

Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen
Schwerpunkte: Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie / Onkologie
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Handgretinger

**Analysen des hämatopoetischen Chimärismus
in Zellsubpopulationen mit Hilfe der
fluoreszenzmarkierten STR-PCR
bei Kindern mit akuten Leukämien.
Erarbeitung prognostischer Parameter
zur Rezidivfrüherkennung**

INAURUGAL-DISSERTATION
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

MEDIZINISCHE FAKULTÄT
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
JETTE SCHENK
aus Göttingen

2007

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

Berichterstatter 1: Professor Dr. P. Bader

Berichterstatter 2: Frau Professor Dr. E. Koscielniak

Für Ellen und Helge

1	Einleitung	1
1.1	Stammzelltransplantation	1
1.1.1	Historie.....	1
1.1.2	Formen der Knochenmarkstransplantation, Spenderauswahl und Durchführung.....	2
1.2	Indikationsstellung zur Stammzelltransplantation	3
1.2.1	Indikation zur Stammzelltransplantation bei Kindern mit ALL.....	3
1.2.2	Indikation zur Stammzelltransplantation bei Kindern mit AML.....	3
1.3	Komplikationen	4
1.3.1	Toxizität	4
1.3.2	Infektion	4
1.3.3	Graft-versus-Host-Erkrankung und Transplantatabstoßung.....	5
1.3.4	Rezidiv	5
1.4	Rezidivüberwachung.....	6
1.4.1	Residualre leukämischer Zellen.....	6
1.4.2	Chimärismus	7
1.4.3	Bedeutung des Chimärismus.....	8
1.4.4	Subpopulationen	9
1.5	Immuntherapie und ihre Grundlagen	10
1.6	Zielsetzung.....	11
2	Material	13
2.1	Reagenzien	13
2.1.1	Dichtezentrifugation.....	13
2.1.2	Isolierung der Subpopulationen	13
2.1.3	DNA-Isolierung.....	14
2.1.4	STR-PCR	14
2.1.5	Geräte und Einmalartikel	14
3	Methoden.....	17

3.1	Untersuchungsmaterial.....	17
3.2	Zusammenfassende Übersicht	17
3.3	Isolierung der mononuklearen Zellen aus dem Knochenmark.....	17
3.4	DNA-Isolation aus den Nativproben von Spender und Patient.....	18
3.4.1	DNA – Isolation	19
3.4.2	Spektrophotometrische Bestimmung der DNA-Quantität	19
3.5	Isolierung der Subpopulationen mit Hilfe des „MACS“	20
3.5.1	Prinzip der „Magnet-aktivierten-Zellsortierung“	20
3.5.2	Isolation der Subpopulationen	20
3.6	Floureszenz-markierte-STR-PCR	22
3.6.1	Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion	22
3.6.2	Short-tandem-Repeats.....	23
3.6.3	Primerauswahl.....	23
3.6.4	PCR-Probenansatz	23
3.6.5	Thermocyclerprogramme.....	24
3.7	Die Kapillarelektrophorese	25
3.7.1	Prinzip der Elektrophorese und die Verarbeitung der Daten	25
3.7.2	Probenansatz für die Kapillarelektrophorese	25
3.7.3	Einstellungen des ABI PRISM 310 System.....	26
3.8	Auswertung der Daten	26
3.8.1	Berechnung des Chimärismus	27
3.8.2	Einteilung der Chimärismusgruppen	31
3.9	Real-Time-PCR	31
4	Patientenkollektiv	32
5	Ergebnisse	38
5.1	Überblick über die Probenverteilung	38
5.1.1	Ereignisfreies Überleben in Abhängigkeit von der Erkrankung	38
5.2	Beispielhafte Darstellungen von Krankheitsverläufen	39
5.2.1	Tabellarischer Überblick über die Krankheitsverläufe.....	39
5.2.2	Ergebnisse der Patienten in kompletter Remission	40

5.2.3	Ergebnisse der Patienten mit wiederkehrender Grunderkrankung.....	44
5.2.4	Krankheitsverläufe in Bezug auf den Chimärismusstatus der Subpopulationen	47
5.3	Chimärismusanalysen vor dem klinischen Rezidivausbruch.....	49
5.3.1	Prognostische Bedeutung gemischter Chimäre.....	50
5.3.2	Zeitintervall zwischen einem ersten MC und der Rezidivdiagnose	51
5.3.3	Vergleich der STR-PCR-Ergebnisse mit der RT-PCR.....	53
5.4	Chimärismusstatus im Vollblut.....	55
6	Diskussion.....	56
6.1	Methode.....	56
6.1.1	STR-PCR	56
6.2	Ursachen und Bedeutung des gemischten Chimärismus	57
6.2.1	Die Subpopulationen.....	57
6.3	Ergebnisse der AML-Patienten.....	58
6.4	Ergebnisse der ALL-Patienten	59
6.4.1	Stammzellen, die CD34-Subpopulation	59
6.4.2	B-Zellen, die CD10- und CD19-Subpopulation	59
6.4.3	T-Zellen, die CD3-Subpopulation und immunologische Toleranz	60
6.5	Knochenmarks- und Vollblutanalysen.....	61
6.6	Zeitspanne zwischen ersten MC und Rezidiv	62
6.6.1	Chimärismusanalysen in den Subpopulationen nach weiterführenden Therapien	63
6.7	MRD und Chimärismusanalysen	64
6.7.1	Methode der Real-Time PCR von Ig/TCR-Rearrangements.....	64
6.7.2	Vergleich der RT-PCR mit der STR-PCR in den Subpopulationen.....	64
6.8	T-ALL	65
6.9	Prognostische Bedeutung von Vollblutuntersuchungen.....	65
6.10	Aktueller Stand der Forschung und Aussichten	66
7	Zusammenfassung	68

8	Anhang	71
8.1	Abkürzungsverzeichnis	71
8.2	Abbildungsverzeichnis	73
8.3	Tabellenverzeichnis	75
8.4	Referenzliste	76
	Lebenslauf.....	88

1 Einleitung

1.1 Stammzelltransplantation

1.1.1 Historie

Die Knochenmarkstransplantation (KMT) ist in den heutigen Tagen ein weit eingesetztes Therapieverfahren für die Behandlung von immunologischen, hämatologischen und onkologischen Erkrankungen.

Die Idee der Knochenmarkstransplantation, „durch Infusion von Blut oder Mark die Säfte des Körpers zu reinigen oder Krankheiten zu heilen“, ist bis in die Mythologie zurückzuverfolgen und bildet einen Bestandteil der Medizingeschichte [8;103]. Die Anfänge der modernen Transplantationsverfahren beruhen auf den ersten Beobachtungen der Hämatotoxizität radioaktiver Strahlen, die zu Beginn des Atomzeitalters gemacht worden sind [45].

1949 haben *Jacobsen und Lorenz et al.* diese weiter untersucht und gezeigt, dass Mäuse eine tödliche Strahlendosis überleben können, wenn entweder die Milz durch eine Bleifolie abgedeckt oder ihnen anschließend Knochenmark infundiert wird [49;65]. Kurz darauf haben *Ford et al.* entdeckt, dass transfundierte Mäuse nach der KMT die zytogenetischen Charakteristika des Spenders aufweisen [41]. Sie demonstrieren in dieser Untersuchung die Möglichkeit, ein krankes hämatopoetisches System durch ein gesundes zu ersetzen.

1968 sind erstmals 3 an einem schweren Immuninsuffizienz-Syndrom leidende Kinder erfolgreich mit einer KMT von Oberflächenantigen-identischen Geschwister geheilt worden [26]. Die ersten Knochenmarkstransplantationen von fremden Spendern sind beim Menschen lange Zeit ohne Erfolg geblieben. Sie sind erst nach der Entdeckung der individuellen immunkompetenten Oberflächenantigene der Zellen und der Einführung einer entsprechenden immunsuppressiven Therapie gelungen. Mitte der 70er Jahre hat sich die KMT als akzeptierte Therapieform durchgesetzt [26].

1.1.2 Formen der Knochenmarkstransplantation, Spenderauswahl und Durchführung

Für eine Transplantation können entweder eigene (autologe-KMT) oder fremde (allogene-KMT) hämatopoetische Zellen herangezogen werden. Bei der autologen KMT besteht die Gefahr der Reinfusion maligner Zellen. Aus diesem Grund wird bei den Leukämien die allogene KMT bevorzugt.

Der Erfolg einer allo-KMT ist wesentlich von der Übereinstimmung der MHC-Oberflächenproteine (Major Histokompatibility Complex) der Zellen abhängig. Letztere sind im sogenannten HLA-System (Human Leukocyt Antigen) genetisch codiert und entscheidend für die Auswahl eines geeigneten Spenders. Die Wahrscheinlichkeit, gleiche Gene dieses Systems zu besitzen bzw. geerbt zu haben, beträgt nach der *Mendelschen Regel* für Geschwister 25%. Durch eine Einflussnahme auf das Immunsystem bzw. das Transplantat ist es mittlerweile möglich, auf nicht-HLA-identische Spender auszuweichen [98].

Für die Transplantation ist anfangs ausschließlich Knochenmark verwendet worden. Es ist reich an Vorläuferzellen, welche die Grundlage für die Entdifferenzierung in ein neues hämatopoetisches System bilden. Diese Zellen werden heutzutage mit Hilfe der Plasmapherese auch aus dem Nabelschnurblut oder aus dem Peripherblut gewonnen, weshalb sich mittlerweile der Begriff Stammzelltransplantation (SZT) etabliert hat [8;45;79;91].

Eingeleitet wird die Transplantation durch ein Konditionierungsregime. Es beinhaltet eine Kombination verschiedener Chemotherapeutika, ggf. mit einer ergänzenden Strahlentherapie, und ist verantwortlich für eine ausreichende Immunsuppression des Patienten, die die Substitution des kranken, hämatopoetischen Systems durch ein fremdes gesundes ermöglicht. Zusammen mit der Ausnutzung des antileukämischen Effekts der Spenderzellen wird die Elimination der Leukämie erreicht [8].

1.2 Indikationsstellung zur Stammzelltransplantation

1.2.1 Indikation zur Stammzelltransplantation bei Kindern mit ALL

Durch die heutigen Chemotherapieprotokolle gelingt es mittlerweile, 70 bis 80 % der erkrankten Kinder zu heilen, die an einer akuten lymphatischen Leukämie (ALL) erkrankt sind. Für die 20 % der Kinder, die trotz der ersten Chemotherapie ein Rezidiv entwickeln, bietet die SZT eine Wahrscheinlichkeit von 40 bis 56 % auf einen erneuten Heilungserfolg [21;48]. Bei bestehenden Hochrisikofaktoren für ein Rezidiv können einige Kinder jedoch schon initial von einer Transplantation profitieren [48].

1994 wurden von der *European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT)* folgende Indikationsrichtlinien zur SZT für Kinder mit ALL zusammengefasst: Die Hochrisikoformen der ALL (Philadelphia-chromosom und der T-Zell-Phänotyp) in der kompletten ersten Remission (CR1); das Frührezidiv in kompletter zweiter Remission (CR2); das Spätrezidiv (nach 2 Jahren) in CR2, jedoch nur bei HLA-identischen Geschwisterspendern. Bei höheren Remissionsstadien als CR2 wird eine SZT auch mit einem Fremdspender empfohlen [21].

1.2.2 Indikation zur Stammzelltransplantation bei Kindern mit AML

Als Möglichkeiten für die Behandlung der akuten myeloischen Leukämie (AML) stehen die konventionelle Chemotherapie, die autologe- oder die allogene-SZT zur Auswahl. Eine allogene-SZT ist absolut indiziert bei Patienten, die einen Rückfall nach einer Chemotherapie erlitten haben (CR2) [10;36]. In der ersten Remissionsphase (CR1) zeigt die allo-SZT im Vergleich zur konventionellen Chemotherapie eine etwas geringere Rezidivrate (ca. 57 - 61 vs. 59 - 77 %) [10;77]. Die stärkeren Nebenwirkungen sowie die Gefahr von Langzeitschäden relativieren jedoch die Indikation für eine Transplantation. Die Rate des rezidivfreien Überlebens nach Chemotherapie ist von den verschiedenen Subklassifikationen der AML abhängig, so dass diese für die Therapiewahl mit entscheidend sind.

1.3 Komplikationen

Die Komplikationen der SZT sind zum einen Folgen der Konditionierung mit Organotoxizitäten und einer stark erhöhten Infektanfälligkeit; zum andern ergeben sie sich aus den immunologischen Reaktionen, die sich als Abstoßungsreaktionen oder als Graf-versus-Host-Krankheit manifestieren können.

1.3.1 Toxizität

Durch das Konditionierungsregime erfolgt die unspezifische Zerstörung bzw. Entwicklungshemmung schnell wachsender Zellen. Frühkomplikationen manifestieren sich deshalb insbesondere im „Wechselgewebe“ wie den Schleimhäuten, Haarwurzeln und Keimdrüsen, und sie äußern sich als Unwohlsein, Schwindel, Übelkeit, Erbrechen, Diarrhoe und Haarausfall [59]. Bis zu 90 % der Patienten sind von einer intestinalen Mukositis betroffen [22]. Im Rahmen der Hochdosischemotherapie bestehen spezifische Toxizitäten der einzelnen Substanzen gegenüber Herz, Niere, Leber, ZNS oder Lunge. Diese können sich z.B. als Herzinsuffizienz, hämorrhagische Myokardnekrose, Niereninsuffizienz oder als Lungenfibrose äußern [59]. Zu den potentiellen Spätfolgen gehören sekundäre Neoplasien, die Demineralisierung der Knochen, neuropsychologische Defizite sowie Endokrinopathien, die sich als Wachstumsstörungen, Diabetes mellitus, Adipositas und als Fertilitätsstörungen manifestieren können [8;45;48;91].

1.3.2 Infektion

Nach einer Transplantation werden beim Patienten durch die iatrogen erzeugte Immunsuppression auch die natürlichen Abwehrmechanismen gegen Bakterien, Pilze und Viren deutlich geschwächt. Diese kritische Phase dauert bei einem unkomplizierten Verlauf ca. ein Jahr; sie kann aber durch das Auftreten einer GvHD und der dadurch erforderlichen immunsuppressiven Therapie ungewollt hinausgezögert werden. In der Frühphase nach der allo-SZT sind die Patienten in Folge der Panzytopenie sowie der Schwächung der Schleimhautbarriere besonders anfällig für bakterielle Infektionen [27]. Nach Engraftment und Normalisierung des Blutbildes bestehen weiterhin funktionelle Störungen des Immunsystems, welche die Infektionen mit opportunistischen Erregern begünstigen. So dominieren in

dieser Phase Pilzinfektionen und virale Infekte. Die Gefahr einer interstitiellen Pneumonie, verursacht durch den Zytomegalie-Virus (CMV), ist zwei Monate nach einer allo-SZT am höchsten. Eine entsprechende antibakterielle, antivirale und fungizide Begleittherapie ist daher obligat [47].

1.3.3 Graft-versus-Host-Erkrankung und Transplantatabstoßung

Der Mechanismus der GvHD ist erstmals 1959 von *Billingham et al.* und *Brand et al.* beschrieben worden [25]. Er beruht, auf der immunologischen Abwehrreaktion der immunkompetenten Zellen des Spenders gegen die fremden *MHC-Oberflächenproteine* auf den Membranen der Empfängerzelle und manifestiert sich akut hauptsächlich in der Haut, der Leber und im Gastrointestinaltrakt. Klinisch äußert sie sich als Exanthem, Ikterus oder Diarrhoe. Als chronische Form, definitionsgemäß mit der Manifestation 100 Tage nach der SZT, ähnelt sie systemischen Kollagenosen und Gefäßerkrankungen [8].

Für die Prophylaxe und die Therapie der GvHD werden Methotrexat (MTX), Cyclosporin A, Anti-Thymozyten-Globulin (ATG) bzw. Steroide verwendet. *Reisner et al.* haben eine Abschwächung der GvHD durch Entfernen ein der T-Zellen aus dem Transplantat (T-Zell-Depletion) beschrieben [84].

Eine unzureichende Konditionierung oder ein Mangel in der immunologischen Aktivität der Effektor-Zellen sind verantwortlich für die Transplantatabstoßung. Das *Non-Engraftment* ist definiert als eine über den 21. Tag hinaus bestehende Aplasie, die eine zweite verstärkt belastende SZT erforderlich macht.

1.3.4 Rezidiv

Durch die Fortschritte in der Therapie der SZT-bedingten Komplikationen wird der Erfolg der Transplantation heute hauptsächlich durch das Wiederauftreten der Grunderkrankung limitiert. Nach der SZT liegt deshalb das Bestreben nahe, das Rezidivgeschehen frühzeitig zu diagnostizieren, um mit einer therapeutische Intervention das Krankheitsgeschehen rechtzeitig abzuwenden und somit die kleinen Patienten vor einer erneuten belastenden Transplantation zu bewahren [48].

1.4 Rezidivüberwachung

Bei akuten Leukämien wird von einer Remission ausgegangen, wenn der mikroskopisch identifizierbare Blasten-Anteil eines Patienten unter 5% liegt. Unter diesen Voraussetzungen würde ein neu auftretendes Rezidiv mit einer Zellzahl kleiner 10^{10} mikroskopisch unerkant bleiben [30]. Durch diese diagnostische Ungenauigkeit werden einerseits geheilte Kinder unnötig mit adjuvanten Therapien belastet, andererseits erkrankte Kinder mit einem „unterschwelligem“ Rezidiv nur unzureichend therapiert. Eine frühzeitige Intervention in das Krankheitsgeschehen bleibt verwehrt. PCR-Techniken ermöglichen eine sensitivere Überwachung dieser residualen leukämischen Zellen, die als die sogenannte Minimale-Rest-Erkrankung (MRD) definiert werden. Es bestehen zwei Ansätze für das Rezidiv-Monitoring. Diese bestehen zum einen in dem direkten Nachweis von Blasten anhand spezifischer Charakteristika und zum anderen in der Unterscheidung zwischen den autologen Zellen eines Patienten und den gesunden, neu transplantierten. Letzteren Ansatz bilden die Chimärismusanalysen.

1.4.1 Residuale leukämischer Zellen

Molekularbiologische Methoden, die einen direkten Nachweis maligner Zellen ermöglichen, bilden momentan das prägnanteste „diagnostische Werkzeug“ für die Abschätzung der Rezidivwahrscheinlichkeit von Patienten [75]. Dass eine Zunahme von residualen Leukämiezellen einem offenen hämatologischen Rezidiv vorausgeht, ist in mehreren Arbeiten belegt worden [48]. Ebenfalls ist eine erhöhte Blastenlast nach einem Konditionierungsregime als ein signifikanter Parameter für die Rezidivwahrscheinlichkeit zu bewerten. Diese Ergebnisse sind sowohl für Chemtherapieprotokolle als auch für Patienten, die eine SZT erhalten haben beschrieben worden. Die MRD besitzt eine höhere Aussagekraft als die bisher prognostisch herangezogenen Anhaltsdaten wie das Alter, die Anzahl der weißen Blutzellen oder Chromosomenanomalien [30;38;75;76;82].

Der Nachweis dieser Zellen erfolgt durch PCR-Techniken anhand von Chromosomen-Anomalien oder spezifischen Verbindungsregionen rearrangierter Immunglobulin- (Ig) und T-Zellrezeptor-Gene (TCR). Letztere charakterisieren nur die lymphatischen Leukämien. Alternativ besteht die Möglichkeit einer durchflusszyto-

metrischen Immunophenotypisierung der Blasten auf der Basis „tumorassoziierter“ Oberflächenproteine. Die erreichte Sensitivität dieser Methoden liegt bei 10^{-5} , d.h. bei der Detektion einer malignen Zelle unter 10.000 Gesunden [31;75;76;82].

1.4.2 Chimärismus

Eine Chimära ist ein Fabelwesen der griechischen Mythologie und ein Abkömmling von Echidna und Typhon. Letztere sind Kreaturen, die zum einem Teil aus einer Schlange und zum anderen aus einem Menschen bestehen. Ihr Zögling, Chimära, ist eine Komposition aus einem Löwenkopf, einem Ziegenkörper und einem Schlangenschwanz [1]. In der Hämatologie ist der Begriff „radiation Chimaera“ 1956 erstmals von *Ford* eingeführt worden. Er hat einer Maus im Anschluss an eine Ganzkörperbestrahlung Knochenmark transplantiert und die im Verlauf anteilige hämatopoetische Zusammensetzung der Spender- und Empfängerzellen beschrieben [41]. Die Analysen geben Auskunft über das hämatopoetische System nach einer Stammzelltransplantation. Stammen alle Zellen vollständig vom Spender, wird von einem kompletten Chimärismus (CC) gesprochen. Sind zusätzlich Anteile des Empfängers nachweisbar, handelt es sich um einen gemischten Chimärismus (MC). Werden diese autogene Zellen über einen längeren Zeitraum betrachtet, wird zwischen einem zunehmenden (inMC), einem abnehmenden (deMC) und einem konstanten gemischten Chimärismus auf niedrigem Niveau (IIMC) unterschieden. Die Transplantatabstoßung und alleinige Detektion von Empfängerzellen ist definiert als autologe Rekonstitution (AR).

Für die Differenzierung der Spender- von den Empfängerzellen stehen verschiedene Techniken zur Verfügung: die Chromosomenanalyse nach intergeschlechtlicher Transplantation mit der Untersuchung der gonosomalen Anteile [111], der Nachweis von Restriktionslängen-Polymorphismen oder die Vervielfältigung von variable-number-of-tandem-repeats (VNTR) oder short-tandem-repeats (STR) [12;16;61;83;99].

Lawler et al. haben 1991 erstmals über den Gebrauch polymorpher short-tandem-repeats (STR) für die Chimärismusanalyse mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) berichtet [60]. Die Sensitivität dieser Methode liegt bei ca. 1×10^{-2} [63].

1.4.3 Bedeutung des Chimärismus

Der Chimärismus wird nach einer Transplantation zur Beurteilung des „Engraftments“ und zur Einschätzung des Rezidivrisikos eingesetzt. Eine vollständigen Hämatopoese des Spenders gilt als Grundlage für ein gesichertes Engraftment und eine Rezidivfreiheit [10;63;78].

Der Frage, ob ein Zusammenhang zwischen einem gemischten Chimärismus und dem Wiederauftreten einer Leukämie besteht, ist Anfang der 90er Jahre in verschiedenen Arbeiten eingehend nachgegangen worden.

1994 haben *Mackinnon et al.* bei Patienten, die aufgrund einer chronisch myeloischen Leukämie (CML) einer Transplantation unterzogen worden sind, in einer prospektiven Studie eine signifikante Korrelation zwischen dem Auftreten autologer Zellen und der Entwicklung eines Rezidives nachgewiesen [69]. Arbeiten, mit der gleichen Fragestellung bei Patienten mit akuten Leukämien, haben anfangs keine eindeutigen Ergebnisse gebracht. So sind einige Autoren der Ansicht gewesen, dass ein gemischter Chimärismus nicht mit einer erhöhten Rezidivwahrscheinlichkeit korreliert [24;92;97]. *Lawler et al.* haben die Bedeutung der autologen Anteile für die Rezidivwahrscheinlichkeit nicht in Bezug auf ein generelles Auftreten untersucht, sondern hinsichtlich dynamischer Veränderungen ihrer Ausprägung. Erst die Zunahme der Empfängeranteile sind hinweisend für ein Rezidiv [60].

Im Hinblick auf die rascheren Rezidiventwicklungen in den akuten Leukämien ist es 1996 *Bader et al.* gelungen, durch Chimärismusuntersuchungen in kurzen Zeitabständen ebenfalls die dynamischen Veränderungen zu erfassen. Die Gruppe hat hierbei aufgezeigt, dass die relative Häufigkeit eines Rezidivs bei Patienten mit zunehmenden autologen Anteilen doppelt so hoch gewesen ist wie bei Patienten mit vollständiger Empfängerhämatopoese ($p = <0.0005$) [15;17]. Über die Bedeutung autologer Anteile auf niedrigem Niveau herrscht weiterhin Unklarheit [62;83;101].

1.4.4 Subpopulationen

Abhängig von der Zellreihe und dem Entwicklungsalter unterscheiden sich Leukozyten anhand ihrer exprimierten CD-Oberflächenantigene (Cluster-of-Differentiation). Als Zellen gleicher Art bilden sie sogenannte Subpopulationen. Die verschiedenen Leukämien weisen eine immunologische und morphologische Ähnlichkeit zu den unterschiedlichen Subpopulationen der gesunden Hämatopoese auf, die hypothetisch durch einen Reifungsstopp der Leukämiezelle in einem bestimmten Zellstadium erklärt wird. *Ginsberg et al.* haben 1985 erstmals begonnen, die Chimärismusanalysen auf die Subpopulationen auszuweiten, mit dem Ziel ein Einblick in das Krankheitsgeschehen der Leukämien zu bekommen [9]. Es sind Überlegungen angestellt worden, ob Chimärismusanalysen der blastenassoziierten Subpopulationen präzisere Aussagen über residuale oder wiederkehrende Leukämiezellen zulassen, zumal durch die selektive Betrachtung einzelner Zelllinien eine Sensitivitätssteigerung der STR-PCR von 10^{-2} auf 10^{-4} beschrieben wird [58;63;73]. So ist während eines Spätrezidivs die empfängereigene Hämatopoese vorrangig in den blastenassoziierten Subpopulationen beobachtet worden. Bei einem frühen Rezidiv hingegen, bis zum Tag 300 nach SZT, sind die autologen Anteile in allen Zelllinien nachweisbar gewesen [20]. Von einigen Autoren wird vermutet, dass ein gemischter Chimärismus in den T-Zellen mit einer Abnahme des GvL-Effekts einherzugehen scheint und so letztlich mit einer erhöhten Rezidivwahrscheinlichkeit in Verbindung gebracht werden könnte [20;87]. In der Abb. 1 wird ein knapper Überblick über den hämatopoetischen Stammbaum und die Verteilung der in dieser Arbeit untersuchten Subpopulationen gegeben.

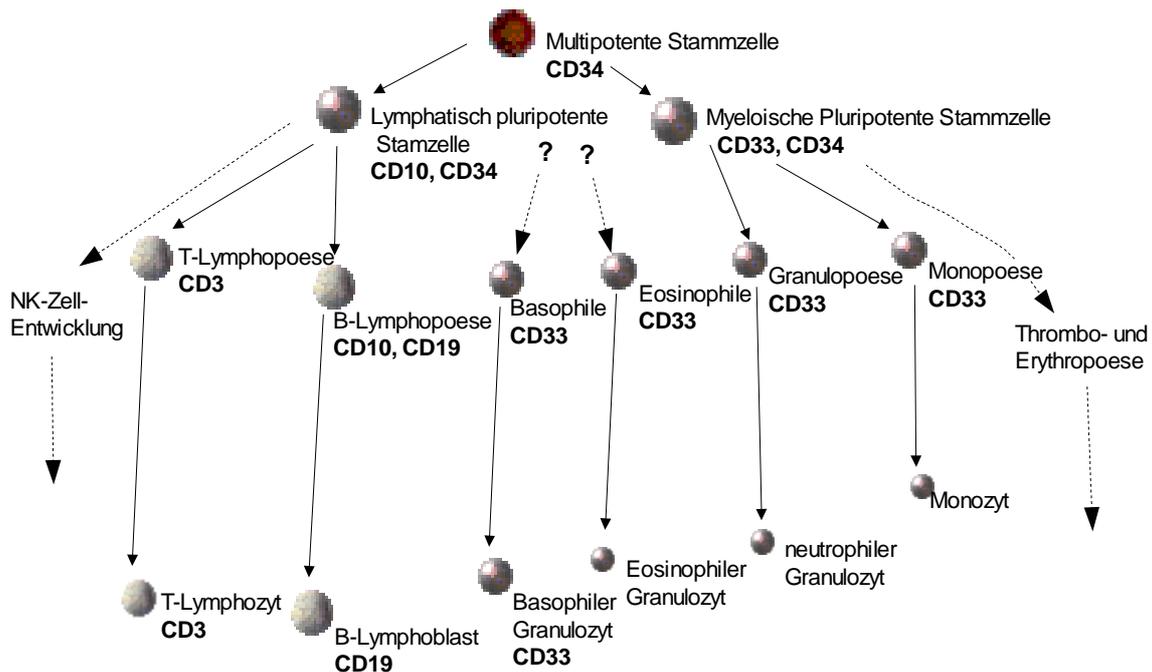


Abbildung 1 Hämatopoetischer Stammbaum mit Angabe der Cluster of Differentiation (CD)

1.5 Immuntherapie und ihre Grundlagen

Ende der 80er Jahre haben *Weiden* und *Thomas et al.* eine vergleichsweise geringere Rückfallrate bei Patienten beobachtet, die eine GvHD entwickeln [110]. Sie haben einen mit dieser Komplikation zusammenhängenden antileukämischen Effekt, dem sogenannten *Graft-versus-Leukemia Effekt (GvL)*, vermutet. Dieser therapeutische Aspekt des Transplantats, bei dem sich die Immunreaktivität der Donor-Effektor-Zellen gegen die malignen Zellen richtet, ist von *Mathé* als *adaptive Immuntherapie* beschrieben worden [71]. 1966 haben *Sprent et al.* die maßgebliche Beteiligung der T-Zellen an dieser Reaktion dargelegt [96].

