

Diplomarbeit

CHIMÄRISMUSANALYSE MITTELS SNP-TECHNOLOGIE BEI KINDERN NACH HÄMATOPOETISCHER STAMMZELLTRANSPLANTATION

eingereicht von

Michael Schinagl

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Klinischen Abteilung für

Pädiatrische Hämato-Onkologie

Unter der Anleitung von

Univ.-Prof. Dr. Christian Urban

Univ.-Prof Dr. Wolfgang Schwinger

Noosa, Australien am 27.01.2015

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Noosa, Australien am 27.01.2015

Michael Schinagl eh.

Danksagung

An erster Stelle danke ich Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Schwinger für seine tatkräftige Unterstützung, große Geduld und engagierte Betreuung über geographische Grenzen hinweg.

Ich möchte Univ.-Prof. Dr. Christian Urban für seine Unterstützung und die Einführung in die faszinierende Welt der Stammzelltransplantation danken.

Danken möchte ich auch Andrea Raicht für ihre großzügige Hilfe bei der Sammlung, Auswertung und grafischen Darstellung der Daten.

Mein größter Dank gilt meinen einzigartigen Eltern. Sie haben mir das Studium ermöglicht und waren mir im Laufe meines Lebens stets ein Vorbild und eine wichtige Stütze.

Zuletzt möchte ich mich von Herzen bei meinen Geschwistern und Freunden bedanken, die immer für mich da waren, wenn ich sie am meisten brauchte.

Zusammenfassung

Hintergrund: Der zunehmende Einsatz von non-myeloablativen Konditionierungsregimen und modernen Techniken zur Graftmanipulation führen zu steigenden Inzidenzen von gemischtem Chimärismus (MC) nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT). Engmaschige Überwachung des Engraftments und der Dynamik von Spender- und Empfängerzellen im Blut ist ein wertvolles Werkzeug zur Beurteilung eines Therapieerfolges und für die Vorhersage negativer Ereignisse wie Transplantatversagen, Transplantatabstoßung, GvHD und Rezidiv. Frühe Identifizierung von Risikopatienten ermöglicht eine rasche Intervention durch Anpassung der immunsuppressiven Therapie und Verabreichung von Spender-Lymphozyten-Infusionen (DLIs). Die SNP-Analyse (*single nucleotide polymorphisms*) ermöglicht eine zuverlässige Unterscheidung von Spender- und Empfängerzellen und kann für die Überwachung des hämatopoetischen Chimärismus nach HSCT genutzt werden.

Patienten und Methoden: 45 Patienten mit den Grunderkrankungen ALL (n=9), SAA (n=8), solide Tumoren (n=8), AML (n=7), MDS (n=2), JMML (n=1), Morbus Hodgkin (n=1), refraktäre Zytopenie (n=1), EBV-AHS (n=1), Evans Syndrom (n=1), angeborene Stoffwechselstörungen (n=2), SCID (n=2), X-LPS (n=1) und ALPS (n=1) wurden zwischen 2004 und 2013 transplantiert. Die Überwachung des Chimärismus erfolgte mittels real time SNP-PCR unter Verwendung von 31 verschiedenen SNPs. Bei 13 Patienten wurden zusätzlich Leukozyten-Subpopulationen analysiert.

Resultate: Die Chimärismusverläufe wurden in Bezug auf Stammzellquelle, Konditionierungsregimen, HLA-Übereinstimmung, Grunderkrankung und Graftmanipulation verglichen. Signifikante Unterschiede wurden zu einzelnen Zeitpunkten beobachtet. Der Vergleich von myeloablativer Konditionierung (MAC) und intensitätsreduzierter Konditionierung (RIC) ergab keinen signifikanten Unterschied über einen längeren Zeitraum.

Schlussfolgerung: Real time SNP-PCR ist eine schnelle, genaue und sehr sensitive Methode für die Überwachung des hämatopoetischen Chimärismus nach HSCT und ermöglicht die frühzeitige Identifizierung von Risikopatienten. RIC kann zu einer schnellen Entwicklung eines vollständigen Spenderchimärismus (CC) führen. Chimärismusanalyse von Subpopulationen ermöglicht eine frühe Intervention bei Risikopatienten durch Anpassung der immunsuppressiven Therapie und Verabreichung von DLIs.

Abstract

Background: The frequent use of nonmyeloablative conditioning regimens and modern techniques for graft-manipulation in haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) have led to an increasing incidence of mixed chimerism (MC). Monitoring of engraftment and surveillance of the relative proportion of donor and recipient cells has become valuable for the prediction of negative events like graft rejection, graft failure, graft-versus-host-disease (GvHD) and recurrence of the underlying malignant or nonmalignant disease. Early detection of patients at risk allows for early intervention, such as pre-emptive immunotherapy and administration of donor lymphocyte infusions (DLI). Single nucleotide polymorphism (SNP) is a sensitive method for discrimination of donor and recipient cells and can be used for monitoring of haematopoietic chimerism.

Patients and Methods: 45 Patients were transplanted between 2004 and 2013 with the diagnosis ALL (n=9), SAA (n=8), solid tumors (n=8), AML (n=7), MDS (n=2), JMML (n=1), Hodgkin's disease (n=1), refractory cytopenia (n=1), EBV-AHS (n=1), Evans syndrome (n=1), inborn errors of metabolism (n=2), SCID (n=2), X-LPS (n=1) and ALPS (n=1). In all Patients chimerism was monitored by real time SNP-PCR using a set of 31 different SNPs. 13 patients required lineage-specific chimerism analysis.

Results: The different transplantation techniques were compared with regard to resource, conditioning regimen, match or mismatch, underlying disease and graft manipulation. Differences in chimerism were shown at individual timepoints. There were no substantial differences over long periods of time between myeloablative and reduced intensity conditioning (RIC) regimens.

Conclusions: Real time SNP-PCR is a fast, accurate and highly sensitive method for chimerism monitoring. SNP-PCR is an important tool for the identification of patients at risk for negative events. RIC can lead to rapid development of CC. Lineage-specific monitoring of changes in chimerism allows for early identification of patients at risk and intervention through adjustment of immunotherapy and administration of DLIs.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	iv
Zusammenfassung	v
Abstract	vi
Inhaltsverzeichnis	1
Glossar und Abkürzungen	3
Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	6
1 Einleitung	7
1.1 Das hämatopoetische System	7
1.2 Die hämatopoetische Stammzelle (HSC).....	7
1.3 Das Immunsystem	10
1.3.1 Zellen des Immunsystems	10
1.4 Transplantationsbarrieren	13
1.4.1 Der T-Zell-Rezeptor (TZR)	13
1.4.2 Der MHC-Komplex	15
1.5 Die Geschichte der Stammzelltransplantation	19
1.6 Die Suche nach einem geeigneten Spender.....	21
1.7 Quellen und Gewinnung von Stammzellen	23
1.8 Konditionierung	24
1.8.1 Myeloablative Konditionierung (MAC)	24
1.8.2 Reduced Intensity Konditionierung (RIC)	25
1.8.3 Non-Myeloablative Konditionierung (NMA).....	25
1.9 Der Graft versus Tumor Effekt	26
1.10 T-Zell Depletion und Immunsuppression	27
1.11 Donor Lymphocyte Infusion (DLI)	28
1.12 HSCT in der Pädiatrie	29
1.13 Chimärismusanalyse.....	30
1.13.1 STR-PCR.....	33
1.13.2 SNP-PCR	33
2 Patienten, Material und Methoden	35
2.1 Patientenkollektiv	35

