proben mit starkem autologen Signal übersteigt die gemessene Menge zuweilen 100%. Das liegt, bedingt durch die Methode der RT-PCR, an der geringeren quantitativen Genauigkeit von Signalen, welche größer als 5% sind. Da autologe Signale über 100% nicht sinnvoll sind, wurden sie in den Darstellungen weg gelassen.

Basierend auf der geschätzten Präzision der Messung $\hat{\sigma}_A$, kann ein 95%-Konfidenzintervall (CI 95%) für ein gegebenes autologes Signal A wie folgt berechnet werden: Unteres CI 95% Limit $A - 2 \hat{\sigma}_A$, oberes CI 95% Limit $A + 2 \hat{\sigma}_A$ (Tabelle 3-2).

2.2.7.4 Autologe Signale in Abhängigkeit von der eingesetzten DNA-Menge

Um herauszufinden, ob die Reproduzierbarkeit eines autologen Signals von der eingesetzten DNA-Menge abhängt, wurden die Differenzen nicht normalisierter autologer Signale zwischen Doppelbestimmungen gegen die eingesetzte DNA-Menge aufgetragen. Dabei ist zu beachten, dass eine geringere Menge eingesetzter DNA zu einer reduzierten maximalen Sensitivität führt.

3 Ergebnisse

Zur statistischen Bewertung der Methode wurden alle Ergebnisse, die im Rahmen unserer Untersuchungen durchgeführt wurden, herangezogen. Die patientenbezogene Auswertung und Diskussion in dieser Arbeit bezieht sich auf die Proben der ALL-Patienten.

3.1 Statistische Bewertung der Methode

3.1.1 Informativität der genetischen Marker

Die Informativität der 29 genetischen Marker wurde im Rahmen der Bewertung der Methode aus 321 Empfänger-/Spenderpaaren bestimmt (Tabelle 3-1).

	n
<u>Patienten</u>	317
<u>Transplantationen</u>	321
<u>Diagnose</u>	
ALL	156
AML	70
MDS	60
JMML	31
<u>Geschlecht</u>	
männlich	104
weiblich	48
<u>Alter^a bei SZT (Jahre)</u>	9.1 Jahre (0.3 – 22.2)
Follow up ^b	1.7 Jahre (0.2 – 6.8)
<u>Spender</u>	
matched family donor	96
mismatched family donor	47
matched unrelated donor	140
mismatched unrelated donor	38
Post-Transplantation Proben pro Patient ^a	
Peripheres Blut	15 (1-73)

Knochenmark	2 (0-11)
Total	18 (1-76)
Peripheres Blut	4659
Knochenmark	756
Total	5415

Tabelle 3-1: Patienten und Proben zur statistischen Bewertung der Methode

^a Median (Range); ^b von Patienten, die leben und sich in vollständiger Remission befinden, unabhängig vom Chimärismus und immunologischer Intervention.

Insgesamt konnte für 96% der Paare (308 von 321) ein geeigneter Marker gefunden werden. Die Marker S05a, PECAM1 G, HA1 G-T, MLH1 G, SUR1 C und SUR1 T wurden nicht zur Quantifizierung verwendet, da ihre Informativität niedrig war, und alle Empfänger-/ Donor-Paare, die für diese SPs informativ waren alternative Marker zur Auswahl hatten. Es ist aber dennoch wichtig auch auf diese Marker zu testen, um den allelen Status festzustellen. Für nicht verwandte Empfänger-/Spender-Kombinationen wurde in 98,3% der Fälle (175 von 178) ein Sequenz Polymorphismus gefunden. Im Falle eines verwandten Spenders konnte in 133 von 143 Fällen (93,0%) ein geeigneter Marker bestimmt werden. Die mittlere Anzahl informativer Marker betrug 2,5 (1-7). Umgekehrt betrug die Informativität für den Donor insgesamt 90,3% (290 von 321); 94,9% (169 von 178) für nicht verwandte Paare und 84,6% (121 von 143) für verwandte Spender. Für den Donor wurden durchschnittlich 2,4 (0-7) informative Marker gefunden. Die Informativität der genetischen Marker ist insgesamt für den Donor etwas geringer, das liegt daran, dass nur solange gescreent wurde, bis ein Marker gefunden war, der für den Empfänger informativ ist, unabhängig davon, ob für den Donor ein informativer Marker gefunden werden konnte.

3.1.2 Kumulative Informativität der genetischen Marker

Um die kumulative Informativität eines Satzes von n spezifischen genetischen Markern zu bestimmen, ist es notwendig, dass diese Marker unabhängig voneinander sind. Das bedeutet, die Wahrscheinlichkeit, dass ein bestimmter Marker für ein willkürlich gewähltes Empfänger/Spenderpaar informativ ist, hängt nicht davon ab, ob irgendein anderer Marker für dieses Paar informativ ist. Das gilt für alle verwendeten genetischen Marker, außer S02.

Marker	Informativität (%)		Anzahl der getesteten R/D Paare (n)	Anzahl der Quantifizie- rungen (n)	Verteilung der Sensitivität in Quantifizierungen (%)		
	Unterscheidung des Empfängers	Unterscheidung des Donors			0.01 ^d	0.1 ^d	1 ^d
Initiales Primer Screening^a							
S01a	9.0	6.9	321	13	7.7	76.9	15.4
S01b	8.1	8.4	321	14	7.1	85.7	7.1
S02	19.6	18.1	321	24	0.0	58.3	41.7
S03	20.2	18.4	321	19	0.0	68.4	31.6
S04a	14.0	14.0	321	20	10.0	55.0	35.0
S04b	10.9	12.5	321	21	9.5	85.7	4.8
S05a	0.3	1.6	321		- ^c		
S05b	14.0	17.1	321	12	0.0	91.7	8.3
S06	15.9	15.0	321	25	4.0	76.0	20.0
S07a	13.7	13.4	321	26	0.0	100.0	0.0
S07b	13.7	14.6	321	35	14.3	85.7	0.0
S08a	11.2	12.1	321	18	0.0	33.3	66.7
S08b	7.5	13.1	321	9	33.3	66.7	0.0
S09a	2.8	4.7	321	3	0.0	100.0	0.0
S09b	17.1	13.7	321	7	0.0	100.0	0.0
S10a	12.1	13.1	321	3	0.0	33.3	66.7
S10b	14.3	11.8	321	5	0.0	100.0	0.0
S11a	16.2	17.4	321	22	9.1	81.8	9.1
S11b	9.3	4.4	321	20	15.0	85.0	0.0
Erweitertes Primer Screening^b							
PECAM1 C	20.0	5.7	35	7	0.0	100.0	0.0
PECAM1 G	2.9	8.6	35		- ^c		
ICAM1 G	11.7	7.8	77	1	0.0	100.0	0.0
ICAM1 A	6.5	2.6	77	1	0.0	0.0	100.0
HA1 G-T	0	2.8	36		- ^c		
HA1 A-C	19.4	2.8	36	3	0.0	33.3	66.7
MLH1 G	0	5.6	36		- ^c		
MLH1 A	5.6	0	36	2	0.0	100.0	0.0
SUR1 C	0	11.8	34		- ^c		
SUR1 T	2.9	0	34		- ^c		
Insgesamt							
Alle Marker	96.0	90.3	321	310	6.4	76.8	16.8

Tabelle 3-2: Validität und Sensitivität der Methode

a Alizadeh et al.2002.[52]

b Maas et al.2003, 2004.[53, 54]

c Dieser Marker wurde nicht zur Quantifizierung verwendet.

d Sensitivität des entsprechenden Markers in Prozent.

Die Amplifikationskurven der Standardreihen für die Marker S08b, S11b, S07a und S04b sind in der Abbildung 3-2 dargestellt.

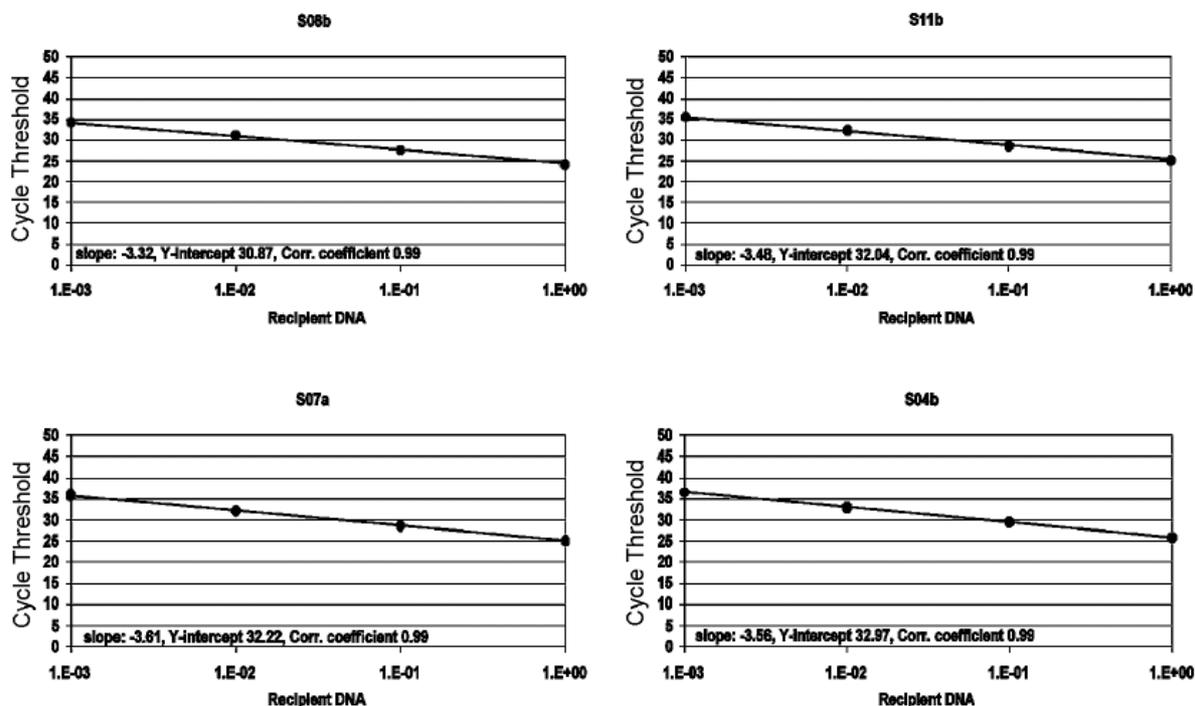


Abbildung 3-2: Standard Amplifikationskurven für die Marker S08b, S11b, S07a und S04b.

X-Achse: Verdünnung der Empfänger DNA, Y-Achse: Cycle Threshold (C_T).

Die C_T -Werte der Empfänger-Marker korrelieren linear mit der Empfänger DNA ($r = 0.99$). Die PCR Effizienz, die aus der Steigung der Gerade abgeleitet werden kann, betrug $E > 0.95$ für alle Messungen. Eine Donorkontrolle, die 100% Donor DNA enthielt, und eine Negativkontrolle, die nur Wasser enthielt (Non-Template Control NTC), zeigten keine Amplifikation (C_T 50).

Ausgehend von einer DNA-Menge von 25 ng konnte gezeigt werden, dass die Quantifizierung der Ziel-DNA über mindestens drei Log-Stufen linear war. Höhere Mengen eingesetzter DNA, die theoretisch zu höherer Sensitivität führen, zeigten deutlich mehr Hintergrundsignale. Daher beschlossen wir 25 ng DNA für die SP-Real-Time PCR zu verwenden.

3.1.4 Messgenauigkeit der Analysen

Die Messgenauigkeit der empfängerspezifischen Signale wurde auf Basis von $n = 3942$ doppelt durchgeführter Bestimmungen normalisierter autologer Anteile der entsprechenden

Proben nach Transplantation beurteilt. Wie in dem Methodenteil beschrieben, wurde die Genauigkeit der Messung eines autologen Signals als Funktion des autologen Signals selbst abgeleitet. Sowohl die resultierenden Standardabweichungen der gemessenen autologen Signale, als auch die zu Grunde liegende Anzahl analysierter Duplikate, sind in der Abbildung 3-3 dargestellt.

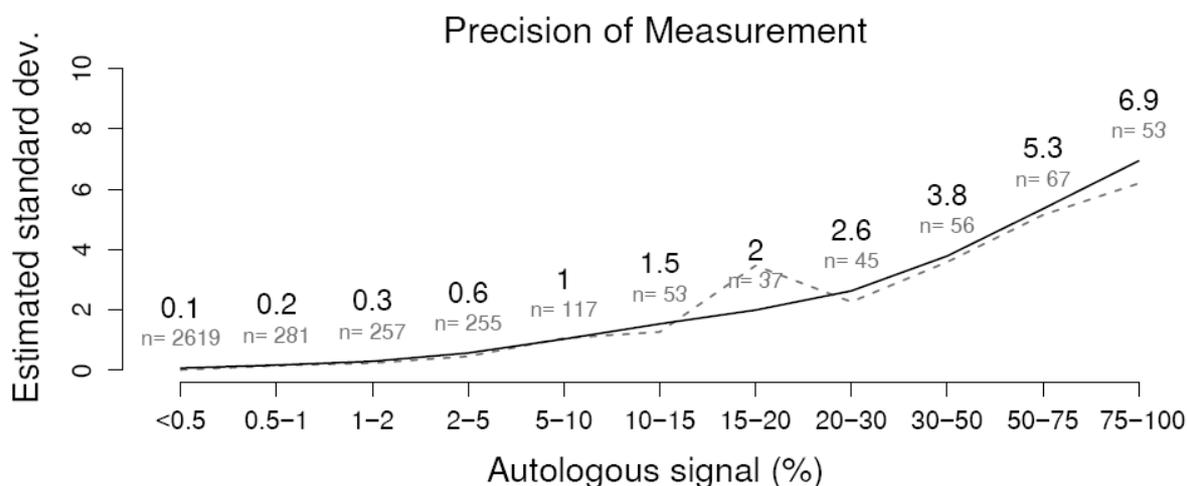


Abbildung 3-3: Genauigkeit der Messung (erstellt von Dr. G. Schneider)

Diese Methode misst autologe Signale sehr genau in den Bereichen 0 – 0,5% (CI 95% +/- 0,2), von 0,5 – 1% (CI 95% +/- 0,4), von 1 – 2% (CI 95% +/- 0,6) und von 2 – 5% (CI 95% +/- 1,2; Tabelle 3.3) unabhängig von der eingesetzten DNA-Menge.