1990 ist es *Kolb et al.* gelungen sich den GvL-Effekt zu Nutze zu machen und einen Patienten, der aufgrund einer CML transplantiert wurde und ein Rezidiv entwickelt hat, durch die Gabe von Spender-Lymphozyten wieder in eine komplette Remission zu überführen [54]. Eine Steigerung des GvL-Effekts nach SZT kann durch die Reduktion der laufenden Immunsuppression (CsA), durch Donor-Lymphozyten-Infusionen (DLI) oder Cytokinen erreicht werden [4;74;80;95].

Für Patienten, die ein Rezidiv einer akuten Leukämien oder eines MDS entwickelt haben, sind die therapeutischen Erfolge vorerst nicht bestätigt worden [55;80]. Letzterer ist abhängig vom Zeitpunkt des Therapiebeginns [85]. Durch die engmaschigen Chimärismusuntersuchungen ist ein frühzeitiges Erkennen eines Rezidivgeschehens auch bei Patienten mit akuten Leukämien und MDS ermöglicht worden, so dass sich auch bei diesen Erkrankungen Erfolge mit der Immuntherapie eingestellt haben [18]. Im Vergleich zu den Fortschritten, die in der chronischen Phase der CML erreicht worden sind, sind diese jedoch von geringerer Konstanz. Die Erfolgsraten liegen in den akuten Leukämien bei nur ca. 30 %, für die CML hingegen bei 70 % [13;14;44].

1.6 Zielsetzung

Der Erfolg der SZT hat durch die Reduktion der therapieassoziierten Komplikationen über die letzten Jahre stark zugenommen, so dass die Hauptursache des Therapieversagens nun primär in der Wiederkehr der malignen Grunderkrankung liegt [8;86].

Neue Behandlungsansätze zielen deshalb auf die Früherkennung des Rezidivgeschehens, welche die Voraussetzung für eine entsprechende Intervention bildet. Molekularbiologische Methoden, die den direkten Nachweis residueller Leukämiezellen ermöglichen, stellen zum aktuellen Zeitpunkt den „Goldstandard“ für die Risikoeinschätzung dar. Dieser „Direkt-Nachweis“ der Blasten ist jedoch bei einigen Patienten, besonders aus der Gruppe des MDS und der AML, nur eingeschränkt anwendbar [38;51;64;88]. Alternativ können bei diesen Patienten intensivierete Chimärismusanalysen im Rezidivmonitoring durchgeführt werden. Aus vorangegangenen Studien ist ersichtlich, dass autologe Anteile während eines Rezidivs gehäuft in den blastenassoziierten Subpopulationen wiederzufinden sind. Des Weiteren kann durch die Separation einzelner Zelllinien eine verhältnismäßige Anreicherung patienteneigener Zellen zur Gesamtzellzahl einer Probe erreicht werden. Ziel dieser Arbeit ist es, durch Chimärismusanalysen klonspezifischer Subpopulationen eine höhere Aussagekraft und Sensitivität der STR-PCR herauszuarbeiten

und damit besonders für die Patienten eine Alternative im Rezidivmonitoring zu schaffen, für die direkte MRD-Methoden nicht zur Verfügung stehen und auch diesen Patienten ggf. eine frühzeitige immuntherapeutische Intervention zukommen lassen zu können. Es wird den folgenden Fragestellungen nachgegangen:

- Welche Bedeutung besitzen autologe Zellen einzelner Hämatopoetischer Subfraktionen für das Wiederauftreten eines Rezidivs nach allogener Stammzelltransplantation bei Kindern mit akuten Leukämien ?
- Lassen sich durch die Analyse des Chimärismusstatus in Zellsubpopulationen Parameter definieren, die es erlauben ein drohendes Rezidiv frühzeitiger zu erkennen als dies durch die Analysen im gesamten peripheren Blut möglich ist?
- Besteht ein Unterschied zwischen den Proben des Knochenmarks und den Analysen im peripheren Blut?
- Ist ein Vergleich mit direkten Nachweismethoden möglich?
- Ist der Erfolg einer weiterführender Immun- oder Chemotherapien in den Ergebnissen der Subpopulationsanalysen zu erkennen ?
- Welche Empfehlungen lassen sich aus den Untersuchungen der Subpopulationen für die Chimärismusanalysen ableiten?

2 Material

2.1 Reagenzien

2.1.1 Dichtezentrifugation

Biocoll-Separating-Solution

Biochrom AG, Berlin

PBS

Gibco BRL, Eggenstein

2.1.2 Isolierung der Subpopulationen

Für die Isolation der Zellsubpopulationen sind Micro Beads der Firma MILTENY BIOTEC GmbH, Bergisch Gladbach, benutzt worden:

CD3-Micro Bead

Bestnr: 130-050-101

CD10-PE Micro Bead

Bestnr: 340921, Becton Dickinson

CD10-Anti PE-Micro Bead

Bestnr: 130-048-801

CD19-Micro Bead

Bestnr: 130-050-301

CD33-Micro Bead

Bestnr:130-050-501

FC-Block +

CD34-Micro Bead

Bestnr: 130-046-702

PBS

GIBCO BRL, Eggenstein

Mineralöl

APPLIED BIOSYSTEMS, Darmstadt

Running Buffer bestehend aus:

1000 ml

+100 ml PBS (10-fach konzentriert)

+ 2 mM EDTA (744 mg)

+ 0,5 % BSA (5,0 g)

UNI-APOTHEKE Tübingen

Rinsing Solution bestehend aus:

1000 ml

+ 100 ml PBS (10-fach konzentriert)

+ 2 mM EDTA (744 mg)

UNI-APOTHEKE Tübingen

Nährlösung:

VLE-RPMI (1640 / 500 ml)

BIOCHROM AG, Berlin

+ 5 ml Penicillin / Streptomycin

+ 5 ml L-Glutamin

2.1.3 DNA-Isolierung

QUIAMP Blood mini Kit No. 29104

QUIAGEN GmbH, Hilden

Ampuwa

FRESENIUS AG, Bad Homburg

Ethanol 96 %

MERCK, Darmstadt

2.1.4 STR-PCR

PCR Buffer

QUIAGEN GmbH, Hilden

Taq DNA Polymerase

QUIAGEN GmbH, Hilden

TE Puffer

QUIAGEN GmbH, Hilden

Oligonukleotide : dATP

QUIAGEN GmbH, Hilden

dCTP

dGTP

dTTP

Fluoreszenz-markierte Primer (siehe Tab. 1)

Formamid

APPLIED BIOSYSTEMS, Darmstadt

Standard: Gene Scan 500 Rox

APPLIED BIOSYSTEMS, Darmstadt

HPLC H₂O

MERCK, Darmstadt

POP-4 Polymer

APPLIED BIOSYSTEMS, Darmstadt

10 X 310 GA Buffer mit EDTA

APPLIED BIOSYSTEMS, Darmstadt

2.1.5 Geräte und Einmalartikel

Falcon Röhrchen 15 ml, 50 ml

GREINER, Nürtingen

Leucosep Röhrchen

GREINER, Nürtingen

2 ml Röhre / Tube NO. 55.476

SARSTEDT, Nürnberg

Sterile Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml

GREINER, Nürtingen

Pipettenspitzen 2 µl, 20 µl, 100 µl,

EPPENDORF, Hamburg

1000 µl

Pasteur Pipetten	HIRSCHMANN
Safecup Reaktionsgefäße	EPPENDORF, Hamburg
MACS Separations Columns	MILTENY BIOTECH, Bergisch Gladbach
PCR-Hütchen	
Kapillare, 47 cm, 50 µm i.d.	APPLIED BIOSYSTEMS, Darmstadt
Pipetten 2 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl	ABIMED, Langenfeld
Accu-Jet	BRAND
Vortexer	NEO-LAB, Heidelberg
Zentrifuge Rotaxia / RP	HETTICH, Tuttlingen
Auto MACS	MILTENY BIOTECHS, Bergisch Gladbach
ABI PRISM™ 310 C Genetic Analyser	APPLIED BIOSYSTEMS
Micro 22 R Tischzentrifuge	HETTICH, Tuttlingen
Blockthermostat TCR 100	ROTH, Karlsruhe
Waage BP 1200	SARTORIUS, Göttingen
Wasserbad	KÖTTERMANN, Hänigsen
Thermocycler	BACHHOFER, Reutlingen
Photometer Gene Quant II	PHARMACIA, Freiburg
Küvette Quarzglas Suprasil	HELLMA, Laborfachhandel
Type Nr. 105.202.008-QS,	
Schichtdicke 10 mm	
Genotyper Software	APPLIED BIOSYSTEMS, Darmstadt
Genescan Software	APPLIED BIOSYSTEMS, Darmstadt

Tabelle 1: Primercharakteristika

Nr.	Name	Chromosom Lokation	Länge der amplifizierten DNA (BP)	Sequenz der Primer	Referenz
1	F13A1	6p 24-25	180-230	P1: 5'- GAGGTTGCACTCCAGCCTTT - 3' P2: 5'- ATGCCATGCAGATTAGAAA - 3'	Polymeropoulos et al. Nucleic Acids Res 1991:19, 4306
3	MYCL1	1p 32	140-209	P1: 5'- TGGCGAGACTCCATCAAAG - 3' P2: 5'- CCTTTTAAGCTGCAACAATTTC - 3'	Mäkelä et al. Human Mol Gen 1992:1, 217
4	D11S533	11q 13	400-1100	P1: 5'- GCCTAGTCCCTGGGTGTGGTC - 3' P2: 5'- GGGGGTCTGGGAACATGTCCCC - 3'	Eubanks et al. Genomics 1991:11,720-729
5	IL2R β	22q 11	100-130	P1: 5'- GAGAGGGAGGGCCTGCGTTC - 3' P2: 5'- CACCCAGGGCCAGATAAAGA - 3'	Brewster et al. Nucleic Acids Res 1991:19, 4022
7	D17S30	17p 13.3	170-870	P1: 5'- CGAAGAGTGAAGTGACAGG - 3' P2: 5'- CACAGTCTTTATTCTTCAGCG - 3'	Horn et al. Nucleic Acids Res 1989:19, 2140
14	HUM RENA-4	1q32	251-271	P1: 5' - AGAGTACCTTCCCTCTACTCA- 3' P2: 5' - CTCTATGGAGCTGGTAGAACCTGA- 3'	Edwards et al. Genomics 1992: 12, 241-253
15	HUM FABP	4	102-189	P1: 5' - CAGTTCGTTTCCATTGTCTGTCCG- 3' P2: 5' - GTAGTATCAGTTTCATAGGGTCACC- 3'	Edwards et al. Am J Hum Genet 1991: 49, 746-756
16	HUM THO1	11p15.5	179-203	P1: 5' - GTGGGCTGAAAAGCTCCCGATTAT- 3' P2: 5' - ATTCAAAGGGTATCTGGGCTCTGG- 3'	Edwards et al. Genomics 1992: 12, 241-253
17	CTLA4	2q33	92-130	P1: 5' - AACCGTGGCTCTATGCA- 3' P2: 5' - GCCAGTGATGCTAAAGGTTG- 3'	Polymeropoulos et al. Nucleic Acids Res 1991:19, 4018
18	HUM CD4	12p	88-128	P1: 5' - GCCTGAGTGACAGAGTGAGAACCC- 3' P2: 5' - TTGGAGTCGCAAGCTGAACTAGC- 3'	Edwards et al. Nucleic Acids Res 1991:19, 4791
20	P-450CYP 19	15q21.1	154-178	P1: 5' - GCAGGTACTTAGTTAGCTAC- 3' P2: 5' - TTACAGTGAGCCAAGTCTGT- 3'	Polymeropoulos et al. Nucleic Acids Res 1991:19, 195
21	VWF II	12p12pter	139-167	P1: 5' - TGTACCTAGTTATCTATCCTG- 3' P2: 5' - GTGATGATGATGGAGACAGAG- 3'	Ploos et al. Nucleic Acids Res 1990:18, 4957

3 Methoden

3.1 Untersuchungsmaterial

Als Ausgangsmaterial für die Chimärismusanalysen sind 1 bis 3 Tage alte, mit EDTA versetzte Knochenmarksproben verwendet worden. Die Untersuchungen im Knochenmark sind nach 30, 60, 100, und 180 Tagen nach SZT sowie nach 9 Monaten und einem Jahr durchgeführt worden. Die Analysen sind im Ergebnisteil zusammen mit den Routineuntersuchungen im Vollblut dargestellt. Letztere sind bis 100 Tage nach SZT wöchentlich und dann monatlich untersucht worden. In der ALL ist der Chimärismus in der CD3-, CD10-, CD19- und CD34-Subpopulationen, in der AML in der CD33- und CD34- Subpopulationen bestimmt worden.

3.2 Zusammenfassende Übersicht

Im ersten Schritt der Zellaufbereitung wird zunächst eine Separation der mononuklearen Zellen aus dem Gesamtknochenmark über die Dichtezentrifugation erreicht. Die Selektion der Subpopulationen wird mit Hilfe des „Magnet-aktivierten Cell-sortings“ (MACS) durchgeführt. Für die Chimärismusanalysen wird die fluoreszenzmarkierte STR-PCR eingesetzt. Hier werden die DNA-Fragmente der gewonnenen Proben vervielfältigt sowie farblich markiert. Im Anschluss werden letztere mit Hilfe der Kapillarelektrophorese der Länge nach voneinander aufgetrennt und in ihrer Quantität (in %) beurteilt.

3.3 Isolierung der mononuklearen Zellen aus dem Knochenmark

Die Trennung der mononuklearen Zellen aus dem ursprünglichen Knochenmarkspunktat erfolgt über die Dichtezentrifugation. Über einen in einem Röhrchen aufgebauten Dichte-Gradienten können durch Zentrifugation Zellen bestimmter Dichte separiert werden[2].

Dazu werden 3 ml Ficoll-Isopaque-Lösung in ein LecoSep-Röhrchen (10 ml) gegeben und zentrifugiert (1000 g, 30 sec). In diesem Röhrchen befindet sich an der 3 ml Markierung eine Filterscheibe, die anschließend ein einfaches Aufbringen von 3 bis 6 ml EDTA-Knochenmark ermöglicht und ein Vermischen der beiden Flüssig-

keiten verhindert. Während der erneuten Zentrifugation (15 min, 800 g, Bremse 5) erfolgt die Isolierung der mononukleären Zellen in der sog. Interphase des erzeugten Gradienten. Aufgrund Ihrer geringen Dichte werden diese Zellen an der Grenzfläche des Gradienten festgehalten und als heller Ring sichtbar. Im folgenden Waschschrift wird der helle Ring mit der Pasteurpipette vorsichtig abgetragen, in ein frisches 15 ml Flaconröhrchen gegeben und mit 10 ml PBS (Phosphat-gepufferte-Salzlösung) resuspendiert. Der Rest ist zu verwerfen. Nach einer weiteren Zentrifugation (12 min, 450 g, Bremse 5), wird der Überstand abpipettiert und das Zellpellet in 1 ml PBS gelöst. Für die spätere Zellzählung (am Cobas-Micros) werden 50 µl abgenommen und zu 450 µl PBS in ein Eppendorf-Gefäß gegeben. Die restlichen Zellen werden für den 2. Waschschrift wieder mit 10 ml PBS versehen, gemischt und abzentrifugiert (12 min, 350 g, Bremse 5). Der Überstand ist abzupipettieren.

Alle folgenden Arbeitsschritte werden auf Eis durchgeführt. Werden die Zellen erst am folgenden Tag weiterverarbeitet, müssen sie über Nacht in 6 ml Nährlösung bei 4°C im Kühlschrank gelagert werden.

3.4 DNA-Isolation aus den Nativproben von Spender und Patient

Die Chimärismusanalysen der Subpopulationen werden im Vergleich mit den Nativproben von Donor und Rezipient durchgeführt. Die Quantität dieser Nativproben wird spektrophotometrisch bestimmt. Die DNA-Isolierung wird nach dem QIAamp-Blood-Kit-Verfahren entsprechend den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Die aufgereinigte DNA ist anschließend frei von Proteinen, Nukleasen und anderen Kontaminationen.

Die dazu benötigte Protease K wird im Kühlschrank aufbewahrt. Die Reagenzien Puffer AL, Reagenz AL1, Puffer AL2, Puffer AE und Puffer AW werden unter Lichtabschluss bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Vor jeder Isolierung ist ein Wasserbad und der Puffer AE auf 70 °C vorzuwärmen.

3.4.1 DNA – Isolation

Für die Isolation werden vorerst die gefrorenen Proben oder die sog. Zellpellets auf Raumtemperatur erwärmt. Von diesen werden 200 µl in ein Eppendorfgefäß gegeben. Ist das Volumen geringer als 200 µl, wird die restliche Menge mit PBS ergänzt. Anschließend werden dazu 25 µl Potease K und 200 µl Puffer AL pipettiert. Die Protease K darf auf keinen Fall direkt in den Puffer AL gegeben werden. Im Anschluss wird das Gemisch sofort so lange gevortext, bis alle Bestandteile gleichmäßig gelöst sind, und dann zur Inkubation für 10 min in das 70 °C vorgewärmte Wasserbad gestellt, um die Zellyse zu beschleunigen. Danach werden zu jeder Probe 210 µl Ethanol pipettiert, die Mischung gevortext und alles vorsichtig in eine QIAamp-Spinsäule übertragen. Die Probe wird bei 8000 UPM für 1 min zentrifugiert. Diese Säule enthält eine Siliconmembran, auf der die aufgebrachte DNA zurückgehalten und auf diese Weise von den anderen durch die Membran hindurchtretenden, verunreinigenden Bestandteile der Zelle getrennt wird. Es folgen zwei Waschschrirte mit 500 µl PBS, wobei der erste bei 8000 UPM für 1 min und der zweite bei 13000 UPM für 2 min zu zentrifugieren ist. Zum Eluieren der DNA wird die Säule auf ein neues Eppendorfhütchen überführt. In die Säule wird 50 µl AE Puffer gegeben und für 1 min inkubiert und dann zentrifugiert (8000 UPM, 1 min). Das Zentrifugat wird für 1 min auf 70 °C erhitzt, erneut auf die Säulen gegeben und wiederum abzentrifugiert. Die Säule ist zu verwerfen. Für die Konzentrationsbestimmung werden 5 µl entnommen, in ein Eppendorfgefäß überführt und mit 95 µl Aqua dest. verdünnt. Die Probe wird bei -20 °C eingefroren. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren hat keinen negativen Effekt auf die PCR-Analyse [12]. Ein Aliquotieren der DNA ist deshalb nicht erforderlich.

3.4.2 Spektrophotometrische Bestimmung der DNA-Quantität

Für die spektrophotometrische Bestimmung der DNA-Quantität werden 5 µl DNA Lösung auf 95 µl ddH₂O in eine 100 µl Glas-Cuvette pipettiert. Die optische Dichte (OD) des Suspensats wird zwischen 260 nm und 280 nm am Genequant-Spektrophotometer ermittelt.

Einer OD260 von 1 entsprechen 0,05 µg / µl doppelsträngiger DNA. Abschließend wird die Reinheit der DNA über dem Quotienten von OD260 / OD280 bestimmt. Einer hohen Reinheit entspricht ein Wert von 1,8.

3.5 Isolierung der Subpopulationen mit Hilfe des „MACS“

3.5.1 Prinzip der „Magnet-aktivierten-Zellsortierung“

Die Isolierung der verschiedenen Subpopulationen ist mit Hilfe des MACS (Magnet-activated Cell-Sorter) erfolgt. Hierzu werden die zu isolierenden Lymphozyten über ihre CD-Oberflächenantigene mit ferromagnetischen Antikörpern (AK, Micro Beads) markiert. Für die Separation durchläuft die zu bearbeitende Zellsuspension eine in einem Magneten platzierte Trennsäule. Der Kern dieser Säule besteht aus plastikummantelten kleinen Eisenkugeln, zwischen denen sich im magnetischen Feld ein Streufluss aufbaut, der die markierten Zellen zurückhält. Nicht markierte Zellen werden aus der Säule ausgewaschen. Durch ein anschließendes Abschalten des Magneten können die positiv markierten Zellen aus der Säule selektiv eluiert werden [2].

3.5.2 Isolation der Subpopulationen

Die Markierung der Zellen erfolgt entweder direkt über die CD-Oberflächenantigene oder indirekt über einen dazwischen geschalteten Antikörper. Die verwendeten Micro Beads werden in Dunkelheit bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Verklumpte Proben werden nicht isoliert, da die Reinheit der Subpopulation nicht mehr gewährleistet werden kann.

Je nach Diagnose werden zu dem gewonnenen Zellpellet entweder 160 µl PBS bei der AML und MDS oder 320 µl PBS bei der ALL pipettiert. Für jede Subpopulation stehen schließlich 80 µl Zellsuspensat für die Isolierung der einzelnen Subpopulationen zur Verfügung. Alle folgenden Arbeitsschritte werden auf Eis durchgeführt.

3.5.2.1 Isolation der CD3-, CD19- und CD33-Subpopulation

Die Separation der CD3-, CD19- und CD33-Subpopulationen erfolgt über eine direkte Markierung der Zellen mit Antikörpern.

Hierzu werden von den in PBS gelösten Mononuklearen Zellen 80 µl in ein Leucosep Röhrchen gegeben und mit 20 µl des gewünschten CD-Antikörpers versetzt. Das steril abgeschlossene Suspensat wird bei 4 °C unter gelegentlichen Schütteln 15 min inkubiert. Nach der Zugabe von 400 µl PBS erfolgt die Zellauftrennung im Auto-MACS-Seperator mit dem Posseld-Programm. Die positiv eluierten Zellen werden in einem 0,5 ml Eppendorfhütchen aufgefangen und abzentrifugiert (1000 g, 5 min).

3.5.2.2 Isolation der CD10-Subpopulation

Die Separation der CD10-Subpopulation erfolgt über eine indirekte Bindung des Antikörpers. Die Zellen werden hierfür zunächst mit einem Flouorchrom-conjugierten Antikörper markiert, der erst die indirekte Bindung eines Anti-Micro Bead ermöglicht.

Zu den 80 µl Zellsuspensat werden 10 µl CD10-PE gegeben und bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Anschließend werden die Zellen abzentrifugiert (300 g, 10 min) und der Überstand abgenommen. Die Zellen werden erneut in der Ursprungsmenge (80 µl) PBS suspensiert. Alle weiteren Arbeitsschritte entsprechen denen der direkten Markierung. Als ferromagnetische Antikörper ist hier der 20 µl Anti-PE zu verwenden.

3.5.2.3 Isolation der CD34-Subpopulation

Die Separation der CD34-Subpopulation erfolgt ebenfalls über eine direkte Bindung des Antikörpers an der Zelle; jedoch reagiert letzterer mit einem weiteren Oberflächen Protein, dem FC-Fragment. Um eine unspezifische Bindung der CD34-Antikörper und einer Verunreinigung der Subpopulation entgegenzuwirken, ist das FC-Fragment vorher abzuschirmen.

Zu den 80 µl Zellsuspensat werden 20 µl FC-Block-Agens pipettiert und inkubiert (20 °C, 5 min). Anschließend werden 20 µl CD34-Antikörper zu dem Suspensat hinzugefügt und erneut inkubiert (4 °C, 30 min). Nach der folgenden Zentrifugation (300 g, 10 min) wird der Überstand abgenommen und die Zellen in 500 µl PBS resuspensiert.

Die optimalen Markierungsverhältnisse für die verwendeten Micro Beads sind nach den Angaben des Herstellers bei einer Zellzahl von 1×10^7 gegeben. Der Median der verwendeten Zellen hat in dieser Studie bei $0,25 \times 10^7$ gelegen. Um die niedrigen Mengen auszugleichen, wird die Isolation bei allen Subpopulationen am Auto-Macs-Seperator mit dem posseld-Programm durchgeführt, bei dem das Suspensat zwei magnetische Säulen durchläuft. Hiermit wird sichergestellt, dass alle markierten Zellen in dem aufgebauten Streufeld zurückgehalten werden. Dieses Programm wird für die Aufreinigung von Subpopulation mit sehr niedrigen Zellzahlen empfohlen [2;3].

3.5.2.4 Weiterverarbeitung der eluierten Zellen

Die positiv eluierten Zellen werden in einem 0,5 ml Eppendorfhütchen aufgefangen und abzentrifugiert (1000 g, 5 min). Der Überstand ist abzupipettieren und zu verwerfen. Auf das Zellpellet werden 20 µl in PBS verdünnter PCR-Puffer (1:10) gegeben und anschließend mit 30 µl Mineralöl ergänzt. Beim anschließenden Erhitzen auf 95 °C (15 min) verhindert das Öl ein Verdunsten der Probe. Durch die hohen Temperaturen kommt es zur Zerstörung der Zellmembranen und zur Freisetzung der denaturierten DNA. Durch ein kurzes anzentrifugieren (8000 g) wird ein Absetzen der Zellbestandteile auf den Gefäßboden erreicht. Anschließend ist das Produkt bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C aufzubewahren.

3.6 Fluoreszenz-markierte-STR-PCR

3.6.1 Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR (Polymerase-Kettenreaktion) ist eine einfache Methode der DNA-Amplifizierung, welche durch mehrfache Wiederholungen eines Reaktionszyklus erreicht wird. Am Anfang dieses Zyklus steht die Denaturierung der DNA bei 95 °C, d.h. die Entspiralisierung und das Auseinanderbrechen der Doppelhelix. Beim Abkühlen auf ca. 60 °C kommt es zum Anneling, d.h. zur Bindung des Primers an die komplementären DNA-Sequenzen. Letzterer ermöglicht die Anlagerung der Taq-Polymerase. Diese katalysiert die Synthese komplementärer Oligonukleotide und bildet aus der DNA in der sog. Extensionsphase wieder eine Doppelhelix. Bei der mehrfachen Wiederholungen dieses Zyklus ergibt sich eine exponentielle Zunahme der

Moleküle. 20 Zyklen resultieren in einer 10^6 -fachen Amplifikation eines doppelsträngigen Moleküls. Durch die Verwendung von fluoreszenzmarkierten Primern sind die neu synthetisierten Oligonukleotide farblich markiert [2;7].

3.6.2 Short-tandem-Repeats

Ursprünglich ist die STR-PCR in der forensischen Medizin angewandt worden. Sie dient dort der Bestimmung des genomischen Fingerabdruckes. Letzterer basiert auf einem System hoch polymorpher, sich wiederholender, nicht codierender Sequenzen von 2 - 7 Basenpaaren (Tandems). Die Unterscheidung der Individuen ergibt sich aus der unterschiedlichen Anzahl der Wiederholungen dieser Sequenzen und den hieraus resultierenden Längenvarianten. Insgesamt erreichen die STRs Längen von 80 bis 300 Basenpaaren [58;63;93;94].

3.6.3 Primerauswahl

Für die Differenzierung der Spender- von den Empfängerzellen stehen für die hier dargestellten Untersuchungen 12 Primer zur Verfügung (Tab. 1). Ein Primer ist nur dann für die Chimärismusanalysen geeignet, wenn zwischen den synthetisierten DNA-Produkten ein Längenunterschied von mindestens 4 Basenpaaren besteht. Besitzen der Spender und der Empfänger für einen Primer dasselbe Allel, ist dieser folglich für eine Unterscheidung nicht geeignet. Für die Analysen nach SZT wird der informativste Primer ausgewählt.

3.6.4 PCR-Probenansatz

Als Richtlinie für die PCR-Amplifikation wird das *Quiagen-Taq-DNA-Polymerase-Protokoll* herangezogen. Alle Arbeiten werden auf Eis durchgeführt. Die Primer und die Taq-Polymerase sind sehr licht- und wärmeempfindlich, so dass der Zeitraum außerhalb des Kühlschranks so kurz wie möglich gehalten werden sollte. Die Primer werden aus diesem Grund aliquotiert.

Für den PCR-Ansatz wird für jede Probe ein *Master Mix* von 9,5 µl vorbereitet.

Der *Master Mix*-Ansatz wird in einem Eppendorf-Gefäß vorbereitet und besteht aus den nachfolgend aufgelisteten Reagenzien. Die Angaben sind mit der Anzahl der

zu untersuchenden Proben zu multiplizieren und in der aufgelisteten Reihenfolge in die Eppendorfhütchen zu pipettieren.