2.2	SNP-Chimärismusanalyse	39
2.2.1	Unterscheidung von Empfänger- und Spender-DNA.....	39
2.2.2	SNP Chimärismusanalyse aus WBC.....	40
2.2.3	SNP Chimärismusanalyse aus Subpopulationen	43
2.2.4	Messpunkte für die Chimärismusanalyse	46
2.2.5	Einteilung des Chimerismus	46
2.3	Statistik	47
3	Ergebnisse	48
3.1	Chimärismusanalyse aus WBC	48
3.1.1	Mismatch vs. Match.....	50
3.1.2	PBSC vs. KM.....	53
3.1.3	MAC vs. RIC.....	56
3.1.4	Maligne vs. Non-maligne	59
3.1.5	Unmanipuliert vs. CD3/19 Depletion vs. α/β Depletion.....	63
3.1.6	Vergleich nach Grunderkrankung	66
3.2	Chimärismusanalyse aus Subpopulationen.....	69
3.3	Kasuistik 1 - SAA.....	70
3.4	Kasuistik 2 - AML.....	72
4	Diskussion.....	76
5	Literaturverzeichnis	80

Glossar und Abkürzungen

ALL	akute lymphatische Leukämie
ALPS	autoimmunes lymphoproliferatives Syndrom
AML	akute myeloische Leukämie
APC	antigenpräsentierende Zellen
ATG	Antithymozytenglobulin
CC	<i>complete chimerism</i> (vollständiger Chimärismus)
DLA	<i>dog leukocyte antigen</i>
DLI	<i>donor lymphocyte infusion</i> (Spender-Lymphozyten-Infusion)
dMC	decreasing mixed chimerism (sinkender gemischter Chimärismus)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV-AHS	Epstein-Barr-Virus-assoziiertes Hämophagozytose-Syndrom
FISH	Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung
GvH	Graft gegen Wirt
GvT	Graft gegen Tumor
Gy	Gray
HLA	humanes Leukozyten-Antigen
HSC	hämatopoetische Stammzelle
HSCT	hämatopoetische Stammzelltransplantation
iMC	<i>increasing mixed chimerism</i> (steigender gemischter Chimärismus)
JMML	juvenile myelomonozytäre Leukämie
KG	Körpergewicht
KIR	<i>killer-cell immunoglobulin-like receptor</i> (Killerzell-Immunglobulin-ähnlicher-Rezeptor)
KM	Knochenmark
MAC	myelotive Konditionierung
MACS	<i>magnetic-activated cell sorting</i> (magnetische Zellsortierung)
MC	<i>mixed chimerism</i> (gemischter Chimärismus)
MDS	myelodysplastisches Syndrom
MHC	Haupthistokompatibilitäts-Komplex
MMF	Mycophenolat-Mofetil
NOD	<i>non obese diabetic</i>

NK-Zelle	natürliche Killerzelle
NMA	non-myelotiv Konditionierung
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PBSC	<i>peripheral blood stem cells</i> (periphere Blutstammzellen)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
RIC	<i>reduced intensity conditioning</i> (Konditionierung reduzierter Intensität)
SAA	Schwere aplastische Anämie
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i> (schwerer kombinierter Immundefekt)
SD	<i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
STR	<i>short tandem repeat</i>
tMC	<i>transient mixed chimerism</i> (vorübergehend gemischter Chimärismus)
TZR	T-Zell Rezeptor
VNTR	<i>variable number tandem repeat</i>
vs.	<i>versus</i> (gegen)
WBC	<i>white blood cells</i> (weiße Blutzellen)
XLPS	<i>x-linked lymphoproliferative syndrome</i> (x-chromosomale lymphoproliferative Erkrankung)

Für Abkürzungen englischer Begriffe (durch kursive Schrift gekennzeichnet), für die dies angemessen erschien, wurden deutsche Bezeichnungen verwendet.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 - Die Hämatopoese.....	9
Abbildung 2 - Der TZR.....	14
Abbildung 3 - Aufbau des MHC1 und MHC2	16
Abbildung 4 - Grafische Darstellung der Grunderkrankungen	36
Abbildung 5 - Verlauf der WBC Chimärismus-Mittelwerte und deren SD	49
Abbildung 6 - Verlauf der Mediane der WBC Chimärismuswerte	50
Abbildung 7 - Gegenüberstellung der Mediane von Matched und Mismatched	51
Abbildung 8 - Match vs. Mismatch.....	53
Abbildung 9 - KM vs. PBCS.....	54
Abbildung 10 - KM vs. PBCS am Tag 14.....	56
Abbildung 11 - MAC vs. RIC.....	57
Abbildung 12 - MAC vs. RIV am Tag 28.....	59
Abbildung 13 - Maligne vs. Non-maligne	60
Abbildung 14 - Maligne vs. Non-maligne am Tag 21, 60, 120, 330, 360, 540, 720 ..	62
Abbildung 15 - Vergleich nach Art der Graftmanipulation.....	63
Abbildung 16 - Gegenüberstellung nach Graftmanipulation am Tag 14	66
Abbildung 17 - Verlauf der Mediane nach Grunderkrankung.....	67
Abbildung 18 - Gegenüberstellung nach Grunderkrankung am Tag 14.....	69
Abbildung 19 - Chimärismusanalyse der Subpopulationen bei SAA	72
Abbildung 20 - Chimärismusanalyse der Subpopulationen bei AML	75

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 - Patientenkollektiv	38
Tabelle 2 - Auflistung der verwendeten Oligonukleotide für die SNP Analyse	42
Tabelle 3 - TaqMan Probes	43
Tabelle 4 - Chimärismusanalyse des Patientenkollektivs aus WBC	49
Tabelle 5 - Gegenüberstellung von Matched und Mismatched	52
Tabelle 6 - Gegenüberstellung von KM und PBSC	55
Tabelle 7 - Gegenüberstellung von MAC und RIC	58
Tabelle 8 - Gegenüberstellung Maligne und Benigne	61
Tabelle 9 - Gegenüberstellung nach Graft Manipulation	65
Tabelle 10 - Gegenüberstellung nach Grunderkrankung	68

1 Einleitung

1.1 Das hämatopoetische System

Die Aufgabe des hämatopoetischen Systems ist die Bildung von Blutzellen. Im Gegensatz zu anderen Systemen des menschlichen Körpers ist die Hämatopoese dadurch gekennzeichnet, dass sie im Laufe der Entwicklung des Menschen in verschiedenen Organen erfolgt. Während des ersten Fetalmonats findet sie im Dottersack statt, danach wechselt der Produktionsort in die Leber und Milz, wo im fünften Fetalmonat das Produktionsmaximum erreicht wird. Ab dem vierten bzw. fünften Fetalmonat wird die Herstellung schlussendlich ins Knochenmark verlagert. Dieses bildet bis ins Erwachsenenalter den Sitz der Hämatopoese. (1)

Knochenmark ist die Füllsubstanz der Hohlräume in unseren Knochen und besteht vorwiegend aus retikulärem Bindegewebe. Ein 60kg schwerer Mensch besitzt ca. 2,7kg Knochenmark. (2) Man kann anhand der Farbe zwei Arten von Knochenmark unterscheiden. Das gelbe Knochenmark ist durch einen hohen Gehalt an Fettzellen charakterisiert und spielt in der Hämatopoese keine Rolle. Das rote Knochenmark dagegen, die Farbe lässt sich auf dessen hohen Gehalt an roten Blutkörperchen zurückführen, weist eine hohe hämatopoetische Aktivität vor. Hier finden wir die Erythropoese zur Herstellung von Erythrozyten, die Leukopoese zur Herstellung von Leukozyten und die Thrombopoese zur Bildung von Thrombozyten. Beim Kind füllt das aktive rote Mark alle Knochen des Körpers aus. Beim gesunden Erwachsenen dagegen ist es auf Wirbelkörper, Brustbein, Rippen, Schulterblätter, Beckenkamm, Schädelknochen und die proximalen Enden der langen Röhrenknochen beschränkt. Im übrigen Skelett des Erwachsenen findet man lediglich gelbes Mark. (3)