Autologes Signal A (%)	Standardabweichung	Unteres CI 95% Limit	Oberes CI 95% Limit	Gemessene Duplikate
< 0.5	0.1	A - 0.2	A + 0.2	2619
0.5 - < 1	0.2	A - 0.4	A + 0.4	281
1 - < 2	0.3	A - 0.6	A + 0.6	257
2 - < 5	0.6	A - 1.2	A + 1.2	255
5 - < 10	1.0	A - 2.0	A + 2.0	117
10 - < 15	1.5	A - 3.0	A + 3.0	53
15 - < 20	2.0	A - 4.0	A + 4.0	37
20 - < 30	2.6	A - 5.2	A + 5.2	45
30 - < 50	3.8	A - 7.6	A + 7.6	56
50 - < 75	5.3	A - 10.6	A + 10.6	67
75 - < 100	6.9	A - 13.8	A + 13.8	53

Tabelle 3-3: Standardabweichungen und 95%-Konfidenzintervalle der gemessenen autologen Signale

3.2 Auswertung der ALL-Patienten

3.2.1 Patienten

Für die Auswertung sollten die Proben der 163 ALL-Patienten bis zum 01.05.2002 („Deadline“, DL) untersucht werden (nach 165 erfolgten Transplantationen, wobei ein Patient zweimal von dem selben Spender transplantiert wurde), die bereits 2003 von Bader et al. beschrieben worden waren [33].

Bei 5 Patienten war keine Vorprobe mehr vorhanden, so dass diese ausgeschlossen werden mussten, bei 6 der 159 übrigen Empfänger-/Spenderkombinationen konnte kein geeigneter Primer gefunden werden. Das bedeutet für 96,2 % der ALL-Patienten konnte mindestens ein geeigneter Marker gefunden werden, was dem Ergebnis der statistischen Gesamtauswertung entspricht.

Drei Patienten haben keine Proben nach Tag 21 und drei Patienten sind wegen zu wenigen Proben und unklarem Outcome nicht auswertbar, daher bezieht sich unsere Auswertung auf 148 Transplantationen bei 146 Patienten.

Die Auswertung der Experimente erfolgte wie in Kapitel 2.2.6.2 beschrieben. Idealerweise betrug die Differenz der C_T -Werte der Einzelbestimmungen $\leq 0,5$. Wenn die Differenz > 1 betrug, wurde der erhaltene Wert bei autologen Anteilen von unter 5% nicht berücksichtigt oder das Experiment für diese Probe wiederholt. Da Knochenmarkproben unabhängig vom weiteren Verlauf häufig deutliche autologe Signale zeigen, wurden zur Auswertung nur Proben aus peripherem Venenblut herangezogen.

3.2.2 Unterteilung der Patienten in zwei Risikogruppen

Die Patienten wurden auf Grund der Sensitivitätsgrenzen der beiden Methoden und den erhaltenen Werten in zwei Risikogruppen eingeteilt:

1. Patienten, die *nach* Tag 21, aber *vor* einem eventuellen Rezidiv, zweimal in Folge ein Signal von größer als 0,5% autologer Anteil im peripheren Blut zeigten
2. Patienten, bei denen das nicht vorkam.

62 Patienten gehörten zur ersten Risikogruppe, 86 Patienten zur zweiten.

3.2.3 Outcome der Patienten

Zur weiteren Auswertung wurde auf das Outcome der Patienten geschaut, dabei gab es folgende Möglichkeiten:

Abstoßung, das heißt, das Transplantat wurde abgestoßen.

Complete Remission (CR) bedeutet, der Patient befand sich zuletzt in vollständiger Remission.

Relapse / Rezidiv besagt dass der Patient ein Rezidiv erlitten hat.

Transplant Related Mortality (TRM) heißt, der Patient ist im Rahmen der Transplantation, aber nicht an einem Rezidiv verstorben. Patienten, die nach einem Rezidiv nicht an diesem, sondern durch die Umstände der Transplantation verstorben sind, wurden zu der Gruppe gezählt, die ein Rezidiv erlitten hat, da untersucht werden sollte, ob mittels der neuen RT-PCR-Methode, ein drohendes Rezidiv früher erfasst werden könnte.

Einige Patienten haben nach der Deadline 01.05.2002 ein Rezidiv erlitten. Soweit das bekannt war, wurden die Proben bis zu dem Rezidiv ebenfalls untersucht und gesondert ausgewertet.

3.2.4 Einteilung der Patienten in Chimärismusgruppen

Angelehnt an die ursprüngliche Betrachtung des Patientenkollektivs [33] wurden die Patienten wiederum in Chimärismusgruppen eingeteilt. Dazu wurde der Verlauf der autologen Anteile aus den peripheren Blutproben betrachtet. Die aus Knochenmark gewonnenen Proben zeigen häufig deutlich höhere autologe Signale und wurden deswegen bei dieser Betrachtung nicht berücksichtigt. Jiménez-Velasco et al. beschreiben, dass Knochenmarkproben oft auch vier Jahre nach der Transplantation noch keinen vollständigen Chimärismus zeigen [55].

3.2.4.1 Vollständiger Chimärismus (CC)

Die Einteilung in die Gruppe Vollständiger Chimärismus (Complete Chimerism, CC) erfolgte auf Grund der Grenze der Sensitivität von 0,1%. Wenn alle Nachproben eines Patienten nach Tag 21, autologe Anteile von weniger als 0,1% besaßen oder höchstens eine einzige Nachprobe einen Wert zwischen 0,1% und 0,2% zeigte, wurde der Patient dieser Gruppe zugeordnet.

3.2.4.2 Gemischter Chimärismus (MC)

Die Einteilung in die Gruppe(n) Gemischter Chimärismus (Mixed Chimerism, MC) orientierte sich an den maximal gemessenen autologen Anteilen größer 0,1% und erfolgte dann, wenn kein eindeutiger Anstieg oder Abfall der autologen Anteile zu beobachten war.

3.2.4.3 Abnehmender gemischter Chimärismus (deMC)

Abnehmender gemischter Chimärismus (Decreasing mixed chimerism deMC) ist ein Phänomen, das häufig beobachtet wird. Es zeigte sich, dass im Verlauf der Abnahme immer wieder statistisch signifikante Anstiege zu beobachten waren.

3.2.4.4 Ansteigender gemischter Chimärismus (inMC)

In früheren Studien [33, 35-37] hat sich gezeigt, dass Patienten mit ansteigendem gemischtem Chimärismus (Increasing mixed chimerism, inMC) regelmäßig ein Rezidiv der Grunderkrankung erleiden. Daher sollen möglichst alle Patienten, die diesen Verlauf zeigen, erkannt werden, um eine Immuntherapie einzuleiten und ein Rezidiv eventuell zu verhindern. Andererseits sollen die Patienten nicht unnötig therapiert und der Gefahr einer GvHD ausgesetzt werden. Daher muss man sehr sorgfältig abwägen, ob dieser beobachtete Anstieg bedeutsam ist. In dieser retrospektiven Betrachtung haben wir diese Zuordnung getroffen, wenn mehrere aufeinander folgende Proben einen Anstieg zeigten, der die Standardabweichung des entsprechenden 95%-Konfidenzintervalls (Tabelle 3-3) überstieg oder wenn der Gesamtverlauf eindeutig ansteigend war oder wenn der Anstieg sehr deutlich war (z. B. von 0,2% auf 12%). Der Anstieg musste vor der Diagnose des Rezidives stattgefunden haben. Die Einteilung in diese Gruppe erfolgte, wenn eines der genannten Kriterien erfüllt war, unabhängig von dem Verlauf bis dahin, da ein Anstieg prognostisch bedeutsamer ist, als eine zuvor erfolgte Abnahme.

Die Einteilung in diese Gruppen ist nur bei einer retrospektiven Betrachtung möglich.

3.2.5 Ergebnisse der ALL-Patienten

Zur besseren Übersicht wurden die Patienten zunächst nach ihrer Risikogruppe, dann nach ihrem Outcome und schließlich nach ihrem Chimärismus eingeteilt. Die beiden Patienten, die ein zweites Mal transplantiert wurden, sind doppelt aufgeführt.

		Risikogruppe 1 (2 x in Folge > 0,5 %)							Risikogruppe 2 (nicht 2 x in Folge > 0,5 %)								
		62							86								
Outcome																	
Abstoßung		2							1								
ChimGr		CC	dMC	iMC	MC05	MC1	MC2	MC6	hMC	CC	dMC	iMC	MC05	MC1	MC2	MC6	hMC
				1					1					1			
CR		26							57								
ChimGr		CC	dMC	iMC	MC05	MC1	MC2	MC6	hMC	CC	dMC	iMC	MC05	MC1	MC2	MC6	hMC
			8	16			2			13	10	1	17	13	3		
Rezidiv		24							10								
ChimGr		CC	dMC	iMC	MC05	MC1	MC2	MC6	hMC	CC	dMC	iMC	MC05	MC1	MC2	MC6	hMC
				21					3	1		4	2	2		1	
TRM		10							18								
ChimGr		CC	dMC	iMC	MC05	MC1	MC2	MC6	hMC	CC	dMC	iMC	MC05	MC1	MC2	MC6	hMC
			2	6			2			5	5	1	4	2	1		

Tabelle 3-4: Auswertung der ALL-Patienten.

ChimGr = Chimärismus Gruppe, CC = Vollständiger Chimärismus, MC05 = Gemischter Chimärismus mit autologen Anteilen < 0,5%, MC1 Gemischter Chimärismus mit autologen Anteilen < 1%, MC 2 = Gemischter Chimärismus mit autologen Anteilen < 2%, MC6 = Gemischter Chimärismus mit autologen Anteilen < 6%, dMC = Abnehmender gemischter Chimärismus, iMC = Ansteigender gemischter Chimärismus, hMC = Hoher gemischter Chimärismus mit autologen Anteilen > 10%.

Wie zu erwarten war, finden sich mehr Rezidivpatienten in der Risikogruppe 1, während der größere Anteil der Patienten, die sich nach unserer letzten Information in vollständiger Remission befanden, zur Risikogruppe 2 gehört. Andererseits befand sich auch ein erheblicher Anteil Patienten aus der Risikogruppe 1 in vollständiger Remission, der Großteil davon sogar nach einem ansteigenden Chimärismus.

In den folgenden Abschnitten werden die oben dargestellten Ergebnisse im Einzelnen vorgestellt.

3.2.5.1 Unterschiedliches Outcome der Patienten aus den beiden Risikogruppen

	Risikogruppe 1 (2 x in Folge > 0,5%)	Risikogruppe 2 (nicht 2 x in Folge > 0,5%)
	62	86
Outcome		
Abstoßung	2 (3,2%)	1 (1,2%)
CR	26 (41,9%)	57 (66,3%)
Rezidiv	24 (38,7%)	10 (11,6%)
TRM	10 (16,1%)	18 (20,9%)

Tabelle 3-5: Outcome der Patienten aus den beiden Risikogruppen

Patienten, bei denen das Kriterium zweimal in Folge autologe Anteile größer als 0,5% im peripheren Blut zutrifft, sind einem signifikant höherem Risiko ausgesetzt, ein Rezidiv zu erleiden. Der χ^2 – Test der vereinfachten Tabelle zeigt eine Signifikanz $p < 0,001$.

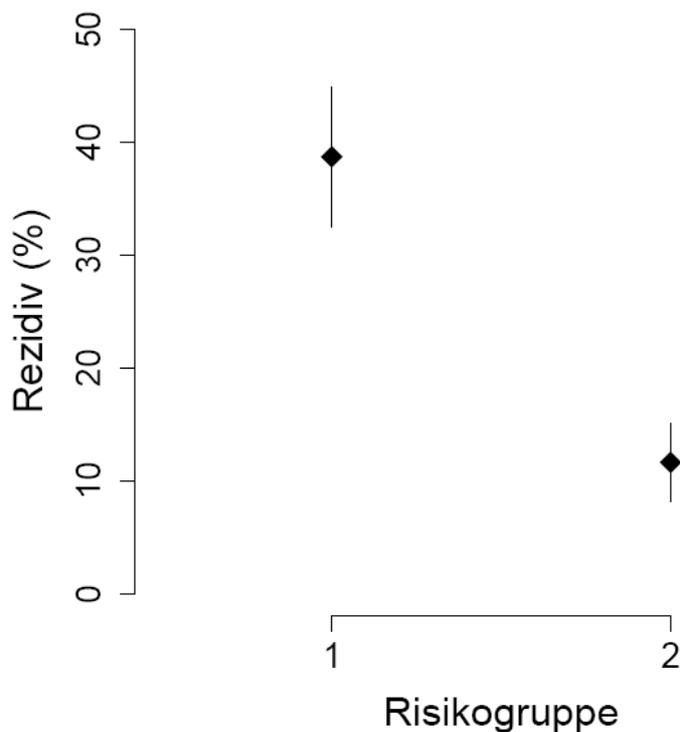
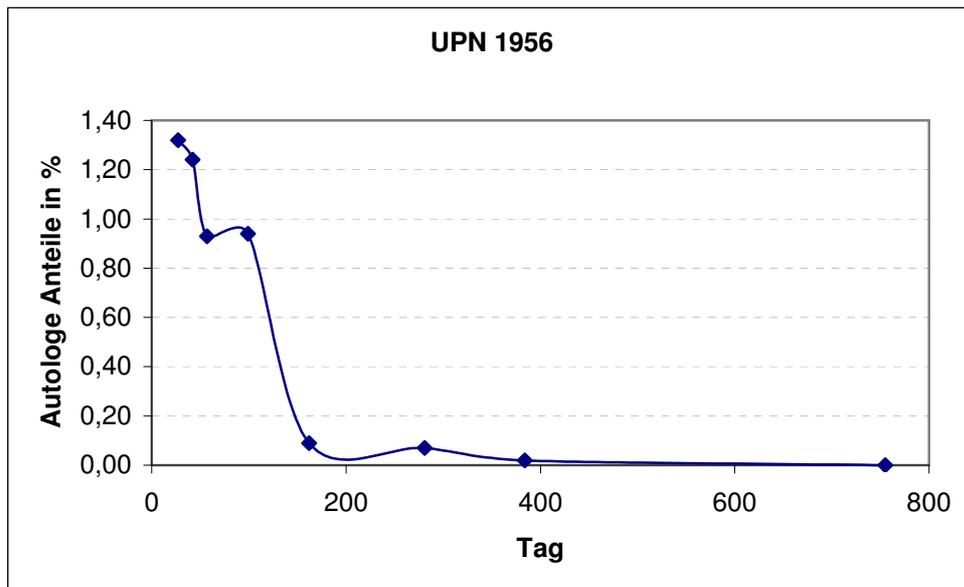


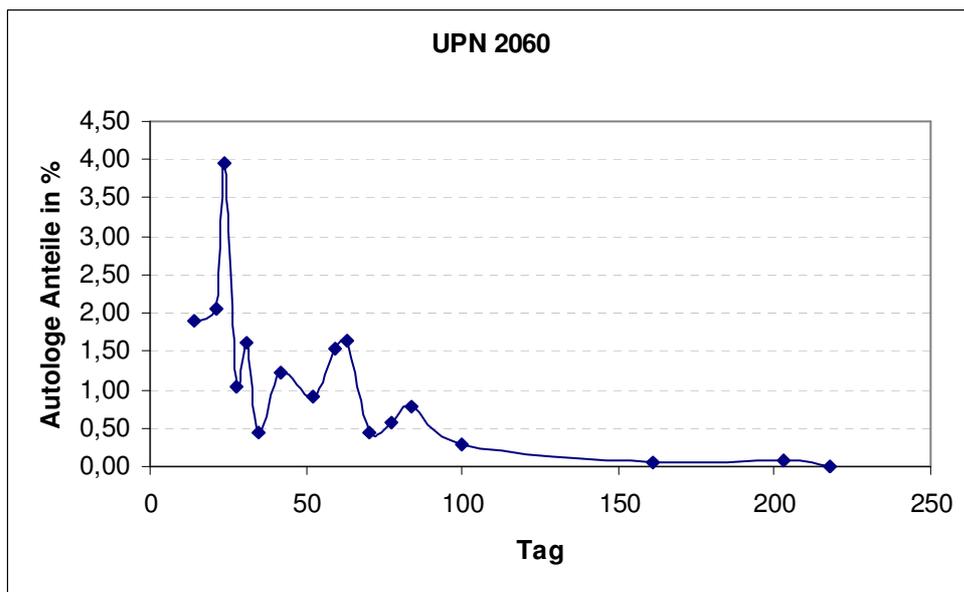
Abbildung 3-4: Patienten der Risikogruppe 1 besitzen ein signifikant höheres Risiko ein Rezidiv zu erleiden

3.2.5.2 Abnehmender Chimärismus (Decreasing Chimerism)

10 Patienten der Risikogruppe 1 und 15 Patienten der Risikogruppe 2 zeigten im Gesamtverlauf einen absteigenden Chimärismus, bei 7 Patienten sieht man allerdings während der Abnahme mindestens einen statistisch signifikanten Wiederanstieg.