1. 7,0 µl H₂O
2. 1,4 µl PCR-Puffer – 10 x PCR-Puffer (enthält 15 mM MgCl₂)
3. 0,8 µl dNTP – 10 nmol / µl / dNTP
4. 0,2 µl Primer (1 + 2) – je 50 pmol / µl
5. 0,1 µl Taq – Polymerase

Für die Analyse der Nativ-DNA von Spender und Empfänger sowie für die zu untersuchende Knochenmarksprobe werden 0,5 µl DNA (enthält ca. 100 ng DNA) zu dem Master Mix in die entsprechend vorbereiteten Hütchen pipettiert. Für die Analyse der Subpopulationen wird die doppelte Menge verwendet. Anschließend werden die PCR-Gefäße kurz auf dem Titertek geschüttelt und in die Cyclor gestellt.

3.6.5 Thermocyclerprogramme

Entsprechend der unterschiedlichen Annealing-Temperaturen und Zyklen der verschiedenen Primer werden die Ansätze wie folgt gecycelt:

Primer NR:	1, 3, 7	5, 14-18, 20, 21	4	17
Initiale Denaturierung	94°C, 3 min	94°C, 3 min	94°C, 3 min	94°C, 3 min
Denaturierungsschritt	94°C, 1 min	94°C, 1 min	94°C, 1 min	94°C, 1 min
Primer-Annealing	58°C, 0,45 min	62°C, 0,45 min	65°C, 0,45 min	64°C, 0,45 min
Primer-Extension	72°C, 1:30 min	72°C, 1:30 min	72°C, 1:30 min	72°C, 1:30 min
Cyclenzahl	35 Cyclen	35 Cyclen	35 Cyclen	35 Cyclen

Tabelle 2: Thermocyclerprogramme

Nach dem Abschluss der Programme werden die Produkte bis zur Weiterverarbeitung bei 4 °C gelagert.

3.7 Die Kapillarelektrophorese

3.7.1 Prinzip der Elektrophorese und die Verarbeitung der Daten

Das Funktionsprinzip der Elektrophorese beruht auf der unterschiedlichen Diffusionsgeschwindigkeit von Oligonukleotiden in einem elektrischen Feld. Getrieben durch die eigene Ladung werden die DNA-Fragmente in Gelen der Größe bzw. Länge nach aufgetrennt [2;7]

In dieser Studie ist die Auftrennung der DNA-Fragmente am ABI PRISM 310-*Genetic-Analyser*-System erfolgt. Hier durchlaufen die fluoreszenzmarkierten-DNA-Produkte eine Kapillare, in der nach einer festgelegten Strecke die Emissionen der Farbstoffe gemessen werden. Das *multi-color-detektion-System* des ABI PRISM 310 ermöglicht es, verschiedene Fluoreszenz-Farbstoffe simultan zu detektieren. Somit können drei unterschiedlich markierte DNA-Fragmente in einer Spur analysiert werden.

Die erhobenen Daten werden mit Hilfe der GeneScan-Analysis-Software ausgewertet. Dieses Programm identifiziert die DNA-Banden und vergleicht sie mit einem mitlaufenden Standard (ROX 500), der eine Beurteilung der Länge und der DNA-Menge der Probe ermöglicht.

Mit Hilfe der GenoTyper-Software werden die Ergebnisse in einem Kurven-diagramm nach Fragmentlänge und Signalintensität dargestellt und die Integrale der Kurven quantifiziert.

3.7.2 Probenansatz für die Kapillarelektrophorese

Die PCR-Produkte werden mit 40 µl H₂O verdünnt.

Für jeweils drei Proben wird ein Hütchen mit 13,7 µl Formamid und 0,3 µl eines Standards (GeneScan Rox 500) vorbereitet. Da die PCR-Produkte mit drei unterschiedlichen Farben (fam, hex, ned) markiert werden, können diese parallel in einer Spur analysiert werden. Von jedem verdünnten Produkt wird 1 µl in ein Hütchen pipettiert. Das Suspensat wird vorsichtig kurz geschüttelt und auf eventuelle Luftblasen am Boden des Hütchens kontrolliert. Die Probe wird denaturiert (90 °C, 2 min), sofort abgekühlt und in das ABI PRISM 310 System zur Analyse überführt.

3.7.3 Einstellungen des ABI PRISM 310 System

Für die Auftrennung der DNA-Fragmente wird das POP-4-Polymer, eine 47 cm lange Kapillare und der 10 X 310 GA Buffer mit EDTA nach den Empfehlungen des Herstellers verwendet.

Folgende Parameter werden für die Läufe eingestellt:

- Injektionszeit: 5 s
- Injektionsenergie: 15.0 kV
- Temperatur: 60 °C
- Zeit pro Lauf: 18 min

Wenn die Analyse unter diesen Einstellungen in den Subpopulationen keine Ergebnisse erbringt, wird ein erneuter Versuch mit einer verlängerten Injektionszeit von 10 sec vorgenommen oder die DNA-Menge für die Analyse verdoppelt.

3.8 Auswertung der Daten

Die Analyse der Rohdaten erfolgt mit der Software von GeneScan 3.1[®] und die Auswertung des Chimärismus mit der GenoTyper[®] Software (Perkin- Elmer, Foster City, USA). Die Ergebnisse werden als Kurvendiagramm dargestellt. Die DNA-Produkte werden abhängig von der Signalintensität und der Fragmentlänge als Integral dargestellt. Aus dem Größenverhältnis der berechneten Flächen ergibt sich das anteilige Verhältnis zwischen Spender und Empfänger.

Das Ergebnis wird im Vergleich mit den ursprünglichen Spender- und Empfängerproben bewertet und in prozentualen Anteilen angegeben [58].

3.8.1 Berechnung des Chimärismus

Die prozentualen Anteile der Spender- und Empfänger-DNA in einer Probe ergeben sich aus dem folgenden Verhältnis:

$$\text{Anteile der Empfänger DNA in \%} = 100x \frac{\text{FlächeEmpfänger}}{\text{FlächeSpender} + \text{FlächeEmpfänger}}$$

Für die Berechnung des Chimärismus bestehen drei Möglichkeiten:

1. Wenn Spender und Empfänger ein Allel teilen, kann das gemeinsame Allel aus der Kalkulation des Chimärismus ausgeschlossen werden (Abb. 2):

$$\text{Anteile der Empfänger DNA in \%} = 100x \frac{\text{FlächeA}}{\text{FlächeA} + \text{FlächeC}}$$

2. Wenn Spender und Empfänger kein Allel teilen, wird der Chimärismus wie im vorherigen Beispiel berechnet. Sind Spender und Empfänger oder einer von beiden heterozygot, werden die Flächen des jeweiligen addiert (Abb. 3):

$$\text{Anteile der Empfänger DNA in \%} = 100x \frac{\text{Fläche}(A + B)}{\text{Fläche}(C + D) + \text{Fläche}(A + B)}$$

3. Wenn entweder der Spender oder der Empfänger homozygot ist und der andere heterozygot und beide ein Allel teilen, ergibt sich für die Kalkulation des Chimärismus folgende Berechnung (Abb 4):

$$\text{Anteile der Empfänger DNA in \%} = 100x \frac{2x\text{FlächeA}}{\text{FlächeA} + \text{FlächeB}}$$

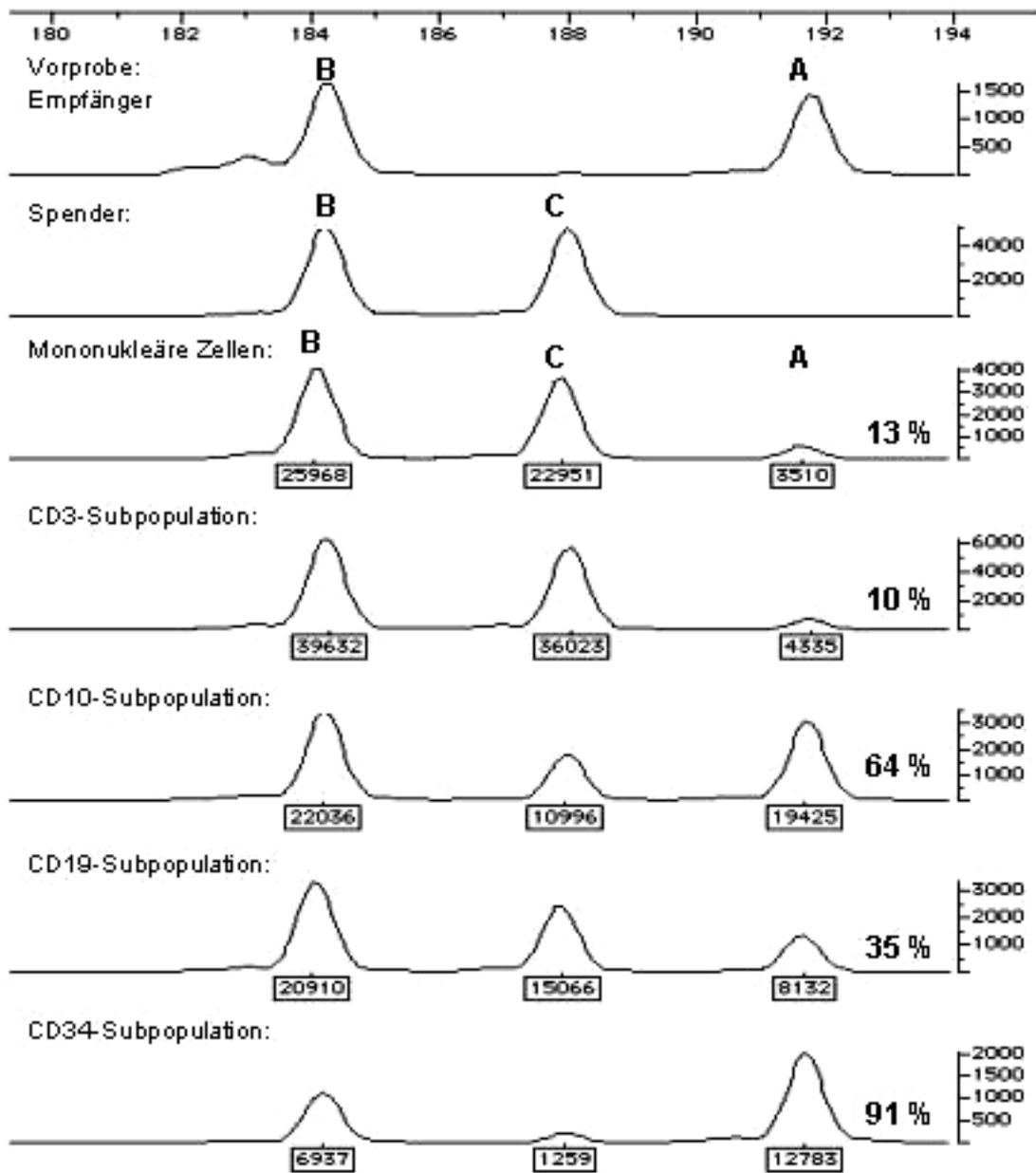


Abbildung 2: Chimärismusanalysen eines Patienten, bei dem sich der Spender und der Empfänger ein Allel teilen; Angaben der autologen Anteile in %, A+B = Allelen des Empfängers, B+C = Allelen des Spenders

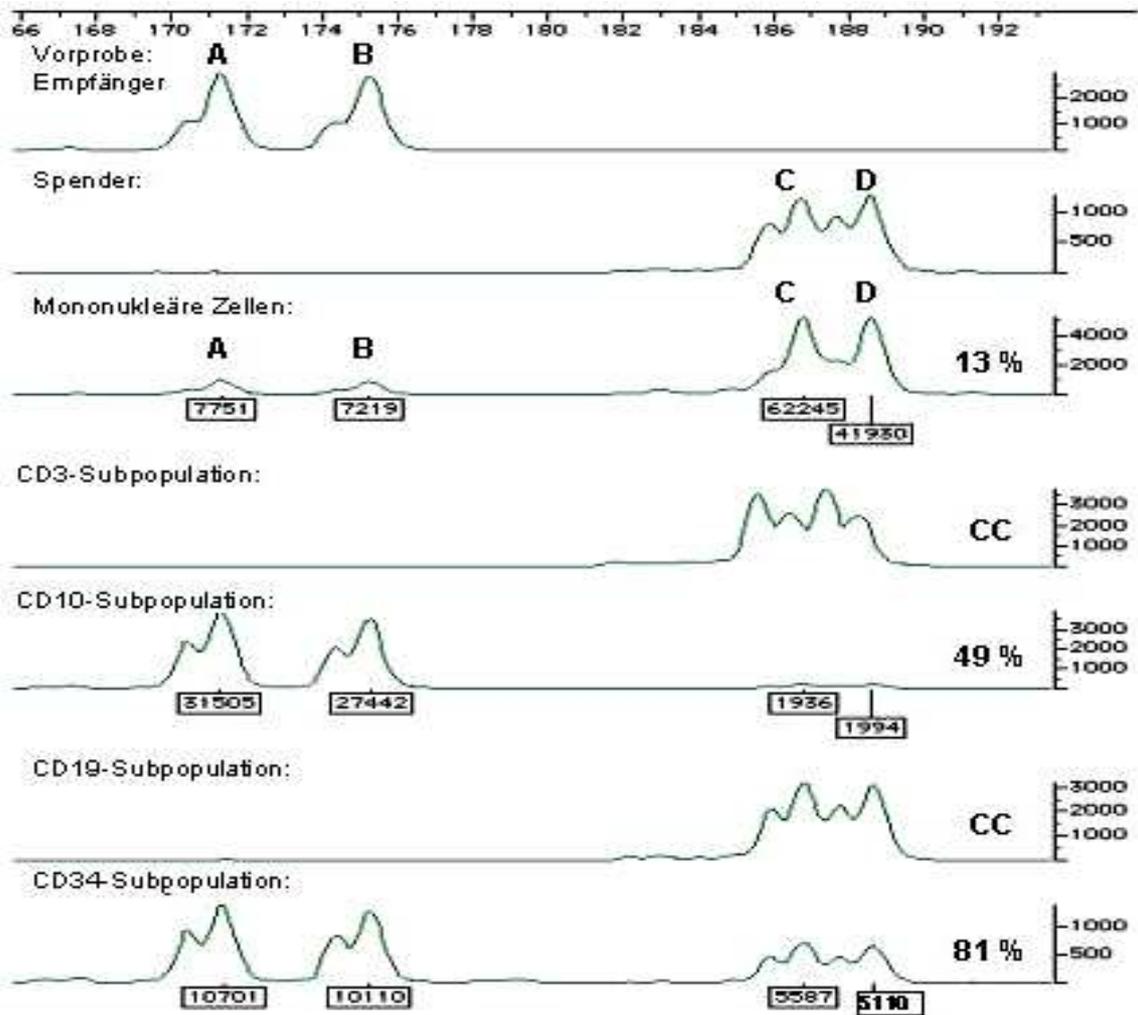


Abbildung 3: Chimärismusanalysen eines Patienten, bei dem sich der Spender und der Empfänger kein Allel teilen; Angaben der autologen Anteile in %, A+B = Allelen des Empfängers, C+D = Allelen des Spenders, autologe Anteile in %, CC = kompletter Chimärismus

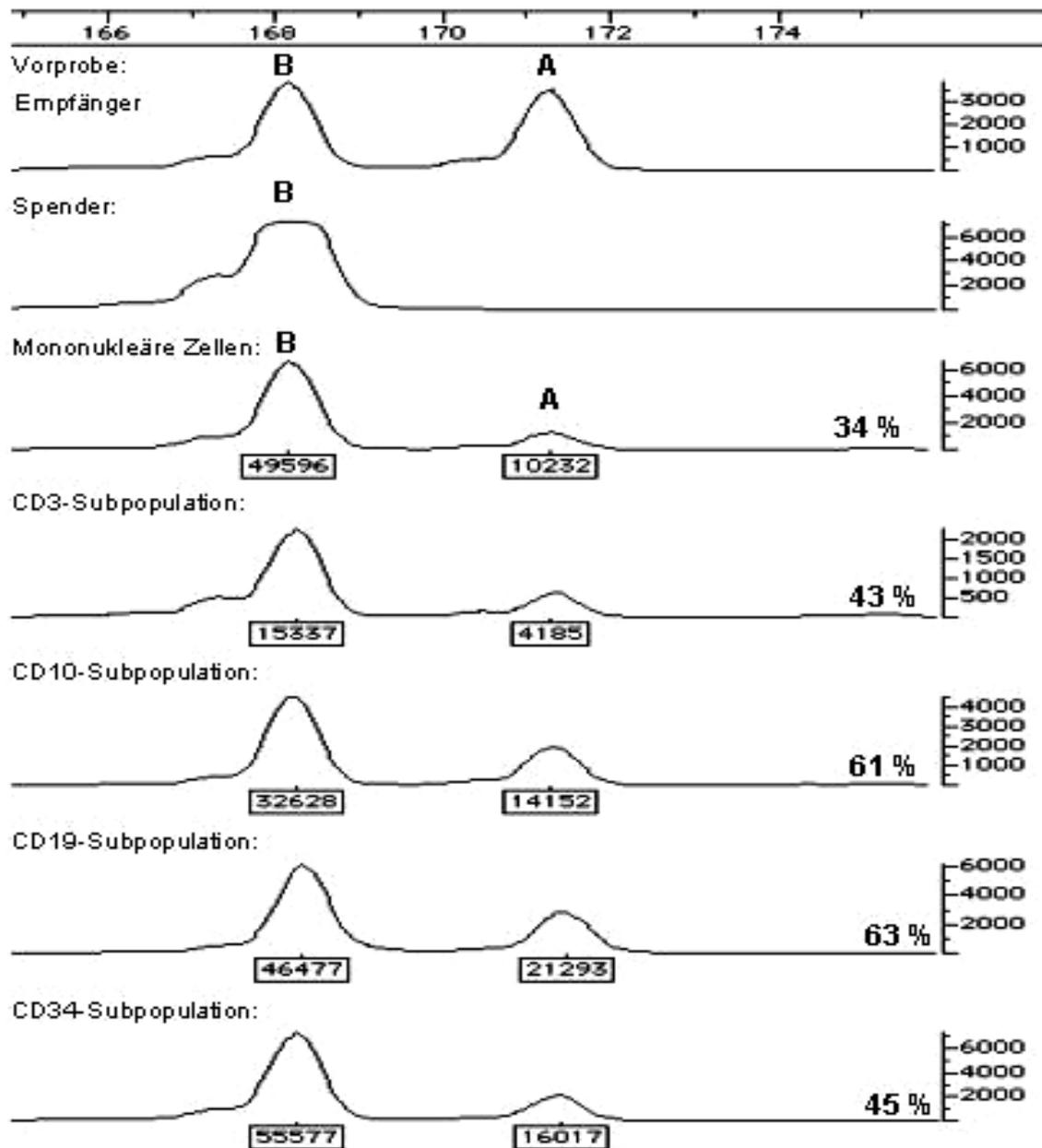


Abbildung 4: Chimärismusanalysen, eines heterozygoten Empfängers und eines homozygoten Spenders, die sich ein Allel teilen; Angaben der autologen Aneile in %, B+A = Allele des Empfängers, B = homozygotes Allel des Spenders

Anhand der erhobenen Ergebnisse aus den Vollblut-, Knochenmarks- und Subpopulationsanalysen sind die Patienten in die verschiedenen Chimärismus-Gruppen eingeteilt.

3.8.2 Einteilung der Chimärismusgruppen

Anhand des Auftretens autologer Anteile werden verschiedene Chimärismusgruppen beschrieben. Die Reduktion autologer Anteile nach SZT bis zum alleinigen Nachweis der Spenderzellen wird als abnehmender Chimärismus (deMC) bezeichnet. Autologe Anteile von weniger als 10% in der vorausgegangenen Untersuchung mit einer Zunahme hierzu von 5%, bzw. ein Empfängeranteil von mehr als 10% mit einer Zunahme von mehr als 10%, werden als zunehmender Chimärismus (inMC) bezeichnet.

Sporadisch auftretende gemischte Chimäre, die die oben genannten Bedingungen nicht erfüllen, stellen einen gemischten Chimärismus auf niedrigem Niveau (IIMC) dar.

3.9 Real-Time-PCR

Die Ergebnisse der Subpopulationsanalysen sind in dieser Studie mit Werten der Real-Time-PCR verglichen worden. Diese Methode basiert auf dem Nachweis klonspezifischer Rearrangements von Immunglobulin- und T-Zell-Rezeptorgenen [2;48]. Beschrieben worden ist die Methode von *Bader et al.* in einer Studie von 2002 [11]. Die Vor- und Nachteile dieser Methode, z. T. im Vergleich mit weiteren Möglichkeiten der MRD-Detektion, werden in der Diskussion näher beleuchtet [30;48;75;76;82].

4 Patientenkollektiv

Die vorliegende Arbeit bildet den Teil einer groß angelegten multizentrischen Studie. Die folgenden Kliniken sind daran beteiligt gewesen:

- Universitätskinderklinik-Freiburg
- Universitätsklinik für Kinder und Jugendliche Erlangen
- Universitätskinderklinik Essen
- Medizinische Hochschule Hannover – Kinderklinik
- Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Klinikum für Kinder- und Jugendmedizin „Jussuf Ibrahim“
- Universitätskinderklinik und Poliklinik Ulm
- Kinderklinik der TU München
- Kinderklinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
- Von Haversche Klinik (München)

Das Durchschnittliche Alter der Kinder betrug 8 Jahre. Der jüngste Patient war zum Zeitpunkt der Transplantation 1 Jahr alt, der Älteste war 22 Jahre. Der Untersuchungszeitraum betrug im Median 453 Tage mit einem Minimum von 16 und einem Maximum von 1586 Tagen.

Die Angaben zu den Patienten und ihren Analyseergebnissen in den Subpopulationen des Knochenmarks sind in unterschiedlichen Tabellen zusammengefasst. Sie sind nach den folgenden Kriterien zusammengefasst: Grunderkrankung (ALL, T-ALL, AML oder MDS), dem Remissionsstatus (komplette Remission, Rezidiv oder transplantationsassoziierte Mortalität).

UPN	AnzPr	Alter	Dis	Spender	Remissionsstatus	Konditionierung	T-Zell depletion	Chimärismusstatus	IT	Krankheitsverlauf	Tage follow up
2664	2	11	AML	MMFD	1	TBI+Eto+Flu+ATG	ja	CC	ja	CR	333
2698	1	13	AML	MUD	1	Bus+Cyc+Mel+ATG	nein	CC	nein	CR	243
2524	1	7	AML	MFD	1	Cyc+Bus	nein	CC	nein	CR	507
2661	1	13	AML	MUD	2	Bus+Cyc+Mel+ATG	nein	CC	nein	CR	170
1964	1	10	AML	MFD	1	Bus+Cyc+Mel	nein	CC	nein	CR	596
1941	1	2	AML	MFD	1	Bus+Cyc+Mel	nein	CC	nein	CR	1208
2608	1	11	AML	MMUD	2	TBI+Cyc+ATG	ja	CC	nein	CR	392
2290	1	11	AML	MUD	2	Bus+Cyc+Mel+ATG	nein	CC	nein	CR	803
2146	1	15	AML	MFD	1	Bus+Cyc	nein	CC	nein	CR	953
1673	2	1	AML	MMUD	2	Bus+Cyc	nein	CC	nein	CR	1586
2604	2	18	AML	MFD	1	Bus+Cyc+Mel	nein	CC	nein	CR	326
2363	2	17	AML	MUD	2	Bus+Cyc+Mel+ATG	ja	CC	nein	CR	635
2344	2	1	AML	MUD	1	Bus+Cyc+ATG	nein	inMC	ja	CR	719
2095	2	1	AML	MFD	1	Bus+Cyc	nein	IIMC	ja	CR	951
2655	3	2	AML	MUD	1	Bus+Cyc+Mel+ATG	nein	IIMC	ja	CR	343
2631	3	3	AML	MUD	1	Bus+Cyc+ATG	nein	IIMC	ja	CR	317
2440	4	7	AML	MUD	2	Bus+Cyc+Mel+ATG	ja	IIMC	ja	CR	643
2408	1	8	AML	MUD	1	Bus+Cyc+ATG	nein	IIMC	nein	CR	631
2207	1	7	AML	MFD	1	Bus+Cyc	ja	IIMC	nein	CR	306
1854	1	19	AML	MUD	4	Bus+Cyc+Mel+ATG	nein	IIMC	nein	CR	924
2457	2	1	AML	MUD	2	TLI+Flu+Mel+ATG	nein	IIMC	nein	CR	524
2226	3	2	AML	MUD	2	Bus+Cyc+Mel+ATG	nein	IIMC	nein	CR	616
2644	3	17	AML	MMUD	2	Bus+Mel+End+ATG	nein	IIMC	nein	CR	301
2573	4	8	AML	MUD	1	Bus+Cyc+Mel+ATG	nein	IIMC	nein	CR	453
1871	1	12	AML	MFD	2	Bus+Cyc	ja	inMC	ja	Rlps	566
2170	1	6	AML	MUD	2	Bus+Cyc+Mel+Pred+OKT3	ja	inMC	nein	Rlps	293
1930	2	12	AML	MFD	1	Bus+Cyc+Mel	nein	inMC	nein	Rlps	1023
1791	2	9	AML	MUD	2	TBI+Cyc+ATG	ja	inMC	nein	Rlps	377
2396	6	15	AML	MUD	2	TBI+Flu+ATG+Rad	nein	inMC	nein	Rlps	327
2343	3	4	AML	MUD	1	TBI+Flu+Cyc+Atg	nein	CC	nein	TRM	354

Tabelle 3: Patientendaten zur allo-SZT bei Patienten mit AML; UPN = Patientenummer, AnzPr = Anzahl der Subpopulationsproben, Dis = Erkrankung, MFD = matched family Donor, MUD = matched unrelated Donor, MMUD = mismatched unrelated Donor, MMFD = mismatched family donor, TBI = Ganzkörperbestrahlung, Eto = Etomidat, Pred = Prednisolon, Bus = Busulfan, Cyc = Cyclophosphamid, Mel =Melphalan, ATG = Antithymozytenglobolin, Thio = Thiotepea, Flu = Fluorourcil, OKT3 = Antikörper, Rad = Radioimmun, CC = vollständiger Chimärismus, inMC = zunehmender Chimärismus, IIMC = gemischter Chimärismus auf niedrigem Niveau, IT = Immuntherapie, CR = komplette Remission, Rlps = Rückfall, TRM = Transplantationsassoziierte Mortalität

UPN	AnzP rb	Dis	SubDis	Alter	Remissions- status	KMT Nr	Spender	Konditionierung	T Zell Depletion	Chimärismus status	IT	Krankheits- verlauf	Tage follow up	MRD
2244	4	ALL	pre-B	22	3	1		TBI+Eto+Thio+ATG	ja	deMC	ja	CR	637	ja
2059	5	ALL	T	5	1	1		TBI+Eto+Cyc+ATG	nein	inMC	ja	CR	983	ja
2230	1	ALL	T	14	2	1		TBI+Eto+Thio	nein	inMC	ja	CR	385	nein
2458	4	ALL	C	2	1	1		Bus+Eto+Cyc+Atg	nein	inMC	ja	CR	614	nein
2629	3	ALL	C	9	2	2		TBI+Eto+Flu+ATG	nein	inMC	ja	CR	279	nein
2688	1	ALL	C	20	2	1		TBI+Eto+ATG	nein	inMC	ja	CR	242	ja
2491	2	ALL	C	13	3	1		TBI+Eto	nein	IIMC	ja	CR	379	ja
2077	1	ALL	T	8	1	1	MUD	TBI+Eto+Thio+ATG	nein	CC	nein	CR	909	ja
2164	1	ALL	C	7	1	1	MUD	TBI+Eto+ATG	nein	CC	nein	CR	877	nein
2205	1	ALL	C	13	2	1	MFD	TBI+Eto	nein	CC	nein	CR	274	nein
2208	5	ALL	T	18	1	1	MFD	Eto+Flu+Thio+ATG	nein	CC	nein	CR	671	ja
2239	2	ALL	C	14	3	1		TBI+Eto+ATG	ja	CC	nein	CR	801	nein
2277	1	ALL	T	9	2	1	MUD	TBI+Eto+ATG	nein	CC	nein	CR	575	nein
2299	2	ALL	C	6	1	1	MFD	TBI+Eto+Flu+ATG	ja	CC	nein	CR	336	nein
2302	1	ALL	C	13	2	1	MFD	TBI+Eto	nein	CC	nein	CR	746	nein
2504	2	ALL	C	7	1	1	MFD	TBI+Eto	nein	CC	nein	CR	474	ja
2541	2	ALL	T	3	2	1	MMUD	TBI+Eto+ATG	nein	CC	nein	CR	363	nein
2547	1	ALL	C	6	1	1	DU	Bus+Eto+ATG	nein	CC	nein	CR	475	nein
2596	3	ALL	T	8	2	1		TBI+Eto+ATG	nein	CC	nein	CR	176	nein
2614	3	ALL	C	0	1	1		Thio+Eto+Mel+ATG	ja	CC	nein	CR	294	nein
2643	2	ALL	C	15	1	1	DU	TBI+Eto+ATG	nein	CC	nein	CR	378	ja
2713	1	ALL	Pre-B	6	2	1	DU	TBI+Eto+ATG	nein	CC	nein	CR	232	nein
2719	1	ALL	C	14	2	1		TBI+Eto+ATG	nein	CC	nein	CR	288	nein
1816	2	ALL	C	9	2	1	MFD	TBI+Eto	nein	deMC	nein	CR	1112	ja
2087	2	ALL	T	7	1	1	MFD	TBI+Eto	nein	deMC	nein	CR	772	ja
2265	1	ALL	C	6	2	1	MUD	TBI+Eto+ATG	nein	deMC	nein	CR	797	nein
2485	1	ALL	pre-B	1	1	1	MUD	Bus+Eto+Cyc+ATG	nein	deMC	nein	CR	522	nein
2489	2	ALL	pre-B	3	1	1	MFD	TBI+Eto	nein	deMC	nein	CR	617	nein
2495	2	ALL	C	7	2	1		TBI+Eto+ATG	nein	deMC	nein	CR	468	nein
2542	1	ALL	pre-B	13	2	1	MFD	TBI+Eto	nein	deMC	nein	CR	490	nein
2610	2	ALL	C	13	1	1	MMUD	Eto+ ATG	nein	deMC	nein	CR	348	ja
2055	3	ALL	C	10	1	1		TBI+Eto+ATG	ja	inMC	nein	CR	1106	nein
2101	2	ALL	C	7	2	1	MFD	TBI+Eto+Flu+OKT3	nein	IIMC	nein	CR	1011	nein
2214	1	ALL	pre-B	7	2	1	MUD	Bus+Eto+Thio	nein	IIMC	nein	CR	98	nein