1.2 Die hämatopoetische Stammzelle (HSC)

Grob lassen sich zwei Arten von Stammzellen voneinander unterscheiden: die

embryonalen und die adulten Stammzellen. Die embryonale Stammzelle ist pluripotent und kann sich uneingeschränkt in alle Zellen der drei embryonalen Keimblätter (Entoderm, Mesoderm, Ektoderm) differenzieren. Die adulte Stammzelle ist höchstens multipotent und in ihrer Differenzierung auf gewisse Zellarten eines Keimblattes beschränkt. Beispielsweise entstehen aus den multipotenten hämatopoetischen Stammzellen lediglich die verschiedenen Zellen des Blutes und Immunsystems. (3)

Stammzellen sind durch einen langsamen Zellzyklus gekennzeichnet, unter dem Mikroskop nur schwer von Lymphozyten zu unterscheiden. Stammzellen sind fähig zur Selbsterneuerung. Wenn sich eine adulte Stammzelle teilt, verläuft die Mitose entweder symmetrisch in zwei identische Tochterzellen mit den Merkmalen der Mutterzelle, oder asymmetrisch. Eine asymmetrische Teilung hat zur Folge, dass eine Tochterzelle die Eigenschaften der Mutterzelle behält und die andere zur Progenitorzelle (Vorläuferzelle) wird. Die Progenitorzelle besitzt eine höhere Differenzierung, eine gesteigerte Zellteilungsrate und hat ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung verloren. Durch die asymmetrische Teilung wird der Bestand an Stammzellen konstant gehalten. (3)

Wird der Stammzellvorrat z.B. durch Bestrahlung oder Chemotherapie verringert, verfügen HSC über eine enorme Regenerationsfähigkeit. Beispielsweise wurde im Rahmen einer Studie an NOD/SCID-Mäusen gezeigt, dass die Transplantation einer einzigen frühen HSC ausreicht, um das gesamte blutbildende System, das zuvor durch Bestrahlung zerstört wurde, langfristig wieder aufzubauen. (4)

Die Identifizierung und Unterscheidung von Zellen geschieht meist durch die Analyse von bestimmten Oberflächenmarkern. Charakteristisch für HSC ist das Oberflächenmolekül CD34, ein Transmembranprotein mit einer Länge von 385 Aminosäuren. (5)

HSC sind in der Lage, alle Zellen des Blutes zu bilden. Welchen Pfad HSC in ihrer Differenzierung einschlagen hängt von ganz bestimmten Steuerungsmechanismen ab. Wichtige Faktoren sind dabei unter anderem die Colony Stimulating Factors (CSF), die als Wachstumsfaktoren fungieren, Interleukine (Il-3, Il-5) und Hormone

(Katecholamine, Steroidhormone, Schilddrüsenhormone, Wachstumshormone). Auch der Zellkontakt zu bestimmten Zellen des Knochenmarks scheint von Bedeutung zu sein. Beispielsweise stehen HSC in enger Verbindung mit den Stromazellen. (6)

Grob gesagt können hämatopoetische Progenitorzellen einen von zwei Wegen einschlagen. Diese sind in Abbildung 1 dargestellt. Der Erste führt über die Zwischenstufe CFU-GEMM (*colony forming units* – Granulozyten, Erythrozyten, Monozyten, Megakaryozyten) zu ausdifferenzierten Erythrozyten, Granulozyten, Monozyten und Megakaryozyten (für die Bildung von Blutplättchen verantwortlich). Dieser Weg wird als „myeloische Zellreihe“ bezeichnet.

Der zweite Weg wird „lymphatische Zellreihe“ genannt. Hier entstehen über verschiedene Zwischenstufen reife T-Zellen, B-Zellen, Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Dendritische Zellen. (1)

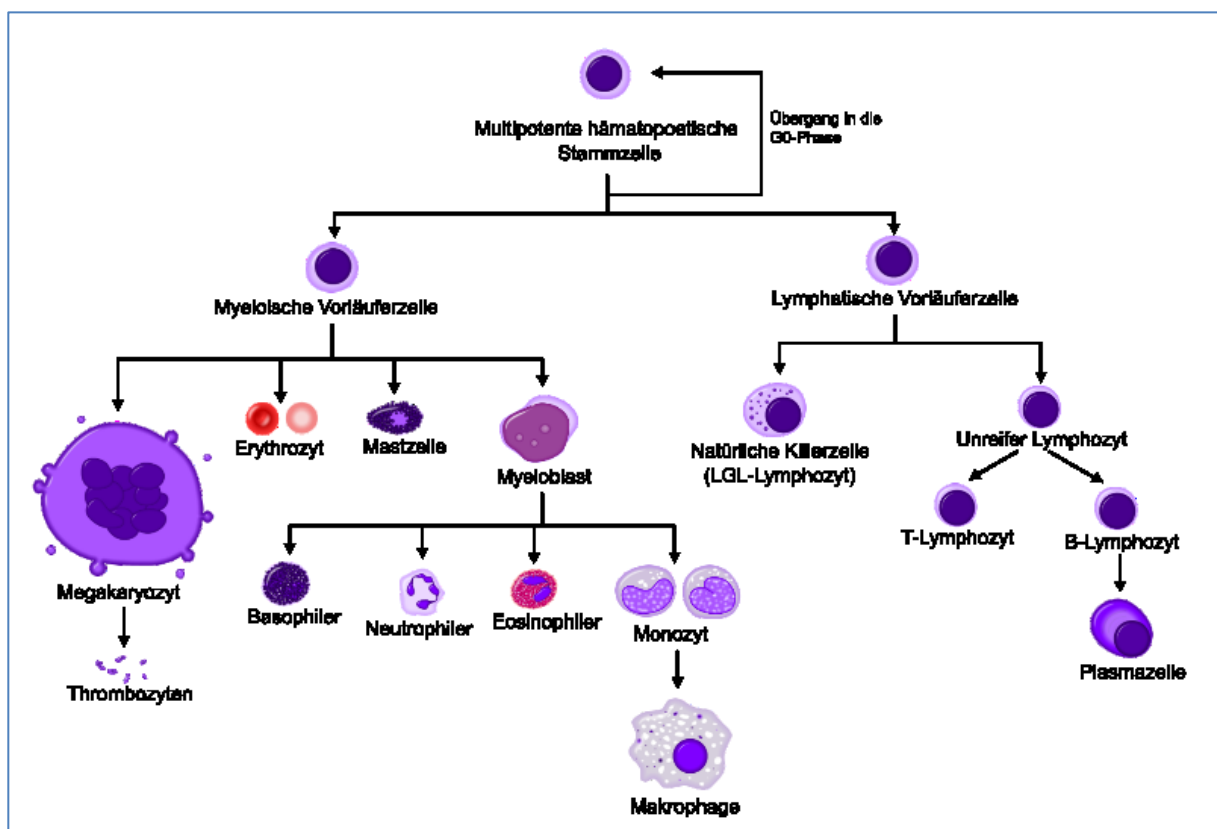


Abbildung 1 - Die Hämatopoese - aus HSC entwickeln sich in mehreren Schritten reife Blutzellen
(Quelle: Mikael Häggström: GFDL (<http://www.gnu.org/copyleft/fdl.html>)), via Wikimedia Commons)

1.3 Das Immunsystem

Das Immunsystem wird in das angeborene und das erworbene Immunsystem unterteilt. Beide Komponenten sind eng miteinander verknüpft und arbeiten gemeinsam für die Aufrechterhaltung der Integrität unseres Körpers.