Absteigender Chimärismus ohne statistisch signifikante Anstiege während der Abnahme



Häufig zeigten sich während der Abnahme statistisch signifikante Wiederanstiege

Abbildung 3-5: Absteigender Chimärismus mit und ohne Wiederanstieg während der Abnahme

Nach der erfolgten Abnahme konnten alle Patienten, bis auf zwei (2/25 Patienten), die während der Abnahme verstorben sind, als CC oder MC < 1% klassifiziert werden.

18 (8/25) dieser Patienten befanden sich in vollständiger Remission (8 aus Risikogruppe 1 und 10 aus Risikogruppe 2), die 7 übrigen Patienten sind im Rahmen der Transplantation verstorben.

UPN	Chimärismus	Risikogruppe	Therapie	Outcome	Chim STR
1956	DecrMC	1	nein	CR	CCLowLev
2147	DecrMC	1	nein	CR	CCLowLev
1563	DecrMC	1	nein	CR	DecreascMC
1849	DecrMC	1	nein	CR	DecreascMC
2060	DecrMC	1	nein	CR	CCLowLev
1836	DecrMC	1	nein	CR	CCLowLev
1615	DecrMC	1	nein	CR	CCLowLev
1753	DecrMC	1	nein	CR	CCLowLev
2018	DecrMC	1	nein	TRM	DecreascMC
2014	DecrMC	1	nein	TRM	IncreascMC
1454	DecrMC	2	nein	CR	DecreascMC
2289	DecrMC	2	nein	CR	CCLowLev
2121	DecrMC	2	nein	CR	CCLowLev
2302	DecrMC	2	nein	CR	CCLowLev
2246	DecrMC	2	nein	CR	CCLowLev
1816	DecrMC	2	nein	CR	DecreascMC
1906	DecrMC	2	nein	CR	CCLowLev
2265	DecrMC	2	nein	CR	CCLowLev
2276	DecrMC	2	nein	CR	DecreascMC
2074	DecrMC	2	nein	CR	CCLowLev
1838	DecrMC	2	nein	TRM	CCLowLev
2324	DecrMC	2	nein	TRM	CCLowLev
2071	DecrMC	2	SZ boost	TRM	DecreascMC
1839	DecrMC	2	nein	TRM	DecreascMC
1831	DecrMC	2	nein	TRM	DecreascMC

Tabelle 3-6: Die Patienten, die in der RT-PCR-Methode einen abnehmenden Chimärismus zeigten mit Outcome und Chimärismusgruppe nach der STR-Methode (Chim STR).

LowLev = niedriger MC. Therapie: Gibt an ob und wenn bekannt welche Immuntherapie der Patient erhalten hat.

3.2.5.3 Ansteigender Chimärismus (Increasing Chimerism)

Ein ansteigender Anteil der autologen Signale stellt ein erhöhtes Risiko dar, ein Rezidiv zu erleiden [33, 35-37]. Entsprechend findet sich der Großteil der Rezidivpatienten in der Gruppe Increasing Chimerism. 25 der 34 Rezidivpatienten (76,5%) zeigten zuvor ansteigende autologe Signale. 17 Patienten mit ansteigendem Chimärismus befanden sich zuletzt in vollständiger Remission, 12 von ihnen haben eine Immuntherapie erhalten. Sieben der Patienten mit steigendem Chimärismus sind verstorben, einer hat abgestoßen und wurde daraufhin ein zweites Mal transplantiert. Insgesamt zeigten 50 Patienten einen ansteigenden Chimärismus, 44 davon sind in der Risikogruppe 1 und 6 in der Risikogruppe 2.

UPN	Chimärismus	Risikogruppe	Therapie	Outcome	Chim STR
1971	IncreasMC	1	nein	Abstoßung	IncreasMC
1888	IncreasMC	1	d41+d98 T-Zellen	CR	DecreasMC
2059	IncreasMC	1	3xDLI	CR	CCLowLev
2072	IncreasMC	1	4x T-Zellen	CR	IncreasMC
2057	IncreasMC	1	d112 CSA ab	CR	IncreasMC
2196	IncreasMC	1	d196 CSA ab	CR	IncreasMC
2185	IncreasMC	1	d249 T-Zellen, 2x DLI	CR	IncreasMC
2064	IncreasMC	1	d307 T-Zellen	CR	CCLowLev
2303	IncreasMC	1	d52 T-Zellen	CR	IncreasMC
2230	IncreasMC	1	d57+ 58 SZ boost	CR	IncreasMC
1435	IncreasMC	1	ja, d54 CSA ab	CR	IncreasMC
1623	IncreasMC	1	nein	CR	CCLowLev
1504	IncreasMC	1	nein	CR	CCLowLev
2101	IncreasMC	1	nein	CR	CCLowLev
2119	IncreasMC	1	d40 CSA ab	CR, Rez n. DL	IncreasMC
1965	IncreasMC	1	ja	CR, Rez n. DL	DecreasMC
1720	IncreasMC	1	nein	CR	CCLowLev
1776	IncreasMC	1	1xT-Zellen d60	Rez	IncreasMC
2056	IncreasMC	1	2xT-Zellen	Rez	IncreasMC
2171	IncreasMC	1	d30 T-Zellen,	Rez	IncreasMC
1499	IncreasMC	1	d35 T-Zellen	Rez	CCLowLev
2186	IncreasMC	1	d63 DLI	Rez	IncreasMC
1868	IncreasMC	1	d78 + d105 DLI	Rez	IncreasMC
1969	IncreasMC	1	nein	Rez	CCLowLev
1914	IncreasMC	1	nein	Rez	IncreasMC
1762	IncreasMC	1	nein	Rez	IncreasMC
1699	IncreasMC	1	nein	Rez	IncreasMC
2132	IncreasMC	1	nein	Rez	DecreasMC
2273	IncreasMC	1	nein	Rez	IncreasMC
1756	IncreasMC	1	2xDLI, T-Zellen	Rez dann TRM	IncreasMC
1489	IncreasMC	1	3x T-Zellen	Rez dann TRM	IncreasMC
2145	IncreasMC	1	d43 CSA ab	Rez dann TRM	IncreasMC
1488	IncreasMC	1	d55 CSA ab, d56 T-Zellen	Rez dann TRM	IncreasMC
1704	IncreasMC	1	d73 T-Zellen, 2x DLI	Rez dann TRM	IncreasMC
1813	IncreasMC	1	IL2, 3xDLI	Rez dann TRM	IncreasMC
1793	IncreasMC	1	nein	Rez dann TRM	IncreasMC
1958	IncreasMC	1	nein	Rez dann TRM	IncreasMC
2116	IncreasMC	1	nein	Rez dann TRM	IncreasMC
2125	IncreasMC	1	3xSZ-Boost	TRM	CCLowLev
2047	IncreasMC	1	d56 T-Zellen	TRM	IncreasMC
2020	IncreasMC	1	d62 DLI	TRM	IncreasMC
1882	IncreasMC	1	nein	TRM	CCLowLev

2057	IncreasMC	1	nein	TRM	IncreasMC
2102	IncreasMC	1	nein	TRM	CCLowLev
1564	IncreasMC	2	nein	CR	CCLowLev
1639	IncreasMC	2	nein	Rez	IncreasMC
1376	IncreasMC	2	T-Zellen	Rez	IncreasMC
1118	IncreasMC	2	nein	Rez	CCLowLev
1902	IncreasMC	2	d42 CSA ab	Rez dann TRM	IncreasMC
1817	IncreasMC	2	nein	TRM	CCLowLev

Tabelle 3-7: Die Patienten, die in der RT-PCR-Methode einen ansteigenden Chimärismus zeigten mit Outcome und Chimärismusgruppe nach der STR-Methode (Chim STR).

Rez = Rezidiv, Rez n DL = Rezidiv nach Deadline. Die meisten Patienten, die auch in der STR-Methode ansteigende autologe Anteile gezeigt hatten, haben soweit möglich eine Immuntherapie erhalten.

3.2.5.4 Vollständiger Chimärismus (Complete Chimerism)

Die 19 Patienten, deren Chimärismus als vollständig aus Spenderanteilen bestehend beurteilt wurden, waren definitionsgemäß in der Risikogruppe 2. 13 von ihnen waren in vollständiger Remission, einer hat dennoch ein Rezidiv erlitten und 5 sind verstorben (TRM).

UPN	Chimärismus	Risikogruppe	Therapie	Outcome	Chim STR
1313	CC	2	nein	CR	CCLowLev
1506	CC	2	nein	CR	CCLowLev
1528	CC	2	nein	CR	CCLowLev
1677	CC	2	nein	CR	CCLowLev
1825	CC	2	nein	CR	CCLowLev
1865	CC	2	nein	CR	CCLowLev
1913	CC	2	nein	CR	CCLowLev
1945	CC	2	nein	CR	CCLowLev
1954	CC	2	nein	CR	CCLowLev
2087	CC	2	nein	CR	DecreasMC
2129	CC	2	nein	CR	CCLowLev
2164	CC	2	nein	CR	CCLowLev
2227	CC	2	nein	CR	CCLowLev
1559	CC	2	nein	Rez dann TRM	CCLowLev
1566	CC	2	nein	TRM	CCLowLev
1711	CC	2	nein	TRM	CCLowLev
2013	CC	2	nein	TRM	CCLowLev
1970	CC	2	nein	TRM	CCLowLev
1801	CC	2	nein	TRM	CCLowLev

Tabelle 3-8: Die Patienten, die in der RT-PCR-Methode einen vollständigen Chimärismus zeigten und ihr Outcome.

3.2.5.5 Gemischter Chimärismus (Mixed Chimerism)

Gemischter Chimärismus mit autologen Anteilen unter 0,5% betrifft 23 Patienten, die ebenfalls definitionsgemäß zur Risikogruppe 2 gehören. 17 von ihnen waren in vollständiger Remission (wobei einer ein Rezidiv nach der Deadline erlitten hat), zwei hatten ein Rezidiv, wovon eines im peripheren Blut nicht zu erkennen war und das andere durch einen schnellen Anstieg gekennzeichnet und somit nicht früher zu erkennen war. Vier Patienten sind im Rahmen der Transplantation (TRM) verstorben.

UPN	Chimärismus	Risikogruppe	Therapie	Outcome	Chim STR
1737	MC < 0,5 %	2	d93 CSA ab	CR	IncreasMC
1889	MC < 0,5 %	2	nein	CR	CCLowLev
2123	MC < 0,5%	2	nein	CR	CCLowLev
2180	MC < 0,5%	2	nein	CR	CCLowLev
2177	MC < 0,5%	2	nein	CR	CCLowLev
1980	MC < 0,5%	2	nein	CR	CCLowLev
1527	MC < 0,5%	2	nein	CR	CCLowLev
1638	MC < 0,5%	2	nein	CR	CCLowLev
2205	MC < 0,5%	2	nein	CR	CCLowLev
2050	MC < 0,5%	2	nein	CR	CCLowLev
1803	MC < 0,5%	2	nein	CR	CCLowLev
2277	MC < 0,5%	2	nein	CR	CCLowLev
1519	MC < 0,5%	2	nein	CR	CCLowLev
1910	MC < 0,5%	2	DLI d72+d84	CR	CCLowLev
2237	MC < 0,5%	2	nein	CR	CCLowLev
1755	MC < 0,5%	2	nein	CR	CCLowLev
2295	MC < 0,5%	2	nein	CR, Rez n DL, jetzt CR	CCLowLev
1806	MC < 0,5%	2	nein	Rez	CCLowLev
1282	MC < 0,5%	2	nein	Rez dann TRM	CCLowLev
2287	MC < 0,5%	2	nein	TRM	CCLowLev
2006	MC < 0,5%	2	nein	TRM	CCLowLev
1561	MC < 0,5%	2	nein	TRM	CCLowLev
1832	MC < 0,5%	2	nein	TRM	CCLowLev

Tabella 3-9: Patienten, die in der RT-PCR-Methode einen Chimärismus < 0,5% autologe Anteile zeigten und ihr Outcome.

18 Patienten der Risikogruppe 2 hatten einen gemischten Chimärismus mit autologen Anteilen unter 1%. Davon hat einer abgestoßen, 13 blieben in vollständiger Remission (zwei davon haben nach der Deadline rezidiert), 2 hatten ein Rezidiv und 2 sind verstorben.

UPN	Chimärismus	Risikogruppe	Therapie	Outcome	Chim STR
1909	MC < 1%	2	nein	Abstoßung dann TRM	CCLowLev
2299	MC < 1%	2	nein	CR	CCLowLev
2110	MC < 1%	2	DLI d93	CR	CCLowLev
1718	MC < 1%	2	nein	CR	CCLowLev
2041	MC < 1%	2	nein	CR	CCLowLev
2239	MC < 1%	2	nein	CR	CCLowLev
2304	MC < 1%	2	nein	CR	CCLowLev
2133	MC < 1%	2	nein	CR	CCLowLev
1285	MC < 1%	2	d1T-Zellen	CR	IncreasMC
1631	MC < 1%	2	nein	CR	CCLowLev
1671	MC < 1%	2	nein	CR	DecreasMC
2035	MC < 1%	2	nein	CR	CCLowLev
2319	MC < 1%	2	nein	CR, Rez n. DL	CCLowLev
2259	MC < 1%	2	nein	CR, Rez n. DL	CCLowLev
1471	MC < 1%	2	d30 T-Zellen	Rez	IncreasMC
2217	MC < 1%	2	nein	Rez, dann TRM	CCLowLev
2036	MC < 1%	2	nein	TRM	CCLowLev
1919	MC < 1%	2	nein	TRM	CCLowLev

Tabelle 3-10: Patienten, die in der RT-PCR-Methode einen Chimärismus < 1% autologe Anteile zeigten und ihr Outcome.