2366	1	ALL	C	12	2	1	MFD	TBI+Eto	nein	IIMC	nein	CR	611	nein
2414	1	ALL	T	10	1	1	MUD	TBI+Eto+ATG	nein	IIMC	nein	CR	539	nein
2468	1	ALL	T	16	1	1	DU	TBI+Eto+ATG	nein	IIMC	nein	CR	239	nein

Tabelle 4: Patientendaten zur allo-SZT bei Patienten mit ALL in kompletter Remission; UPN = Patientenummer, AnzPr = Anzahl der Subpopulationsproben, Dis = Erkrankung, SubDis = Subtyp der ALL, MFD = matched family Donor, MUD = matched unrelated Donor, MMUD = mismatched unrelated Donor, MMFD = mismatched family donor, DU = unrelated Donor, TBI = Ganzkörperbestrahlung, Eto = Etomidat, Bus = Busulfan, Cyc = Cyclophosphamid, Mel =Melphalan, ATG = Antithymozyten-globolin, Thio = Thiotepa, Flu = Fluorourcil, OKT3 = Antikörper, CC = vollständiger Chimärismus, inMC = zunehmender Chimärismus, IIMC = gemischter Chimärismus auf niedrigem Niveau, deMC = abnehmender Chimärismus, IT = Immuntherapie, CR = komplette Remission, Rlps = Rückfall, TRM = Transplantationsassoziierte Mortalität, MRD = Minimale Rest Erkrankung

UPN	AnzPr	Dis	SubDis	Alter	Remissionsstatus	KMT Nr	Spender	Konditionierung	T Zell Depletion	Chimärismusstatus	IT	Krankheitsverlauf	Tage follow up	MRD
2671	1	ALL	C	12	2	1		TBI+Eto	nein	inMC	ja	CR	275	ja
1849	2	ALL	C	14	3	1	UD	TBI+Flu	ja	deMC	nein	CR	1113	ja
2110	2	ALL	pre-B	7	2	1		TBI+Eto+Thio+ATG	nein	CC	nein	CR	363	nein
2123	2	ALL	C	3	1	1	MUD	TBI+Eto+ATG	nein	CC	nein	CR	754	ja
2222	3	ALL	C	12	3	1		TBI+Eto+Flu+Tec	nein	CC	nein	CR	734	nein
2345	1	ALL	C	14	2	1	MUD	TBI+Eto+ATG	nein	IIMC	nein	CR	524	nein
2432	2	ALL	C	1	2	1	MUD	TBI+Eto	nein	CC	nein	CR	457	ja
2562	3	ALL	C	10	2	1		TBI+Eto+ATG	ja	CC	nein	CR	105	ja
2590	2	ALL	C	2	1	1		TBI+Eto+Flu+ATG	ja	deMC	nein	CR	420	nein
2592	1	ALL	C	15	2	1		TBI+Eto+ATG	nein	CC	nein	CR	106	nein
2626	3	ALL	T	38	2	2		TLI+Flu+ATG	ja	CC	nein	CR	137	nein
2633	1	ALL	C	16	1	1		TBI+Eto	nein	IIMC	nein	CR	315	nein
2645	1	ALL	C	7	1	1	UD	TBI+Eto+ATG	nein	CC	nein	CR	60	nein
2657	2	ALL	C	14	1	1	UD	TBI+Eto+ATG	nein	CC	nein	CR	286	nein

Tabelle 5: Patientendaten zur allo-SZT bei Patienten mit ALL in kompletter Remission und autologen Anteilen in den Subpopulationen; UPN = Patientenummer, AnzPr = Anzahl der Subpopulationsproben, Dis = Erkrankung, SubDis = Subtyp der ALL, MFD = matched family Donor, MUD = matched unrelated Donor, MMUD = mismatched unrelated Donor, MMFD = mismatched family donor, DU = unrelated Donor, TBI = Ganzkörperbestrahlung, Eto = Etomidat, ATG = Antithymozytenglobolin, Thio = Thiotepa, Flu = Fluorourcil, Tec = ?! CC = vollständiger Chimärismus, inMC = zunehmender Chimärismus, IIMC = gemischter Chimärismus auf niedrigem Niveau, deMC = abnehmender Chimärismus, IT = Immuntherapie, CR = komplette Remission

UPN	AnzPrb	Dis	SubDis	Alter	Remissions-status	SZT-Nr	Spender	Konditionierung	T Zell Depletion	Chimärismus-status	IT	Krankheitsverlauf	Tage follow up	MRD
2287	2	ALL	C	14	1	1	MFD	TBI+Eto+Thio+ATG	nein	CC	nein	TRM	165	ja
2071	1	ALL	C	7	2	1		TBI+Eto+Thio+ATG	nein	deMC	nein	TRM	72	ja
2177	2	ALL	C	19	2	2		Flu+ATG	ja	CC	nein	TRM	67	nein
2214	1	ALL	C	7	2	2		Bus+Eto+Thio	ja	CC	nein	TRM	16	nein
2269	1	ALL	biphän.	0	1	1	MUD	Bus+Eto+Cyc+ATG	nein	CC	nein	TRM	95	nein
2472	3	ALL	C	10	1	1		TBI+Eto	nein	CC	nein	TRM	302	nein

Tabelle 6: Patientendaten zur allo-SZT bei Patienten mit ALL und wiederkehrender Grunderkrankung / Transplantationsassoziierter Mortalität; UPN = Patientenummer, AnzPr = Anzahl der Subpopulationsproben, Dis = Erkrankung, SubDis = Subtyp der ALL, SZT = Stammzelltransplantation, MFD = matched family Donor, MUD = matched unrelated Donor, MMUD = mismatched unrelated Donor, MMFD = mismatched family donor, DU = unrelated Donor, TBI = Ganzkörper-bestrahlung, Eto = Etomidat, Bus = Busulfan, Cyc = Cyclophosphamid, Mel =Melphalan, ATG = Antithymozyten-globolin, Thio = Thiotepa, Flu = Fluorourcil, OKT3 = Antikörper, Pred = Prednisolon, CC = vollständiger Chimärismus, inMC = zunehmender Chimärismus, IIMC = gemischter Chimärismus auf niedrigem Niveau, deMC = abnehmender Chimärismus, IT = Immuntherapie, CR = komplette Remission, Rlps = Rückfall, TRM = transplantationsassoziierte Mortalität, MRD = Minimale Rest Erkrankung

UPN	AnzPrb	Dis	SubDis	Alter	Remissions-status	SZT-Nr	Spender	Konditionierung	T Zell Depletion	Chimärismus-status	IT	Krankheitsverlauf	Tage follow up	MRD
1776	10	ALL	pre-B	1	2	1	MUD	Bus+Eto+Cyc+ATG	Ja	inMC	ja	Rlps	1428	ja
2114	4	ALL	C	10	2	1	MFD	TBI+Eto+ Flu+ ATG	ja	inMC	ja	Rlps	117	ja
2119	9	ALL	C	8	1	1	MFD	TBI+Eto	nein	inMC	ja	Rlps	421	ja
2413	4	ALL	C	8	1	1	MFD	Bus+Cyc	nein	inMC	ja	Rlps	346	ja
2130	1	ALL	T	5	1	1	MMFD	TBI + Eto	nein	IIMC	ja	Rlps	104	ja
2413	1	ALL	C	7	2	2	MFD	Bus+Cyc	nein	IIMC	ja	Rlps	251	ja
2451	4	ALL	C	15	2	1	MFD	TBI++Eto+Flu+ATG	ja	IIMC	ja	Rlps	319	ja
2217	2	ALL	pre-B	6	3	1	MMUD	TBI+Eto+ATG	ja	CC	nein	Rlps	105	ja
2433	1	ALL	T	8	2	1	MUD	TBI+Eto+ATG	nein	CC	nein	Rlps	563	ja
2130	1	ALL	T	5	3	2	MMUD			inMC	nein	Rlps	42	ja
2266	2	ALL	C	10	2	1	MFD	TBI+Eto+Flu+ATG	ja	inMC	nein	Rlps	73	ja

2295	2	ALL	C	8	1	1	MUD	TBI+Eto+ATG	nein	inMC	nein	Rlps	251	ja
2298	5	ALL	T	8	1	1	MFD	TBI+Flu+ATG+Eto	ja	inMC	nein	Rlps	552	ja
2582	1	ALL	C	3	2	1	DU	TBI+Eto+ATG	nein	inMC	nein	Rlps	163	ja
1965	5	ALL	C	22	3	1	MUD	TBI+Eto+Thio+ATG	ja	IIMC	nein	Rlps	1136	ja
2043	3	ALL	C	11	1	1	MUD	TBI+Eto+Cyc+Pred+OKT3	ja	IIMC	nein	Rlps	523	ja
2445	3	ALL	pre-B	4	2	1	MUD	TBI+Eto+ATG	ja	IIMC	nein	Rlps	386	ja
2478	2	ALL	pre-B	6	2	1	MFD	TBI+Eto	nein	IIMC	nein	Rlps	142	ja
2560	1	ALL	pre-B	12	2	1	MFD	TBI+Eto+ATG	nein	IIMC	nein	Rlps	353	ja
1868	1	ALL	C	9	3	2	MFD	Bus+Flu+Eto+Okt3	ja	inMC	ja	Rlps	631	nein
2186	1	ALL	C	11	2	1	MMUD	TBI+Eto+Cyc+OKT3	ja	inMC	ja	Rlps	83	nein
2196	1	ALL	C	12	3	1	MFD	TBI+Eto	nein	inMC	ja	Rlps	203	nein
2122	1	ALL	C	15	3	1	MUD	Thio+Eto+ATG	nein	IIMC	ja	Rlps	308	nein
2140	2	ALL	C	10	2	1	DU	TBI+Eto+Thio+ATG	nein	IIMC	ja	Rlps	157	nein
2273	1	ALL	pre-B	7	1	1	MMUD	TBI+Eto+Cyc+OKT3	nein	inMC	nein	Rlps	163	nein
2333	1	ALL	C	16	2	1	MUD	TBI+Eto+ATG	nein	inMC	nein	Rlps	36	nein
2613	1	ALL	C	13	2	1	MFD	TBI+ Eto	nein	inMC	nein	Rlps	95	nein

Tabelle 7: Patientendaten zur allo-SZT bei Patienten mit ALL und wiederkehrender Grunderkrankung ; UPN = Patientenummer, AnzPr = Anzahl der Subpopulationsproben, Dis = Erkrankung, SubDis = Subtyp der ALL, SZT = Stammzelltransplantation, MFD = matched family Donor, MUD = matched unrelated Donor, MMUD = mismatched unrelated Donor, MMFD = mismatched family donor, DU = unrelated Donor, TBI = Ganzkörper-bestrahlung, Eto = Etomidat, Bus = Busulfan, Cyc = Cyclophosphamid, Mel =Melphalan, ATG = Antithymozyten-globolin, Thio = Thiotepa, Flu = Fluorourcil,OKT3 = Antikörper, Pred = Prednisolon, CC = vollständiger Chimärismus, inMC = zunehmender Chimärismus, IIMC = gemischter Chimärismus auf niedrigem Niveau, deMC = abnehmender Chimärismus, IT = Immuntherapie, CR = komplette Remission, Rlps = Rückfall, TRM = zransplantationsassoziierte Mortalität, MRD = Minimale Rest Erkrankung

5 Ergebnisse

5.1 Überblick über die Probenverteilung

In dem Zeitraum vom August 2001 bis August 2003 sind von 84 ALL- und 30 AML-Patienten insgesamt 239 Knochenmarksproben auf ihren Chimärismus hin untersucht worden. In der ALL wurden die CD3-, CD10-, CD19- und CD34-Subpopulationen untersucht, in der AML und im MDS die CD33- und CD34-Subpopulation. In der folgenden Tabelle ist ein Überblick über die untersuchten Proben pro Patienten gegeben.

Anzahl:	ALL		AML	
	Patienten	Proben / Patient	Patienten	Proben / Patient
	2	10	1	6
	5	5	2	4
	4	4	5	3
	10	3	9	2
	24	2	13	1
	38	1		
Gesamt:	84	179	30	60

Tabelle 8: Proben- und Patientenverteilung in der AML und der ALL

5.1.1 Ereignisfreies Überleben in Abhängigkeit von der Erkrankung

Die folgende Abbildung zeigt das „Ereignisfreie Überleben“ (EFÜ) der Patienten bzw. das Überleben der Patienten in kompletter Remission nach einer Stammzelltransplantation. Um einen Anhalt zu bekommen, ob die Erkrankung hierfür von Bedeutung ist, sind die ALL und die AML getrennt voneinander dargestellt.

Das „EFÜ“ für die ALL beträgt 25 %, das für die AML 33 %. Der Log-Rank-Test weist keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Erkrankungen auf in Bezug auf die Überlebenschance. Der p-Wert beträgt 0,1599. Der Beobachtungszeitraum erstreckt sich über 1100 Tage.

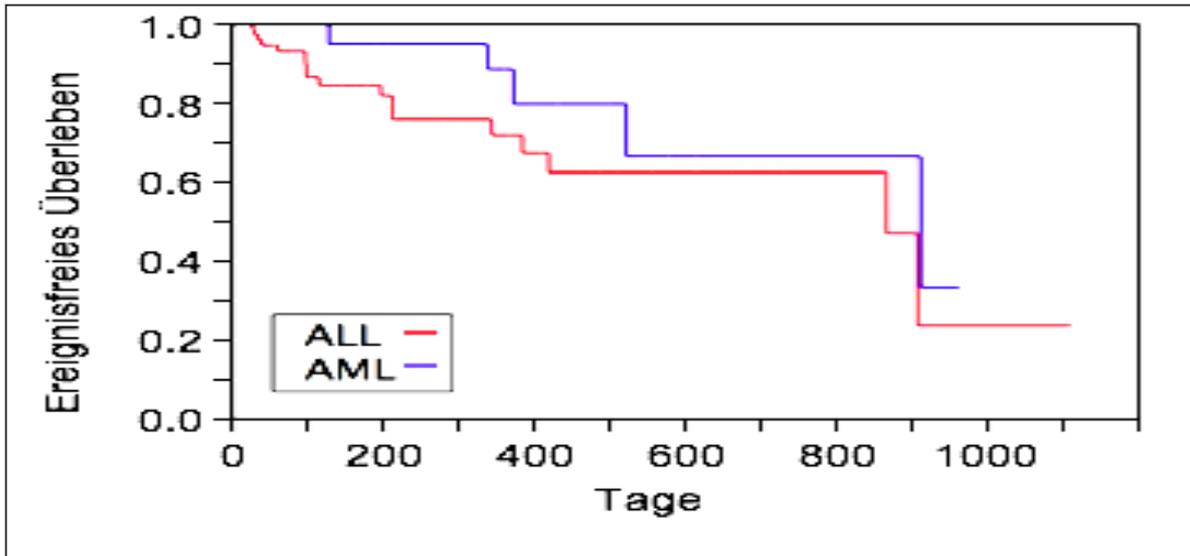


Abbildung 5: Ereignisfreies Überleben für AML und ALL; Beobachtungszeitraum in Tagen, Ereignisfreies Überleben (EFÜ) in %

5.2 Beispielhafte Darstellungen von Krankheitsverläufen

5.2.1 Tabellarischer Überblick über die Krankheitsverläufe

In der folgenden Tabelle sind die Krankheitsverläufe der Patienten in Bezug auf den Chimärismusstatus der Vollblutuntersuchungen aufgelistet. Patienten die eine Immuntherapie (IT) erhalten haben und Patienten, bei denen zusätzlich die Minimale Rest Erkrankung (MRD) bestimmt wurde, sind als Teilgruppe abgebildet.

ALL	MC			CC			Gesamt
	IT	MRD		IT	MRD		
CR	25	8	13	25	1	10	50
Rlps	25	10	16	2	1	2	27
TRM	2			5	1		7
Gesamt	52			32			84

AML	MC		CC		Gesamt
	IT		IT		
CR	12	5	12	1	24
RLPS	5	1			5
TRM			1	1	1
Gesamt	17		13		30

Tabelle 9 + 10: ALL- und AML-Patienten: MC = gemischter Chimärismus, CC = kompletter Chimärismus, MRD = minimale Rest-Erkrankung, IT = Immuntherapie, CR = komplette Remission, Rlps = Rezidiv, TRM = Therapie assoziierte Mortalität, Gesamt = Anzahl der untersuchten Patienten

Im folgenden Abschnitt dieser Arbeit werden die Chimärismusuntersuchungen einiger Patienten beispielhaft für die verschiedenen Krankheitsverläufe dargestellt.

5.2.2 Ergebnisse der Patienten in kompletter Remission

50/84 der ALL- und 24/30 der AML-Patienten haben sich zum Studienende in kompletter Remission befunden. Die Daten dieser Patientengruppe sind in den Tabellen 3 - 5 (Seiten 33 – 35) aufgelistet.

5.2.2.1 Beispielhafter Verlauf eines AML- und eines ALL-Patienten in kompletter Remission ohne Immuntherapie

Der Patient 2208 (T-ALL) zeigt im Verlauf durchgehend einen kompletten Chimärismus. Allein in der T-Zelllinie des Vollbluts ist ein gemischter Chimärismus 80 Tage nach der SZT detektierbar. Am Tag 59 nach der SZT sind 1 E^{-4} Blasten im Knochenmark nachweisbar.

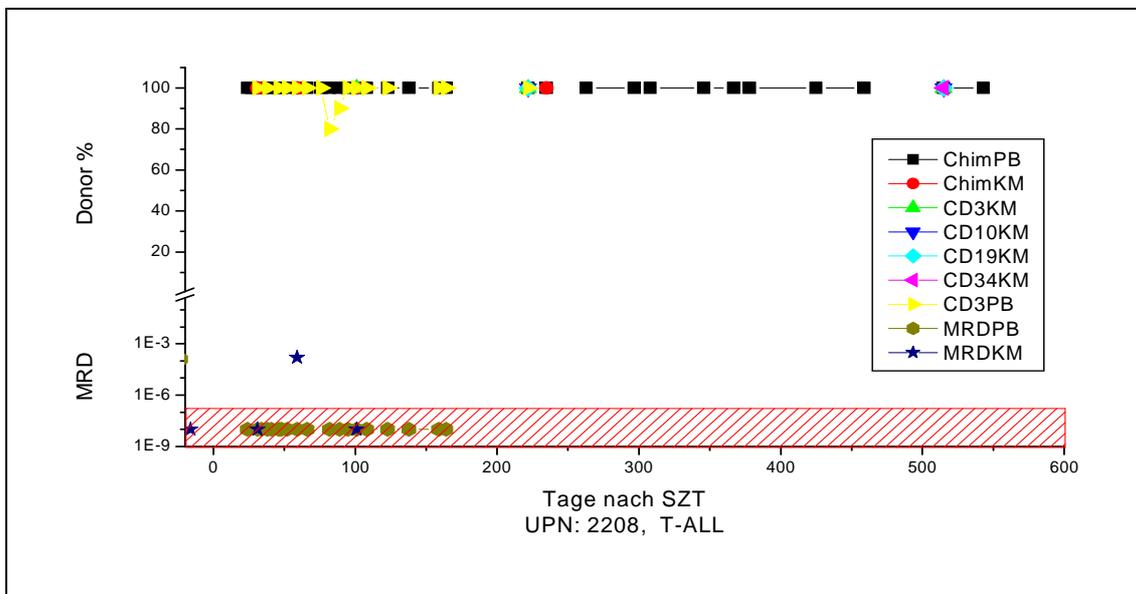


Abbildung 6: Chimärismusanalysen eines ALL-Patienten in kompletter Remission; ChimPB = Chimärismus im Vollblut, ChimKM = Chimärismus im Gesamtknochenmark, CD3+10+19+34KM = Chimärismus der Subpopulationen im Knochenmark, CD3PB = Chimärismus der T-Zellen im Vollblut, MRD = Minimale-Rest-Erkrankung, 1 E^{-8} = MRD negativ.

Der Patient 2631 (AML) zeigt einen abnehmenden Chimärismus (Abb.7). Eine residuale Empfängerhämatoopoese ist im Knochenmark und der CD33-Subpopulation bis zu 120 Tagen nach der SZT nachweisbar.

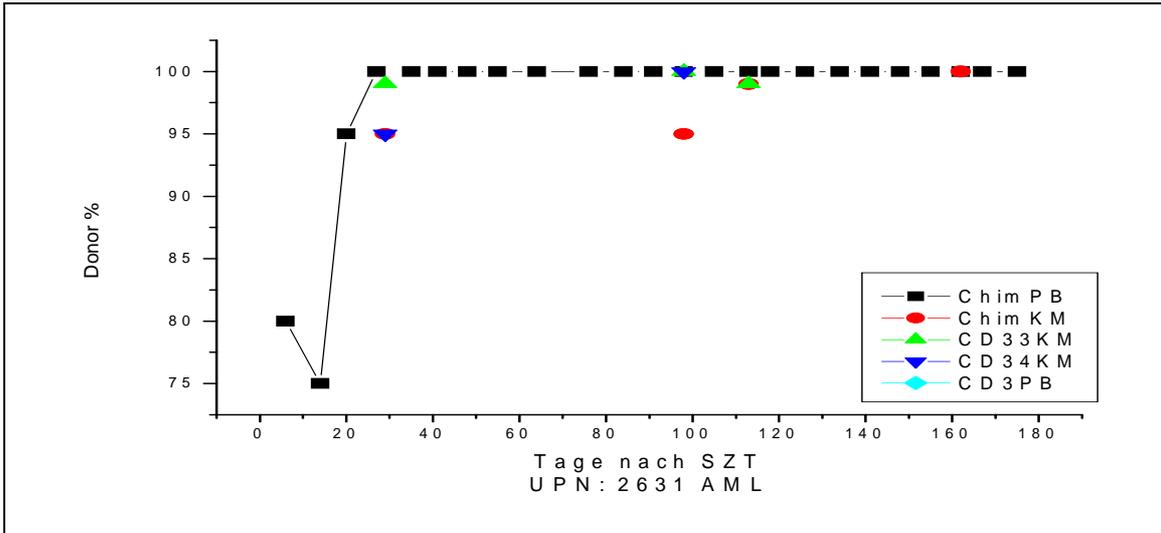


Abbildung 7: Chimärismusanalysen eines AML-Patienten in kompletter Remission; ChimPB = Chimärismus im Vollblut, ChimKM = Chimärismus im Knochenmark, CD33+34KM = Chimärismus in den Subpopulationen des Knochenmarks, Donor % = autologe Anteile in %

5.2.2.2 Beispielhafter Verlauf eines ALL-Patienten in kompletter Remission mit einer erfolgreichen immunologischer Intervention

9/50 ALL-Patienten in kompletter Remission haben eine Immuntherapie erhalten.

Patient 2629 (ALL) hat aufgrund einer Transplantatabstoßung eine zweite SZT erhalten. Der Rückgang der autologen Zellen durch die Induktionstherapie vor der zweiten SZT ist im folgenden Diagramm deutlich zu erkennen. 40 Tage nach der SZT hat das Kind einen ausgeprägten gemischten Chimärismus in der T-Zelllinie des Vollbluts entwickelt, woraufhin Donor-Lymphozyten-Infusionen (DLI) eingeleitet worden sind. Durch den verzögerten Wirkungseintritt der DLI erreichen die autologen Anteile in der T-Zell-Fraktion ihre stärkste Ausprägung 60 Tage nach der SZT. Einen Monat später sind in dieser Zelllinie nur noch Signale des Donors nachweisbar. Im Vollblut und der CD3-Subpopulation des Knochenmarks lassen sich ebenfalls autologe Anteile auffinden, nicht jedoch in der CD10-, CD19- und CD34-Subpopulation. Zum Abschluss der Untersuchungen befindet sich das Kind in kompletter Remission.

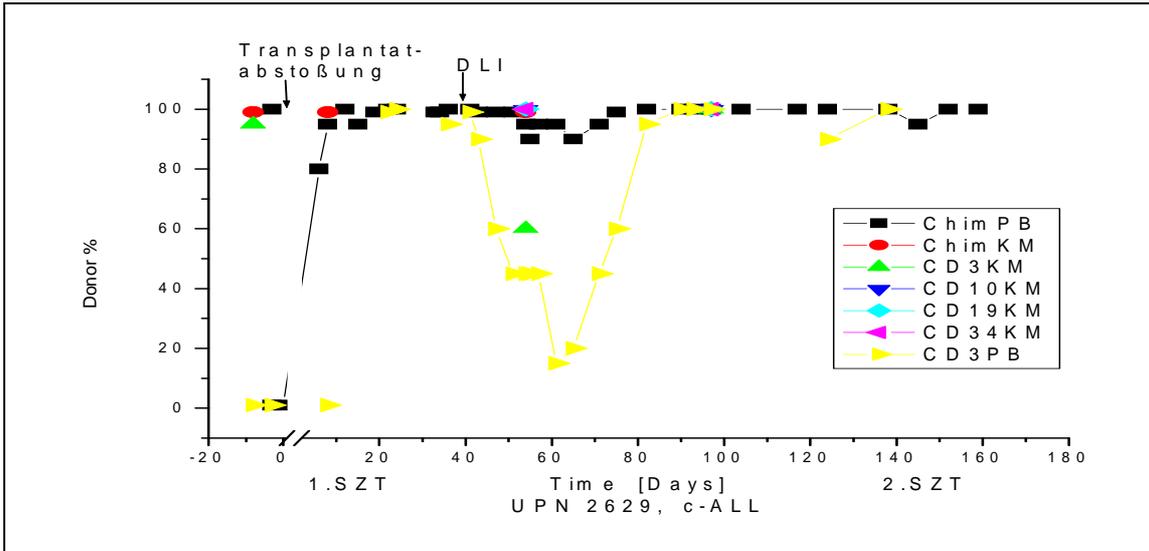


Abbildung 8: Chimärismusanalysen eines ALL-Patienten mit immunologischer Intervention
 ChimPB = Chimärismus im Vollblut, ChimKM = Chimärismus im Gesamtknochenmark, CD3+10+19+34KM = Chimärismus in den Subpopulationen des Knochenmarks, CD3PB = Chimärismus in den T-Zellen des Vollblutes, DLI = Donor Lymphozyten Infusion, SZT = Stammzelltransplantation

5.2.2.3 Betrachtung gemischter Chimäre in den Subpopulationen in kompletter Remission

Bei 14/50 ALL- und 5/24 AML-Patienten in kompletter Remission konnte ein gemischter Chimärismus in den Subpopulationen des Knochenmarks nachgewiesen werden. Patienten, die eine Immuntherapie erhalten haben, sind von den folgenden Darstellungen ausgeschlossen worden. Der Untersuchungszeitraum beträgt 742 Tage.

In der ALL kommen die patienteneigenen Zellen am häufigsten und ausgeprägtesten in der CD3-Subpopulation zum Vorschein. Dieser ist häufig mit einem MC in der CD10-Subpopulation verbunden. In den blastenassoziierten Subpopulationen ist ein isolierter gemischter Chimärismus selten zu beobachten.

In der AML scheinen autologe Anteile in der CD33-Subpopulation häufiger aufzutreten als in der CD34-Zelllinie. Der gemischte Chimärismus im Knochenmark und der CD34-Subpopulation von Patient 2631 am Tag 29 nach der SZT ist vermutlich auf die residuale Empfänger-Hämatopoese nach der SZT zurückzuführen.