Das angeborene Immunsystem ist in der Lage, fremdartige Antigene und Krankheitserreger über bestimmte Rezeptoren zu identifizieren. Es ist unspezifisch und besitzt keine Merkfähigkeit. (7) Das erworbene Immunsystem befindet sich in einem lebenslangen Entwicklungsprozess. Eine enorme Bandbreite an T- und B-Lymphozyten, von denen jeder einen spezifischen T- bzw. B-Zell Rezeptor besitzt, steht uns für die Erkennung von Viren und Krankheitserregern zur Verfügung. Erkennt eine Zelle des spezifischen Immunsystems ein fremdartiges Antigen, erfolgt eine klonale Expansion und eine Immunreaktion wird in Gang gesetzt. Das erworbene Immunsystem ist lernfähig und besitzt ein immunologisches Gedächtnis.

1.3.1 Zellen des Immunsystems

Monozyten, Makrophagen

Monozyten und Makrophagen werden auch als mononukleäre Phagozyten bezeichnet. Monozyten zirkulieren im Körper und können ins Gewebe einwandern, wo sie sich zu Makrophagen differenzieren. Ihre Hauptaufgabe ist es, Krankheitserreger zu erkennen und zu phagozytieren. Makrophagen besitzen verschiedenste Rezeptoren (z.B. Toll-like Rezeptoren, Mannose Rezeptoren), die es ihnen ermöglichen, Krankheitserreger aufzuspüren. Phagozytierte Pathogene werden im Inneren der Fresszellen von lysosomalen Peroxydasen zerstört und die fremdartigen Antigene mit Hilfe von MHC2-Komplexen an der Zelloberfläche präsentiert. Makrophagen gehören daher zusammen mit B-Zellen und Dendritischen Zellen zur Gruppe der Antigenpräsentierenden Zellen (APC). Die Antigenpräsentation mittels MHC2 kommt insbesondere den CD4-positiven T-Zellen zugute.(3)

Makrophagen sind in nahezu allen Organen des menschlichen Körpers vorhanden

und erfüllen dort wichtige Aufgaben im Rahmen der Immunantwort (z.B. Kupfferzellen in der Leber und Alveolarmakrophagen in der Lunge). (1)

Granulozyten

Das Kollektiv der polymorphkernigen Phagozyten besteht neben den eosinophilen und basophilen Granulozyten hauptsächlich aus neutrophilen Granulozyten. Sie haben eine Überlebenszeit von lediglich 2-3 Tagen (im Gegensatz dazu leben Makrophagen Monate bis Jahre). Pro Minute wird ca. eine Millionen Granulozyten/kg KG in die Blutbahn abgegeben. (8)

Die Hauptaufgabe der neutrophilen Granulozyten besteht, ähnlich wie die der Makrophagen, in der Erkennung und Phagozytose von Krankheitserregern. Neutrophile Granulozyten sind unspezifisch und haben eine Vielzahl an Rezeptoren, die in der Lage sind, verschiedene Pathogene zu erkennen. Anders als die Makrophagen gehören Granulozyten nicht zu den antigenpräsentierenden Zellen. Granulozyten setzen Antigene phagozytierter Krankheitserreger in die Blut- bzw. Lymphbahn frei und können so indirekt Immunzellen der spezifischen Abwehr wie zB. B-Zellen aktivieren.

T-Lymphozyten

T-Lymphozyten sind ein Teil der spezifischen Immunabwehr. Sie werden, wie alle anderen Blutzellen auch, im Knochenmark gebildet und gelangen anschließend in den Thymus (daher kommt die Bezeichnung „T-Zellen“), um dort ihre „Spezialausbildung“ zu erhalten. T-Lymphozyten werden so erzogen, dass jede Zelle nur auf ein einziges Antigen reagiert. Dementsprechend exprimiert jeder Lymphozyt nur eine einzige Art von T-Zell Rezeptor (TZR) an seiner Oberfläche. Diese Antigenpezifität ist ein wichtiges Kennzeichen des gesamten erworbenen Immunsystems.

Im Gegensatz zur angeborenen Immunabwehr und den Antikörpern erkennen T-Zellen ein fremdes Antigen nur dann, wenn es an der Oberfläche von körpereigenen Zellen präsentiert wird. Diese präsentierten Antigene können entweder von Krankheitserregern wie Viren oder intrazellulären Bakterien stammen, die sich

innerhalb der Zelle vermehren, oder von Krankheitserregern und deren Bestandteile, die von Körperzellen aus dem extrazellulären Raum durch Endozytose in die Zelle aufgenommen und intrazellulär in Peptide zerlegt wurden. Die fremdartigen Peptide werden dann von spezialisierten Glykoproteinen an die Oberfläche der Zelle transportiert und dort den T-Zellen präsentiert. Diese Glykoproteine wurden erstmalig bei der Reaktion von Immunzellen auf transplantiertes Gewebe beobachtet. Dies führte zum Namen „*major histocompatibility complex*“ (MHC, übersetzt: Haupthistokompatibilitätskomplex). Die Erkennung von, an MHC-Moleküle gebundenen, Peptiden ist das wichtigste Charakteristikum von T-Zellen und erfolgt über die Interaktion von T-Zell Rezeptor (TZR), MHC-Molekül und einigen Co-Rezeptoren. Wenn ein fremdartiges Antigen mittels MHC Komplex präsentiert wird und mit einem passenden TZR in Verbindung tritt, reagiert die T-Zelle mit klonaler Expansion. (9)

T-Zellen sind sowohl für die Graft-versus-Host (GvH), als auch für die Graft-versus-Tumor (GvT) Reaktion von großer Bedeutung. Hierbei reagieren transplantierte T-Zellen auf die fremdartigen Proteine des Empfängers. Es kommt zu einer Aktivierung von CD4+ T-Helferzellen und CD8+ Zytotoxischen T-Zellen. Diese können bösartige Zellen (GvT), aber auch gesunde Empfängerzellen (GvH) attackieren. Im Rahmen der GvH Reaktion kommt es am häufigsten zu Manifestationen an Haut, Leber und Gastrointestinaltrakt. Man unterscheidet die akute von der chronischen GvH-Reaktion, welche erst ab dem 100. Tag nach der Transplantation auftritt. (10)

B-Lymphozyten

B-Lymphozyten sind der zweite wichtige Teil der erworbenen Immunabwehr. Sie werden im Knochenmark gebildet und siedeln sich vor allem in sekundär lymphatischen Organen wie Lymphknoten und Milz an.

B-Zellen sind antigenspezifisch und exprimieren B-Zell-Rezeptoren an ihrer Oberfläche. Wenn diese Rezeptoren mit einem passenden Antigen in Kontakt treten, reagieren die Zellen mit klonaler Expansion. Im Gegensatz zu T-Zellen funktioniert die Aktivierung von B-Zellen auch ohne MHC2-Komplex. Durch die Stimulation von T-Helferzellen, differenzieren sich die aktivierten B-Zellen zu antikörperproduzierenden Plasmazellen.

NK- Zellen

Natürliche Killerzellen entwickeln sich im Knochenmark aus lymphatischen Vorläuferzellen. Sie besitzen keine antigenspezifischen Rezeptoren und zählen somit zum angeborenen Immunsystem. NK-Zellen erkennen vor allem virusinfizierte Zellen und Tumorzellen. Ihre speziellen Rezeptoren (KIR) interagieren mit den MHC1-Komplexen von Zielzellen und können so gesunde Zellen von kranken Zellen unterscheiden.