Es bestätigte sich also, dass ein vollständiger Chimärismus oder möglichst niedrige autologe Anteile von unter 1%, also unterhalb der Sensitivitätsgrenze der STR-Analyse, prognostisch günstig sind. Von den 60 Patienten in diesem Chimärismusbereich, blieben 43 (71,6%) in vollständiger Remission.

8 Patienten (jeweils 4 aus jeder Risikogruppe) hatten autologe Anteile unter 2%, davon befanden sich 5 in vollständiger Remission (ein Rezidiv nach der Deadline) und 3 Patienten sind verstorben.

UPN	Chimerismus	Risikogruppe	Therapie	Outcome	Chim STR
1277	MC < 2%	1	d70 CSA ab	CR	IncreasMC
2238	MC < 2%	1	nein	CR	CCLowLev
1661	MC < 2%	1	nein	TRM	CCLowLev
2214	MC < 2%	1	nein	TRM	CCLowLev
2077	MC < 2%	2	nein	CR	CCLowLev
2055	MC < 2%	2	nein	CR	CCLowLev
2043	MC < 2%	2	T-Zellen	CR, Rez n. DL	CCLowLev
1663	MC < 2%	2	nein	TRM	CCLowLev

Tabelle 3-11: Patienten, die in der RT-PCR-Methode einen Chimärismus < 2% autologe Anteile zeigten und ihr Outcome.

5 Patienten hatten hohe gemischte autologe Anteile, ein Patient aus Risikogruppe 2 hatte Anteile bis fast 6%, die anderen weit über 10%, ein Patient mit autologen Anteilen über 50% hat abgestoßen, die anderen 4 haben rezidiert, wovon einer ein zweites Mal transplantiert wurde.

UPN	Chimerismus	Risikogruppe	Therapie	Outcome	Chim STR
1803	MC > 50%	1	nein	Abstoßung	IncreasMC
2006	hoher MC	1	nein, 2. Tx.	Rez	IncreasMC
1412	hoher MC	1	nein	Rez	IncreasMC
1977	hoher MC	1	1xT-Zellen	Rez dann TRM	IncreasMC
1274	MC < 6%	2	T-Zellen	Rez dann TRM	IncreasMC

Tabelle 3-12: Patienten, die in der RT-PCR-Methode einen gemischten Chimärismus mit hohen autologen Anteilen von mindestens 5 % zeigten und ihr Outcome.

3.2.6 Vergleich mit der STR-Methode

Die RT-PCR-Methode erlaubt es, Chimärismusanalysen mit der selben Zuverlässigkeit durchzuführen, wie mit dem derzeitigen Goldstandard (STR-PCR). Autologe Anteile zwischen 0,1% und 1% lassen sich mit der neuen Methode reproduzierbar messen.

3.2.7 Vergleich der Einteilung in die Chimärismusgruppen

Die hier definierten Chimärismusgruppen orientieren sich an denen, die bereits von Bader et al [33] beschrieben wurden. Es zeigen sich allerdings deutliche Unterschiede bei der Einteilung der Patienten in die einzelnen Gruppen.

Chimärismus	SP (Sensitivität 0.1%)	STR (Sensitivität 1%)
n	148	
CC	68 ^a (45,9%)	91 (61,5%)
CC (<0.15)	19	-
MC (>0.1 <0.5%)	23	-
MC (>0.5 <1%)	18	-
MC (>1 <2%)	8	-
Decreasing MC	25 (16,9%)	14 (9,5%)
Increasing MC	50 (33,8%)	43 (29,0%)
Hoher MC (>5%)	5 (3,4%)	

Tabelle 3-13: Vergleich der Anzahl der Patienten in den Chimärismusgruppen in beiden Methoden.

^a Summe der Patienten in den Unterkategorien CC – MC < 2 % in der RT-PCR-Methode. Low Level MC = niedriger MC. Es wurden nur die Patienten berücksichtigt, die mit beiden Methoden untersucht wurden.

Erwartungsgemäß zeigt sich in der neuen Methode etwas häufiger ein ansteigender Chimärismus, aber noch wesentlich häufiger wird ein abnehmender Chimärismus beobachtet. Diese Signale in den frühen Proben, die dann abnehmen, sind in der STR Methode nicht gesehen worden. Der Anteil der Patienten, die als CC/ Low Level MC eingestuft wurden, ist in der RT-PCR-Methode deutlich niedriger (45,9%) als in der STR-Methode (61,5%).

Mit der STR-Methode werden 26 der 34 Rezidivpatienten (76,5%) als gefährdet, in die Gruppen Ansteigender MC oder Hoher MC, eingestuft, mit der RT-PCR-Methode werden 29 der 34 Rezidivpatienten (85,3%) als Ansteigender MC oder Hoher MC bewertet. 52,7% der Patienten die in der STR Methode als Increasing oder Hoher MC klassifiziert worden waren, haben ein Rezidiv erlitten, in der RT-PCR-Methode waren es 60%. Es werden hier nur die Rezidive bis zur Deadline am 01.05.2002 berücksichtigt.

3.2.7.1 Frühere Detektion der autologen Anteile mit Hilfe der RT-PCR-Methode?

Bei 39 der 122 (31,9%) Patienten, die keinen absteigenden Chimärismus zeigen, konnten mit Hilfe der RT-PCR-Methode autologe Anteile früher gesehen werden, als mit der STR-Methode, umgekehrt wurde bei 2 Patienten in der STR Methode früher ein autologes Signal

gesehen. Das heißt, es zeigten sich in der RT-PCR-Methode entweder zweimal in Folge ein Signal von größer 0,5% autologer Anteil oder einmal ein Signal größer 1%, während in der STR-Methode noch kein Signal von größer als 1% gesehen wurde. Umgekehrt zeigt die STR-Methode autologe Anteile früher, wenn hier ein Signal größer 1% gefunden wurde, dass in der STR-Methode zu diesem Zeitpunkt noch nicht gesehen wurde. 50 Patienten zeigen in der RT-PCR-Methode insgesamt steigende autologe Anteile, die bei 33 davon früher detektiert werden können. 18 der Patienten, die früher autologe Anteile zeigen, haben ein Rezidiv erlitten, davon 17 nachdem sie einen ansteigenden Chimärismus zeigten und einer mit einem gemischten Chimärismus bis ca. 6%. Ein Patient, dessen autologe Signale wir in der RT-PCR-Methode früher sehen, hat abgestoßen.

MC früher?	UPN	Outcome	Chimärismus	Risikogruppe	Therapie	Chim STR
ja	1882	TRM	IncreasMC	1	nein	CCLowLev
ja	1971	Abstoßung	IncreasMC	1	nein	IncreasMC
ja	2059	CR	IncreasMC	1	3xDLI	CCLowLev
ja	2057	CR	IncreasMC	1	d112 CSA ab	IncreasMC
ja	2196	CR	IncreasMC	1	d196 CSA ab	IncreasMC
ja	2064	CR	IncreasMC	1	d307 T-Zellen	CCLowLev
ja	2303	CR	IncreasMC	1	d52 T-Zellen	IncreasMC
ja	1623	CR	IncreasMC	1	nein	CCLowLev
ja	1504	CR	IncreasMC	1	nein	CCLowLev
ja	2101	CR	IncreasMC	1	nein	CCLowLev
ja	2238	CR	MC < 2%	1	nein	CCLowLev
ja	2041	CR	MC < 1%	2	nein	CCLowLev
ja	2077	CR	MC < 2%	2	nein	CCLowLev
ja	1965	CR, Rez n. DL	IncreasMC	1	ja (wann)	DecreasMC
ja	1720	CR	IncreasMC	1	nein	CCLowLev
ja	1564	CR	IncreasMC	2	nein	CCLowLev
ja	1776	Rez	IncreasMC	1	1xT-Zellen d60	IncreasMC
ja	2056	Rez	IncreasMC	1	2xT-Zellen	IncreasMC
ja	2171	Rez	IncreasMC	1	d30 T-Zellen,	IncreasMC
ja	2186	Rez	IncreasMC	1	d63 DLI	IncreasMC
ja	1969	Rez	IncreasMC	1	nein	CCLowLev
ja	1914	Rez	IncreasMC	1	nein	IncreasMC
ja	1762	Rez	IncreasMC	1	nein	IncreasMC
ja	1699	Rez	IncreasMC	1	nein	IncreasMC
ja	1639	Rez	IncreasMC	2	nein???	IncreasMC
ja	1118	Rez	IncreasMC	2	nein	CCLowLev
ja	1489	Rez dann TRM	IncreasMC	1	3x T-Zellen	IncreasMC

ja	2145	Rez dann TRM	IncreasMC	1	d43 CSA ab	IncreasMC
ja	1488	Rez dann TRM	IncreasMC	1	d55 CSA ab, d56 T-Zellen	IncreasMC
ja	1813	Rez dann TRM	IncreasMC	1	IL2, 3xDLI	IncreasMC
ja	1793	Rez dann TRM	IncreasMC	1	nein	IncreasMC
ja	1958	Rez dann TRM	IncreasMC	1	nein	IncreasMC
ja	2116	Rez dann TRM	IncreasMC	1	nein	IncreasMC
ja	1274	Rez dann TRM	MC < 6%	2	T-Zellen	IncreasMC
ja	2125	TRM	IncreasMC	1	3xSZ-Boost	CCLowLev
ja	2047	TRM	IncreasMC	1	d56 T-Zellen	IncreasMC
ja	2057	TRM	IncreasMC	1	nein	IncreasMC
ja	2102	TRM	IncreasMC	1	nein	CCLowLev
ja	1661	TRM	MC < 2%	1	nein	CCLowLev
ja	2214	TRM	MC < 2%	1	nein	CCLowLev

Tabelle 3-14: Die Patienten, bei denen man mittels der RT-PCR-Methode früher autologe Anteile erkennen konnte und ihr Outcome.

Bei 17 der 34 Rezidivpatienten (50,0%) und zwei Patienten, die abgestoßen haben, zeigen sich mittels der RT-PCR-Methode mit Hilfe der SPs früher autologe Signale, bei den übrigen 17 Rezidivpatienten steigen die autologen Anteile zeitgleich.

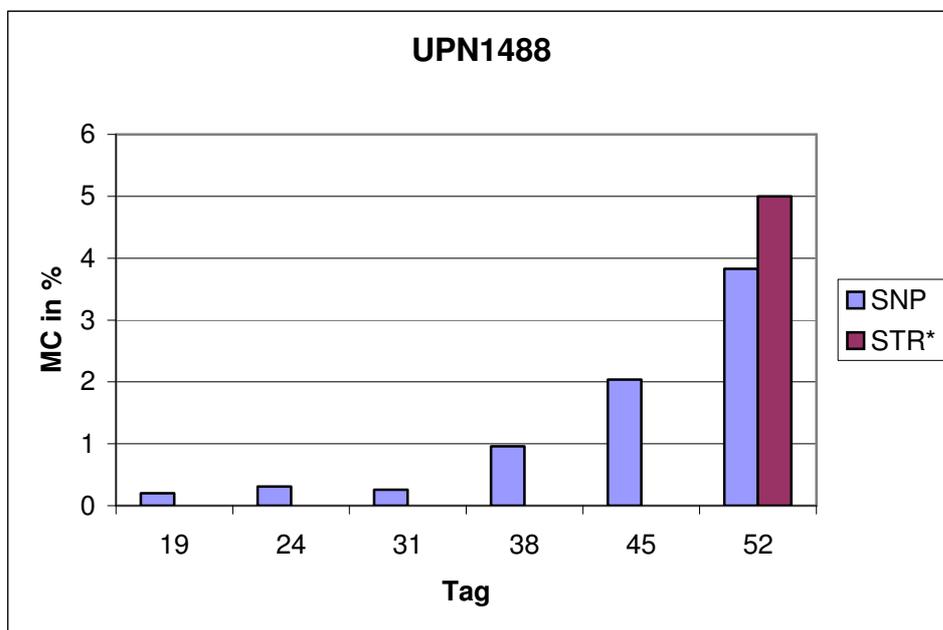


Abbildung 3-6: UPN 1488, Vergleich der Ergebnisse beider Methoden.

Bei diesem Patienten sieht man mit Hilfe der RT-PCR-Methode früher ein ansteigendes Signal. STR*, in der STR Methode werden Bereiche angegeben 1-5 %, 10 – 20 % und 30 – 40 %.

UPN	Chimärismus	Chim STR	Outcome	MC SNP	MC STR	Differenz
1971	IncreasMC	IncreasMC	Abstoßung	d27	d33	6
1803	MC > 50%	IncreasMC	Abstoßung	d19	d40	21
1118	IncreasMC	CCLowLev	Rlps	d77	d156	79
1776	IncreasMC	IncreasMC	Rlps	d18	d60	42
2171	IncreasMC	IncreasMC	Rlps	d27	d45	18
2186	IncreasMC	IncreasMC	Rlps	d34	d48	14
1914	IncreasMC	IncreasMC	Rlps	d21	d29	8
1762	IncreasMC	IncreasMC	Rlps	d131	d139	8
1699	IncreasMC	IncreasMC	Rlps	d14	d42	28
1639	IncreasMC	IncreasMC	Rlps	d22	d29	7
2273	IncreasMC	IncreasMC	Rlps	d126	d133	14
1489	IncreasMC	IncreasMC	Rlps, dann TRM	d26	d33	7
2145	IncreasMC	IncreasMC	Rlps, dann TRM	d48	d62	14
1488	IncreasMC	IncreasMC	Rlps, dann TRM	d38	d49	11
1813	IncreasMC	IncreasMC	Rlps, dann TRM	d132	d139	7
1793	IncreasMC	IncreasMC	Rlps, dann TRM	d140	d175	35
1958	IncreasMC	IncreasMC	Rlps, dann TRM	d17	d24	7
2116	IncreasMC	IncreasMC	Rlps, dann TRM	d174	d186	12
1274	MC < 6%	IncreasMC	Rlps, dann TRM	d106	d251	145

Tabelle 3-15: Frühere Messung gemischter autologer Anteile bei 19 Patienten, die rezidiert oder abgestoßen haben mit der RT-PCR-Methode. Die autologen Signale wurden im Mittel 25,4 Tage früher gesehen..

MC SNP: Tag, an dem mit der RT-PCR Methode erstmalig gemischte autologe Anteile >1% gemessen wurden, MC STR, Tag, an dem mit der STR-Methode erstmalig gemischte autologe Anteile >1% gemessen wurden, Differenz in Tagen.