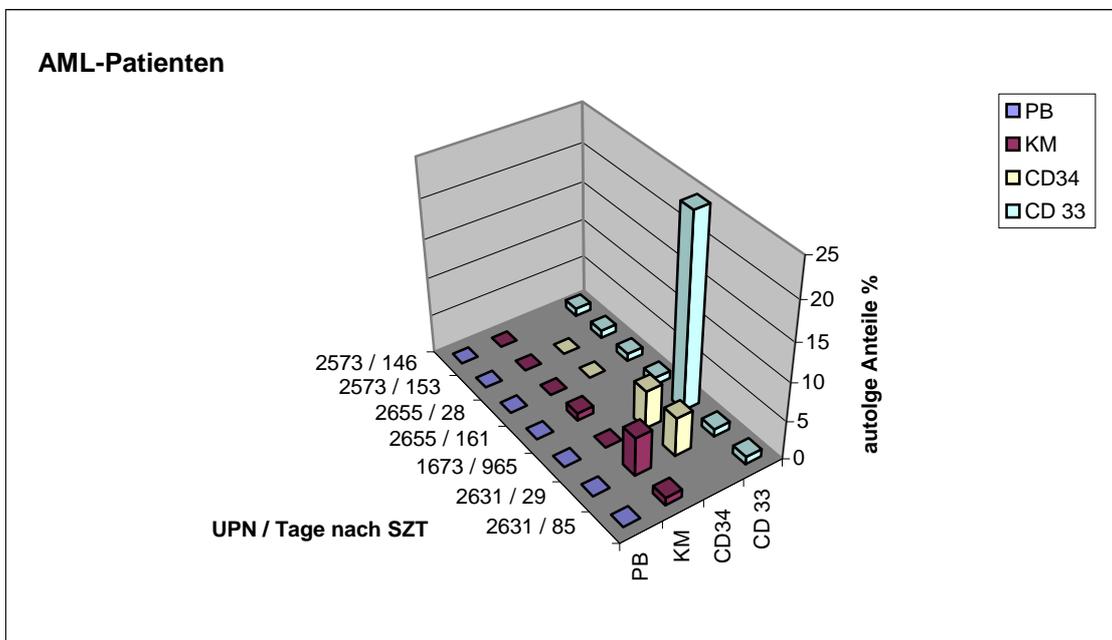
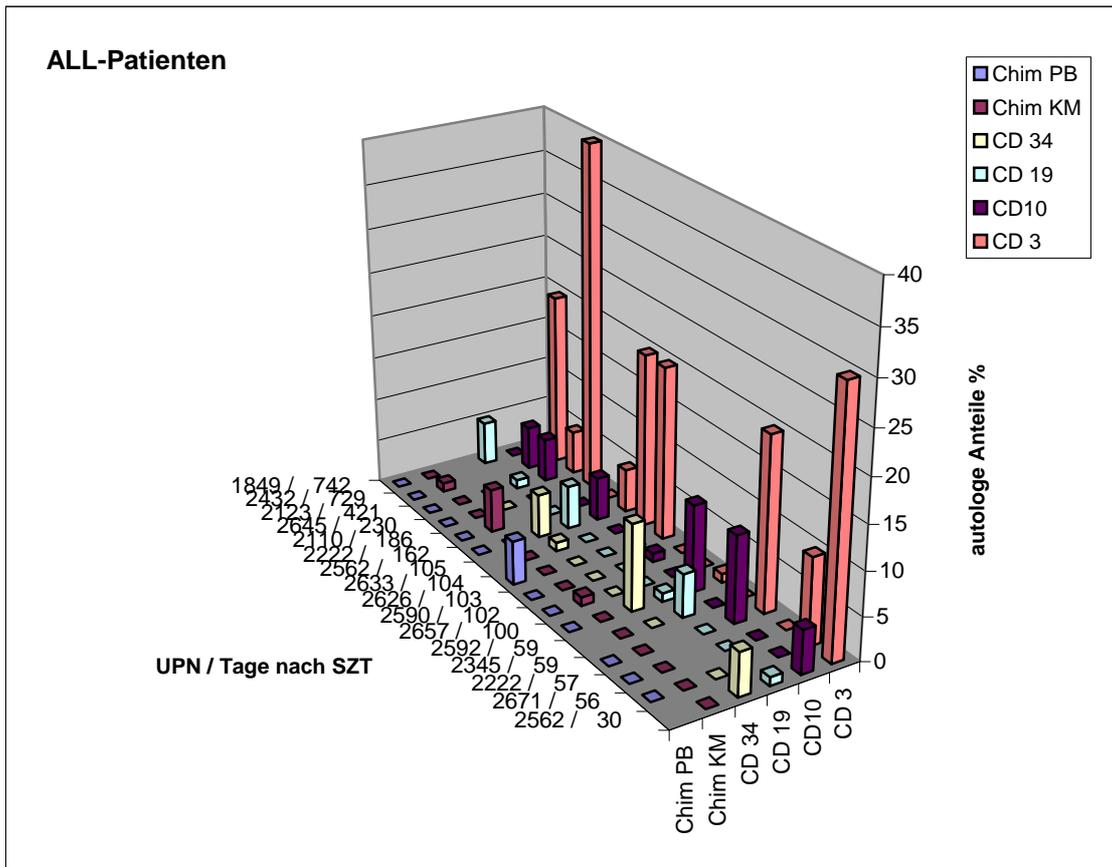


Abbildung 9 + 10: Chimärismusanalysen von ALL und AML-Patienten mit einem gemischten Chimärismus in den Subpopulationen in der kompletten Remission; PB = Vollblut, KM = Knochenmark, CD33+34+3+10+19 = Subpopulationen, UPN = Patientennummer, Tag = Tage nach SZT

5.2.3 Ergebnisse der Patienten mit wiederkehrender Grunderkrankung

27/84 der ALL- und 5/30 der AML-Patienten haben ein Rezidiv entwickelt. Die Daten dieser Patientengruppe sind in den Tabellen 3 und 6 (Seite 33, 36) zusammengefasst.

5.2.3.1 Beispielhafte Verläufe von AML- und ALL-Patienten mit der Entwicklung eines Rezidivs ohne Immuntherapie

In Abbildung 11 ist der Verlauf eines fulminanten Rezidivs dargestellt. Bei Patient 2266 (ALL) ist zu keinem Zeitpunkt eine Reduktion der Blasten unter die Nachweisgrenze erreicht worden. Vor der SZT ist eine MRD von $7E^{-3}$ gemessen worden. 20 Tage danach sind kontinuierlich zunehmende Blastenzahlen ab $7,5E^{-4}$ nachweisbar gewesen. In den Chimärismusanalysen sind autologe Anteile erst 31 Tage nach der SZT im Knochenmark mit 5 % und in der CD19-Subpopulation mit 40 % detektierbar gewesen. Morphologisch ist das Rezidiv 41. Tage nach der SZT diagnostiziert worden. Es spiegelt sich in der fast vollständigen autologen Rekonstitution der CD10-Subpopulationen wieder.

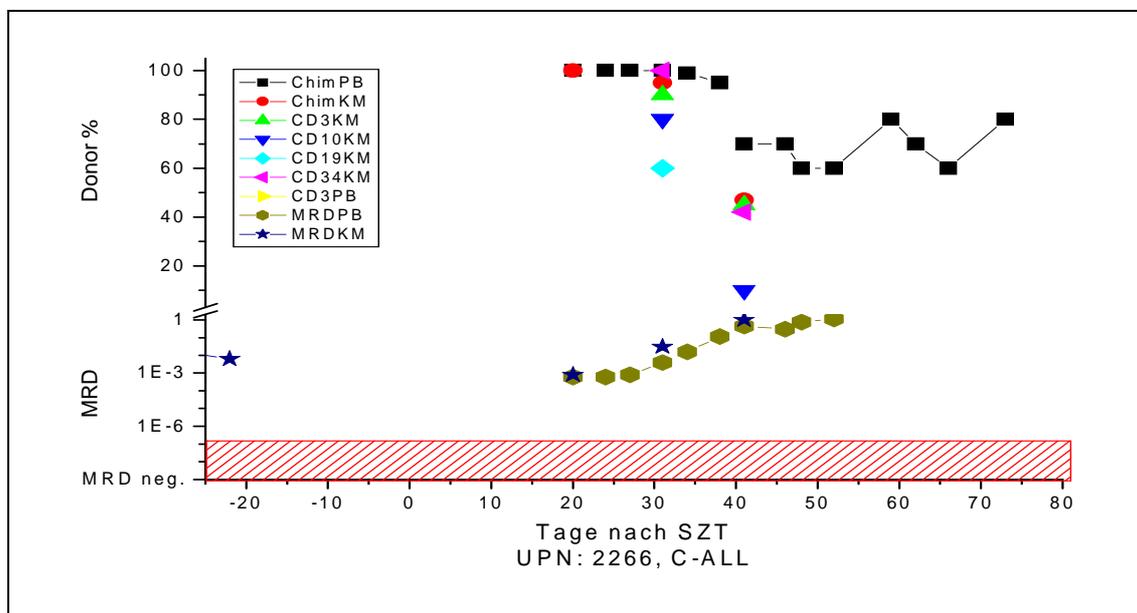


Abbildung 11: Chimärismusanalysen eines ALL-Patienten mit der Entwicklung eines fulminanten Rezidivs; ChimPB = Chimärismus im Vollblut, ChimKM = Chimärismus im Knochenmark, CD3+10+19+34KM = Chimärismus in den Subpopulationen des Knochenmarks, CD3PB = Chimärismus der T-Zellen im Vollblut, UPN = Patientenummer, MRD = Minimale-Rest-Erkrankung, Donor % = autologe Anteile in %

Der Patient hat während seines Krankheitsverlaufs mehrfach SZT-Booster und Dosen natürlicher Killerzellen erhalten. Er ist 87 Tage nach der SZT verstorben.

Auch bei Patient 2369 (AML) sind die autologen Anteile zum Zeitpunkt der Rezidivdiagnose am stärksten in der CD33- und der CD34-Zelllinie ausgeprägt gewesen (Abb. 12). Die Patientin hat eine erneute SZT erhalten. Der Rückgang der Leukämie durch die Induktionstherapie ist deutlich zu erkennen. In den Subpopulationen vollzieht sich dieser im Vergleich zum Knochenmark verzögert.

Der Patient 1791 (AML) erhielt ebenfalls eine 2. SZT. Kurz nach der Transplantation ist eine Persistenz der autologen Zellen in den Subpopulationen zu erkennen (Abb. 13). Die CD34-Subpopulation ist hiervon am stärksten betroffen. Bis zum erneuten Wiederauftreten der Erkrankung zeigt der Patient im Vollblut und im Knochenmark einen vollständigen Chimärismus. 341 Tage nach der 2. SZT sind die autologen Anteile wieder am stärksten in den Subpopulationen ausgeprägt.

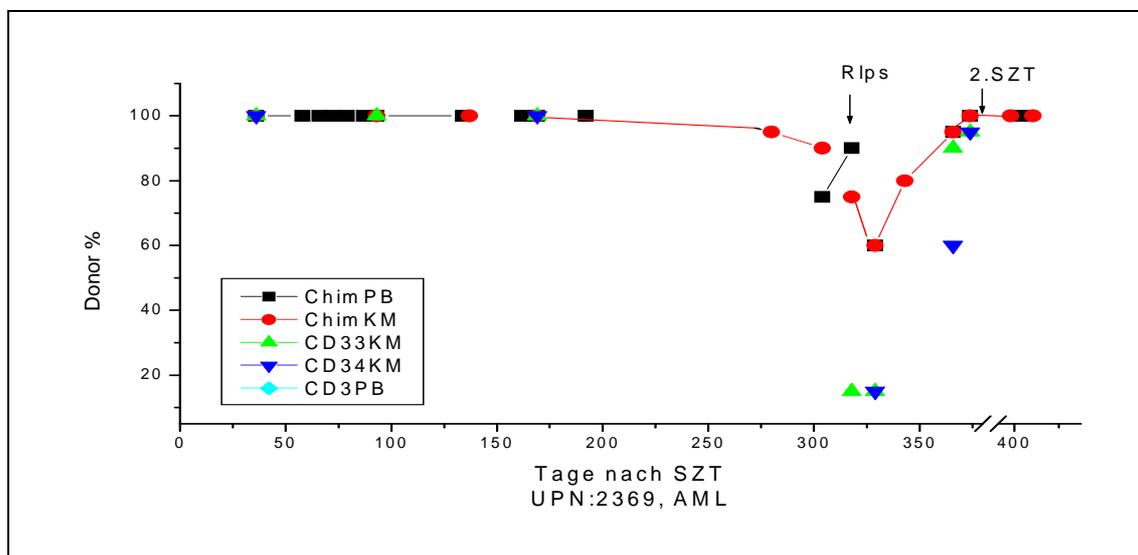


Abbildung 12: Chimärismusanalysen eines AML-Patienten mit Rezidiventwicklung und anschließend erneuter SZT; ChimPB = Chimärismus im Vollblut, ChimKM = Chimärismus im Knochenmark, CD33+34 = Chimärismus in den Subpopulationen des Knochenmarks, CD3PB = Chimärismus in den T-Zellen des Vollbluts, Donor % = autologe Anteile in %, R Ips = Rezidiv, 2.SZT = 2. Stammzelltransplantation

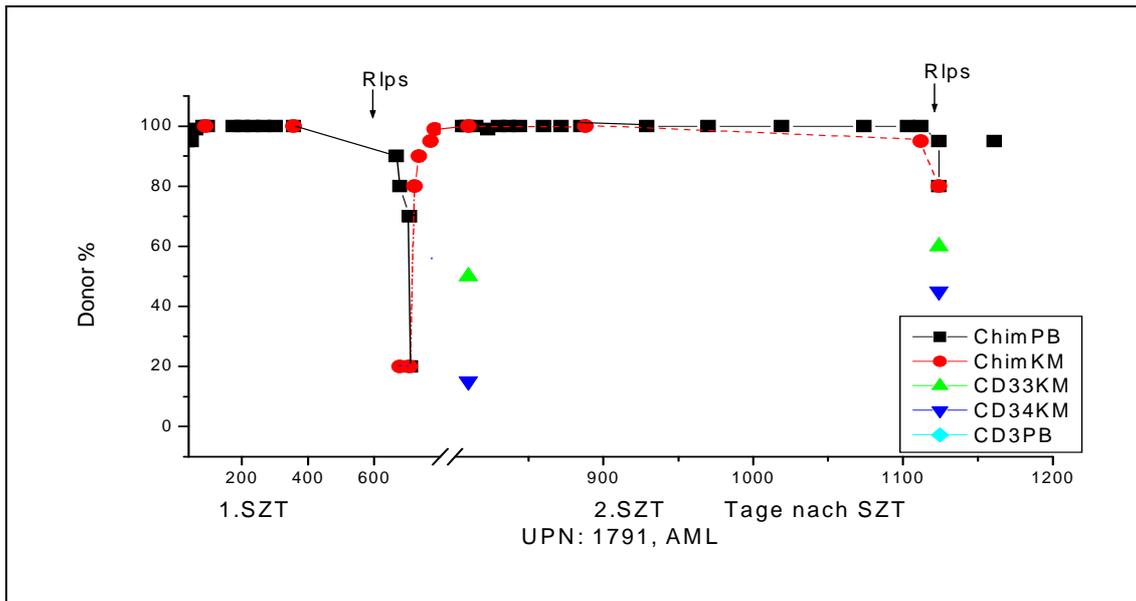


Abbildung 13: Chimärismusanalysen eines AML-Patienten mit Rezidiventwicklung nach einer zweiten SZT; ChimPB = Chimärismus im Vollblut, ChimKM = Chimärismus im Knochenmark, CD33+34 = Chimärismus in den Subpopulationen des Knochenmarks, CD3PB = Chimärismus in den T-Zellen des Vollbluts, Rlps = Rezidiv

5.2.3.2 Beispielhafter Verlauf eines ALL-Patienten mit Rezidiv und immunologischer Intervention seiner

Patient 2119 zeigt nach der Transplantation im Knochenmark als auch in den T-Zellen einen abnehmenden Chimärismus (Abb. 14). Die MRD ist zu diesem Zeitpunkt mit $1E^{-5}$ nachweisbar. Auch vor dem Therapiebeginn ist die gemessene MRD-Last mit $1E^{-6}$ gering und nicht mit einem erhöhten Rezidivrisiko verbunden. Das CSA ist am 40. Tag abgesetzt worden.

Im weiteren Verlauf sind dann zunehmend autologe Anteile und eine steigende MRD nachweisbar. Mit der Verdachtsdiagnose eines Rezidivs ist eine Immuntherapie mit Donor-Lymphozyten 220 Tage nach der SZT begonnen worden. Es ist zu einem vorübergehenden Rückgang der Blasten gekommen. Das klinische Auftreten des Rezidives ist dadurch herausgezögert und erst 416. Tage nach der SZT gestellt worden. Im weiteren Verlauf ist die Persistenz der malignen Zellen aus den erhobenen MRD-Werten der Knochenmarksuntersuchungen abzuleiten und in einem gemischten Chimärismus der CD10-, CD19- und CD34-Subpopulationen zu erkennen. Das Peripherblut und das Knochenmark geben zu diesem Zeitpunkt keinen Anhalt auf den malignen Krankheitsverlauf. 602 Tage nach der SZT sind

auch die autologen Anteile in den Subpopulationen nicht mehr nachweisbar. Die MRD bleibt konstant bei 5×10^{-3} .

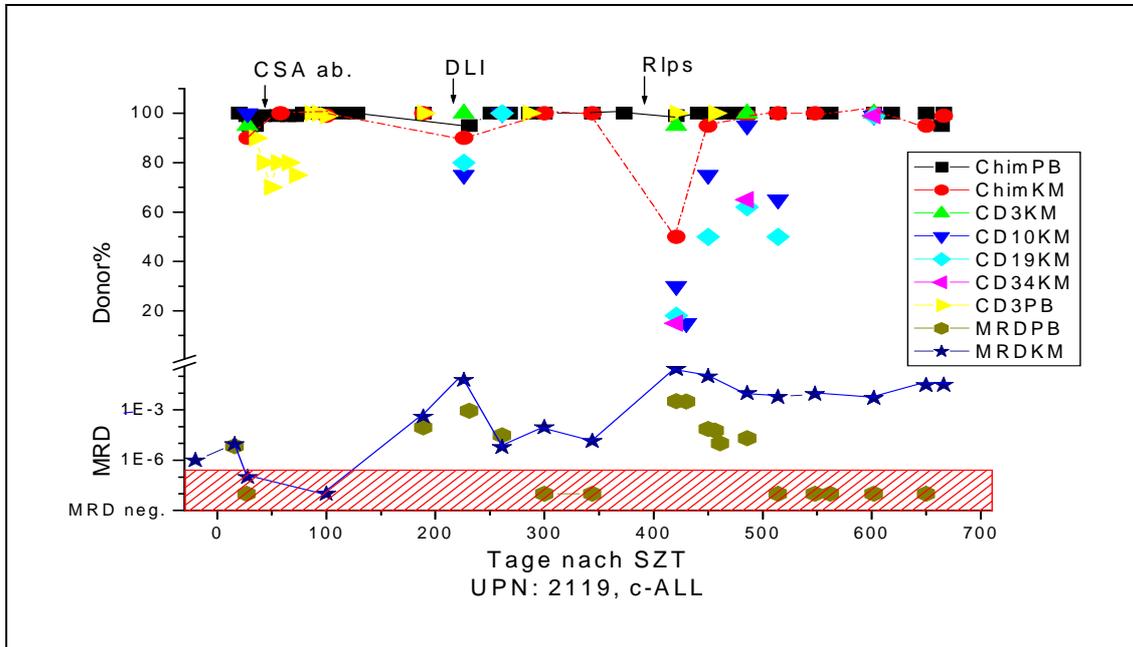


Abbildung 14: Chimärismusanalysen eines ALL-Patienten mit der Entwicklung eines Rezidivs und immunologischer Intervention; ChimPB = Chimärismus im Vollblut, ChimKM = Chimärismus im Knochenmark, CD3+10+19+34KM = Chimärismus in den Subpopulationen des Knochenmarks, CD3PB = Chimärismus der T-Zellen im Vollblut, MRD = Minimale-Rest-Erkrankung, MRD1E-6 = MRD nicht quantifizierbar, MRD1E-8 = MRD negativ, Donor % = autologe Anteile in %, UPN = Patientennummer, CSA abgesetzt, DLI = Donor Lymphozyten Infusion, Rlps = Rückfall

5.2.4 Krankheitsverläufe in Bezug auf den Chimärismusstatus der Subpopulationen

Die folgenden Abbildungen (Abb. 15 +16) zeigen die Chimärismusstatus der ALL- und AML-Patienten in den Subpopulationen, im Vollblut und im Knochenmark in Bezug auf den Krankheitsverlauf. Hierbei wird nur berücksichtigt, ob die Patienten im Verlauf durchgehend einen kompletten Chimärismus aufgewiesen haben (CC), oder ob sie zu einem Zeitpunkt autologe Anteile nachweisbar gewesen sind (MC). Auf Grund der Analyseausfälle sind einige Patienten nicht in jeder Subpopulationen repräsentiert (z.B. Patientenzahl in CD34).

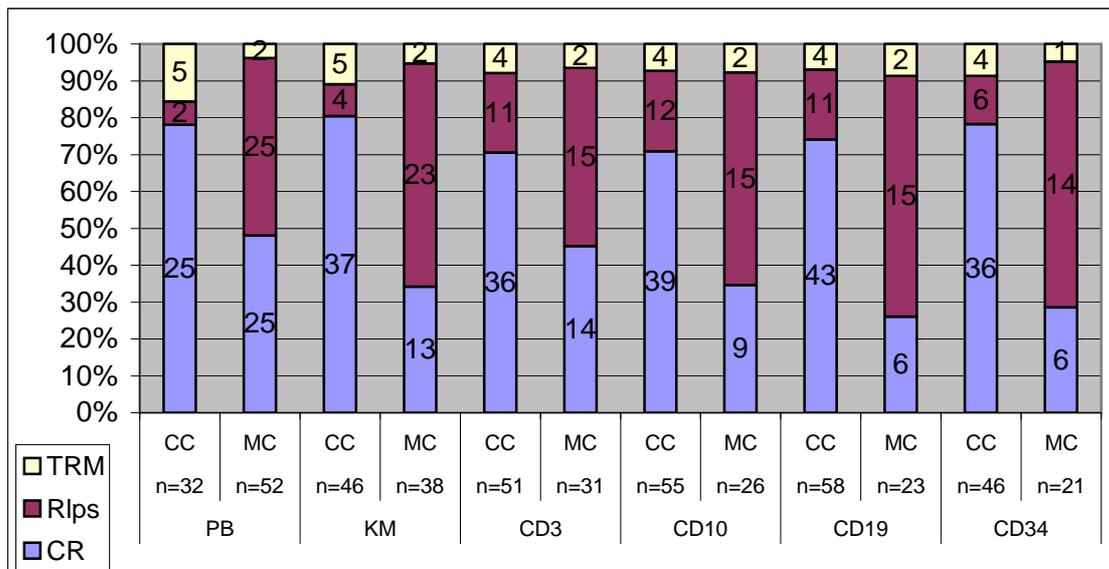


Abbildung 15: Krankheitsverläufe von 84 ALL Patienten in Bezug auf die Chimärismusgruppen der Subpopulationen und die des Knochenmarks; CC = vollständiger Chimärismus, MC = gemischter Chimärismus, TRM = transplantationsassoziierte Mortalität, Rlps = Rezidiv, CR = komplette Remission, KM = Knochenmark, PB = Vollblut, CD3+10+19+34 = Subpopulationen

Auch in dieser Darstellung (Abb.15) ist unabhängig von der untersuchten Zellfraktion die Korrelation eines vollständigen Chimärismus mit einer kompletten Remission zu erkennen. Im Vollblut haben nur zwei Patienten ohne den Nachweis eines gemischten Chimärismus ein Rezidiv entwickelt. Die Wahrscheinlichkeit auf eine komplette Remission ist unter diesen Umständen im Vergleich zu den Subpopulationen am höchsten. Zurückzuführen ist dieses Ergebnis sicher nicht auf eine höhere Sensibilität, sondern auf die Häufigkeit der durchgeführten Analysen und der damit verbundenen Detektions-Möglichkeit autologer Anteile. Patienten mit einem gesteigerten Rezidivrisiko durch einen MC fallen so aus der CC-Gruppe heraus.

Der gemischte Chimärismus hingegen geht in allen untersuchten Zellreihen mit einem erhöhten Rezidivrisiko einher. Bei einem MC in der T-Zellen-Linie liegt die Wahrscheinlichkeit der Rezidiv-Entwicklung mit 48 % am niedrigsten, gefolgt von denen der CD10-Subpopulation mit 57 % und des Knochenmarks mit 60 %. Sie ist in der CD19- und CD34-Subpopulation mit 66 % am höchsten. Im Vollblut liegt sie bei 50 %.

Auch in der AML (Abb.16) ist ein vollständiger Chimärismus mit einer geringen Rezidivwahrscheinlichkeit verbunden. Bei allen Patienten, die ein Rezidiv entwickelt

haben, konnten, ausgenommen von einer CD33-Subpopulationprobe, gemischte Chimäre sowohl im Vollblut als auch in den Subpopulationen nachgewiesen werden.

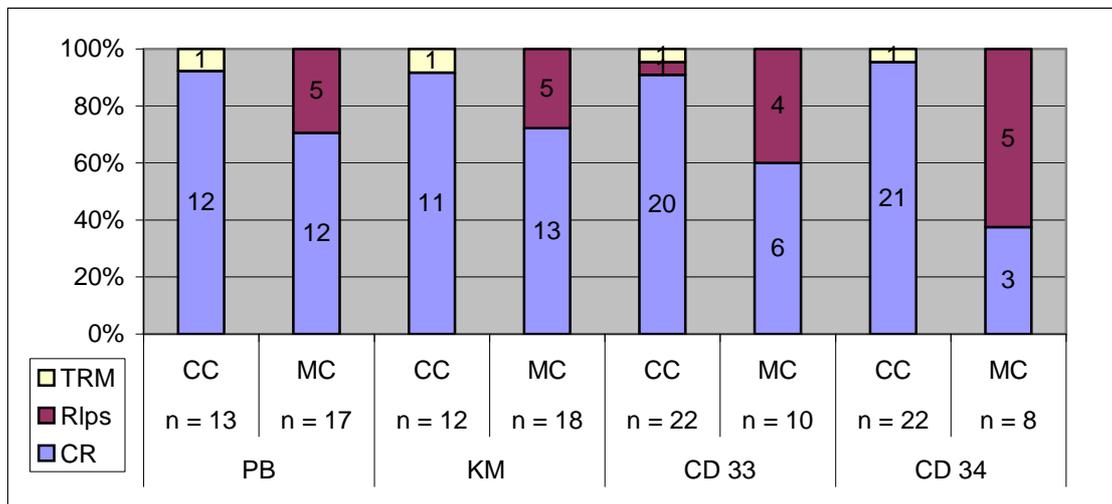


Abbildung 16: Krankheitsverläufe von 30 AML-Patienten in Bezug auf den Chimärismusstatus in den Subpopulationen und im Knochenmark; CC = vollständiger Chimärismus, MC = gemischter Chimärismus, TRM = transplantationsassoziierte Mortalität, Rlps = Rezidiv, CR = komplette Remission; KM = Knochenmark, PB = Vollblut; CD = Subpopulationen

5.3 Chimärismusanalysen vor dem klinischen Rezidivausbruch

Um einen Anhaltspunkt über die Bedeutung von gemischten Chimären für ein Rezidiv zu bekommen, werden im folgenden Abschnitt alle Analysen von der Ergebnisbetrachtung ausgeschlossen, die nach der klinischen Rezidivdiagnose abgenommen worden oder die von Patienten stammen, die an einer transplantationsassoziierten Komplikation verstorben sind. Es verbleiben 206 Proben von 106 Patienten (76 ALL-, 30 AML-Patienten).

5.3.1 Prognostische Bedeutung gemischter Chimäre

Die Tabelle 11 gibt die Ergebnisse der Kaplan-Meier-Analyse der Subpopulationen wieder. Sie beschreibt, wie viel Prozent der Patienten in Abhängigkeit von ihrem Chimärismusstatus (CC / MC) nach einem definierten Zeitintervall (150 Tage / 2 Jahre) ein Rezidiv entwickelt haben. Diese Prozentzahlen werden in den Spalten 2-5 wiedergegeben. Zum anderen kann der prozentuale Anteil der Patienten ermittelt werden, der trotz eines kompletten Chimärismus ein Rezidiv entwickelt hat (pCC). Sig ist die Streuung der Logarithmen der entsprechenden Lognormalverteilungen. Sig ist für den kompletten (CC) und gemischten (MC) Chimärismus in den letzten beiden Spalten aufgelistet. Die Daten der AML und der CD34-Subpopulation wurden bei dieser Betrachtung wegen einer zu hohen Ungenauigkeit ausgeschlossen.