Tumorzellen neigen dazu, die Expression von MHC-Molekülen herunterzuregulieren, um der Abwehr durch zytotoxische T-Zellen zu entkommen. Zellen mit veränderter Expression von MHC-Molekülen werden von NK-Zellen identifiziert und in die Apoptose geleitet. Dieser Vorgang wird auch als „Missing Self Hypothese“ bezeichnet. (11)

Es existieren bis zu 15 Gene für aktivierende (B-Haplotyp) und hemmende (A-Haplotyp) KIR-Haplotypen. Die Anzahl an verschiedenen KIR-Genen variiert von Person zu Person. Der KIR-Haplotyp spielt auch bei der hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSCT) eine Rolle. Bei Patienten mit AML kommt es seltener zu einem Rezidiv, wenn beim Spender der Haplotyp-B dominiert. (12,13)

Natürliche Killerzellen spielen auch bei der Vermittlung eines Graft versus Leukämie Effekts bei HLA-mismatch Transplantationen eine wichtige Rolle. Hierbei kommt ihnen die Eigenschaft zugute, neoplastische Zellen auch ohne Erkennung von tumorspezifischen Antigenen identifizieren und lysieren zu können. (14,15)

1.4 Transplantationsbarrieren

1.4.1 Der T-Zell-Rezeptor (TZR)

An den Oberflächen von T-Zellen findet man ein heterodimäres Molekül, bestehend aus den beiden Polypeptidketten α und β – die T-Zell-Rezeptoren (TZR).

Dank ihrer Vielgestaltigkeit sind sie in der Lage, verschiedene Antigene zu erkennen. An der Oberfläche einer T-Zelle wird jeweils nur eine Version eines TZR exprimiert. Um möglichst viele Antigenen erkennen zu können brauchen wir daher einerseits eine große Anzahl an T-Zellen und andererseits eine großes Repertoire an TZR. Diese Vielfalt wird durch den besonderen Aufbau des TZR ermöglicht.

Der TZR ist aus fünf variablen Segmenten und einer konstanten Region aufgebaut. Zwei der variablen Segmente befinden sich in der α -Kette und drei in der β -Kette. Die Bindungsstelle für Antigene wird von diesen fünf variablen Segmenten gebildet. Die Erbinformation für jedes dieser Segmente verteilt sich auf zahlreiche Teilgene. Berechnungen zufolge können durch somatische Rekombination bis zu $2,9 \times 10^{20}$ (290 Trillionen) verschiedene TZR entstehen. (10) Abbildung 2 zeigt einen schematischen Aufbau des TZR.

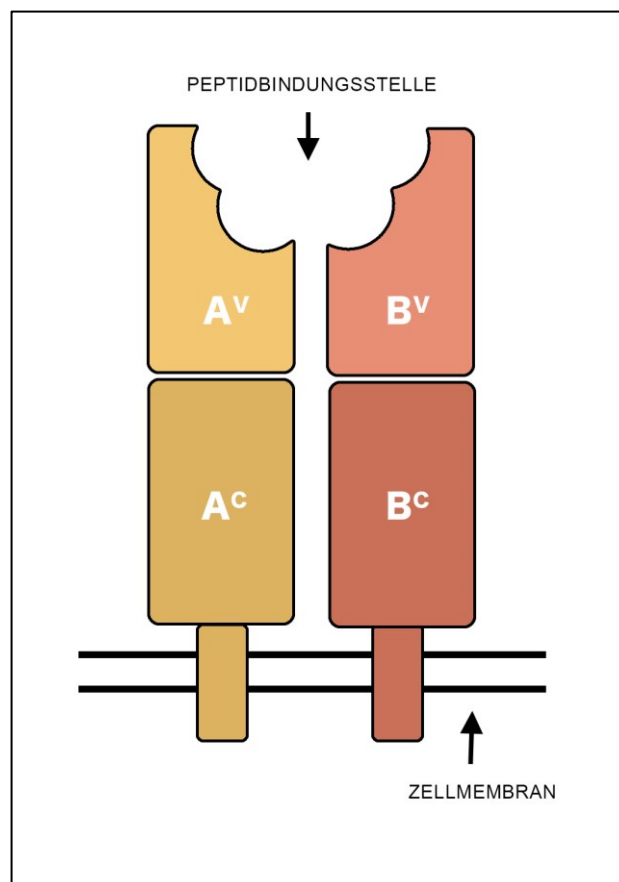


Abbildung 2 – Der TZR ist aufgebaut aus einer α - und einer β -Kette (A und B), die jeweils aus einer konstanten (A^c , B^c) und einer variablen Komponente (A^v , B^v) aufgebaut sind. Die beiden Variablen Abschnitte der α - und β -Kette bilden gemeinsam die Peptidbindungsstelle.

Jeder TZR besitzt die Eigenschaft, ein spezifisches Antigen zu erkennen. Im Gegensatz zur unspezifischen Immunabwehr reicht die alleinige Anwesenheit des passenden Antigens für die T-Zellen nicht aus. Um eine Immunreaktion hervorzurufen, muss das Antigen in Verbindung mit einem MHC Molekül präsentiert werden und an einen passenden TZR binden. Sobald dies geschieht, löst der CD3-Komplex, der einen wichtigen Teil des funktionellen TZR darstellt, eine Signaltransduktion aus, die in weiterer Folge in einer Aktivierung und Proliferation der T-Zelle resultiert. (10)

Eine Ausnahme bilden $\gamma\delta$ T-Zellen, die 0,5 – 5% aller T-Zellen ausmachen und vor allem in den Epithelien der Haut und Schleimhäute vorkommen. Diese Untergruppe der T-Zellen weist eine geringere Spezifität auf und ist in der Lage, Pathogene auch ohne die Mithilfe von MHC-Molekülen zu erkennen. Es wird sogar ein antineoplastischer Effekt dieser Zellen vermutet. $\gamma\delta$ T-Zellen scheinen an GvH Reaktionen nicht beteiligt zu sein. (16)

1.4.2 Der MHC-Komplex

Man unterscheidet zwei Klassen an **MHC-Molekülen** – MHC Klasse 1 und MHC Klasse 2. Die beiden Klassen ähneln einander in ihrem groben Aufbau, unterscheiden sich aber in der Zusammensetzung ihrer Untereinheiten und kommen auf unterschiedlichen Zelltypen vor. Abbildung 3 zeigt den Aufbau der beiden MHC Moleküle.

MHC-Klasse-1-Moleküle werden von nahezu allen Zellen des Menschlichen Körpers gebildet. Ihre Aufgabe ist es, in der Zelle entstandene Peptide an die Oberfläche der Zellmembran zu bringen, um sie dort den CD8-T-Zellen zu präsentieren. Je nachdem, ob es sich um körpereigene oder fremde Peptide handelt, werden die Zellen von den CD-8-Zellen als gesund eingeordnet und verschont oder für krank erklärt und beseitigt.

Das MHC-1 Molekül besteht aus zwei Polypeptidketten, die insgesamt vier Domänen bilden. Die längere α -Kette durchspannt die Zellmembran und wird im MHC-Komplex

(beim Menschen das Chromosom 6) codiert. Sie setzt sich aus drei Domänen zusammen (α 1-3). Das kürzere β 2-Mikroglobulin wird im Chromosom 15 codiert und bildet die β 2-Domäne. Die α 1- und α 2-Domäne bilden zusammen die peptidbindende Stelle. (9)