Nur bei zwei der sechs Patienten, die nach der Deadline ein Rezidiv erlitten haben, wurden mit der RT-PCR-Methode früher autologe Signale gesehen. Bei einem der Patienten, bei denen vorher kein Anstieg detektiert werden konnte, ist der Abstand zwischen den Proben sehr lang (119 Tage).

Die beiden Patienten, bei denen wir zwar in der STR-Methode, nicht aber in der RT-PCR-Methode Signale sehen, befanden sich nach Immuntherapie zuletzt in vollständiger Remission.

3.3 Zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse

Zusammenfassend sollen die in der Einleitung gestellten Fragen mit Hilfe der gewonnenen Ergebnisse beantwortet werden:

1. Ist es möglich für alle Empfänger/Spender Paare einen informativen Sequenz Polymorphismus zu finden?

Es ist in 96% der Empfänger-/Spenderpaare möglich unter den 29 ausgewählten SPs mindestens einen geeigneten Marker zu finden und sicherlich wäre es möglich noch weitere Sequenz-Polymorphismen hinzu zu nehmen, falls die Informativität der 29 verwendeten nicht ausreichend ist.

2. Wie ist die Sensitivität der informativen Marker?

Es konnte in fast allen Experimenten eine Sensitivität von 0,1% erreicht werden, mit zunehmender experimenteller Erfahrung immer zuverlässiger, so dass man inzwischen ein Experiment, bei dem diese Sensitivität nicht erreicht worden wäre, wiederholen würde.

3. Wie ist die Anwendbarkeit der Real-Time PCR Methode in der täglichen Praxis?

Durch eine Vereinfachung der Methode mit einem optimierten Primerscreening, universellen Standardreihen und dem Einsatz von einer definierten Menge DNA-Lösung, die zumindest über einen weiten Bereich unabhängig ist von der enthaltenen Konzentration, lässt sich eine Laborroutine entwickeln, die ähnlich zeitaufwändig ist, wie der jetzige Goldstandard, die STR-Methode. Allerdings ist die RT-PCR-Methode derzeit noch deutlich teurer.

In dieser Arbeit zeigt sich, dass die Real-Time PCR mit Sequenz Polymorphismen als genetische Marker eine sehr sensitive Methode zur Erfassung autologer Anteile darstellt und in der praktischen Anwendbarkeit mit der bisherigen PCR-Methode mit Short Tandem Repeats zur Differenzierung vergleichbar ist.

4. Kann man mit der Real-Time PCR Methode eine höhere Sensitivität als mit der STR-Analyse erzielen, ohne dabei an Spezifität zu verlieren? Ist es damit möglich einen

ansteigenden Chimärismus früher zu diagnostizieren und somit früher darauf zu reagieren?

Häufig lassen sich autologe Signale früher detektieren. Dadurch werden auch mehr Patienten als gefährdet eingestuft. Vor allem Patienten, die zweimal oder öfter in Folge einen gemischten Chimärismus von größer als 0,5% aufweisen (und sich nicht in der Phase eines abnehmenden Chimärismus befinden) müssen genau beobachtet und engmaschig kontrolliert werden. Bei einer ansteigenden Dynamik ist es häufig sinnvoll, eine Immuntherapie einzuleiten. Nur bei zwei der Patienten verschwinden die autologen Signale von alleine wieder.

4 Diskussion

Allogene Stammzelltransplantation wird mit wachsendem Erfolg zur Behandlung von Patienten mit malignen und nicht-malignen hämatologischen Erkrankungen eingesetzt. [6] Obwohl akute lymphatische Leukämien im Kindesalter in über 70% der Fälle mit einer Chemotherapie entsprechend dem BMF-Protokoll geheilt werden können, ist bei Hochrisiko- und Rezidivpatienten eine Stammzelltransplantation die letzte Möglichkeit eine Heilung zu erreichen. [5] Dabei ist die Unterscheidung zwischen der Hämatopoese durch Stammzellen des Spenders oder durch verbliebene Stammzellen des Spenders bedeutend für die Beurteilung des Engraftment Prozesses. [67] Des Weiteren ermöglicht es die regelmäßige, engmaschige Kontrolle des hämatopoetischen Chimärismus, einen Teil der Patienten zu identifizieren, die Gefahr laufen, ein Rezidiv ihrer Grunderkrankung zu erleiden. [36] Trotz kontroverser Diskussion [68] ist es doch gemeinhin anerkannt, dass Patienten mit steigenden gemischten autologen Anteilen ein erhöhtes Risiko haben, ein Rezidiv zu erleiden. [33, 35-37] Durch eine frühzeitig eingeleitet Immuntherapie, lässt sich dieser unerwünschte Verlauf möglicherweise abwenden [8, 38-43], daher ist es wünschenswert, die Patienten mit einem ansteigenden Chimärismus möglichst schnell und zuverlässig zu erkennen. Bisher stellt die Quantifizierung der autologen Anteile mittels einer PCR-Methode, die Short Tandem Repeats (STR) als genetische Marker verwendet, auf Grund ihrer hohen Zuverlässigkeit und guten praktischen Durchführbarkeit, den Goldstandard dar. [45-48] Die Einschränkung der STR-Methode besteht in ihrer geringen Sensitivität, erst autologe Anteile von über 1 % lassen sich zuverlässig reproduzierbar detektieren. Seit einigen Jahren wird postuliert, dass auf RT-PCR basierende Messmethoden autologe Anteile ab 0,1% zuverlässig erfassen und somit steigende autologe Anteile noch früher wahrnehmen können. [52-55] Gerade in der frühen Posttransplantationsphase, in der die Zellzahl häufig noch niedrig ist, lassen sich mit der RT-PCR autologe Anteile sehr empfindlich nachweisen. Zahlreiche Veröffentlichungen sind erschienen, die versuchen an Testpopulationen oder einem kleinen Patientenkollektiv die Überlegenheit der RT-PCR-Methode darzustellen. [52-55, 69] In dieser Arbeit wurde zum einen die Zuverlässigkeit und Sensitivität der neuen RT-PCR-Methode mit beschriebenen Sequenzpolymorphismen [52-54] als genetische Marker an einem großen Patientenkollektiv untersucht und statistisch ausgewertet, zum anderen wurden die mit dieser neuen Methode erhaltenen Ergebnisse kritisch auf ihre Vergleichbarkeit und Unterschiede zu den bekannten Ergebnissen der STR-Analysen untersucht.

4.1 Statistische Bewertung der Methode

Die statistische Bewertung der Methode erfolgte im Rahmen einer größeren Untersuchung in der außer den Proben von 156 ALL-Patienten noch die von 70 AML-Patienten, 60 MDS-Patienten und 31 Patienten mit einer JMML nach allogener Stammzelltransplantation betrachtet wurden. Sinnvollerweise wurden die gesamten Ergebnisse dieser größeren Studie zur statistischen Auswertung der neuen Methode, die Bestimmung autologer Anteile mit Hilfe der SP-Real Time PCR, verwendet [65].

4.1.1 Informativität der genetischen Marker

Das verwendete System mit 29 SP-Markern, die von Alizadeh et al.[52] und Maas et al. [53, 54] beschrieben worden waren, erlaubt die Unterscheidung des Empfängergenoms in 96 % der untersuchten Empfänger/Spenderpaare unabhängig von der geschlechtlichen Kombination. Wie zu erwarten war, ist es einfacher für nicht verwandte Empfänger/Spenderpaare (98,3%) einen geeigneten Marker zu finden. Durch die Kombination der Primer Sets wurde es möglich, 96% der Empfänger/Spenderpaare genetisch zu unterscheiden, zuvor waren ungefähr 90% erreicht worden. [52-54] Es ist mittels der STR-Methode derzeit möglich alle Empfänger/Spenderpaare zu unterscheiden, um dieses Ziel auch für die RT-PCR mit SP-Markern zu erreichen, werden noch weitere Marker untersucht werden müssen.

Es ist aber im Rahmen dieser Arbeit gelungen, das verwendete System soweit zu optimieren, dass mit deutlich geringerem Screeningaufwand bereits eine sehr hohe Informativität erzielt werden kann. [65]

4.1.2 Sensitivität der RT-PCR-Methode

In 83,3% konnte mit der RT-PCR-Methode, wie auch in der Literatur beschrieben, eine Sensitivität von $\leq 0,1\%$ erreicht werden. [53, 69] In den übrigen Fällen konnte immerhin eine Sensitivität von 1% erreicht werden. Das bedeutet, dass autologe Signale mit der neuen Methode meist zehnfach bis hundertfach sensitiver, auf jeden Fall aber mindestens genauso sensitiv erfasst werden, wie mit der STR-Methode, die bisher den Goldstandard darstellt.

4.1.3 Genauigkeit der Messung

Die Genauigkeit der Methode ist vor allem in den entscheidenden Bereichen niedriger und sehr niedriger autologer Signale sehr hoch. Diese Methode misst autologe Signale in den Bereichen 0 – 0,5% (CI 95% +/- 0,2), von 0,5 – 1% (CI 95% +/- 0,4), von 1 – 2% (CI 95% +/- 0,6) und von 2 – 5% (CI 95% +/- 1,2; Tabelle 3.3) unabhängig von der eingesetzten DNA-Menge. Die größere Messungengenauigkeit bei Signalen über 5 % autologe Anteile liegt in der Methode der RT-PCR begründet und wurde bereits von anderen Autoren beschrieben. [52-54] Bei einem gemischten Chimärismus über 5% ist die STR-Methode weiterhin deutlich zuverlässiger. [2, 46, 48, 50, 70] Das ist aber insofern für diese Analyse unproblematisch, da hier besonders der Bereich niedriger autologer Anteile und deren Dynamik interessant ist.

Basierend auf den Ergebnissen, die in Tabelle 3-3 zusammengefasst werden, ist es möglich, einen Anstieg oder eine Abnahme des autologen Anteils in aufeinander folgenden Proben als statistisch signifikant zu bewerten. Das schafft eine Grundlage für die zuverlässige Bewertung der dynamischen Entwicklung, vor allem in dem Bereich niedriger autologer Anteile. Es hat sich gezeigt, dass die RT-PCR weniger störanfällig ist, da hier nicht unterschiedlich lange Sequenzen während der Amplifikation miteinander konkurrieren. [69]

4.2 Auswertung der ALL-Patienten

Die Herausforderung bei der Auswertung bestand darin, die retrospektiv erhaltene Datenflut auf Hinweise eines drohenden Rezidivs hin auszuwerten, ohne zuviel Beachtung auf die Hintergrundsignale zu legen und ohne sich zu sehr von dem bekannten Outcome beeinflussen zu lassen. Bei fast allen Patienten gibt es Proben, die ein Signal von bis zu 0,5% autologen Anteil zeigen. Messungen von Plasma zeigten keinerlei autologe Anteile, so dass ausgeschlossen werden kann, dass diese Signale möglicherweise durch Hautzellen bei der Blutentnahme entstehen, während die isolierten, gereinigten Subpopulationen auch geringe autologe Anteile besitzen (A. Willasch, pers. Information). Die aus Knochenmark gewonnenen Proben zeigen häufig höhere autologe Anteile [55], die, obwohl sie oft mehr als 1% betragen, in der STR-Methode nicht gesehen worden sind.

4.2.1 Einteilung der Patienten

Da die wenigsten Patienten tatsächlich durchgehend einen vollständigen Chimärismus aufweisen können, sondern fast alle Patienten zumindest einige Proben mit autologen Anteilen besitzen, haben wir einen Grenzwert gesucht, ab dem wir zumindest besondere Beobachtung für notwendig halten. Die große Mehrheit der Proben zeigt autologe Anteile unter 0,5%, so dass wir dies als den Grenzwert gewählt haben. Patienten, die diesen Grenzwert nach Tag 21 zweimal in Folge überschritten haben, wurden daher in die Risikogruppe 1, die übrigen in die Risikogruppe 2 eingeteilt. Es zeigte sich, dass die Patienten in der Risikogruppe 1 tatsächlich ein höheres Risiko tragen, ein Rezidiv zu erleiden (38,7%), als die Patienten in Risikogruppe 2 (11,6%). Eine Analyse mittels eines χ^2 -Tests zeigt, dass dieses Ergebnis statistisch signifikant ist.

Da es aber auch in der Risikogruppe 2 Rezidive gibt, darf diese Unterteilung nicht das einzige Kriterium sein, um gefährdete Patienten zu identifizieren und zu behandeln, weitere wichtige Faktoren sind eine ansteigende Dynamik oder Einzelproben mit sehr hohen autologen Anteilen. Dennoch wird es mit keiner Methode möglich sein, alle Rezidivpatienten rechtzeitig zu erkennen [33, 50, 65, 70-75], da sich gerade bei akuten Leukämien der Rückfall innerhalb weniger Tage entwickeln kann [33] und nicht immer im peripheren Blut zu erkennen ist.

Abnehmender Chimärismus (Decreasing Chimerism) ist ein Phänomen, das häufig beobachtet wird. Es zeigte sich allerdings, dass in der SP-Methode im Verlauf der Abnahme immer wieder deutliche Wiederanstiege zu beobachten sind (siehe Abbildung 3-5), die man engmaschig kontrollieren und sehr kritisch bewerten sollte.

Mit der RT-PCR-Methode zeigt sich häufiger ein abnehmender Chimärismus, da die verbliebenen autologen Anteile in den frühen, oft zellarmen Proben besonders ins Gewicht fallen. Ein abnehmender Trend der autologen Anteile ist sehr erfreulich, prognostisch günstig und möglicherweise ein Anzeichen einer Graft-versus-Leukemia-Reaktion. Wichtig ist der weitere Verlauf nach der erfolgten Abnahme.

Vollständiger Chimärismus (Complete Chimerism) wird mit der hochsensitiven RT-PCR-Methode im Gegensatz zur STR-Methode nur selten beobachtet, ist aber, wenn ein Patient so eingestuft werden kann, prognostisch sehr günstig

Gemischter Chimärismus (Mixed Chimerism) mit niedrigen autologen Anteilen ist ebenfalls prognostisch günstig, wobei man da immer auf eine ansteigende Dynamik achten muss. Die Mehrheit der Patienten mit vollständigen Chimärismus oder geringen autologen Anteilen von kleiner 1%, befanden sich zuletzt in vollständiger Remission (43 von 60 Patienten, 71,6 %).

Hohe autologe Anteile von mehr als 5% hingegen sind ungünstig und deuten auf ein Rezidiv oder eine Abstoßung hin.