Zellart	150dCC	150dMC	2aCC	2aMC	pCC	sigCC	sigMC
CD10	8.9	24.2	18.5	69.8	0.19	0.86	1.30
CD19	11.9	19.6	19.8	64.0	0.21	1.07	1.30
CD3	10.9	22.6	15.9	70.4	0.16	0.88	1.23
KM	7.8	28.5	13.4	73.7	0.14	0.83	1.32
PB	16.4	17.7	31.1	69.8	0.33	1.05	1.09

Tabelle 11: Angabe der Patienten in %, die nach einem bestimmten Zeitintervall in Abhängigkeit vom Chimärismusstatus ein Rezidiv entwickelt haben; 150d = Tage nach SZT, 2a = Jahre nach SZT, MC = gemischter Chimärismus, CC = kompletter Chimärismus, pCC = prozentualer Anteil der Patienten, die bei einem kompletten Chimärismus ein Rezidiv entwickeln, sigCC/MC = Streuung der Logarithmen bei kompletten und gemischten Chimärismus, CD3-19 = Subpopulationen, KM = Knochenmark, PB = Vollblut

Patienten mit einer reinen Spenderhämatopoese in den Knochenmarksanalysen wiesen sowohl nach 150 Tagen als auch nach 2 Jahren die niedrigste Rezidivrate auf (7,8 % und 13,3 %). Entsprechend ist ein Rezidiv am häufigsten mit dem Nachweis autologer Anteile im Knochenmark assoziiert. Die Wahrscheinlich bei einem kompletten Chimärismus liegt mit 14 % am niedrigsten. In den Vollblutanalysen hingegen, scheint die Rezidivrate vom Chimärismusstatus innerhalb der ersten 150 Tage nach der SZT weitgehend unabhängig zu sein (16,5% vs. 17,7%). Nach einem zweijährigen Beobachtungszeitraum nimmt das Rezidivrisiko ebenfalls mit

dem Nachweis autologer Anteile zu (31,5 % vs. 70 %). Die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs bei einem kompletten Chimärismus liegt bei 33 %.

Deutliche Unterschiede innerhalb der Subpopulationen zeichnen sich nicht ab. In allen untersuchten Zellreihen ist die Streuung (sig) der Daten um den errechneten Mittelwert (in %) bei gemischten Chimären höher als bei kompletten. Auch in dieser Darstellungsform wird die schwierige Beurteilung eines gemischten Chimärismus offensichtlich und kann nur richtungshinweisend betrachtet werden.

5.3.2 Zeitintervall zwischen einem ersten MC und der Rezidivdiagnose

In der folgenden Tabelle 14 ist für jede Subpopulation der Median des Zeitintervalls für das erste Auftreten eines gemischten Chimärismus vor der klinischen Rezidivdiagnose angegeben. In den Vollblutanalysen beträgt dieser 5 Tage, in den Knochenmarksanalysen ist er mit 67 Tagen am höchsten. Die große Standardabweichung der CD34-Subpopulation ist sicherlich auf die geringere Anzahl der untersuchten Proben zurückzuführen.

Subpopulation	Median	sig
ChimCD10	41	1.84
ChimCD19	42	1.08
ChimCD3	39	1.92
ChimCD34	49	2.21
ChimKM	67	1.60
ChimPB	5	2.42

Tabelle 14: Mediane Tagangabe der ersten Detektion autologer Anteile vor der klinischen Rezidivdiagnose; ChimCD3,10,19,34 = Subpopulationesanalysen, ChinPB = Vollblutanalysen, ChimKM = Knochenmarksanalyse, Median = Tagangabe im Median des Auftretens erster autologer Anteile vor einem Rezidiv, sig = Standardabweichung.

Die folgende Graphik (Abb. 17) zeigt die Lognormalverteilung der untersuchten Daten. Der Untersuchungszeitraum beträgt 900 Tage.

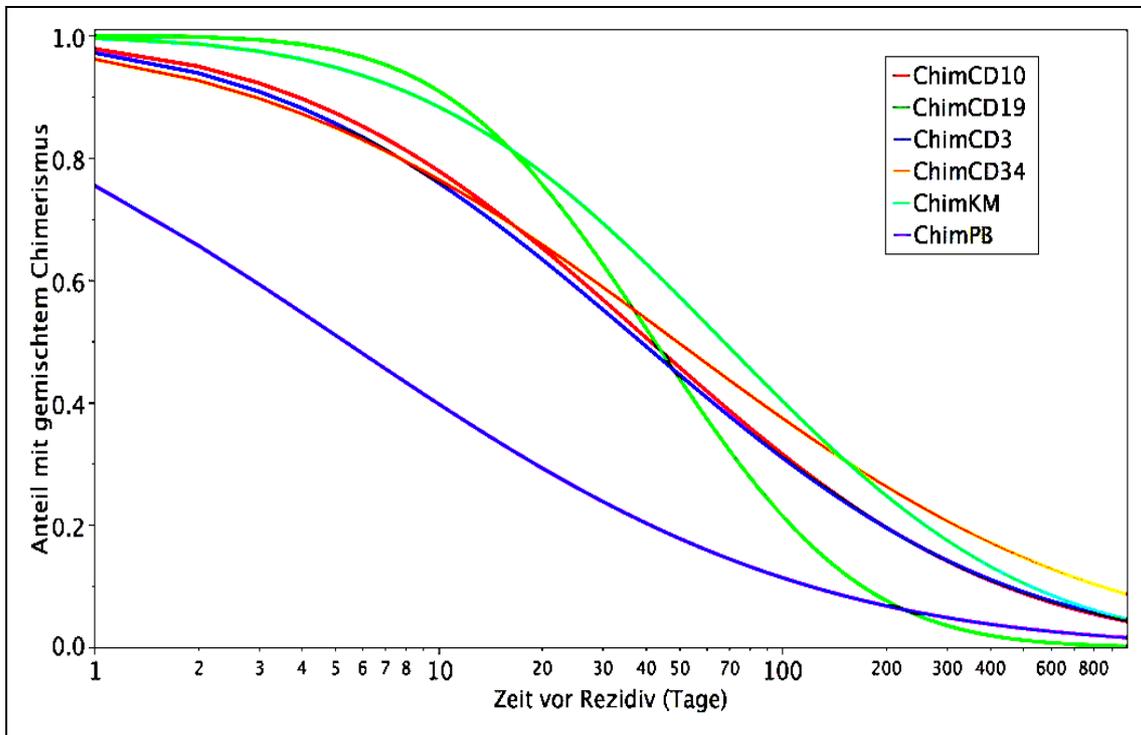


Abbildung 17: Wahrscheinlichkeit des Auftretens gemischter Chimäre in den Subpopulationen in Abhängigkeit vom Zeitintervall bis zum Rezidivausbruch der ALL-Patienten; Chim CD3+10+19+34 = Subpopulationsanalysen, ChimKM = Knochenmarksanalysen, ChimPB = Vollblutanalysen

Auffällig ist, dass gemischte Chimäre in den Vollblutuntersuchungen im Vergleich zu den anderen untersuchten Proben seltener auftreten. Sowohl in den Subpopulationen als auch im Knochenmark sind 50 Tage vor der klinischen Diagnose bei mindestens 50 % der Patienten autologe Anteile nachweisbar. Im Vollblut hingegen sind es nur 20 %. Es zeichnet sich eine größere Sensitivität der Knochenmarksanalysen im Vergleich zum Vollblut ab. Unterschiede innerhalb der Subpopulationen sind nicht festzustellen.

5.3.3 Vergleich der STR-PCR-Ergebnisse mit der RT-PCR

Um einen Eindruck zu bekommen, inwieweit der Nachweis autologer Anteile in den Subpopulationen mit der tatsächlichen residualen Blastenlast korreliert, sind die Ergebnisse dieser beiden Methoden im folgenden Diagramm (Abb. 18) dargestellt.

In 24 Knochenmarksproben von 11 Patienten sind sowohl Chimärismusanalysen als auch Untersuchungen der residuale Blastenlast mit Hilfe der RT-PCR durchgeführt worden. 5 Patienten haben eine Immuntherapie erhalten. Patienten mit einem T-Zell Subtyp der ALL (UPN 2130, 2433, 2298) sind von der Darstellung ausgeschlossen worden.

In dem Diagramm (Abb.18) ist zum einen erkennbar, dass mit einer zunehmenden MRD-Last auch die autologen Anteile zunehmen; zum anderen tritt die verstärkte Präsenz maligner Zellen in den malignomassoziierten Zelllinien hervor (UPN 2114, 2119, 2266). Mit Hilfe der RT-PCR wird ab einer Blastenlast von $1E^{-04}$ ausgegangen, dass sie einem Rezidiv vorraus geht. Gemischte Chimäre sind in den Subpopulationen und im Knochenmark ab einer MRD von $5E^{-4}$ (UPN 2114) nachweisbar. In der CD3-Subpopulation scheinen patienteneigene Zellen bei höheren MRD-Werten aufzutreten und weniger stark ausgeprägt zu sein (UPN 2217, 2413, 2114, 2266). UPN 2119 hat eine Immuntherapie erhalten. Diese könnte den Nachweis autologer Anteile bei einer negativen Blastenlast erklären. Die Probe ist 28 Tage nach SZT abgenommen worden. Im Vollblut entwickeln sich gemischte Chimäre ab MRD-Werten von $3E^{-3}$ (UPN 2114).

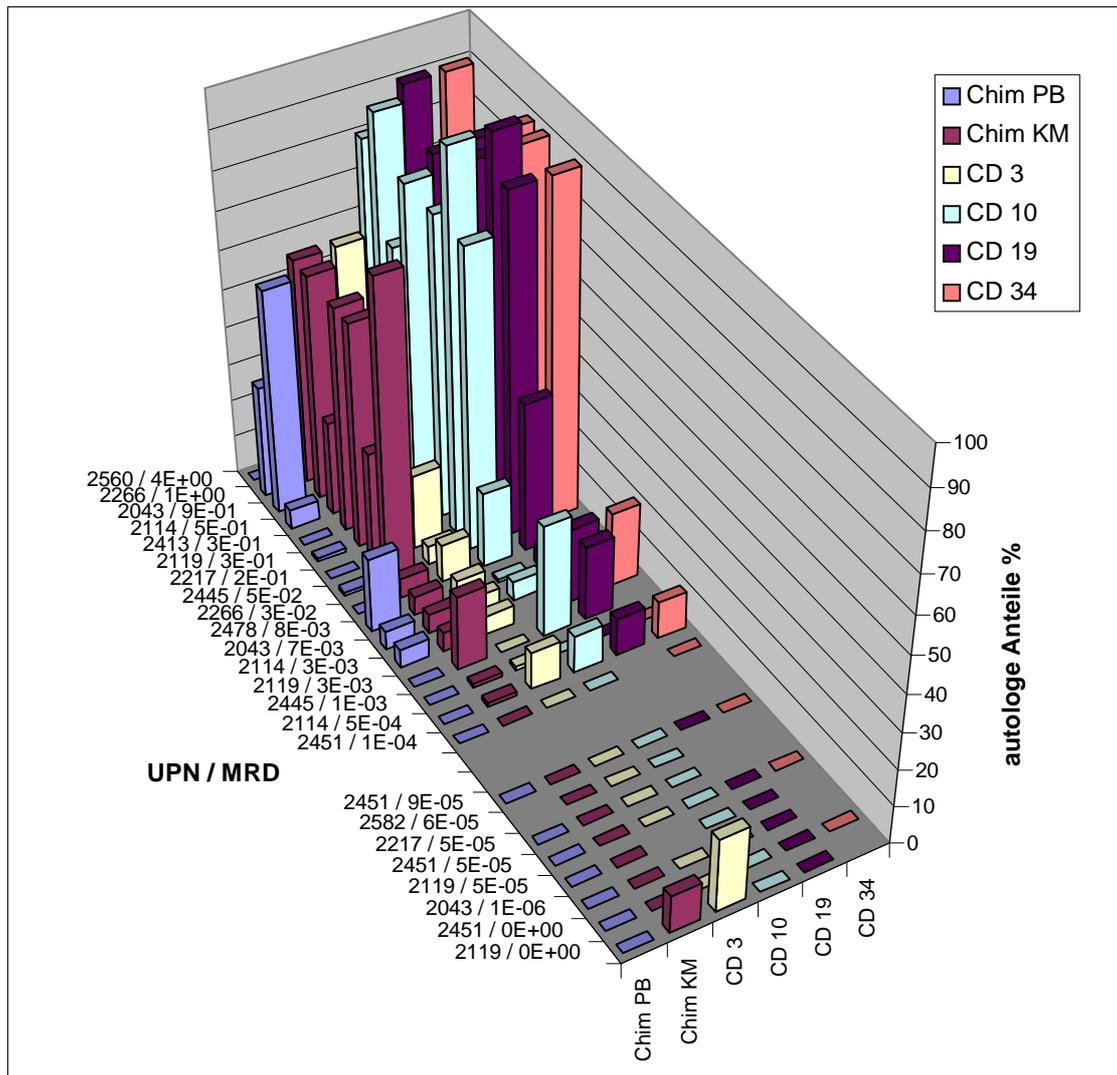


Abbildung 18: Chimärismusanalysen der Subpopulationen von c-ALL- und pre-B-ALL-Patienten, die ein Rezidiv entwickelt haben in Bezug auf die MRD; ChimPB = Chimärismus im Vollblut, ChimKM = Chimärismus im Knochenmark, CD3+10+19+34 = Chimärismus in den Subpopulationen des Knochenmarks; Patienten = 1965 - 2582, $1E^{-6}$ bis $1E^0$ = MRD-Werte der untersuchten Proben, $0E+00$ = keine Blasten nachweisbar

5.4 Chimärismusstatus im Vollblut

Aktuell bilden engmaschige Chimärismusanalysen des Vollbluts den Standard für das klinische Monitoring von Patienten. Diese Analysen werden in den ersten zwei Monaten wöchentlich durchgeführt und im Anschluss alle 4 Wochen, so dass sich eine Zunahme (inMC) oder Abnahme (deMC) von autologen Anteilen rasch darstellt. Entsprechend dieser Veränderungen sind die Patienten in die verschiedenen Chimärismusgruppen eingeteilt worden und im Zusammenhang mit ihrem Krankheitsverlauf dargestellt.

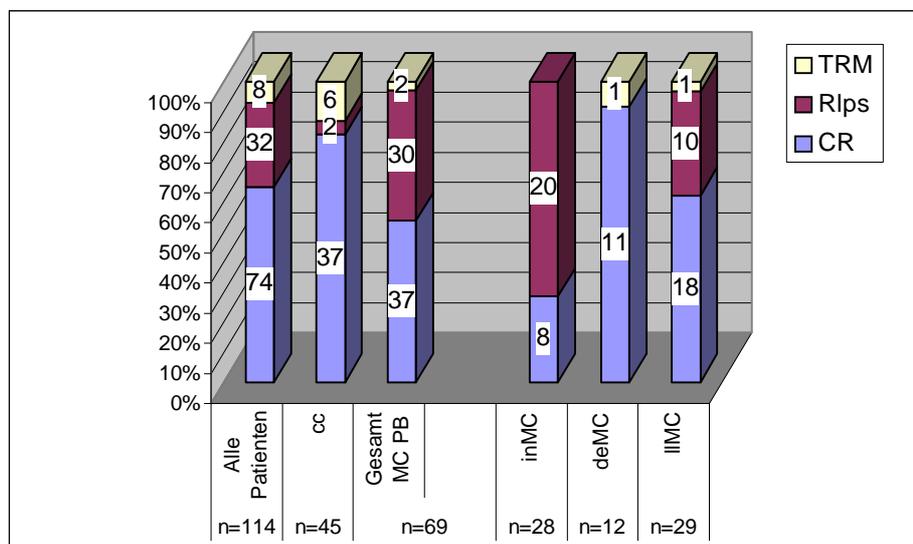


Abbildung 19: Klinische Entwicklung aller Patienten in den jeweiligen Chimärismusgruppen des Vollbluts; CC = kompletter Chimmärismus, inMC = zunehmende autologe Anteile, deMC = abnehmende autolge Anteile, IIMC = autologe Anteile auf geringem Niveau, gesamtMCPB = zusammengefasster gemischter Chimärismus, CR = komplette Remission, Rlps = Rezidiv, TRM = Therapie assoziierte Motalität

Insgesamt haben 32/114 Patienten ein Rezidiv entwickelt. Die Rezidivhäufigkeiten (Rlps) in den Gruppen CC (n = 2/45) und MC (n = 30/69) unterscheiden sich deutlich. Werden die Patienten mit einem MC zusätzlich unter dem Aspekt der Dynamik des Chimärismus betrachtet, ist die Rezidivhäufigkeit bei zunehmenden autologen Anteilen am größten (20/28). Alle Patienten mit abnehmenden autologen Anteilen befinden sich in kompletter Remission (10/11), einer verstarb an den Folgen der Transplantation. Bei 34 % der Patienten, die einen IIMC aufgewiesen haben, ist es zum Wiederauftreten der Erkrankung gekommen und nur bei 3 Patienten, ist kein MC im Zusammenhang mit einem Rezidiv detektiert worden.

6 Diskussion

6.1 Methode

6.1.1 STR-PCR

Aufbauend auf vorangegangenen Untersuchungen von *Bader et al.*, ist auch in dieser Arbeit die STR-PCR für die Analysen des Chimärismus verwandt worden [12]. Die Limitationen und Fehlerquellen dieser Methode sind ausführlich von *Kreyenberg et al.* beleuchtet worden. *Lion et al.* haben in einer Multi-Center-Studie die Reproduzierbarkeit von STR-PCR-Ergebnissen verschiedener Forschergruppen untersucht [58;63].

Für die Isolation der Subpopulationen ist in dieser Untersuchung die MACS-Methode herangezogen worden. Die Sensitivitätsschwelle, die in unserem Labor für Minorpopulationen erreicht wird, liegt zwischen 0,8 und 6,2 %, die mittlere Sensitivität beträgt 3 %. Die erzielte Reinheit wird zwischen 80 und 98 % angegeben [20;58;67].

Die Grundlage für die Analysen stellen kernhaltige Zellen dar. Während einer Knochenmarkspunktion besteht deshalb die Gefahr der Verunreinigung der Probe durch patienteneigene Stromazellen. Diese können zu falsch positiven Ergebnissen führen. Durch die Positiv-Selektion der Subpopulationen und dem Effekt, dass nicht markierten Zellen eliminiert werden, wird diese Fehlerquelle behoben [67]. Es sinkt jedoch die DNA-Ausbeute der Probe, so dass die für die Analysen benötigte Menge von 50 - 100 ng an DNA häufig nicht gewährleistet werden kann. Die CD34-Subpopulation ist hiervon am stärksten betroffen. Sie bildet mit nur 0,5 bis 3 % den kleinsten Anteil an den Knochenmarkszellen [58;67]. Mit dem zunehmenden Alter einer Probe kommt es zusätzlich zu einer Abnahme der exprimierten Oberflächenantigene, das sich ebenfalls negativ auf die Ausfallrate auswirkt. Durch die selektive Betrachtung der einzelnen Zelllinien ist trotzdem eine Sensitivitätssteigerung der Methode um 1 bis 2 Logarithmen zu erreichen [64;113]. Im Vergleich zu den Analysen des Vollblutes liegt die Begründung in der spezifischen Anreicherung proliferierender autologer Zellen in den betroffenen Zell-Reihen, d. h. in einer anteiligen Zu-

nahme autologer Zellen innerhalb der Zellzahl des vorselektionierten Präparats [20;101;113].

6.2 Ursachen und Bedeutung des gemischten Chimärismus

Mit der Weiterentwicklung der molekularen Techniken und dem Erfolg einer höheren Sensitivität der Methoden ist ein gemischter Chimärismus zu einem häufig beobachteten Ereignis geworden [5;19;46;57]. Entsprechend vielseitig sind die z. T. kontroversen Diskussionen über den Ursprung und die Bedeutung dieses Phänomens. Ein MC kann bedingt sein durch eine Insuffizienz des ablativen Konditionierungsregimens, durch Immunsuppressiva oder einfach durch den Zeitpunkt der Probenentnahme [108]. *Schaap et al.* beschreiben ein deutlich häufigeres Vorkommen von gemischten Chimären nach T-Zell-depletierten Transplantationen im Vergleich zu unmanipulierten [89;90]. Es wird beschrieben, dass ein gemischter Chimärismus häufig mit einem geringeren Ausmaß einer GvHD in Verbindung gebracht werden kann und dass er von einer erhöhten Abstoßungsrate begleitet wird [23;37;70;72;90;105]. Mit der dynamischen Betrachtung des Chimärismus ist ein erster Schritt getan worden, eine gesunde residuale Hämatopoese von ungewollten Ereignissen wie z.B. der Transplantatabstoßung oder einem Rezidivgeschehen abzugrenzen. [17;53;69].

6.2.1 Die Subpopulationen

Eine weitere Möglichkeit, die Ursache eines MC bzw. eines transienten MC zu verifizieren, besteht in der Betrachtung der Subpopulationen. *Roux et al.* vermuten während eines Rezidivs eine vermehrte Beteiligung der leukämieassoziierten Zelllinien am gemischten Chimärismus [87]. Es existieren verschiedenste Arbeiten, die die Präsenz der CD-Oberflächenproteine auf leukämischen Zellen formulieren. *Consolini et al.* z.B. beschreiben eine vermehrte Expression der CD10-Oberflächenproteine auf den Blasten der ALL. In Ihren Untersuchungen sind bei 95,5 % der untersuchten B-ALL-Patienten diese Antigene nachzuweisen, bei T-ALL-Patienten jedoch nur bei 18 % [33]. *Farahat et al.* haben ebenfalls ein vermehrtes Vorkommen von CD10- und CD19-Oberflächenrezeptoren auf den Blasten der B-Zell abstammenden ALLs im Vergleich zu gesunden hämatopoetischen Zellen

beobachtet [40]. Gleiches gilt für die CD34-Oberflächenantigene. Hier wird zusätzlich diskutiert, ob ihr Vorhandensein mit einem höheren Rezidivrisiko assoziiert ist [29;35;81;104].

In einer Studie von *Bader et al.* ist die Beteiligung von blastenassoziierten Zelllinien vorrangig für Rezidive beschrieben worden, die erst 300 Tage nach einer SZT aufgetreten sind. Vorher seien alle Zelllinien an einem Rezidivgeschehen beteiligt gewesen. Die Forschergruppe vermutet, dass dieses Ergebnis ebenfalls mit einer Toleranzentwicklung des Transplantats begründet werden kann [20]. Es besteht die These, dass die Reaktivität der Spenderzellen gegen den Empfänger, insbesondere die der T-Zellen, herabgesetzt würde und so zu einer Abschwächung des wertvollen GvL-Effekts führen könnte. Durch die unzureichende Immunkompetenz des Transplantats würde das Wiederauftreten eines Rezidivs begünstigt werden [20].

6.3 Ergebnisse der AML-Patienten

Mattsson et al. haben ein Kollektiv aus insgesamt 30 AML und MDS-Patienten untersucht. Mit Hilfe immunomagnetischer Antikörper haben sie die CD13-, CD33-, CD7- und CD45-Subpopulationen selektioniert und haben dadurch eine Sensitivitätssteigerung der Analysen auf 2 bis 4×10^{-4} erreicht. 14 der 30 untersuchten Patienten ihrer Studie haben ein Rezidiv entwickelt (AML: $n = 7$, MDS: $n = 2$, MDS-AML: $n = 3$), 10/14 haben einen gemischten Chimärismus in den untersuchten Zelllinien gezeigt. 7/14 Patienten haben einen MC nur in den von der Leukämie betroffenen Subpopulationen entwickelt, im Gegensatz zu nur 2/16, die sich weiterhin in kompletter Remission befunden haben. Durch die Subpopulations-Analysen hat die Forschergruppe sowohl eine Steigerung der Sensitivität als auch der Spezifität der STR-PCR Methode erreichen können. Sie empfehlen ihre Methode als Ergänzung im Rezidivmonitoring [73]. *Zeiser et al.* hingegen haben eine höher Sensitivität der Subpopulationen bei myeloischen Erkrankungen nur in vitro feststellen können [112].

In der vorliegenden Studie haben 5/30 AML-Patienten ein Rezidiv entwickelt. Mit einer Ausnahme in der CD33-Subpopulation ist ein MC bei allen Patienten sowohl im KM als auch in den Subpopulationen nachweisbar gewesen (Abb 16). 13/24 Patienten haben einen MC im Knochenmark auch in kompletter Remission

aufgewiesen. In der CD33- sind es 6/24, (25 %) in der CD34-Subpopulation 3/24 (12 %) Patienten gewesen. Die autologen Anteile in der CD34-Subpopulation scheinen bei der Betrachtung der beispielhaften Chimärismusverläufe von der gesunden empfängereigenen Hämatopoese etwas weniger beeinflusst zu sein.

6.4 Ergebnisse der ALL-Patienten

6.4.1 Stammzellen, die CD34-Subpopulation

Thiede et al. haben die Präsenz autologer Anteile im Vollblut in der CD34-Subpopulation bei Patienten die aufgrund einer CML und einer ALL transplantiert wurden beleuchtet. Für die Rezidivdetektion sowie für das Therapie-Monitoring stellt sich diese Subpopulation im Falle der CML als ein wertvoller Marker heraus. Bei Patienten mit akuten Leukämien haben sich ähnlich Ergebnisse angedeutet, sie sind jedoch weniger signifikant. Dieser Autorengruppe ist außerdem der Nachweis der malignen Zellklone in dieser Zelllinie mit Hilfe der STR-PCR aufgrund des Verlusts von Signalen bei Chromosomen-aberanten Leukämien gelungen [100-102]. *Dubowsky et al.* hingegen beschreiben den Nachweis von CD34-positiven-Zellen unabhängig vom weiteren Krankheitsverlauf der Patienten bis zu 70 Tagen nach der SZT [37].

In den Ergebnissen der vorliegenden Studie haben 27/84 ALL-Patienten ein Rezidiv entwickelt (Abb 15). Die CD34-Fraktion ist bei 67 Patienten bestimmt worden (Rlps: n = 20, CR: n = 42, TRM: n = 5). Bei 14/20 (66 %) Patienten, die ein Rezidiv haben, ist ein MC nachweisbar gewesen. 6/42 (14 %) haben ein MC auch in kompletter Remission entwickelt.

6.4.2 B-Zellen, die CD10- und CD19-Subpopulation

Zetterquist et al. haben den Chimärismusstatus in den B-Zellen des Knochenmarks von pre-B-ALL-Patienten untersucht. Ihre Ergebnisse zeigen bei 5/12 Patienten einen MC in der CD19-Zelllinie. Alle Patienten haben ein Rezidiv entwickelt. Die 7/12 Patienten, bei denen ein CC in den B-Zellen detektiert worden ist, sind in kompletter Remission verblieben ($p = 0,01$). Diese Forschergruppe erreichte in ihren Untersuchungen ebenfalls eine Sensitivität mit einem Wert von 2×10^{-4} . Mit Hilfe von monoklonalen Markern und der RT-PCR ist auch dieser Forschergruppe

der direkte Nachweis von Blasten in der CD19-Zellpopulation gelungen. Sie verweisen außerdem auf die Bedeutung der MRD vor SZT zur Einschätzung des Therapieerfolgs. Eine erhöhte Blastenlast nach der Induktionstherapie ist mit einer erhöhten Rezidivwahrscheinlichkeit assoziiert. Diese Forschergruppe vermutet, dass ein MC in der B-Zelllinie kurz nach SZT diese residualen Leukämiezellen reflektiert [113].

Mattsson et al. hingegen haben ein Fortbestehen der B-Zellen bis zu drei Monate nach der SZT beobachtet, dieser sei häufig mit einem gleichzeitigem MC in den T-Zellen verbunden gewesen. Sie vermuten eine Beeinflussung der autologen B-Zellen durch den T-Zell-Status [73].

Von den 32 Patienten, die in dieser Studie ein Rezidiv entwickelt haben, wurden 26 Patienten in der CD10- und 23 Patienten in der CD19-Subpopulation auf ihren Chimärismus hin untersucht (Abb 15). Bei 15/26 (57 %) in der CD10- und bei 15/23 (65 %) in der CD19-Zelllinie ist ein MC nachweisbar gewesen. 9/50 (18 %) Patienten in der CD10- sowie 6/50 (12 %) in der CD19-Subpopulation haben ein MC in kompletter Remission entwickelt.

Die zeitgleiche Präsenz der malignomassoziierten Subpopulationen mit den T-Zellen ist in den Abbildungen 9+10 dargestellt. Die CD10-Subpopulation scheint von der gesunden Hämatopoese etwas stärker beeinflusst zu werden als die CD19- und CD34-Subpopulation.