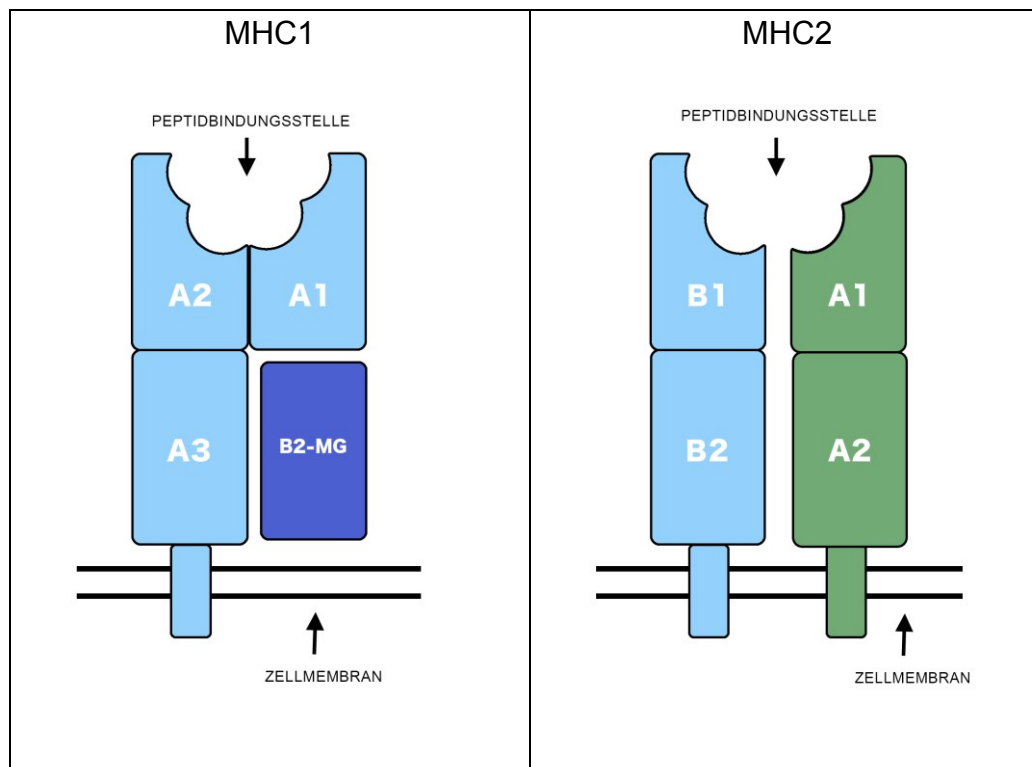


Abbildung 3 - Aufbau des MHC1 (links) und MHC2 (rechts). Der MHC1-Komplex besteht aus drei Domänen der α -Kette (A1,A2, A3) und dem β 2-Mikroglobulin (B2-MG). Die Peptidbindende Stelle wird von den Domänen A1 und A2 gebildet. Der MHC2-Komplex ist aus einer α - (A1, A2) und einer β - Kette (B1, B2) zusammengesetzt. Die Peptidbindungsstelle wird von den Domänen A1 und B1 gebildet.

Für die Interaktion zwischen MHC-Klasse-1-Molekül und TZR ist der Co-Rezeptor CD8 von entscheidender Bedeutung. CD8-Proteine kommen nur an zytotoxischen T-Zellen vor und binden an MHC-Klasse-1-Moleküle.

MHC-Klasse-2-Moleküle werden ausschließlich von APC (Dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen) gebildet. Ihre Aufgabe ist es, in Peptide zerlegtes phagozytiertes Zellmaterial, an die Zelloberfläche von APC zu transportieren. Dort angekommen, präsentieren sie die Peptide an CD4-T-Zellen. Wenn der TCR einer CD4-T-Zelle auf ein passendes Antigen an einem MHC-Klasse-2-Molekül trifft, wird

die T-Zelle aktiviert und setzt eine Immunreaktion in Gang. (9)

Das MHC-Klasse-2-Molekül besteht aus zwei Ketten α und β , welche die Zellmembran durchspannen und im MHC-Lokus codiert sind. Im Unterschied zum MHC-Klasse-1-Molekül wird der peptidbindende Spalt von 2 Domänen verschiedener Ketten gebildet ($\alpha 1$, $\beta 1$). Als Co-Rezeptor dient das CD4-Protein, das auf T-Helferzellen exprimiert wird.

Um der Vernichtung durch T-Zellen zu entkommen, haben sich zahlreiche Pathogene die Fähigkeit angeeignet, der Präsentation durch MHC-Moleküle zu entgehen. Glücklicherweise gibt es zwei separate Mechanismen, die es Krankheitserregern erschweren, dem spezifischen Immunsystem zu entkommen.

1. Der MHC ist polygen

Der erste Mechanismus besteht in der **Polygenie** des MHC. Jeder Mensch besitzt mehrere Gene, die für verschiedene MHC1 und -2 Komplexe mit unterschiedlichen Peptidbindungsspezifitäten kodieren. Die Vielfältigkeit von MHC-Molekülen macht es einerseits Krankheitserregern schwer, ihrer Präsentation zu entgehen, andererseits macht es aber auch das Finden eines MHC-kompatiblen Organspenders zu einem schwierigen Unterfangen.

Beim Menschen befindet sich der MHC-Komplex auf dem Chromosom 6 und erstreckt sich über mindestens 4×10^6 Basenpaare. Die insgesamt über 200 Gene werden beim Menschen auch als HLA (Humanes Leukozyten-Antigen)-Komplex bezeichnet. Die Gene der α - und β -Ketten von MHC-Molekülen sind an diesen Genkomplex gekoppelt (die Ausnahme bildet das $\beta 2$ -Mikroglobulin des MHC-Klasse-1-Moleküls). (9)

Für die α -Kette des MHC-Klasse-1-Moleküls besitzt der Mensch drei Gene, die HLA-A, -B und -C genannt werden. Das $\beta 2$ -Mikroglobulin liegt auf dem Chromosom 15 und ist somit nicht Teil des HLA-Komplexes. Damit erhalten wir pro HLA-Komplex drei verschiedene MHC-Klasse-1-Moleküle. Die Gene für die α - und β -Kette der MHC-Klasse-2-Moleküle werden als HLA-DR, HLA-DP und HLA-DQ bezeichnet. Bei vielen Menschen lagert sich ein zusätzliches Gen für eine β -Kette an das HLA-DR

Cluster. Somit kann ein Mensch pro HLA-Komplex bis zu vier MHC-Klasse-2-Typen besitzen. (9) Diese Vielfalt ermöglicht es den MHC-Molekülen eine größere Bandbreite an Peptiden an sich zu binden, um sie anschließend an der Zelloberfläche den T-Zellen zu präsentieren.

2. Der MHC ist polymorph

Der zweite Mechanismus, der zur Vielfalt der MHC-Moleküle beiträgt, ist der MHC-**Polymorphismus**. Für jedes Gen innerhalb einer Population existieren mehrere Ausprägungsformen. Die Bezeichnung Polymorphismus beschreibt die Variation eines Gens und dessen Produkt innerhalb einer Population. Die individuellen Ausprägungsformen eines Gens nennt man Allele. Aufgrund der hohen Anzahl an möglichen Allelen für jeden MHC-Locus ist es unwahrscheinlich, dass ein Mensch auf beiden homologen Chromosomen dasselbe Gen besitzt. Mit anderen Worten ist die Mehrzahl aller Menschen in Bezug auf den MHC-Locus heterozygot. (9)

Als MHC-Haplotyp bezeichnet man die Kombination verschiedener MHC-Allele auf einem bestimmten Chromosom. Über 5500 MHC-Klasse-1 Allele (HLA-A, HLA-B, HLA-C) und über 1600 MHC-Klasse-2 Allele (MHC-DRB1 und HLA-DQB1) resultieren in einigen Millionen möglichen HLA-Kombinationen. Diese beinahe unüberschaubar große Bandbreite an möglichen Allelen und Kombinationen verdeutlicht die verschwindend geringe Chance einer genetischen HLA-Übereinstimmung zweier nicht-verwandter Individuen. (17) Die Wahrscheinlichkeit einer HLA-Kompatibilität liegt bei Geschwistern bei 1:4, bei nicht verwandten Personen dagegen bei ca. 1:100 000. (18)

Neben dem MHC-Klasse-1 und -2 Molekül existieren noch sogenannte MiHA (*minor histocompatibility antigen*), deren Gene sich außerhalb des HLA-Komplexes befinden. Diese Moleküle können bei Disparität zwischen Empfänger und Spender auch bei HLA-identen Transplantationen zu Abstoßungsreaktionen bzw. zu einer GvH-Erkrankung führen. (16)