Ansteigender Chimärismus (Increasing Chimerism) bedeutet das größte Risiko, ein Rezidiv zu erleiden. [33, 35-37] Möglicherweise reduzieren gemischte autologe Anteile den Graft-versus-Leukemia Effekt. [76, 77] 25 der 34 Rezidivpatienten zeigen zuvor ansteigende autologe Signale, 4 zeigen einen hohen gemischten Chimärismus und nur 5 Patienten rezidierten nachdem sie zuvor keine oder nur geringe autologe Anteile aufwiesen. Bei der Chimärismusanalyse mit der RT-PCR-Methode zeigen geringfügig mehr Patienten (33,6%, 50 Patienten) ansteigende autologe Anteile als bei der STR-Analyse (28,9%, 43 Patienten). Von den 17 Patienten, die sich trotz steigender autologer Anteile in vollständiger Remission befanden, haben 12 eine Immuntherapie erhalten.

4.3 Vergleich mit der STR-Methode

Wie erwartet stimmen die Ergebnisse in beiden Methoden gut überein, wobei die RT-PCR-Methode niedrige autologe Signale empfindlicher erfasst. [52-54, 61, 65, 69] Daher findet sich häufiger ein ansteigender Chimärismus als in der STR-Methode. Noch häufiger sehen wir autologe Signale in den frühen Proben, die dann abnehmen. Ein Grund dafür, dass diese Signale mittels der STR-Methode nicht detektiert wurden, obwohl sie in der RT-PCR-Methode häufig weit über 1% betragen ist, dass die frühen Proben oft wenig Zellen und somit wenig DNA enthalten. Der Anteil der Patienten, die als CC / LowLevel MC eingestuft werden können, ist in der RT-PCR-Methode geringer (45,9%) als in der STR-Methode (61,5%). Ein Vorteil der SP-RT-PCR-Methode ist, dass sie mit sehr wenig Ausgangs-DNA auskommt.

Durch die RT-PCR-Methode werden etwas mehr Rezidivpatienten (85,3%) als gefährdet (Increasing oder Hoher MC) eingestuft, als in der STR-Methode (76,5%), es werden aber auch mehr Patienten als gefährdet eingestuft, die kein Rezidiv erlitten haben (49% in der RT-PCR-Methode gegen 40 % in der STR-Methode). Allerdings haben insgesamt 38 Patienten

eine Immuntherapie erhalten, darunter auch welche, die mittels der STR Methode als nicht gefährdet eingestuft worden waren, sicher unter klinischen Gesichtspunkten.

4.3.1 Lassen sich mit der RT-PCR-Methode autologe Signale früher detektieren?

Bei 39 der 122 Patienten, die nicht als absteigend klassifiziert wurden, zeigt die RT-PCR früher Signale. 17 von ihnen haben ein Rezidiv erlitten, 16 nachdem sie zuvor ansteigende autologe Signale zeigten, und ein Patient hatte immer wieder gemischte autologe Anteile über 5%. 2 Patienten, bei denen mit der RT-PCR-Methode früher autologe Signale zu sehen sind, haben abgestoßen. Bei 17 der 34 Rezidivpatienten (50%) hätte die RT-PCR früher autologe Anteile gezeigt. Umgekehrt zeigen sich bei zwei Patienten in der STR-Methode autologe Anteile, die in der SP-Analyse nicht zu detektieren sind, die beiden Patienten waren nach Immuntherapie in vollständiger Remission.

Von den 17 Patienten, die trotz steigender autologer Anteile in der RT-PCR-Analyse zuletzt in vollständiger Remission befanden, haben 12 eine Immuntherapie erhalten. 5 der Patienten, die keine Immuntherapie erhalten hatten, da sie in der STR-Methode nicht als gefährdet eingestuft worden waren, befanden sich zur Deadline in vollständiger Remission und bei zweien davon sanken die autologen Anteile im Gegensatz zu den Erfahrungen aus der STR-Analyse [33] von selbst wieder. Leider kann man in der Nachbeobachtung eines Patienten nicht abwarten ob das geschieht. Einer der Patienten, dessen autologe Anteile persistierten, hat ein spätes Knochenmark- und Hodenrezidiv erlitten, es sind aber leider keine Proben aus diesem Zeitraum vorhanden. Bei zwei Patienten sind keine weiteren Proben mehr gefolgt und es war trotz Nachfrage in den Kliniken keine neuere Information über das Schicksal der beiden Patienten zu erhalten.

Einer der Rezidivpatienten, bei denen die RT-PCR kein früheres Signal zeigt, hatte nur zwei Proben mit hohen autologen Signalen bis zum Rezidiv. Bei 2 weiteren waren die Abstände zwischen den Proben zu lang, bei einem anderen fehlen leider die Proben vor dem Anstieg. Bei vier Patienten erfolgte der Anstieg so schnell, dass er nicht früher zu detektieren war.

Es ist schwierig in diesem retrospektiv betrachteten Patientenkollektiv eine Aussage zu treffen, wie viele Tage früher im Durchschnitt autologe Signale detektiert werden können, da

zu einem die Proben nicht immer so regelmäßig eingetroffen sind, wie gefordert und zum anderen die Verläufe sehr individuell sind. Häufig zeigen sich mit Hilfe der SPs autologe Signale, die mit der STR-Methode zu keiner Zeit gesehen wurden. Teilweise fehlen auch wichtige Proben. Dennoch lässt sich sagen, dass bei den 19 Patienten, deren Signale in der RT-PCR früher gesehen werden und die ein Rezidiv erlitten oder abgestoßen haben, die Signale im Durchschnitt 25,4 Tage früher gesehen wurden, wobei die Spannweite hier von 6 bis zu 145 Tagen reicht. Das stimmt gut mit den Ergebnissen der AML und JMML Patienten überein, bei denen die autologen Signale im Mittel 21 Tage früher gesehen wurden. [78]

Allerdings zeigt es sich, dass die RT-PCR-Methode mit Hilfe von SPs autologe Signale häufig zuverlässiger und früher anzeigt [52-54, 65, 69], als die bisherige STR-Methode, man darf aber nicht vergessen, dass sich auch die STR-Methode immer weiter verbessert.

Um die tatsächliche Gefährdung eines Patienten ein Rezidiv zu erleiden mit der RT-PCR-Methode zu ermitteln, sind mehrere Faktoren in Betracht zu ziehen: Die Einteilung in die Risikogruppe, der absolute Prozentanteil, wie auch die Entwicklung gemischter autologer Anteile und natürlich, wie es jetzt auch schon getan wird, die Klinik des Patienten. Und sie muss, wie auch die STR-Methode durch weitere wichtige Untersuchungen wie der Analyse der Minimalen Resterkrankung (MRD) ergänzt werden. [34, 79, 80]

Zur Prüfung der Vergleichbarkeit der beiden Methoden, bzw. der Überlegenheit einer der beiden Analysen, wäre eine großangelegte prospektive Studie indiziert.

4.4 Anwendbarkeit der Real-Time PCR Methode in der täglichen Praxis

4.4.1 Vereinfachtes Markerscreening

Um die RT-PCR-Methode in die Praxis zu übernehmen, ließe sich zunächst das Screening nach einem geeigneten Marker einfacher, effektiver und kostengünstiger gestalten. Im Falle eines männlichen Empfängers und eines weiblichen Spenders könnte sogar ganz darauf verzichtet und der Marker S02, der auf dem Y-Chromosom liegt, verwendet werden.

Mit einer Kombination von 13 ausgewählten Markern kann eine Informativität von 90%, mit 9 SPs kann bereits eine Informativität von 80% erreicht werden, so dass man auf einer 96-

well-Platte parallel fünf Spender-/Empfängerpaare screenen könnte. Vorbereitete Platten lassen sich mit Folie bedeckt im Kühlschrank bis zu zwei Wochen lagern.

4.4.2 Verwendung von Standardreihen

Durch die Verwendung von Standardreihen aus künstlichen DNA Mischungen gesunder freiwilliger Spender, die in größerer Menge hergestellt und gelagert werden können, wurde zum einen eine hohe Reproduzierbarkeit, zum anderen eine Vereinfachung der Methode erreicht. Der zunächst beschriebene Weg [50], die Standardreihen aus den Vorproben von den jeweiligen Spender und Empfänger herzustellen, wäre für die tägliche Routine nicht praktikabel gewesen: Erstens wäre dies zu arbeitsaufwändig, und zweitens würde sehr viel Spender und Empfänger-DNA dazu benötigt.

4.4.3 Einsatz einer bestimmten Menge an DNA-Lösung

Die RT-PCR-Methode lässt sich in der täglichen Laborroutine dadurch noch weiter vereinfachen, dass eine bestimmte Menge DNA-Lösung, ungeachtet der Konzentration, eingesetzt wird. Die eingesetzte DNA-Menge wird per Albumin Assay überprüft und das erhaltene autologe Signal wird normalisiert, so dass eine Probe wiederholt werden kann, falls sie zu viel oder zu wenig DNA enthalten haben sollte, wobei sich die Quantifizierung über drei Log-Stufen linear zeigte [65]. Für diese wissenschaftliche Untersuchung war es allerdings notwendig, möglichst immer gleiche DNA-Mengen einzusetzen.

Es ist also möglich, eine Routine für die RT-PCR-Methode zu entwickeln, die ähnlich aufwendig aber deutlich empfindlicher ist, wie die derzeit angewendete STR-Methode.

5 Zusammenfassung

Nach einer erfolgten Stammzelltransplantation im Rahmen einer Leukämie sollte in regelmäßigen Abständen der hämatopoetische Chimärismus untersucht werden, da ansteigende autologe Anteile einem Rezidiv häufig voran gehen. [33, 35-37] Es wurde in den letzten Jahren beschrieben [50, 52, 54, 55, 81], dass Sequenzpolymorphismen (SPs) als hochempfindliche Marker für die Chimärismusanalyse fungieren können. Durch sie würde eine deutlich höhere Sensitivität erzielt werden, als mit der bisher verwendeten Methode, die Short Tandem Repeats als Marker zur Diskriminierung von Spender und Empfänger benutzt.

Ziel dieser Arbeit war es, die Proben von Kindern, die nach einer ALL eine Stammzelltransplantation erhalten hatten, und die bereits mit der STR-Methode untersucht worden waren, mit der RT-PCR-Methode in Hinblick auf die in der Einleitung gestellten Fragen, erneut zu analysieren.

Es ist in 96 % der Empfänger-/Spenderpaare möglich unter den 29 ausgewählten SPs mindestens einen geeigneten Marker zu finden und sicherlich wäre es möglich noch weitere Sequenz-Polymorphismen hinzu zu nehmen, falls die Informativität der 29 verwendeten nicht ausreichend ist.

Es konnte in fast allen Experimenten eine Sensitivität von 0,1 % erreicht werden, mit zunehmender experimenteller Erfahrung immer zuverlässiger, so dass man inzwischen ein Experiment, bei dem diese Sensitivität nicht erreicht wird, wiederholen würde.

Durch eine Vereinfachung der Methode mit einem optimierten Primerscreening, universellen Standardreihen und dem Einsatz von einer definierten Menge DNA-Lösung, die zumindest über einen weiten Bereich unabhängig ist von der enthaltenen Konzentration, lässt sich eine Laborroutine entwickeln, die ähnlich zeitaufwändig ist, wie der jetzige Goldstandard, die STR-Methode. Allerdings ist die RT-PCR-Methode derzeit noch deutlich teurer.

In dieser Arbeit zeigt sich, dass die Real-Time PCR mit Sequenz Polymorphismen als genetische Marker eine sehr sensitive Methode zur Erfassung autologer Anteile darstellt und in der praktischen Anwendbarkeit mit der bisherigen PCR-Methode mit Short Tandem Repeats zur Differenzierung vergleichbar ist.

Häufig lassen sich autologe Signale früher detektieren. Dadurch werden auch mehr Patienten als gefährdet eingestuft. Vor allem Patienten, die zweimal oder öfter in Folge einen gemischten Chimärismus von größer als 0,5 % aufweisen (und sich nicht in der Phase eines abnehmenden Chimärismus befinden) müssen genau beobachtet und engmaschig kontrolliert werden. Bei einer ansteigenden Dynamik ist es häufig sinnvoll, eine Immuntherapie einzuleiten. Nur bei zwei unserer Patienten verschwanden die autologen Signale von alleine wieder.

Bei 50 % der Rezidivpatienten und bei 2 der 3 Patienten, die abgestoßen haben, sieht man mit der RT-PCR-Methode früher autologe Signale.

Es wäre jetzt in einem nächsten Schritt nötig, bei einem ausreichend großen Patientenkollektiv beide Methoden parallel in einer prospektiven Studie miteinander zu vergleichen.

6 Abstract

Post-transplant monitoring of chimerism allows detection of impending relapse in many patients thus providing the basis for immunotherapy. It has been recently published that SP-PCR chimerism monitors dynamics of autologous cells with high sensitivity (quantifiable limit $1E-4$ to $1E-3$) and reproducibility. This principally offers the possibility of earlier and more frequent diagnosis of ongoing relapse.

To substantiate this, we retrospectively performed SP-chimerism in a multicenter study in 148 children with ALL after allo-SCT, who have formerly been analysed by STR-PCR.

The overall informativity of recipient genotype discrimination was found to be 96%. Nearly all quantification assays reached a sensitivity of at least 10^{-3} (0,1 %). Taken together, the presented SP systems for qPCR provide high informativity and sensitivity together with an excellent reproducibility and accuracy in order to perform quantitative chimerism analysis for virtually all patients. Analyses can now be done on a routine daily basis since primer screening can be performed with a manageable number of SP markers. Quantification of chimerism is reliably possible when applying marker-specific standard dilution series from healthy volunteers. Moreover, this allows a fast performance of the assay.

SP-PCR based chimerism is feasible and reliable for post-transplant monitoring in ALL. Compared to STR-, the SP-PCR method allowed the diagnosis of significant MC more frequently (8.8%) and earlier (50%) in relapsed patients. However the fact, that significant MC could be detected in some patients, who never relapsed, has to be kept in mind.

Finally, this system can be the platform to conduct large prospective studies to evaluate whether SP-qPCR is superior to STR-PCR in terms of clinical impact of chimerism.