6.4.3 T-Zellen, die CD3-Subpopulation und immunologische Toleranz

Die Bedeutung autologer Anteile in der T-Zelllinie hinsichtlich eines Rezidivgeschehens ist stark umstritten. Es ist bekannt, dass diese Zellen (CD3) in der Lage sind, auch intensive Konditionierungsregimen zu überleben [24;64;68;87]. *Van Leeuwen et al.* haben demonstriert, dass ein MC in dieser Zellfraktion nicht mit einem erhöhten Rezidivrisiko verbunden ist [107]. Andere Autoren hingegen postulieren, dass der MC eine Toleranzentwicklung des Transplantats gegen den Empfänger hervorrufen kann und dass er eine Abschwächung der GvL bewirkt [17]. Im Vergleich zu den bisher diskutierten Subpopulationen ist die Assoziation zwischen einem T-Zell-MC und einem Rezidiv geringer ausgebildet. Bei 15/31 (48%) Patienten, die ein Rezidiv entwickelt haben, ist ein MC nachweisbar

gewesen. In der CR haben 14/50 (28 %) der Patienten einen gemischten Chimärismus aufgezeigt. Gehäuft ist dieser direkt nach der SZT zu finden. In der Assoziation mit einem Rezidiv ist ein MC in der T-Zellfraktion im Vergleich zu den vorher beschriebenen Subpopulationen ebenfalls schwächer ausgebildet (Abb. 15, 18).

Eine Steigerung der Aussagekraft des Chimärismus durch Analysen in der CD3-Fraktion kann in dieser Studie nicht aufgezeigt werden. Bisherige Versuche, den schädlichen Effekt der T-Zellen (GvHD, Transplantatabstoßung) vom nützlichen (GvL) zu trennen, sind bislang nur unbefriedigend beantwortet worden [28;53;56].

6.5 Knochenmarks- und Vollblutanalysen

Von den 114 Patienten dieser Studie haben 32 ein Rezidiv entwickelt. Bei 69 Patienten ist während des Beobachtungszeitraums ein gemischter Chimärismus im Vollblut nachweisbar gewesen. 30 von diesen Patienten (34 %) haben ein Rezidiv entwickelt (Tab 9+10). Im Vergleich dazu haben 28/56 Patienten (50 %) ein Rezidiv erlitten, die einen MC im Knochenmark aufgewiesen haben (Abb 15 + 16). Auffällig ist, dass im KM ein MC vergleichsweise seltener als im Vollblut detektiert wird und dass dieser mit einer entsprechend höheren Rezidivwahrscheinlichkeit verbunden ist.

Auch die Kaplan-Meier-Analyse verdeutlicht die prognostische Bedeutung der Chimärismusanalysen des Knochenmarks im Vergleich zum Vollblut (Tab. 11) Die Wahrscheinlichkeit für einen Patienten, trotz eines kompletten Chimärismus ein Rezidiv zu entwickeln, liegt im Knochenmark bei 14 % und im Vollblut bei 33 %. Im Umgekehrten Fall ist ein MC im Knochenmark häufiger mit einem Rezidiv assoziiert (28 % vs. 17 % innerhalb der ersten 150 Tage nach SZT). Knochenmarksanalysen scheinen in dieser Darstellungsform die größte Prädiktivität bezüglich eines Rezidivs zu besitzen.

Zum einen ist dies sicherlich auf die Häufigkeit der durchgeführten Analysen und der damit verbundenen Detektionsmöglichkeit autologer Anteile zurückzuführen; zum anderen beruht die höhere Sensitivität auf der methodisch bedingte Vor-selektion der mononuklearen Zellen aus dem KM im Vergleich zum PB [42;83]. Weiterhin wird vermutet, dass die höhere Sensitivität der Knochenmarksanalysen

auf einer meist medullären Lokalisation der Rezidive beruht [39;64;73]. Der Anteil maligner Zellen im KM ist entsprechend höher.

Eine Verbesserung der STR-PCR-Methode durch Subpopulationsanalysen im Vergleich zum Knochenmark ist in dieser Ergebnisdarstellung nicht erreicht worden. *Zeiser et al.* haben ebenfalls keinen Unterschied im Chimärismus zwischen den Subpopulationen und dem unselektionierten Untersuchungen des Vollbluts feststellen können. Als Ursache hat die Gruppe vermutet, dass die entscheidenden Zeitpunkte der Chimärismusveränderungen durch die zu groß gewählten Untersuchungsabstände nicht erfasst worden sind (Median 24 d) [112].

6.6 Zeitspanne zwischen ersten MC und Rezidiv

Mattsson et al. berichten bei Patienten mit einer AML oder einem MDS von einer Zeitspanne im Median von 66 Tagen zwischen der Detektion erster autologer Anteile im Vollblut und dem klinischem Ausbruch des Rezidives [73]. *Zetterquist et al.* konnten bei ALL-Patienten einen MC in der CD19-Subpopulation 75 Tage vor der klinischen Diagnose nachweisen [113].

Der Median dieses Zeitintervalls, der in diesen Ergebnissen für die ALL erhoben worden ist, liegt niedriger (Tab. 12). Aufgrund der großen Streuung der Ergebnisse beträgt er im Vollblut nur 5 Tage ($\text{sig} = 2,42$) und ist im Knochenmark mit 67 Tagen am größten ($\text{sig} = 1,6$). Eine Sensitivitätssteigerung durch die Subpopulationsanalysen ist in dieser Darstellungsform ebenfalls nicht erreicht worden, obwohl sie in den beispielhaft abgebildeten Patientenverläufen zu vermuten gewesen ist. Zurückzuführen ist dies sicherlich zum einen auf die geringere Anzahl der untersuchten Subpopulationsproben und zum anderen auf die variierende Präsenz der CD-Oberflächenproteinen auf den Blasten. Beides führt zu einer größeren Varianz der Ergebnisse, die sich negativ auf den Median auswirken. Interessanterweise ist die Standardabweichung der CD19-Zelllinie am geringsten (Abb. 17). Dieses Ergebnis ließe die Vermutung zu, dass für diese Subfraktion eine höhere Assoziation zwischen dem Rezidiv im Vergleich zu den anderen untersuchten Zelllinien besteht. *Verdock et al.* haben für die Entwicklung eines ‚Anti-Tumor-Effekts‘ des Transplantates nach DLI eine Zeitspanne von zwei Monaten ermittelt [109]. *Suttrop et al.* ziehen die Schlussfolgerung, dass die Sensitivität der STR-PCR von 1 % nicht

ausreichend sei, um auf die schnelle Krankheitsentwicklung akuter Leukämien adäquat reagieren zu können [97]. In diesen Untersuchungen ist durch die Chimärismusanalysen im Knochenmark ein Zeitgewinn erreicht worden. Dennoch sind die weiterführenden Immuntherapien bei einem ausgeprägten MC sowohl im Knochenmark als auch in den Subpopulationen selten von Erfolg gekrönt gewesen (Abb. 11 - 14).

6.6.1 Chimärismusanalysen in den Subpopulationen nach weiterführenden Therapien

Zwei Forschergruppen, die um *Gardiner* sowie die um *Baurmann*, schildern die Kinetik der GvL nach DLI bei Patienten, die auf Grund einer CML eine Transplantation erhalten haben. *Gardiner et al.* beschreiben als erste Reaktion auf eine Immuntherapie den Rückgang der autologen T-Zellen im Vollblut. Leukämie-assoziierte Zellen reagieren als letzte Zelllinie. Die Beobachtung dieses T-Zell-Switches haben *Baurmann et al.* nicht bestätigen können. Sie begründen die Unterschiede in den Ergebnisse damit, dass ihre Gruppe vorwiegend unmanipulierte Transplantationen untersucht hat, die um *Gardiner* hingegen in erster Linie T-Zell-depletierte. Beide Autoren beschreiben jedoch ein Vorherrschen autologer Anteile in der CD34-Subpopulation zum Zeitpunkt des offenen Rezidives [43]. *Kolb et al.* berichten, dass der Erfolg einer Immuntherapie bei Patienten mit einer CML mit der zu überwindenden Anzahl an Tumorzellen korreliert [55].

Der frühe Rückgang der T-Zell-Population nach weiterführenden Therapien ist auch anhand der eigenen Patientenbeispielen zu erkennen (Abb. 8). Eine Persistenz der malignomassoziierten Zelllinien lässt sich sowohl im Krankheitsverlauf der ALL- als auch der AML-Patienten deutlich erkennen (Abb. 12 - 14). Die verstärkte Präsenz bzw. Persistenz autologer Anteile im Knochenmark oder in den Subpopulationen könnte als Spiegel eines bereits fortgeschrittenen Rezidivgeschehens betrachtet werden und für eingeschränkte Erfolgsaussichten im Hinblick auf weiterführende Immuntherapien als Hinweis gewertet werden. Die Erfolge der Immuntherapien, die aufgrund eines MCs im Knochenmark initiiert worden sind, blieben aus oder haben in dieser Studie nur einen vorübergehenden Rückgang der Grundkrankheit erreicht (Abb. 13, 14)

Zeiser et al. haben in ihrer Studie keine Erfolge in der Immuntherapie erzielen können, die aufgrund eines inMC initiiert worden sind [112].

Es stellt sich die Frage, ob der prinzipielle Erfolg einer Immuntherapie bei den akuten Leukämien nur durch eine Intervention vor dem eigentlichen Rezidivgeschehen zu erreichen ist, also vor dem Nachweis autologer Anteile in den Blastenassoziierten Subpopulationen und letztendlich nur auf dem Unterbinden einer Toleranz beruht.

6.7 MRD und Chimärismusanalysen

6.7.1 Methode der Real-Time PCR von Ig/TCR-Rearrangements

Die Bestimmung der residualen Blastenlast ist in diesem Labor über den Nachweis von Ig/TCR-Rearrangements mit Hilfe der Real-Time-PCR erfolgt.

Neale et al. haben die Durchflußzytometrie mit der RT-PCR in den kindlichen ALL-Formen verglichen. Letztere stellen die am meisten genutzten Techniken zur Validierung der MRD dar. Die Forschergruppe hat von 227 Patienten insgesamt 1375 Proben untersucht, die sowohl aus dem Knochenmark als auch aus dem Vollblut gewonnen worden sind. Die durchflußzytometrische Analysen sind bei 95,8 % der Patienten anwendbar gewesen; Ig/TCR-Rearrangements haben sich bei 88,9 % nachweisen lassen. Bezüglich der MRD-Detektion ist eine weitgehende Übereinstimmung der Ergebnisse erreicht worden. Es zeichnet sich eine etwas höhere Sensitivität der RT-PCR ab (0,001 vs. 0,01 %) [76].

Der Nachteil der RT-PCR beruht auf einer Instabilität der Ig/TCR-Rearrangements. Dieser liegt begründet in dem Wandel der malignen Zellklone, der zu Veränderungen der MRD-Marker führt. Die Folge sind falsch negative Resultate. Durch den Gebrauch mehrerer Marker kann diese Fehlerquelle auf weniger als 5 % reduziert werden [34].

6.7.2 Vergleich der RT-PCR mit der STR-PCR in den Subpopulationen

Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist für die minimale Rest Erkrankung kein einheitlicher Schwellenwert beschrieben worden, der einem Rezidiv vorraus geht. Die Angaben variieren zwischen Zahlen von 10^{-5} bis 10^{-3} [75].

Bei dem Vergleich des Chimärismus mit den MRD-Werten (Abb. 18) lassen sich erste autologe Anteile konstant ab einer Blastenlast von 5×10^{-4} in den Knochenmarksanalysen nachweisen, im Vollblut erst ab Werten von 3×10^{-3} . Die Sensitivitätssteigerung der STR-PCR-Methode durch Knochenmarksuntersuchungen wird auch in dieser Betrachtungsform deutlich.

6.8 T-ALL

Van der Velden et al. haben die Präsenz von Blasten im Vollblut und Knochenmark bei Patienten mit einer c-ALL und T-ALL mit Hilfe der RT-PCR von Immunglobulin- und T-Zell-Rezeptor-Rearrangements untersucht. Hierbei finden sie in der c-ALL bis zu 1000 mal höher Werte im Knochenmark als im Peripherblut; die Werte bei den T-ALL-Patienten hingegen sind nahezu identisch [106].

In dieser Studie sind die autologen Anteile der T-ALL-Patienten im Knochenmark etwas stärker ausgeprägt als im Vollblut. Die Subpopulationen hingegen zeigen nur eine sehr geringe bzw. gar keine Beteiligung am Rezidivgeschehen. Als mögliche Ursache könnte im thymalen Ursprung dieses ALL-Subtyps vermutet werden; ein weiterer Grund könnte in der Beteiligung anderer nicht untersuchter Subpopulationen liegen, die so im MC des KM verborgen bleiben [33].

6.9 Prognostische Bedeutung von Vollblutuntersuchungen

Von den 114 Patienten dieser Studie haben 32 ein Rezidiv entwickelt. Bei 30/69 (38 %) ist ein MC im Vollblut mit einem Rezidiv assoziiert gewesen (Abb. 19). Wird die Dynamik des Chimärismus hinzugezogen, haben 20/28 Patienten (71 %) die eine zunehmende patienteneigene Hämatopoese gezeigt, im Vergleich zu 10/29 (34%) mit geringen autologen Anteilen. Alle Patienten mit einem abnehmenden Chimärismus befinden sich in kompletter Remission. Die Signifikanz der Dynamik wird auch in dieser Arbeit deutlich und bestätigt die Ergebnisse vorangegangener Studien [14;23;32;82;83]

6.10 Aktueller Stand der Forschung und Aussichten

Alizadeh et al. haben erstmals von dem Gebrauch der RT-PCR für Chimärismusanalysen berichtet. Sie verwenden hierbei Single-Nucleotid-Polymorphismen (SNPs) und haben in ihren Untersuchungen eine Sensitivität zwischen 0,1 und 0,01 % erreicht. Durch den Einsatz von 11 Markern ist diese Methode bei bis zu 90 % der Patienten anwendbar gewesen. Ein großer Nachteil dieser Technik liegt jedoch in der niedrigen quantitativen Reproduzierbarkeit [5;66]. Handelt es sich um den Nachweis sehr geringer Anteile eines gemischten Chimärismus, ist diese Ungenauigkeit zu tolerieren. Übersteigen die autologen Zellen jedoch einen Anteil von 5 %, sind Ergebnisvariationen bis zu 50 % möglich. Für eine quantitative Beurteilung des Chimärismusverlaufs ist diese Methode daher nicht geeignet. Der Variationskoeffizient der STR-PCR beträgt dagegen nur 5 % [19]. *Koldenhoff et al.* vergleichen die STR-PCR mit der RT-PCR von den SNPs und von den Y-Chromosom spezifischen Sequenzen. Sie erzielen durch Chimärismusanalysen mit der RT-PCR ebenfalls eine höhere Sensitivität und können mit RT-PCR den Zeitraum zwischen der ersten MC-Detektion und dem Rezidivausbruch von 30 auf bis zu 120 Tage ausweiten ($p = 0,007$). Aufgrund der hohen Sensitivität und der damit einhergehenden Verfälschung der Ergebnisse durch die Verunreinigungen der Knochenmarksproben mit Stromazellen haben sie für die Analysen Peripherblut verwendet [57].

Es ist zu überlegen, ob diese Methode auch auf Knochenmarksproben übertragen werden kann, wenn diese vorher durch Selektionsvorgänge aufgereinigt würden. So könnte der Zeitraum zwischen einem ersten MC und einem Rezidiv weiter ausgebaut werden. Aufgrund der geringen Reproduzierbarkeit der RT-PCR-Ergebnisse ist jedoch diese Methode für die weitere Verlaufskontrolle zum aktuellen Zeitpunkt ungeeignet.

Um therapieassoziierte Komplikationen zu reduzieren, sind die T-Zell-Depletion der Transplantate und die non-myeloablative Konditionierung in die Therapieschemata eingeführt worden. Infolge der gehäuften Entwicklung gemischter Chimäre besteht die Möglichkeit, unter der Kontrolle des Chimärismus diese Therapieverfahren durch DLI zu unterstützen, und somit eine vollständigen Donor-Hämatopoese erreichen zu können. *Antin et al.* bewerten in diesem Kontext die Bedeutung

gemischter Chimäre in den verschiedenen Zell-Reihen [6]. Geringe Anteile des Spenders in der CD33- und CD34-Subpopulation nach SZT sind oftmals mit einem Non-Engraftment assoziiert. Vor einer DLI sind diese ein Hinweis auf die Entwicklung einer Aplasie [50]. Weiterhin hat sich für das Monitoring des Engraftment der Chimärimus in den T- und NK-Zellen als wertvoll erwiesen. Gemischte Chimäre in diesen Zelllinien geben einen Hinweis auf eine Transplantatabstoßung [19;56].

Die Ergebnisse der letzten Studien zum Rezidivmonitoring der akuten Leukämien bei Kindern sind von verschiedenen Autorengruppen zusammengefasst und als Leitlinien veröffentlicht worden [19;52;100]. Sie postulieren Chimärismusanalysen vor allem in den ersten 2 Jahren in kurzen Zeitabständen, unterstützt, wenn möglich, durch die RT-PCR. Ist letztere nicht realisierbar, sollten bei dem Auftreten gemischter Chimäre malignomassoziierte Subpopulationsanalysen hinzugezogen werden, vornehmlich die der CD34-Zellen. Für non-myeloablative Transplantationsverfahren wird zusätzlich die Analyse der T- und NK-Zellen empfohlen.

7 Zusammenfassung

Durch die Erfolge in der Reduktion therapieassoziierter Komplikationen von allogenen-Stammzelltransplantationen, stellt das Rezidiv bei Kindern mit akuten Leukämien heute die Hauptursache für ein Therapieversagen dar [8;86]. Weiterführende Immuntherapien auf der Basis von Chimärismusanalysen haben bei Patienten mit akuten Leukämien in nur wenigen Fällen zu einer Reinduktion langanhaltender Remission geführt. Leider ist es nicht für alle Patienten möglich, ein drohendes Rezidiv durch Vollblutanalysen rechtzeitig zu erfassen.

Aus diesem Grund sind in der vorliegenden Studie serielle Chimärismusanalysen von insgesamt 114 Patienten (84 ALL, 30 AML) in den blastenassozierten-Subpopulationen des Knochenmarks (in der ALL die CD3-, CD10-, CD19-, CD34- und in der AML die CD33-, CD34-Zelllinie), im Vollblut und im Gesamtknochenmark durchgeführt worden.

5 der 30 Patienten mit einer AML haben ein Rezidiv erlitten. Bei allen Patienten sind die autologen Anteile in den Subpopulationen stärker als im Knochenmark ausgeprägt gewesen. In CR ist ein MC in der CD34-Fraktion im Vergleich zum KM seltener zu detektieren (3/8 vs. 13/18). Die Assoziation eines Rezidivs scheint mit einem MC in der CD34-Subpopulation am stärksten ausgeprägt zu sein.

Auch bei den 27 der 84 ALL-Patienten, die ein Rezidiv entwickelt haben, kann eine verstärkte Anreicherung leukämischer Zellen in den Subpopulationsanalysen nachgewiesen werden. Bei 14/21 Patienten ist ein MC in der CD34- und bei 15/23 in der CD19-Subpopulation mit einem Rezidiv assoziiert gewesen. In kompletter Remission haben in der CD19-Subpopulation nur 6/49 Patienten einen MC entwickelt, im Vergleich dazu sind es im KM 13/50 gewesen. Der T-Zellchimärismus besitzt für die Rezidivdiagnostik die geringste Aussagekraft. Ein MC ist hierbei unter kompletter Remission keine Seltenheit (15/50) und besitzt ebenso wie der des Vollbluts (25/50) die geringste Prädiktivität hinsichtlich eines Rezidivgeschehens.

Die Blasten lassen sich in den Subpopulationen zwar deutlicher nachweisen, doch kommt es auf Grund der Vorselektion der Zellen zu DNA-Verlusten, die Untersuchungsausfälle verursachen. Daraus ergibt sich, dass die Wahrscheinlichkeit einer langanhaltenden Remission beim Nachweis eines kompletten Chimärismus

im Knochenmark mit 86 % am größten ist und im Vollblut mit 67 % am kleinsten. Die Ergebnisse der Subpopulationsanalysen liegen bei 80 %.

Beim Vergleich der STR-PCR-Ergebnisse mit denen der RT-PCR sind autologe Anteile im Knochenmark und in den Subpopulationen mit dem Überschreiten einer Blastenlast von 5 leukämischen unter 1000 gesunden Zellen (5×10^{-4}) darstellbar; in den Vollblutanalysen liegt die Nachweisgrenze bei 3×10^{-3} . Diese Sensitivitätssteigerung ermöglicht es, Hinweise auf ein drohendes Rezidiv bereits zu einem früheren Zeitpunkt zu erhalten [64]. Autologe Anteile sind im Knochenmark im Median von 67 Tage vor dem Rezidivausbruch detektierbar gewesen, gegenüber einem Vorlauf von 5 Tagen mittels von Vollblutuntersuchungen. In den Subpopulationsanalysen liegt der Median bei 40 Tagen.

In dieser Studie konnte ebenfalls gezeigt werden, dass durch Subpopulationsanalysen eine Sensitivitäts- und Prädiktivitätszunahme erreicht werden kann. Aufgrund der methodisch bedingten Untersuchungsausfälle ist jedoch kein signifikanter Informationsgewinn gegenüber der Aussagekraft von Knochenmarksuntersuchungen zu erzielen. Deutliche Vorteile zeigen sich jedoch gegenüber den Ergebnissen aus den Vollblut. Ob der Zeitgewinn durch die Sensitivitätssteigerung in den Subpopulationsuntersuchungen hinsichtlich einer rechtzeitigen Intervention ausreicht, ist ungewiss. Bei Patienten mit bereits bestehenden gemischten Chimären im Knochenmark bzw. in den Subfraktionen sind in dieser Studie keine langanhaltenden Erfolge durch weiterführenden Immuntherapien erreicht worden. Es ist zu vermuten, dass der MC hier als Spiegel eines bereits fortgeschrittenen Krankheitsgeschehen zu bewerten ist, und folglich die Blastenlast zu hoch ist, um erfolgreich intervenieren zu können. Es stellt sich die Frage, ob der prinzipielle Erfolg von immuntherapeutischen Behandlungskonzepten nicht allein auf dem Unterbinden einer Toleranzentwicklung des Transplantats beruht und dementsprechend autologe Anteile im Knochenmark nur einen negativen Prädiktor für das Therapie-outcome darstellen.

Chimärismusanalysen durch die RT-PCR auf der Basis von SNPs könnten aufgrund ihrer höheren Sensitivität zukünftig für Patienten, bei den ein Direktnachweis der Blasten nicht realisierbar ist, eine Alternative zum Rezidivmonitoring eröffnen. Aufgrund der hohen Varianz der Ergebnisse der RT-PCR bietet jedoch die hier

vorgestellte Methode zum jetzigen Zeitpunkt die bestmögliche Alternative um das Risiko eines Rezidivs abzuschätzen zu können [101].

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

AML	Akute Myeloische Leukämie
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
allo-SZT	allogene Stammzelltransplantation
AK	Antikörper
AR	Autologe Rekonstitution
ATG	Anti-Thymozyten-Globolin
CC	kompletter Chimärismus, vollständige Spender-Hämatopoese
CD	Cluster of Differentiation, Oberflächen-Antigene immunkompatibler Zellen
CML	Chronisch Myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalie Virus
CR 1	erste komplette Remission der Grundkrankheit
CR 2	zweite komplette Remission, nach der Therapie des ersten Rezidives
CSA	Cyclosporin A
DdH ₂ O	destilliertes Wasser
DLI	Donor-Lymphozyten-Infusion
EBMT	European Group for Blood and Marrow Transplantation
G-CSF	Granulozyten-colony-stimulating-factor
GvHD	Graft versus host disease
GvL	Graft versus leukaemia
HLA	Human-leukozyt-antigens
Ig	Immunglobulin
KM	Knochenmark
KMT	Knochenmarkstransplantation
MC	gemischter Chimärismus
deMC	abnehmender Chimärismus
inMC	zunehmender Chimärismus

IIMC	gemischter Chimärismus auf niedrigem Niveau
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MRD	Minimal residual Disease
MHC	Major-histocompatibility-complex
PB	Peripheres Blut, Vollblut
PCR	Polymerase-chain-reaction
Rlps	Rezidiv
RT-PCR	Real-Time PCR
SNP	Single nucleotide polymorphism
STR	Short tandem repeats
SZT	Stammzelltransplantation
TBI	Total body irradiation
TCR	T-Zellrezeptor
TRM	Transplantations assoziierte Mortalität

8.2 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1:</i>	Hämatopoetischer Stammbaum mit Angabe der Cluster of Differentiation (CD)	9
<i>Abbildung 2:</i>	Chimärismusanalysen eines Patienten, bei dem sich der Spender und der Empfänger ein Allel teilen	28
<i>Abbildung 3:</i>	Chimärismusanalysen eines Patienten, bei dem sich der Spender und der Empfänger kein Allel teilen	29
<i>Abbildung 4:</i>	Chimärismusanalysen eines heterozygoten Empfängers und eines homozygoten Spenders, die sich ein Allel teilen	30
<i>Abbildung 5:</i>	Ereignisfreies Überleben für AML und ALL	39
<i>Abbildung 6:</i>	Chimärismusanalysen eines ALL-Patienten in kompletter Remission	40
<i>Abbildung 7:</i>	Chimärismusanalysen eines AML-Patienten in kompletter Remission	41
<i>Abbildung 8:</i>	Chimärismusanalysen eines ALL-Patienten mit immunologischer Intervention.	42
<i>Abbildung 9 +10:</i>	Chimärismusanalysen von ALL- und AML-Patienten mit einem gemischten Chimärismus in den Subpopulationen in der kompletten Remission	43
<i>Abbildung 11:</i>	Chimärismusanalysen eines ALL-Patienten mit der Entwicklung eines fulminanten Rezidivs	44
<i>Abbildung 12:</i>	Chimärismusanalysen eines AML-Patienten mit Rezidiventwicklung und anschließend erneuter SZT	45
<i>Abbildung 13:</i>	Chimärismusanalysen eines AML-Patienten mit Rezidiventwicklung nach einer zweiten SZT	46
<i>Abbildung 14:</i>	Chimärismusanalysen eines ALL-Patienten mit der Entwicklung eines Rezidivs und immunologischer Intervention	47
<i>Abbildung 15:</i>	Krankheitsverläufe von 84 ALL Patienten in Bezug auf die Chimärismusgruppen der Subpopulationen und die des Knochenmarks	48

<i>Abbildung 16:</i>	Krankheitsverläufe von 30 AML-Patienten in Bezug auf den Chimärismusstatus in den Subpopulationen und im Knochenmark	49
<i>Abbildung 17:</i>	Wahrscheinlichkeit des Auftretens gemischter Chimäre in den Subpopulationen in Abhängigkeit vom Zeitintervall bis zum Rezidivausbruch der ALL-Patienten	52
<i>Abbildung 18:</i>	Chimärismusanalysen der Subpopulationen von c-ALL- und pre-B-ALL-Patienten, die ein Rezidiv entwickelt haben in Bezug auf die MRD	54
<i>Abbildung 19:</i>	Klinische Entwicklung aller Patienten in den jeweiligen Chimärismusgruppen	55

8.3 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1:</i>	Primercharakteristika.....	16
<i>Tabelle 2:</i>	Thermocyclerprogramme.....	24
<i>Tabelle 3:</i>	Patientendaten zur allo-SZT bei Patienten mit AML	33
<i>Tabelle 4:</i>	Patientendaten zur allo-SZT bei Patienten mit ALL in kompletter Remission	34
<i>Tabelle 5:</i>	Patientendaten zur allo-SZT bei Patienten mit ALL in kompletter Remission und autologen Anteilen in den Subpopulationen	35
<i>Tabelle 6:</i>	Patientendaten zur allo-SZT bei Patienten mit ALL und wiederkehrender Grunderkrankung.....	36
<i>Tabelle 7 :</i>	Patientendaten zur allo-SZT bei Patienten mit ALL und Transplantationsassoziiierter Mortalität	37
<i>Tabelle 8:</i>	Proben- und Patientenverteilung in der AML und der ALL	38
<i>Tabelle 9+10:</i>	Übersicht über die ALL- und AML-Patienten.....	39
<i>Tabelle 11:</i>	Angabe der Patienten in %, die nach einem bestimmten Zeitintervall in Abhängigkeit vom Chimärismusstatus ein Rezidiv entwickelt haben.....	50
<i>Tabelle 12:</i>	Mediane Tagangabe der ersten Detektion autologer Anteile vor der klinischen Rezidivdiagno	51

8.4 Referenziste

- (1) Mayers Grosses Taschen Lexikon , Band 4, 1995.
- (2) Immunologists' Toolbox In: Janeway JA, Travers P, Walport M, Shlomchik M, editors. Immunobiology 5. 2001.
- (3) Macs Technology: Gold standard in cell separation, Product information Miltenyi Biotec 2002.
- (4) Abraham R, Szer J, Bardy P, Grigg A. Early cyclosporine taper in high-risk sibling allogeneic bone marrow transplants. Bone Marrow Transplant 1997; 20(9):773-777.
- (5) Alizadeh M, Bernard M, Danic B, Dauriac C, Birebent B, Lapart C, Lamy T, Le Prise PY, Beauplet A, Bories D, Semana G, Quelvennec E. Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. Blood 2002; 99(12):4618-4625.
- (6) Antin JH, Childs R, Filipovich AH, Giralt S, Mackinnon S, Spitzer T, Weisdorf D. Establishment of complete and mixed donor chimerism after allogeneic lymphohematopoietic transplantation: recommendations from a workshop at the 2001 Tandem meetings. Biol Blood Marrow Transplant 2001; 7:473-485.
- (7) Applied Biosystems. ABI PRISM 310 C Genetic Analyser. Product information 1999.
- (8) Armitage OJ. Bone marrow transplantation. N Engl J Med 1994; 292:832-895.
- (9) Ault K, Antin JH, Ginsburg D, Orkin S, Rapoport J, Keohan M, Martin P, Smith BR. Phenotype of recovering lymphoid cell populations after marrow transplantation. J Exp Med 1985; 161:1483-1502.
- (10) Bader P. Serielle quantitative Untersuchungen des hämatopoetischen Chimärismus nach allogener Stammzelltransplantation bei Kindern mit akuten Leukämien und Myelodysplastischen Syndromen. 2002.
- (11) Bader P, Hancock ML, Kreyenberg H, Niethammer D, Oakhill A, Steward C, Handretinger R, Beck J, Klingbiel T. Minimal residual disease (MRD) status prior to allogeneic stem cell transplantation is a powerful predictor for post-transplant outcome in children with ALL. Leukemia 2002; 16:1668-1672.
- (12) Bader P, Kreyenberg H. Analysis of chimerism after stem cell transplantation. In: Goulden N, Steward C, editors. Methods in Molecular Medicine, Vol 91: Pediatric Hematology: Methods and Protocols. 1999.