1.5 Die Geschichte der Stammzelltransplantation

Der Beginn für die Entwicklung der hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSCT) erfolgte zur Zeit des zweiten Weltkriegs. Nach dem Abwurf der ersten Atombomben auf Hiroshima und Nagasaki wurde nach Heilungsmöglichkeiten der strahleninduzierten Knochenmarkaplasie gesucht. Die grundlegende Beobachtung durch Leon Jacobsen et al. 1949, dass Mäuse eine tödliche Strahlendosis überleben konnten, indem man ihre Milz mittels Bleifolien abschirmte, erweckte Interesse und führte zu weiteren Untersuchungen auf diesem Gebiet. (19) Kurze Zeit später wurden protektive Effekte gegen hochdosierte Strahlung durch die intravenöse Infusion von Knochenmark beobachtet. (20)

Ein Pionier in der klinischen Anwendung der Knochenmarktransplantation war E. Donnall Thomas. Er unternahm erste Versuche einer allogenen Stammzelltransplantation am Menschen. (21) In einer Studie im Jahre 1959 wurden zwei ALL-Patienten mit einer hochdosierten Ganzkörperbestrahlung behandelt. Anschließend wurde ihnen das Knochenmark ihrer eineiigen Zwillingsgeschwister (syngene Transplantation) verabreicht. Die Patienten zeigten eine sofortige klinische und hämatologische Rekonstitution. Leider trat die Krankheit aber nach wenigen Monaten wieder auf. (22) Die Studie konnte demonstrieren, dass eine syngene Knochenmarktransplantation einen wirksamen Schutz vor strahlungs-induzierter Knochenmarksaplasie darstellt und dass man zusätzlich zur Bestrahlung auch effektive Chemotherapeutika benötigen würde, um Tumorzellen restlos beseitigen zu können.

Die ersten Versuche einer Knochenmarkstransplantation beim Menschen weckten große Hoffnungen. Gleichzeitig stieg aber auch die Anzahl an missglückten Transplantationen bei Patienten mit Leukämien und Lymphomen. (21) Eine Ausnahme bildete Beilby et al. (23), der vom partiellen und stabilen Engraftment eines Patienten mit Hodgkin-Lymphom berichtete. Ihm wurde das Knochenmark seines zweieiigen Zwillings in Kombination mit einer hohen Dosis des Zytostatikums Amino-Chlorambucil verabreicht.

Im Jahre 1965 beschrieb D.W. Barnes und J. F. Loutit die Graft versus Host Krankheit (GvHD) bei Mäusen. (24) Der Begriff tauchte allerdings schon einige Jahre zuvor auf, als M. Simonsen die immunologischen Schäden beschrieb, die auftraten, wenn immunkompetente Zellen in einen immungeschwächten Empfänger eingebracht wurden. (25)

1965 wurde erstmals ein dauerhaftes Engraftment von allogenen Knochenmark in einem Leukämiepatienten erreicht. Der Patient starb jedoch an den Folgen der schweren GvHD. (26) Auch in einigen anderen Versuchen wurde das Transplantat von Empfängern abgestoßen oder die Patienten entwickelten schwere GvH-Reaktionen. (21)

Der bekannte Hämatologe Dirk van Bekkum führte die zahlreichen gescheiterten Versuche auf die Tatsache zurück, dass die tierischen Versuche zu früh in die Klinik überführt worden waren. Die experimentellen Tierversuche basierten Großteils auf aus Inzucht hervorgegangenen Mäusen, die kein HLA-matching benötigen. Viele Wissenschaftler verloren ihren Glauben an die Zukunft der allogenen KMT. (27)

Trotz der Zweifel wurde die Forschung fortgeführt und im Jahre 1968 wurde eine DLA-Typisierung für Hunde (D steht für dog) präsentiert. Tiere, die das Transplantat eines Artgenossen mit passendem DLA-Typ bekamen, erreichten signifikant längere Überlebenszeiten als Tiere, die ein Transplantat mit ungleichem DLA-Typ empfangen. (28,29) Bald sollte sich herausstellen, dass die Grundlagen dieser DLA-Typisierung auch auf den Menschen übertragen werden konnten. (30-32)

1968 führte man die ersten erfolgreichen Knochenmarktransplantationen bei Kindern mit angeborenen Defekten des Immunsystems durch. Die Spender waren jeweils HLA-A kompatible Geschwister. (33,34) Im Jahre 1969 führte E. Donnall Thomas die erste erfolgreiche Knochenmarktransplantation bei einem Jungen mit Leukämie durch. Der Patient erhielt das Knochenmark einer verwandten Spenderin und zeigte danach einen vollständigen Chimärismus mit ausschließlich weiblichen Zellen im Knochenmark. (35) Einige Jahre darauf präsentierten Thomas et al. einige bedeutende Erkenntnisse, die zur Verbesserung der Ergebnisse der SCT beitrugen. Sie stellten unter anderem fest, dass Patienten, die sich zum Zeitpunkt der Transplantation in einem besseren klinischen Zustand präsentierten, höhere

Langzeitüberlebensraten erzielten, als Patienten mit schlechtem klinischen Zustandsbild. (36,37)

1979 wurde der Graft-versus-Leukämie (GvL) Effekt beschrieben. Dabei wurde beobachtet, dass Rezidive bei Patienten mit GvH Reaktionen 2,5 mal seltener auftraten als bei Patienten, die keine GvHD entwickelten. (38)

In den 1980er und 1990er Jahren machte die HSCT große Fortschritte. Technologien wurden verbessert und neue Quellen zur Gewinnung von Stammzellen erforscht. Es wurden nationale Knochenmark-Spenderdatenbanken gegründet und durch *Bone Marrow Donors Worldwide* (BMDW) vernetzt. (21,39) Neue Medikamente zur Prävention von GvHD wurden entdeckt. (40) 1984 zeigten Prentice et al. (41) in einer Studie, dass T-Zell Depletion vor GvHD schützen kann. Medikamente wie Busulfan wurden als Alternative zu Bestrahlung eingeführt. (42)

Die erste erfolgreiche KMT in Österreich erfolgte 1978 am LKH-Universitätsklinikum Graz. Mutz et al. berichteten von einem 10-jährigen Mädchen mit aplastischer Anämie, das Stammzellen ihres HLA-identen Bruders erhielt. Der Chimärismus wurde damals anhand des Geschlechtschromatins bestimmt. (43)

1997 berichteten Giralt et al. von den ersten Anwendungen von RIC (*reduced intensity conditioning*) am Menschen. (44) Damit sollten die toxischen Effekte der Bestrahlung und intensiven Chemotherapie, sowie die damit in Verbindung stehende Altersbeschränkung für Stammzelltransplantationen gesenkt werden.

1.6 Die Suche nach einem geeigneten Spender

Die Auswahl eines geeigneten Spenders ist ein Schlüsselement der HSCT, das über Erfolg oder Misserfolg des Eingriffs entscheiden kann.