7 Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Die drei Phasen der Real-Time PCR Kurve.	9
Abbildung 1-2: Links: Real Time - PCR-Kurven für verschiedene DNA - Ausgangskonzentrationen Je höher die Konzentration an Target um so niedriger der CT-Wert. Rechts: Standard Amplifikationskurve	10
Abbildung 2-1: Pipettierschema für das SP Screening	16
Abbildung 2-2: Pipettierschema Quantifizierung	19
Abbildung 3-1: Kumulative Informativität der verwendeten genetischen Marker (erstellt von Dr. G. Schneider)	25
Abbildung 3-2: Standard Amplifikationskurven für die Marker S08b, S11b, S07a und S04b.	27
Abbildung 3-3: Genauigkeit der Messung (erstellt von Dr. G. Schneider).....	28
Abbildung 3-4: Patienten der Risikogruppe 1 besitzen ein signifikant höheres Risiko ein Rezidiv zu erleiden.....	33
Abbildung 3-5: Absteigender Chimärismus mit und ohne Wiederanstieg während der Abnahme	34
Abbildung 3-6: UPN 1488, Vergleich der Ergebnisse beider Methoden.....	43

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Verwendete Primer und Probes	13
Tabelle 3-1: Patienten und Proben zur statistischen Bewertung der Methode.....	24
Tabelle 3-2: Validität und Sensitivität der Methode	26
Tabelle 3-3: Standardabweichungen und 95%-Konfidenzintervalle der gemessenen autologen Signale.....	28
Tabelle 3-4: Auswertung der ALL-Patienten.....	32
Tabelle 3-5: Outcome der Patienten aus den beiden Risikogruppen	33
Tabelle 3-6: Die Patienten, die in der RT-PCR-Methode einen abnehmenden Chimärismus zeigten mit Outcome und Chimärismusgruppe nach der STR-Methode (Chim STR). ...	35
Tabelle 3-7: Die Patienten, die in der RT-PCR-Methode einen ansteigenden Chimärismus zeigten mit Outcome und Chimärismusgruppe nach der STR-Methode (Chim STR). ...	37
Tabelle 3-8: Die Patienten, die in der RT-PCR-Methode einen vollständigen Chimärismus zeigten und ihr Outcome.	37

Tabelle 3-9: Patienten, die in der RT-PCR-Methode einen Chimärismus < 0,5% autologe Anteile zeigten und ihr Outcome.	38
Tabelle 3-10: Patienten, die in der RT-PCR-Methode einen Chimärismus < 1% autologe Anteile zeigten und ihr Outcome.	39
Tabelle 3-11: Patienten, die in der RT-PCR-Methode einen Chimärismus < 2% autologe Anteile zeigten und ihr Outcome.	39
Tabelle 3-12: Patienten, die in der RT-PCR-Methode einen gemischten Chimärismus mit hohen autologen Anteilen von mindestens 5 % zeigten und ihr Outcome.....	40
Tabelle 3-13: Vergleich der Anzahl der Patienten in den Chimärismusgruppen in beiden Methoden.....	41
Tabelle 3-14: Die Patienten, bei denen man mittels der RT-PCR-Methode früher autologe Anteile erkennen konnte und ihr Outcome.	43
Tabelle 3-15:Frühere Messung gemischter autologer Anteile bei 19 Patienten, die rezidiert oder abgestoßen haben mit der RT-PCR-Methode. Die autologen Signale wurden im Mittel 25,4 Tage früher gesehen..	44

Literaturverzeichnis

- (1) Borgmann A, von Stackelberg A, Hartmann R, Ebell W, Klingebiel T, Peters C, et al. Unrelated donor stem cell transplantation compared with chemotherapy for children with acute lymphoblastic leukemia in a second remission: a matched-pair analysis. *Blood* 2003 May 15;101(10):3835-9.
- (2) de Weger RA, Tilanus MG, Scheidel KC, van den Tweel JG, Verdonck LF. Monitoring of residual disease and guided donor leucocyte infusion after allogeneic bone marrow transplantation by chimaerism analysis with short tandem repeats. *Br J Haematol* 2000 Sep;110(3):647-53.
- (3) O'Reilly J, Meyer B, Stoner M, Erber W, Herrmann R, Davies J. Very early analysis of graft establishment after allogeneic bone marrow transplantation using the polymerase chain reaction. *Br J Haematol* 1993 Sep;85(1):169-72.
- (4) van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grumayer ER, Biondi A, Pongers-Willems MJ, Corral L, et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet* 1998 Nov 28;352(9142):1731-8.
- (5) Chessells JM. Recent advances in management of acute leukaemia. *Arch Dis Child* 2000 Jun;82(6):438-42.
- (6) Thomas ED. Bone marrow transplantation: a review. *Seminars in Hematology* 1999 Oct;36:95-103.
- (7) Thomas ED, Blume K.G., Forman SJ. Hematopoietic cell transplantation. 2nd edition ed. Blackwell Science, Inc.; 1999.
- (8) Sosman JA, Sondel PM. The graft-vs.-leukemia effect. Implications for post-marrow transplant antileukemia treatment. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1993 May;15(2):185-95.
- (9) Weiden PL, Flournoy N, Thomas ED, Prentice R, Fefer A, Buckner CD, et al. Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *N Engl J Med* 1979 May 10;300(19):1068-73.
- (10) Offit K, Burns JP, Cunningham I, Jhanwar SC, Black P, Kernan NA, et al. Cytogenetic analysis of chimerism and leukemia relapse in chronic myelogenous leukemia patients after T cell-depleted bone marrow transplantation. *Blood* 1990 Mar 15;75(6):1346-55.
- (11) Sparkes R. Cytogenetic analysis in human bone marrow transplantation. *Cancer Genet Cytogenet* 1981;4:345-52.
- (12) Schattenberg A, de Witte T, Salden M, Vet J, Van Dijk B, Smeets D, et al. Mixed hematopoietic chimerism after allogeneic transplantation with lymphocyte-depleted bone marrow is not associated with a higher incidence of relapse. *Blood* 1989 Apr;73(5):1367-72.

-
- (13) Schaap N, Schattenberg A, Bar B, Mensink E, de Man A, Geurts vK, et al. Red blood cell phenotyping is a sensitive technique for monitoring chronic myeloid leukaemia patients after T-cell-depleted bone marrow transplantation and after donor leucocyte infusion. *Br J Haematol* 2000 Jan;108(1):116-25.
 - (14) Casarino L, Carbone C, Capucci MA, Izzi T, Ferrara GB. Analysis of chimerism after bone marrow transplantation using specific oligonucleotide probes. *Bone Marrow Transplant* 1992;10:165-70.
 - (15) Knowlton RG, Brown VA, Braman JC, Barker D, Schumm JW, Murray C, et al. Use of highly polymorphic DNA probes for genotypic analysis following bone marrow transplantation. *Blood* 1986;68:378-85.
 - (16) Yam PY, Petz LD, Knowlton RG, Wallace RB, Stock AD, de Lange G, et al. Use of DNA restriction fragment length polymorphisms to document marrow engraftment and mixed hematopoietic chimerism following bone marrow transplantation. *Transplantation* 1987 Mar;43(3):399-407.
 - (17) Brunet S, Casals T, Madoz P, Aventin A, Muniz E, Baiget M. DNA polymorphisms as implant markers in allogeneic bone marrow transplantation. Preliminary evaluation. *Med Clin (Barc)* 1989;93:765-71.
 - (18) Kogler G, Wolf HH, Heyll A, Arkesteijn G, Wernet P. Detection of mixed chimerism and leukemic relapse after allogeneic bone marrow transplantation in subpopulations of leucocytes by fluorescent in situ hybridization in combination with the simultaneous immunophenotypic analysis of interphase cells. *Bone Marrow Transplant* 1995 Jan;15(1):41-8.
 - (19) Petz LD, Yam P, Wallace RB, Stock AD, de Lange G, Knowlton RG, et al. Mixed hematopoietic chimerism following bone marrow transplantation for hematologic malignancies. *Blood* 1987 Nov;70(5):1331-7.
 - (20) Bieleorai B, Trakhtenbrot L, Amariglio N, Rothman R, Tabori U, Dallal I, et al. Multilineage hematopoietic engraftment after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation without conditioning in SCID patients. *Bone Marrow Transplant* 2004 Aug;34(4):317-20.
 - (21) Thiele J, Wickenhauser C, Kvasnicka HM, Varus E, Schneider C, Muller H, et al. Mixed chimerism of erythro- and megakaryopoiesis following allogeneic bone marrow transplantation. *Acta Haematol* 2003;109(4):176-83.
 - (22) Thiele J, Wickenhauser C, Kvasnicka HM, Varus E, Beelen DW, Schaefer UW. Dynamics of lineage-restricted mixed chimerism following sex-mismatched allogeneic bone marrow transplantation. *Histol Histopathol* 2003 Apr;18(2):557-74.
 - (23) Seong CM, Giralt S, Kantarjian H, Xu J, Swantkowski J, Hayes K, et al. Early detection of relapse by hypermetaphase fluorescence in situ hybridization after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2000 May;18(9):1831-6.
 - (24) Mulli KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 1990;262:56-61.

-
- (25) Lawler M, McCann SR, Conneally E, Humphries P. Chimaerism following allogeneic bone marrow transplantation: detection of residual host cells using the polymerase chain reaction. *Br J Haematol* 1989 Oct;73(2):205-10.
 - (26) Lawler M, Humphries P, McCann S. Evaluation of mixed chimerism by in vitro amplification of dinucleotide repeat sequences using the polymerase chain reaction. *Blood* 1991;77:2504-14.
 - (27) Suttorp M, Schmitz N, Dreger P, Schaub J, Loffler H. Monitoring of chimerism after allogeneic bone marrow transplantation with unmanipulated marrow by use of DNA polymorphisms. *Leukemia* 1993 May;7(5):679-87.
 - (28) van Leeuwen JE, van Tol MJ, Bodzinga BG, Wijnen JT, van der KM, Joosten AM, et al. Detection of mixed chimaerism in flow-sorted cell subpopulations by PCR-amplified VNTR markers after allogeneic bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 1991 Oct;79(2):218-25.
 - (29) Bertheas MF, Lafage M, Blaise D, Stoppa AM, Viens P, Mannoni P, et al. Mixed chimerism after allogeneic bone marrow transplantation for leukemias. *Bone Marrow Transplant* 1990 Jul;6(Suppl 1):61-3.
 - (30) Scharf SJ, Smith AG, Hansen JA, McFarland C, Erlich HA. Quantitative determination of bone marrow transplant engraftment using fluorescent polymerase chain reaction primers for human identity markers. *Blood* 1995;85:1954-63.
 - (31) Oberkircher AR, Strout MP, Herzig GP, Fritz PD, Caligiuri MA. Description of an efficient and highly informative method for the evaluation of hematopoietic chimerism following allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1995 Nov;16(5):695-702.
 - (32) Rivera GK, Pinkel D, Simone JV, Hancock ML, Crist WM. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. 30 years' experience at St. Jude Children's Research Hospital. *N Engl J Med* 1993 Oct 28;329(18):1289-95.
 - (33) Bader P, Kreyenberg H, Hoelle W, Dueckers G, Handgretinger R, Lang P, 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* 2004;22(9):1696-706.
 - (34) 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* 2005;35(2):107-19.
 - (35) Bader P, Hoelle W, Klingebiel T, Handgretinger R, Benda N, Schlegel PG, et al. Mixed hematopoietic chimerism after allogeneic bone marrow transplantation: the impact of quantitative PCR analysis for prediction of relapse and graft rejection in children. *Bone Marrow Transplant* 1997 Apr;19(7):697-702.
 - (36) Bader P, Beck J, Frey A, Schlegel PG, Hebarth H, Handgretinger R, et al. Serial and quantitative analysis of mixed hematopoietic chimerism by PCR in patients with acute

-
- leukemias allows the prediction of relapse after allogeneic BMT. *Bone Marrow Transplant* 1998 Mar;21(5):487-95.
- (37) Barrios M, Jimenez-Velasco A, Roman-Gomez J, Madrigal ME, Castillejo JA, Torres A, et al. Chimerism status is a useful predictor of relapse after allogeneic stem cell transplantation for acute leukemia. *Haematologica* 2003 Jul;88(7):801-10.
- (38) Collins R-HJ, Rogers ZR, Bennett M, Kumar V, Nikein A, Fay JW. Hematologic relapse of chronic myelogenous leukemia following allogeneic bone marrow transplantation: apparent graft-versus-leukemia effect following abrupt discontinuation of immunosuppression. *Bone Marrow Transplant* 1992 Oct;10(4):391-5.
- (39) Abraham R, Szer J, Bardy P, Grigg A. Early cyclosporine taper in high-risk sibling allogeneic bone marrow transplants. *Bone Marrow Transplant* 1997 Nov;20(9):773-7.
- (40) Mehta J, Powles R, Kulkarni S, Treleaven J, Singhal S. Induction of graft-versus-host disease as immunotherapy of leukemia relapsing after allogeneic transplantation: single-center experience of 32 adult patients. *Bone Marrow Transplant* 1997 Jul;20(2):129-35.
- (41) Mehta J, Powles R, Singhal S, Tait D, Swansbury J, Treleaven J. Cytokine-mediated immunotherapy with or without donor leukocytes for poor-risk acute myeloid leukemia relapsing after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1995 Jul;16(1):133-7.
- (42) Slavin S, Naparstek E, Nagler A, Ackerstein A, Samuel S, Kapelushnik J, et al. Allogeneic cell therapy with donor peripheral blood cells and recombinant human interleukin-2 to treat leukemia relapse after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1996 Mar 15;87(6):2195-204.
- (43) Mehta J, Powles R, Treleaven J, Horton C, Meller S, Pinkerton CR, et al. Outcome of acute leukemia relapsing after bone marrow transplantation: utility of second transplants and adoptive immunotherapy. *Bone Marrow Transplant* 1997 Apr;19(7):709-19.
- (44) Johnson BD, Becker EE, Truitt RL. Graft-vs.-host and graft-vs.-leukemia reactions after delayed infusions of donor T-subsets. *Biol Blood Marrow Transplant* 1999;5(3):123-32.
- (45) Bader P, Hoelle W, Klingebiel T, Handgretinger R, Niethammer D, Beck J. Quantitative assessment of mixed hematopoietic chimerism by polymerase chain reaction after allogeneic BMT. *Anticancer Res* 1996 Jul;16(4A):1759-63.
- (46) Kreyenberg H, Holle W, Mohrle S, Niethammer D, Bader P. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by PCR amplification of microsatellite markers and capillary electrophoresis with fluorescence detection: the Tuebingen experience. *Leukemia* 2003;17(1):237-40.
- (47) Bader P, Kreyenberg H. Analysis of chimerism after stem cell transplantation. *Methods Mol Med* 2004;91:247-64.

-
- (48) Thiede C, Florek M, Bornhauser M, Ritter M, Mohr B, Brendel C, et al. Rapid quantification of mixed chimerism using multiplex amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection. *Bone Marrow Transplant* 1999 May;23(10):1055-60.
 - (49) Hancock JP, Goulden NJ, Oakhill A, Steward CG. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic bone marrow transplantation using immunomagnetic selection and fluorescent microsatellite PCR. *Leukemia* 2003 Jan;17(1):247-51.
 - (50) Acquaviva C, Duval M, Mirebeau D, Bertin R, Cave H. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by PCR amplification of microsatellite markers and capillary electrophoresis with fluorescence detection: the Paris-Robert Debre experience. *Leukemia* 2003;17(1):241-6.
 - (51) Chalandon Y, Vischer S, Helg C, Chapuis B, Roosnek E. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by PCR amplification of microsatellite markers and capillary electrophoresis with fluorescence detection: the Geneva experience. *Leukemia* 2003 Jan;17(1):228-31.
 - (52) Alizadeh M, Bernard M, Danic B, Dauriac C, Birebent B, Lapart C, et al. Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Blood* 2002;99(12):4618-25.
 - (53) Maas F, Schaap N, Kolen S, Zoetbrood A, Buno I, Dolstra H, et al. Quantification of donor and recipient hemopoietic cells by real-time PCR of single nucleotide polymorphisms. *Leukemia* 2003;17(3):621-9.
 - (54) Maas F, Schaap N, Kolen S, Zoetbrood A, Buno I, Dolstra H, et al. Corrigendum - Quantification of donor and recipient hemopoietic cells by real-time PCR of single-nucleotide polymorphisms. *Leukemia* 2004;18:663.
 - (55) Jimenez-Velasco A, Barrios M, Roman-Gomez J, Navarro G, Buno I, Castillejo JA, et al. Reliable quantification of hematopoietic chimerism after allogeneic transplantation for acute leukemia using amplification by real-time PCR of null alleles and insertion/deletion polymorphisms. *Leukemia* 2005;19(3):336-43.
 - (56) Meuer S, Wittwer C, Nakagawara C. *Rapid cycle real-time PCR: Methods and applications*. Springer Verlag; 2001.
 - (57) Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 1993 Sep;11(9):1026-30.
 - (58) Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 1995 Jun;4(6):357-62.
 - (59) Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 2001;409(6822):928-33.