- (13) Bader P, Kreyenberg H, Hoelle W, Dueckers G, Handgretinger R, Lang P, Kremens B, Dilloo D, Sykora KW, Schrappe M, Niemeyer C, Von Stackelberg A, Gruhn B, Henze G, Greil J, Niethammer D, Dietz K, Beck J, Klingbiel T. 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; 22:1696-705.
- (14) Bader P, Kreyenberg H, Hoelle W, Dueckers G, Kremens B, Dilloo D, Sykora KW, Niemeyer C, Reinhardt D, Vormoor J, Gruhn B, Lang P, Greil J, Handgretinger R, Niethammer D, Klingbiel T, Beck J. Increasing mixed chimerism defines a high-risk group of childhood acute myelogenous leukemia patients after allogeneic stem cell transplantation where pre-emptive immunotherapy may be effective. *Bone Marrow Transplant* 2004; 33:815-21.
- (15) Bader P, Beck J, Frey A, Schlegel PG, Hebarth H, Handgretinger R, Einsele H, Niemeyer C, Benda N, Faul C, Kanz L, Niethammer D, Klingbiel T. 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; 21(5):487-495.
- (16) Bader P, Hoelle W, Klingbiel T, Handgretinger R, Niethammer D, Beck J. Quantitative assessment of mixed haematopoietic chimerism by polymerase chain reaction after allogeneic BMT. *Anticancer research* 1996; 16.
- (17) Bader P, Holle W, Klingbiel T, Handgretinger R, Benda N, Schlegel PG, Niethammer D, Beck J. 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; 19(7):697-702.
- (18) Bader P, Klingbiel T, Schaudt A, Theurer-Mainka U, Handgretinger R, Lang P, Niethammer D, Beck JF. 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 centre experience of 12 children. *Leukemia* 1999; 13(12):2079-2086.
- (19) Bader P, Niethammer D, Willasch A, Kreyenberg H, Klingbiel T. How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation? *Bone Marrow Transplant* 2005; 35(2):107-119.
- (20) Bader P, Stoll K, Huber S, Geiselhart A, Handgretinger R, Niemeyer C, Einsele H, Schlegel PG, Niethammer D, Beck J, Klingbiel T. Characterization of lineage-specific chimerism in patients with acute leukaemia and myelodysplastic syndrome after allogeneic stem cell

- transplantation before and after relapse. *Br J Haematol* 2000; 108(4):761-768.
- (21) Barrett AJ, Horowitz MM, Pollock BH, et al. Bone marrow transplants from HLA-identical siblings compared with chemotherapy for children with acute lymphoblastic leukemia in a second remission. *N Engl J Med* 1994; 331(1253):11258.
 - (22) Bearmann SI, Appelbaum F, Buckner CD, Petersen FB, Fischer LD, Clift RA, Thomas ED. Regimen-related toxicity in patients undergoing bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* 1988; 6:1562-8.
 - (23) Bertheas MF, Lafage M, Levy P, Blaise D, Stoppa AM, Viens P, Mannoni P, Maraninchi D. Influence of mixed chimerism on the results of allogeneic bone marrow transplantation for leukemia. *Blood* 1991; 78(11):3103-3106.
 - (24) Bertheas MF, Maraninchi D, Lafage M, Fraisse J, Blaise D, Stoppa AM, Michel G, Brizard CP, Gaspard MH, Novakovitch G. Partial chimerism after T-cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation in leukemic HLA-matched patients: a cytogenetic documentation. *Blood* 1988; 72(1):89-93.
 - (25) Billingham RE, Brent L. Induction of tolerance in new born mice and studies of the phenomenon of runt disease *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1959; 242:189-95.
 - (26) Bortin MM BF, Bekkum BW van, Good RA, Rood JJ. 25th anniversary of the first successful bone marrow transplants. *Bone Marrow Transplant* 1994.
 - (27) Bowden RA, Meyers JD. Infectious complications following bone marrow transplantation. *Plasma Ther Transfus Technol* 1985; 6:285-302.
 - (28) Bunjes D, Theobald T, Nierle B, et al. T-Helferzellen: Ihre Rolle in der Pathogenese von Graft-versus-Host-Erkrankungen und Graft-versus-Leukämie-Effekt. In: Bartsch B, editor. *Knochenmark- und periphere Stammzelltransplantation*. 1996.
 - (29) Cacciola E, Guglielmo P, Cacciola E, Stagno F, Cacciola RR, Impera S. CD34 expression in adult acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 1995; 18 Suppl 1:31-36.
 - (30) Campana D, Pui CH. Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance. *Blood* 1995; 85(6):1416-1434.
 - (31) Campana D, Yokota S, Coustan-Smith E, Hansen-Hagge TE, Janossy G, Bartram CR. The detection of residual acute lymphoblastic leukemia cells with immunologic methods and polymerase chain reaction: a comparative study. *Leukemia* 1990; 4(9):609-614.

- (32) Choi SJ, Lee KH, Lee JH, Kim S, Chung HJ, Lee JS, Kim SH, Park CJ, Chi HS, Kim WK. Prognostic value of hematopoietic chimerism in patients with acute leukemia after allogeneic bone marrow transplantation: a prospective study. *Bone Marrow Transplant* 2000; 26(3):327-332.
- (33) Consolini R, Legitimo A, Rondelli R, Guguelmi C, Barisone E, Lippi A, Cantu-Rajnoldi A, Arico M, Conter V, Cocito MG, Putti MC, Pession A, Maserà G, Biondi A, Basso G. Clinical relevance of CD10 expression in childhood ALL. The Italian Association for Pediatric Hematology and Oncology (AIEOP). *Haematologica* 1998; 83(11):967-973.
- (34) Coustan-Smith E, Behm FG, Sanchez J, Boyett JM, Hancock ML, Raimondi SC, Rubnitz JE, Rivera GK, Sandlund JT, Pui CH, Campana D. Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 1998; 351(9102):550-554.
- (35) Cox CV, Evely RS, Oakhill A, Pamphilon DH, Goulden NJ, Blair A. Characterization of acute lymphoblastic leukemia progenitor cells. *Blood* 2004; 104(9):2919-2925.
- (36) Dini G, Cornish JM, Gardner H, Souillet G, Paolucci P, Vossen JM, Paolucci P, Manfredini L, Miano M, Niethammer D. Bone marrow transplant indications for childhood leukemias: achieving a consensus. *Bone Marrow Transplant* 1996; 18:4-7.
- (37) Dubovsky J, Daxberger H, Fritsch G, Printz D, Peters C, Matthes S, Gardner H, Lion T, Muller-Berat N. Kinetics of chimerism during the early post-transplant period in paediatric patients with malignant and non-malignant hematologic disorders: implications for timely detection of engraftment, graft failure and rejection. *Leukemia* 1999; 13(12):2059, 2060-2059, 2069.
- (38) Elmaagacli AH, Beelen DW, Becks HW, Mobascher A, Stockova J, Trzensky S, Opalka B, Schaefer UW. Molecular studies of chimerism and minimal residual disease after allogeneic peripheral blood progenitor cell or bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1996; 18(2):397-403.
- (39) Elmaagacli A, Beelen DW, Kroll M, Trzensky S, Stein C, Schaefer UW. Detection of CBFbeta/MYH11 fusion transcripts in patients with inv(16) acute myeloid leukemia after allogeneic bone marrow or peripheral blood progenitor cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1998; 21:159-166.
- (40) Farahat N, Lens D, Zomas A, Morilla R, Matutes E, Catovsky D. Quantitative flow cytometry can distinguish between normal and leukaemic B-cell precursors. *Br J Haematol* 1995; 91(3):640-646.
- (41) Ford CE. Cytological identification of radiation chimeras. *Nature* 1965; 177.

- (42) Gardiner N, Lawler M, O'Riordan JM, Duggan C, De Arce M, McCann SR. Monitoring of lineage-specific chimaerism allows early prediction of response following donor lymphocyte infusions for relapsed chronic myeloid leukaemia. *Bone Marrow Transplant* 1998; 21(7):711-719.
- (43) Gardiner N, McCann SR, O'Riordan J, Lawler M. Chimerism following donor lymphocyte infusion for chronic myeloid leukemia. *Blood* 1999; 93(8):2748-2749.
- (44) Gorczynska E, Turkiewicz D, Toporski J, Kalwak K, Rybka B, Ryczan R, Sajewicz L, Chybicka A. Prompt initiation of immunotherapy in children with an increasing number of autologous cells after allogeneic HCT can induce donor-type chimerism: a report of 14 children. *Bone Marrow Transplant* 2004; 33:211-217.
- (45) Gratwohl A. Entwicklung der hämatopoetischen Vorläuferzell-Transplantation. In: Bartsch HH, Mertelsmann R, editors. *Knochenmark und periphere Stammzelltransplantation*. Freiburg: 1996.
- (46) Hancock JP, Burgess MF, Goulden NJ, Steward CG, Knechtli CJ, Pamphilon DH, Potter MN, Oakhill A. Same-day determination of chimaeric status in the immediate period following allogeneic bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 1997; 99(2):403-409.
- (47) Hebart H, Einsele H. Infektiöse Komplikationen nach autologer und allogener Stammzelltransplantation. In: Bartsch HH MR, editor. *Knochenmark- und periphere Stammzelltransplantation*. Freiburg: 1996: 16-24.
- (48) Hoelzer D, Gokbuget N, Ottmann O, Pui CH, Relling MV, Appelbaum FR, van Dongen JJ, Szczepanski T. Acute lymphoblastic leukemia. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2002; 162-92:-92.
- (49) Jacobsen LO. Effekt of spleen protection on mortality following x-irradiation. *J lab clin med* 1949.
- (50) Keil F, Haas O, Fritsch G, Kalhs G, Lechner K, Mannhalter C, Reiter E, Niederwieser D, Hoecker P, Greinix HT. Donor lymphozyt infusions for leukemic relapse after allogenic marrow transpantation: lack of residual donor hematopoiesis predicts aplasia. *Blood* 1997; 89:3113-3117.
- (51) Kern W, Danhauser-Riedl S, Ratei R, Schnittinger S, Schoch G, Kolb HJ, Ludwig WD, Hiddemann W, Haferlach T. Detection of minimal residual disease in unselected patients with akute myeloid leukemia using multiparameter flowcytometry to define leukemia-associated immunophenotypes and determine their frequencies in normal bone marrow. *Haematologica* 2003; 88:646-653.

- (52) Khan F, Agarwal A, Agarwal s. Significance of chimerism in hematopetic stem cell transplantation: new variations on an old theme. *Bone Marrow Transplant* 2004; 34:1-12.
- (53) Kolb HJ, Guenther W, et al. Tolerance and chimerism. *Transplantation* 2003; 75(Supplement):26-31.
- (54) Kolb HJ, Mittermuller J, Clemm C, Holler E, Ledderose G, Brehm G, Heim M, Wilmanns W. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood* 1990; 76(12):2462-2465.
- (55) Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM, Hertenstein B, Jacobsen N, Arcese W, Ljungman P, Ferrant A, Verdonck L, Niederwieser D. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party Chronic Leukemia. *Blood* 1995; 86(5):2041-2050.
- (56) Kolb HJ, Schmid C, Barrett AJ, Schendel DJ. Graft-versus-leukemia reactions in allogeneic chimeras. *Blood* 2004; 103(3):767-776.
- (57) Koldehoff M, Steckel NK, Hlinka M, Beelen DW, Elmaagacli AH. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by real-time polymerase chain reaction with single nucleotide polymorphisms, standard tandem repeats, and Y-chromosome-specific sequences. *Am J Hematol* 2006.
- (58) Kreyenberg H, Hölle W, Möhrle 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* 2002; 16.
- (59) Lange W. Autologe hämatologische Stammzelltransplantation. In: Bartsch HH, Mertelsmann R, editors. *Knochenmark- und Stammzelltransplantation*. Freiburg: 1996: 8-15.
- (60) Lawler M, Humphries P, McCann SR. Evaluation of mixed chimerism by in vitro amplification of dinucleotide repeat sequences using the polymerase chain reaction. *Blood* 1991; 77:2504-15.
- (61) Leclair B, Fregeau CJ, Aye MT, Fourney RM. DNA typing for bone marrow engraftment follow-up after allogeneic transplant: a comparative study of current technologies. *Bone Marrow Transplant* 1995; 16:43-55.
- (62) Lion T. Chimerism testing after allogeneic stem cell transplantation: importance of timing and optimal technique for testing in different clinical-biological situations. *Leukemia* 2001; 15(2):292.
- (63) Lion T. Summary: reports on quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by PCR amplification of microsatellite

markers and capillary electrophoresis with fluorescence detection. *Leukemia* 2003; 17(1):252-254.

- (64) Lion T, Daxberger H, Dubovsky J, Filipcik P, Fritsch G, Printz D, Peters C, Matthes-Martin S, Lawitschka A, Gadner H. 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):307-310.
- (65) Lorenz E. Modification of irradiation in mice and guinea pigs by bone marrow injection. *J natl Cancer Inst* 1951; 12.
- (66) Maas J. Quantification of donor and recipient haematopoietic cells by real time PCR of single nucleotid polymorphisms. *Leukemia* 2003; 17.
- (67) MAC'S. Direct CD34 Progenitor Cell Isolation Kit. MACS USER MANUAL 2002.
- (68) Mackinnon S, Barnett L, Bourhis JH, Black P, Heller G, O'Reilly RJ. Myeloid and lymphoid chimerism after T-cell-depleted bone marrow transplantation: evaluation of conditioning regimens using the polymerase chain reaction to amplify human minisatellite regions of genomic DNA. *Blood* 1992; 80(12):3235-3241.
- (69) Mackinnon S, Barnett L, Heller G, O'Reilly RJ. Minimal residual disease is more common in patients who have mixed T-cell chimerism after bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1994; 83(11):3409-3416.
- (70) Martin P, Hansen JA, Buckner CD, Sanders J, Deeg HJ, Stewart P, Appelbaum FR, Clift RA, Fefer A, Witherspoon RP, et al. Effects of in vitro depletion of T cells in HLA-identical allogeneic marrow grafts. *Blood* 1985; 66:664-672.
- (71) Mathé G, Amiel JL, Schwarzenberg L, et al. Adoptive immunotherapy of acute leukemia: Experimental and clinical results. *Cancer Res* 1965; 25:1525-1531.
- (72) Mattsson J, Uzunel M, Remberger M, Ringden O. T-cell mixed chimerism is significantly correlated to a decreased risk of acute graft-versus-host-disease after allogeneic stem cell transplantation. *Transplantation* 2001; 71:433-439.
- (73) Mattsson J, Uzunel M, Tammik L, Aschan J, Ringden O. Leukemia lineage-specific chimerism analysis is a sensitive predictor of relapse in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia* 2001; 15(12):1976-1985.

- (74) Mehta J. The first clinical use of donor leukocyte infusions for the treatment of leukemia relapsing after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1996; 87(9):4010.
- (75) Moppett J, Burke GAA, Steward C, Oakhill A, Goulden J. The clinical relevance of detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *J Clin Oncol* 2003; 56:295-253.
- (76) Neale GAM, Coustan-Smith E, Stow P, Pan Q, Chen X, Pui CH, Campana D. Comparative analysis of flow cytometry and polymerase chain reaction for the detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2004; 18:934-938.
- (77) Niethammer D, Klingbiel T, Ebell W, Henze G Paolucci P, Riehm H. Which children do benefit from bone marrow transplant? The EBMT paed disease working party. *Bone Marrow Transplant* 1996; 18:43-46.
- (78) Petz LD, Yam P, Wallace RB, Stock AD, de Lange G, Knowlton RG, Brown VA, Donis-Keller H, Hill LR, Forman SJ, . Mixed hematopoietic chimerism following bone marrow transplantation for hematologic malignancies. *Blood* 1987; 70(5):1331-1337.
- (79) Philip PA and Poppack DG. *Principals and practise of pedeatric onkology*. JB Lippincott Company, Philadelphia 1993.
- (80) Porter DL, Roth MS, Lee SJ, McGarigle C, Ferrara JL, Antin JH. Adoptive immunotherapy with donor mononuclear cell infusions to treat relapse of acute leukemia or myelodysplasia after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1996; 18(5):975-980.
- (81) Pui CH, Hancock ML, Head DR, Rivera GK, Look AT, Sandlund JT, Behm FG. Clinical significance of CD34 expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1993; 82(3):889-894.
- (82) Raanani P, Ben-Bassat I. Detection of minimal residual disease in acute myelogenous leukemia. *Acta Hematology* 2004; 112:40-54.
- (83) Ramirez M, Diaz MA, Garcia-Sanchez F, Velasco M, Casado F, Villa M, Vicario JL, Madero L. Chimerism after allogeneic hematopoietic cell transplantation in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant* 1996; 18(6):1161-1165.
- (84) Reisner Y, Kapoor N, et al. Transplantation for acute leukemia with HLA-A and B nonidentical prental marrow cells fracionated with soybean agglutinin and sheep red blood cells. *Lancet* 1981; 2:327-331.
- (85) Rhee F, Lin F, Cullis J, Spencer A, Cross N, Chase A, Garicochea B, Bungey J, Barrett J, Goldman JM. Relapse of chronic myeloid leukemia after allogeneic bone marrow transplant: The case of giving donor leukocyt

- transfusion before the onset of hematological relapse. *Blood* 1994; 83:3377-3383.
- (86) 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; 329(18):1289-1295.
- (87) Roux E, Abdi K, Speiser D, Helg C, Chapuis B, Jeannet M, Roosnek E. 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; 81(1):243-248.
- (88) San Miguel JF, Martinez A, Macedo A, et al. Early immunophenotypical evaluation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia identifies different patient risk groups and may contribute to post induction treatment stratification. *Blood* 2001; 98:1746-51.
- (89) Schaap N, Schattenberg A, Bar B., Mensink E, de Man A, Geurts van Kessel A, de Witte T. Red blood cell phenotyping is a sensitive technique for monitoring chronic myeloid leukemia patients after t-cell-depleted bone marrow transplantation and after lymphocyt infusion. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2000; 108:116-125.
- (90) Schaap N, Schattenberg A, Mensink E, Preijers F, Hillegers M, Knops R, Pennings A, Boezeman J, Geurts vK, de Pauw B, de Witte T. Long-term follow-up of persisting mixed chimerism after partially T cell-depleted allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia* 2002; 16(1):13-21.
- (91) Schaefer UW, Beelen DW. Knochenmarkstransplantation. 1998.
- (92) Schattenberg A, de Witte T, Salden M, Vet J, Van Dijk B, Smeets D, Hoogenhout J, Haanen C. Mixed hematopoietic chimerism after allogeneic transplantation with lymphocyte-depleted bone marrow is not associated with a higher incidence of relapse. *Blood* 1989; 73(5):1367-1372.
- (93) Schraml E, Daxberger H, Watzinger F, Lion T. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by PCR amplification of microsatellite markers and capillary electrophoresis with fluorescence detection: the Vienna experience. *Leukemia* 2003; 17(1):224-227.
- (94) Schraml E, Lion T. Interference of dye-associated fluorescence signals with quantitative analysis of chimerism by capillary electrophoresis. *Leukemia* 2003; 17(1):221-223.
- (95) Slavin S, Naparstek E, Nagler A, Ackerstein A, Kapelushnik J, Or R. Allogeneic cell therapy for relapsed leukemia after bone marrow transplantation with donor peripheral blood lymphocytes. *Exp Hematol* 1995; 23(14):1553-1562.

- (96) Sprent J, Korngold R. T-cell-subsets controlling graft-versus-host disease in mice. *Transplant Proc* 1987; 19:41-47.
- (97) 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; 7(5):679-687.
- (98) Szydlo R, Goldman JM, Klein JP, Gale RP, Ash RC, Bach FH, Bradley BA, Casper JT, Flomenberg N, Gajewski JL, Gluckman E, Hanslee-Downey PJ, Hows JM, Jacobsen N, Kolb HJ, Lowenberg B, Masaoka T, Rowlings PA, Sondel PM, van Bekkum DW, Van Rood JJ, Vowels MR, Zhang MJ, Horowitz MM. Results of allogeneic bone marrow transplantation for leukaemia using donors other than HLA-identical siblings. *J Clin Oncol* 1997; 15.
- (99) Thiede C, Bornhauser M, Ehninger G. Evaluation of STR informativity for chimerism testing -- comparative analyses of 27 STR systems in 203 matched related donor recipient pairs. *Leukemia* 2004; 18.
- (100) Thiede C, Bornhauser M, Ehninger G. Strategies and clinical implications of chimerism diagnostics after allogeneic stem cell transplantation. *Acta Hematologica* 2004; 112:16-23.
- (101) Thiede C, Bornhauser M, Oelschlagel U, Brendel C, Leo R, Daxberger H, Mohr B, Florek M, Kroschinsky F, Geissler G, Naumann R, Ritter M, Prange-Krex G, Lion T, Neubauer A, Ehninger G. Sequential monitoring of chimerism and detection of minimal residual disease after allogeneic blood stem cell transplantation (BSCT) using multiplex PCR amplification of short tandem repeat-markers. *Leukemia* 2001; 15(2):293-302.
- (102) Thiede C, Lutterbeck K, Oelschlagel U, Kiehl M, Steudel C, Platzbecker U, Brendel C, Fauser AA, Neubauer A, Ehninger G, Bornhauser M. Detection of relapse by sequential monitoring of chimerism in circulating CD34+ cells. *Ann Hematol* 2002; 81 Suppl 2:S27-S28.
- (103) Thomas ED, Storb R, Clift RA, Fefer A, Johnson L, Neiman PE, Lerner KG, Glucksberg H, Buckner CD. Bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1975; 292:832-895.
- (104) Thomas X, Archimbaud E, Charrin C, Magaud JP, Fiere D. CD34 expression is associated with major adverse prognostic factors in adult acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1995; 9(2):249-253.
- (105) Truitt R, Atasoylu AA. Impact of pretransplant conditioning and donor T-cells on chimerism, graft-versus-host disease, graft-versus-leukemia reactivity and tolerance after bone marrow transplantation. *Blood* 1991; 77:2515-2523.

- (106) van der Velden V, Jacobs DC, Wijkhuijs AJ, Comans-Bitter WM, Willemse MJ, Hahlen K, Kamps WA, van Wering ER, van Dongen JJ. Minimal residual disease levels in bone marrow and peripheral blood are comparable in children with T-cell acutelymphoblastic leukemia (ALL), but not in precursor-B-ALL. *Leukemia* 2002; 16(8):1432-1436.
- (107) van Leeuwen JE, van Tol MJ, Joosten AM, Wijnen JT, Khan PM, Vossen JM. Mixed T-lymphoid chimerism after allogeneic bone marrow transplantation for hematologic malignancies of children is not correlated with relapse. *Blood* 1993; 82(6):1921-1928.
- (108) van Leeuwen JE, van Tol MJ, Joosten AM, Wijnen JT, Verweij PJ, Khan PM, Vossen JM. Persistence of host-type hematopoiesis after allogeneic bone marrow transplantation for leukemia is significantly related to the recipient's age and/or the conditioning regimen, but it is not associated with an increased risk of relapse. *Blood* 1994; 83(10):3059-3067.
- (109) Verdonck LF, Petersen EJ, Lokhorst HM, Nieuwenhuis HK, Dekker AW, Tilanus MG, de Weger RA. Donor leukocyte infusions for recurrent hematologic malignancies after allogeneic bone marrow transplantation: impact of infused and residual donor T cells. *Bone Marrow Transplant* 1998; 22(11):1057-1063.
- (110) Weiden PL, Flournoy N, Thomas ED, Prentice R, Fefer A, Buckner CD, Storb R. Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic marrow grafts. *N Engl J Med* 1979; 300:1068-73.
- (111) Wessmann M, Ruutu T, Volin L, Knuutila S. In situ hybridization using a Y-specific probe - a sensitive method for distinguishing residual male recipient cells from female donor cells in bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1989; 4:283-286.
- (112) Zeiser R, Spyridonidis A, Wasch R, Ihorst G, Grulich C, Bertz H, Finke J. Evaluation of immunomodulatory treatment based on conventional and lineage-specific chimerism analysis in patients with myeloid malignancies after myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Leukemia* 2005; 19(5):814-821.
- (113) Zetterquist H, Mattsson J, Uzunel M, Nasman-Bjork I, Svenberg P, Tammik L, Bayat G, Winiarski J, Ringden O. Mixed chimerism in the B cell lineage is a rapid and sensitive indicator of minimal residual disease in bone marrow transplant recipients with pre-B cell acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant* 2000; 25(8):843-851.

Danksagung

Meinen herzlichen Dank möchte ich aussprechen, bei

Herrn Prof. Dr. med. Peter Bader, meinem Doktorvater, für die Überlassung des Dissertationsthemas, seine Hilfestellungen und seine Bemühungen bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Klaus Dietz, für die Geduld und die Hilfe bei der Auswertung meiner Daten

Dr. Gregor Dückers, meinem Betreuer, für die Einarbeitung und Hilfestellungen

Dem Team des Chimärismuslabors, für die Unterstützung und die herzliche Atmosphäre am Arbeitsplatz

Meiner Familie. Meinem Vater Helge, dem ich diese Arbeit widme, für Deine wertvolle Hilfe, Deine Geduld, Deinen wohlthuenden Rückhalt und Deine Unterstützung in allen Lebenslagen; meiner Schwester Esther, dafür, dass Du immer da bist und Tante Rita, für die aufmunternden Worte.

Meinen Freunden; Birgit Zimmermann und Birte Huber,... Ihr seid Balsam für die Seele... Danke für alles...;Jutta Wolff, Julia Mattar, der Hechinger Str. 46 insbesondere Hermann Geisler, Holger Putzhammer, Carolin Pfrommer und Bettina Welte für Eure offenen Ohren, und Euren Rückhalt; Fabian Reidinger, für die Unterstützung auf der Zielgeraden.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Jette Schenk
Adresse	Riemannstraße 36 04107 Leipzig
Geburtstag	28.03.1978
Geburtsort	Göttingen

Schulische Ausbildung

1984 – 1988	Grundschule Waake
1988 – 1998	Georg-Christoph-Lichtenberg-Gesamtschule

Berufliche Ausbildung

1998 – 2001	Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock
9 / 2001	Ärztliche Vorprüfung
2001 – 2006	Eberhard-Karls-Universität Tübingen
3 / 2002	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung an der Universität Tübingen
3 / 2005	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung an der Universität Tübingen
4 / 2005 – 4 / 2006	Praktisches Jahr am Steinbergklinikum Reutlingen
10. Mai 2006	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung an der Universität Tübingen
seit Januar 2007	Assistenzärztin der Anästhesie, Universitäts-Klinikum Leipzig