-
- (60) Wang DG, Fan JB, Siao CJ, Berno A, Young P, Sapolsky R, et al. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* 1998;280(5366):1077-82.
- (61) Hochberg EP, Miklos DB, Neuberg D, Eichner DA, McLaughlin SF, Mattes-Ritz A, et al. A novel rapid single nucleotide polymorphism (SNP)-based method for assessment of hematopoietic chimerism after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2003 Jan 1;101(1):363-9.
- (62) Oliver DH, Thompson RE, Griffin CA, Eshleman JR. Use of single nucleotide polymorphisms (SNP) and real-time polymerase chain reaction for bone marrow engraftment analysis. *J Mol Diagn* 2000 Nov;2(4):202-8.
- (63) Pongers-Willemse MJ, Verhagen OJ, Tibbe GJ, Wijkhuijs AJ, de Haas V, Roovers E, et al. Real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using junctional region specific TaqMan probes. *Leukemia* 1998;12(12):2006-14.
- (64) van der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, van Dongen JJ. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* 2003 Jun;17(6):1013-34.
- (65) Willasch A, Schneider G, Reincke BS, Shayegi N, Kreyenberg H, Kuci S, et al. Sequence polymorphism systems for quantitative real-time polymerase chain reaction to characterize hematopoietic chimerism-high informativity and sensitivity as well as excellent reproducibility and precision of measurement. *Lab Hematol* 2007;13(3):73-84.
- (66) The R Foundation for Statistical Computing c/o Institut für Statistik und Wahrscheinlichkeitstheorie der Technischen Universität Wien. R, a language and environment for statistical computing and graphics. University of Vienna, Austria 2003.
- (67) Dubovsky J, Daxberger H, Fritsch G, Printz D, Peters C, Matthes S, et al. Kinetics of chimerism during the early post-transplant period in pediatric patients with malignant and non-malignant hematologic disorders: implications for timely detection of engraftment, graft failure and rejection. *Leukemia* 1999 Dec;13(12):2059, 2060-59, 2069.
- (68) Choi SJ, Lee KH, Lee JH, Kim S, Chung HJ, Lee JS, et al. Prognostic value of hematopoietic chimerism in patients with acute leukemia after allogeneic bone marrow transplantation: a prospective study. *Bone Marrow Transplant* 2000 Aug;26(3):327-32.
- (69) Fredriksson M, Barbany G, Liljedahl U, Hermanson M, Kataja M, Syvanen AC. Assessing hematopoietic chimerism after allogeneic stem cell transplantation by multiplexed SNP genotyping using microarrays and quantitative analysis of SNP alleles. *Leukemia* 2004 Feb;18(2):255-66.
- (70) Lion T, Daxberger H, Dubovsky J, Filipcik P, Fritsch G, Printz D, et al. Analysis of chimerism within specific leukocyte subsets for detection of residual or recurrent

-
- leukemia in pediatric patients after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia* 2001;15(2):307-10.
- (71) Lion T. Chimerism testing after allogeneic stem cell transplantation: importance of timing and optimal technique for testing in different clinical-biological situations. *Leukemia* 2001 Feb;15(2):292.
- (72) Bader P, Niemeyer C, Willasch A, Kreyenberg H, Strahm B, Kremens B, et al. Children with myelodysplastic syndrome (MDS) and increasing mixed chimaerism after allogeneic stem cell transplantation have a poor outcome which can be improved by pre-emptive immunotherapy. *Br J Haematol* 2005;128(5):649-58.
- (73) Yoshimi A, Bader P, Matthes-Martin S, Stary J, Sedlacek P, Duffner U, et al. Donor leukocyte infusion after hematopoietic stem cell transplantation in patients with juvenile myelomonocytic leukemia. *Leukemia* 2005;19(6):971-7.
- (74) Bader P, Klingebiel T, Schaudt A, Theurer-Mainka U, Handgretinger R, Lang P, et al. Prevention of relapse in pediatric patients with acute leukemias and MDS after allogeneic SCT by early immunotherapy initiated on the basis of increasing mixed chimerism: a single center experience of 12 children. *Leukemia* 1999;13(12):2079-86.
- (75) Baron F, Sandmaier BM. Chimerism and outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation following nonmyeloablative conditioning (Review). *Leukemia* 2006;20:1690-700.
- (76) Roux E, Abdi K, Speiser D, Helg C, Chapuis B, Jeannet M, et al. Characterization of mixed chimerism in patients with chronic myeloid leukemia transplanted with T-cell-depleted bone marrow: involvement of different hematologic lineages before and after relapse. *Blood* 1993 Jan 1;81(1):243-8.
- (77) Fernandez-Aviles F, Urbano-Ispizua A, Aymerich M, Colomer D, Rovira M, Martinez C, et al. Serial quantification of lymphoid and myeloid mixed chimerism using multiplex PCR amplification of short tandem repeat-markers predicts graft rejection and relapse, respectively, after allogeneic transplantation of CD34+ selected cells from peripheral blood. *Leukemia* 2003;17(3):613-20.
- (78) Shayegi N. Sequenzpolymorphismen als hochsensitive Marker für Chimärismusanalysen bei Kindern mit AML und MDS nach allogener Stammzelltransplantation mittels quantitativer PCR Goethe Universität Frankfurt am Main; 2009.
- (79) Chung NG, Buxhofer-Ausch V, Radich JP. The detection and significance of minimal residual disease in acute and chronic leukemia. *Tissue Antigens* 2006 Nov;68(5):371-85.
- (80) Szczepanski T, Orfao A, van dV, V, San Miguel JF, van Dongen JJ. Minimal residual disease in leukaemia patients. *Lancet Oncol* 2001 Jul;2(7):409-17.
- (81) Maas F, Schaap N, Kolen S, Zoetbrood A, Buno I, Dolstra H, et al. Quantification of donor and recipient hemopoietic cells by real-time PCR of single nucleotide polymorphisms. *Leukemia* 2003;17(3):630-3.

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Professor Dr. med. Peter Bader für die Betreuung meiner Arbeit, die interessante Themenstellung und die hervorragenden Arbeitsmöglichkeiten.

Des Weiteren danke ich Dr. Andre Willasch für die Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Experimente, genauso wie Dr. Hermann Kreyenberg, der bereitwillig alle meine Fragen beantwortet hat.

Bei Frau Dr. Gaby Schneider bedanke ich mich für statistische Auswertung der Methode und das kritische Durchsehen meiner Patientenauswertungen.

Zudem danke ich Vida Meyer für ihre großartige Unterstützung bei der praktischen Durchführung, sowie Christlinda Mauracher, Mahin Seyedi und Gitta Nozad, die mir im Labor jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ich danke außerdem allen Mitgliedern und Doktoranden der Arbeitsgruppe Bader für das angenehme Arbeitsklima.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich herzlich für ihre Unterstützung, die es mir überhaupt erst möglich gemacht hat, diese Arbeit anzufertigen.

Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Sequenz Polymorphismen in der Real-Time PCR als hochsensitive Marker für die Analyse des hämatopoetischen Chimärismus in Kindern mit ALL nach allogener Stammzelltransplantation“

in dem Zentrum für Kinder und Jugendmedizin, Klinik III, Schwerpunkt Stammzelltransplantation

unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. med. Peter Bader

mit Unterstützung durch Dr. med. André Willasch, Zentrum für Kinder und Jugendmedizin, Klinik III und Jun. Prof. Dr. Gaby Schneider, FB Mathematik der Johann Wolfgang Goethe Universität ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde teilweise in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Willasch A, Schneider G, Reincke BS, Shayegi N, Kreyenberg H, Kuci S, Weber G, Van Der Reijden B, Niethammer D, Klingebiel T, Bader P.

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.

Kelkheim, den 21.09.2009

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Britta Sofia Reincke
Geburtstag	20.01.1972
Geburtsort	Rüsselsheim
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	verheiratet
Kinder	zwei Töchter, geboren 2003 und 2007
Religion	evangelisch

Derzeitige Tätigkeit

Seit 01.07.2009 Assistenzärztin in der Orthopädie/Unfallchirurgie

Ausbildung

Juni 2009	2. Staatsexamen nach neuer Approbationsordnung Gesamtnote: 2,0
10/2002 06/2009	Studium der Humanmedizin an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main
08/2004	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung Gesamtnote: 3,0

Dissertation

Experimentelle medizinische Dissertationsarbeit unter der Leitung von Prof. Dr. med. P. Bader, Pädiatrische Klinik III
Titel: Sequenz Polymorphismen in der Real-Time PCR als hochsensitive Marker für die Analyse des hämatopoetischen Chimärismus in Kindern mit ALL nach allogener Stammzelltransplantation

Postdoc

an der Medical University of South Carolina, Charleston, SC, USA

01/2001 – 10/2002 Postdoctoral Fellow im Department of Pathology and Laboratory
Medicine, Prof. Dr. Wright
Thema: “Tumorigenesis in Malignant Rhabdoid Tumor”

Promotion

08/1997 – 03/2001 Naturwissenschaftliche Promotion am Institut für
Biophysikalische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-
Universität in Frankfurt am Main;
Titel der Dissertation: “Struktur und Funktion löslicher
Fragmente des Cytochrom *c*₅₅₂ aus *Paracoccus denitrificans*”
Gesamtnote: 1.0

10/1991 - 06/1997 **Studium der Chemie** an der Johann Wolfgang Goethe-
Universität in Frankfurt am Main

10/1996 - 06/1997 Diplomchemiker-Hauptprüfung sowie Diplomarbeit am Institut
für Biophysikalische Chemie, Prof. Dr. Rüterjans
Titel der Diplomarbeit: “Optimierung der Expression und
Reinigung eines löslichen Fragments des Cytochrom *c*₅₅₂ aus
Paracoccus denitrificans”
Gesamtnote: 1.1

10/1994 Diplom-Chemiker-Vorprüfung
Gesamtnote: “gut”

Schulausbildung

08/1988 – 06/1991 Besuch des Friedrich-Dessauer-Gymnasiums in Frankfurt/Höchst
(Gymnasiale Oberstufe)

Abschluss: Abitur, Gesamtnote: 2.3

05/1988 – 06/1988 Besuch der Leibniz-Schule in Frankfurt/Höchst
(Gymnasium)

08/1982 - 04/1988 Besuch der Ulstertal-Schule in Hilders/Rhön
(Gymnasium)

04/1980 - 06/1982 Besuch der Eberhardt-Schule in Tann/Rhön
(Grundschule)

08/1979 - 03/1980 Besuch der Karl Treutel-Schule in Kelsterbach
(Grundschule)

Ehrenamtliche Tätigkeiten

10/01 – 10/02 Volunteer bei der Telefonseelsorge in Charleston

05/86 – 04/88 Betreuung des Kindergottesdienstes der evangelischen
Kirchengemeinde Tann / Rhön

Publikationen

Willasch A, [Schneider G](#), **Reincke BS**, [Shayegi N](#), [Kreyenberg H](#), [Kuci S](#), [Weber G](#), [Van Der Reijden B](#), [Niethammer D](#), [Klingebliel T](#), [Bader P](#).

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.

Reincke BS, Rosson GB, Oswald BW, Wright CF.

INI1 expression induces cell cycle arrest and markers of senescence in malignant rhabdoid tumor cells. *J Cell Physiol.* 2003 Mar;**194(3)**:303-13.

Drosou, V., **Reincke, B.**, Schneider, M. & Ludwig, B. Specificity of the interaction between the *Paracoccus denitrificans* oxidase and its substrate cytochrome *c*: comparing the mitochondrial to the homologous bacterial cytochrome *c*₅₅₂, and its truncated site-directed mutants, *Biochemistry* 2002 Aug 27; **41(34)**:10629-34.

Reincke B., Pérez C., Pristovšek P., Lücke C., Ludwig C., Löhr F., Rogov V.V., Ludwig B. & Rüterjans H. Solution Structure and Dynamics of the Functional Domain of *Paracoccus denitrificans* Cytochrome *c*₅₅₂ in Both Redox States. *Biochemistry* 2001 Oct 16;**40(41)**:12312-20.

Lücke C., **Reincke B.**, Löhr F., Pristovšek P, Ludwig B. & Rüterjans H. Complete ¹H, ¹⁵N and ¹³C Assignment of the Functional Domain of *Paracoccus denitrificans* Cytochrome *c*₅₅₂ in the Oxidized State. *J Biomol NMR* 2000 Dec;**18(4)**:365-6.

Pristovšek P., Lücke C., **Reincke B.**, Ludwig B. & Rüterjans H. Solution Structure of the Functional Domain of *Paracoccus denitrificans* Cytochrome *c*₅₅₂ in the Reduced State. *Eur J Biochem* 2000 Jul;**267(13)**:4205-12.

Pristovšek P., Lücke C., **Reincke B.**, Löhr F., Ludwig B. & Rüterjans H. Complete ¹H, ¹⁵N and ¹³C Assignment of the Functional Domain of *Paracoccus denitrificans* Cytochrome *c*₅₅₂ in the Reduced State. *J Biomol NMR* 2000 Apr;**16(4)**:353-4.

Harrenga A., **Reincke B.**, Rüterjans H., Ludwig B. & Michel H. Structure of the Soluble Domain of Cytochrome *c*₅₅₂ from *Paracoccus denitrificans* in the Oxidized and Reduced States. *J Mol Biol.* 2000 Jan 21;**295(3)**:667-78.

Reincke B., Thöny-Meyer L., Dannehl C., Odenwald A., Aidim M., Witt H., Rüterjans H. & Ludwig B. Heterologous Expression of Soluble Fragments of Cytochrome *c*₅₅₂ acting as Electron Donor to the *Paracoccus denitrificans* Cytochrome *c* Oxidase. *Biochim Biophys Acta* 1999 Apr 21;**1411(1)**:114-20.