Die erste Wahl stellt ein HLA-identer verwandter Spender (matched related donor, MRD) dar. Geschwister haben aufgrund des Vererbungsmodus eine 25% Chance

HLA-ident zu sein. Die schnelle, kostengünstige Spendersuche und niedrigere Raten akuter und chronischer GvH-Reaktionen sind Vorteile der MRD. (45)

Da nur in ca. 30% der Fälle ein HLA-identer verwandter Spender zur Verfügung steht, muss häufig nach einem HLA-identen Fremdspender gesucht werden. In ca. 70% der Fälle kann ein passender Fremdspender gefunden werden. (46) Die zahlreichen internationalen Stammzellspenderregister mit weltweit über 18 Millionen registrierten Spendern erleichtern diese Aufgabe. (17,39)

Die Anpassung (matching) der HLA-Merkmale von Empfänger und Spender ist essentiell für eine erfolgreiche Transplantation. In der Regel werden HLA-1 (HLA-A,-B und -C) und HLA-2 (HLA-DRB1 und -DQB1) analysiert und mit dem Patienten verglichen. Diskrepanzen der HLA-Merkmale führen zu höheren Raten an GvHD bei Patienten mit malignen Erkrankungen und höheren Raten an Transplantatversagen bei Patienten mit non-malignen Erkrankungen. (47-49)

Da die Suche nach einem unverwandten Spender aufwendig ist, vergehen meist zwei bis sechs Monate von der Indikationsstellung bis zur Durchführung der Transplantation. Je nach zugrundeliegender Pathologie kann diese Verzögerung die zumutbare Wartezeit überschreiten. Da längere Wartezeiten vor der Transplantation mit schlechteren Ergebnissen assoziiert sind, wird nach schneller verfügbaren Stammzellressourcen gesucht. Dazu gehören Stammzellen aus Nabelschnurblut und die immer häufiger durchgeführte haploidente Stammzelltransplantation. (50)

Die haploidente SCT hat den großen Vorteil der leichten und schnellen Verfügbarkeit eines Spenders. Fast alle Patienten haben Eltern, Geschwister oder Kinder, die als Spender in Frage kommen. Ein weiterer Vorteil ist die geringere Rate an Rückfällen bei malignen Erkrankungen. Die HLA-Disparität geht aber auch mit einem erhöhten immunologischen Risiko für GvH-Reaktionen und Abstoßungsreaktionen einher. (10) Grundlage für ein Engraftment ohne GvHD ist daher einerseits eine ausgeprägte T-Zelldepletion des Grafts und andererseits eine hohe Anzahl an transplantierten Stammzellen. Beides kann durch die Anreicherung CD34 positiver Stammzellen durch immunomagnetische Selektion erreicht werden. Bei Kindern konnten unter anderem Handgretinger et al. gute Ergebnisse mit dauerhaftem Engraftment und

niederen Raten an GvH-Reaktionen vorweisen. (51,52)

Generell sollte sich ein Spender in einem guten Allgemeinzustand befinden und frei von Komorbiditäten sein, die zu Komplikationen während der Entnahme der Stammzellen führen können. Stammzellen von jüngeren Spendern werden generell bevorzugt, da diese mit besseren Transplantationsergebnissen in Verbindung zu stehen scheinen. Des Weiteren sind Stammzellen von männlichen Spendern und nulliparen Spenderinnen mit niedrigeren Raten an chronischen GvH Reaktionen vergesellschaftet. (53,54)

1.7 Quellen und Gewinnung von Stammzellen

Die drei wichtigsten Quellen für die Gewinnung von HSC sind Knochenmark, peripheres Blut und Nabelschnurblut. (55)

Knochenmark wird unter Vollnarkose mittels multipler Punktionen beider Beckenkämme gewonnen. In der Vergangenheit stellte Knochenmark die häufigste Quelle für die Gewinnung von HSC dar. (6) Hüftschmerzen gehören zu den häufigsten Nebenwirkungen einer Knochenmarkspunktion. Fieber, Blutungen und lokale Infektionen werden selten beobachtet. (56) Das Spenden von Knochenmark ist auch für Kinder ohne großes Risiko möglich. Kleinkindern unter 4 Jahren sollte vor dem Eingriff Eigenblut abgenommen werden, da diese nach der Entnahme des Knochenmarks häufig eine Bluttransfusion benötigen. (57)

Im peripheren Blut zirkulieren HSC in extrem kleinen Mengen. (58) Die Beobachtung, dass die Verabreichung von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren wie G-CSF oder GM-CSF zur Mobilisierung von HSC aus dem Knochenmark und damit zu einer Konzentrationssteigerung im Blut um mehr als das 1000-fache führt, war eine richtungsweisende Entdeckung für die Gewinnung von HSC. (59-61) Peripheres Blut ist derzeit die am häufigsten verwendete Stammzellquelle bei nicht-verwandten Spendern. (62)

Eine relativ hohe Zahl an HSC ist in Nabelschnurblut vorhanden, das zum Zeitpunkt der Geburt gewonnen werden kann. Die gewonnenen Zellen werden eingefroren und in Blutbanken aufbewahrt. Passende Konserven können in Datenbanken gesucht und ohne große zeitliche Verzögerungen zu den Transplantationszentren transportiert werden. Vorteile von Nabelschnurblut als Quelle für HSCT sind eine konstante Verfügbarkeit von Spendern, die einfache Gewinnung und niedrige Raten an GvHD. Nachteile sind das höhere Risiko für Transplantatversagen, längere Zeiten bis zur Rekonstitution des Immunsystems und die Nicht-Verfügbarkeit des Spenders bei Bedarf an weiteren Stammzellen, beispielsweise für die Verabreichung einer DLI (*donor lymphocyte infusion*). (63)

1.8 Konditionierung

Ein elementarer Teil der HSCT ist die sogenannte Konditionierung. Diese verfolgt vor allem drei Ziele: Sie soll die Zahl neoplastischer Zellen (im Falle einer neoplastischen Erkrankung) reduzieren, das Immunsystem des Empfängers supprimieren und die Binnenräume des Knochenmarks ausräumen, um Platz für ein potenzielles Engraftment allogener Stammzellen zu schaffen. (64)

Die Konditionierung erfolgt entweder durch die Verabreichung von Chemotherapeutika oder durch eine Kombination von Chemo- und Strahlentherapie. Gereiht nach ihrer Intensität unterscheidet man drei Konditionierungsverfahren: die myeloablative Konditionierung (MAC), die Reduced Intensity Konditionierung (RIC) und die non-myeloablative Konditionierung (NMA). (65)

1.8.1 Myeloablative Konditionierung (MAC)

Bei der MA werden alkylierende Chemotherapeutika und Strahlentherapie eingesetzt. Diese werden dabei so hoch dosiert, dass die autologe Produktion von Blutzellen sistiert. Der lebensbedrohlichen Panzytopenie muss durch die Verabreichung von HSC entgegengewirkt werden. Nach MAC kommt es meist zu einem relativ schnellen Anwachsen der transplantierten Stammzellen. (65)

Neben der Ganzkörperbestrahlung (*total body irradiation*, TBI) werden folgende Substanzen häufig verwendet: Cyclophosphamid, Busulphan, Melphalan, Thiotepa, Etoposid und Dimethylbusulfan. (65)

Die MAC hat zum Ziel, neoplastische Zellen durch hohe Toxizität vollständig zu eliminieren. Mit der Höhe der Dosierung der TBI sinkt die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs der Grunderkrankung. Durch die hohe Toxizität kommt es aber auch zu einer höheren behandlungsinduzierten Mortalität. (66)

1.8.2 Reduced Intensity Konditionierung (RIC)

Die RIC unterscheidet sich von der MAC durch die niedrigere Dosierung der Chemotherapeutika bzw. der TBI. Die Reduktion der Dosis beträgt mindestens 30%. In der Regel verbleiben trotz der myelosuppressiven Wirkung der RIC einige hämatopoetische Vorläuferzellen im Körper des Patienten und machen eine autologe Rekonstitution nach RIC möglich. (65,67) Bei RIC ersetzen die Stammzellen des Spenders die autologe Hämatopoese des Empfängers schrittweise. Solange dieser Prozess andauert, besteht im Blut des Patienten ein gemischter Chimärismus (*mixed chimerism*, MC). Spender- und Empfängerblutzellen existieren nebeneinander und interagieren miteinander. (67)

Häufig wird Fludarabin mit alkylierenden Zytostatika wie Melphalan, Busulphan, Thiotepa oder TBI in reduzierten Dosierungen kombiniert. Die verschiedenen Konditionierungsstrategien unterscheiden sich im Grad ihrer myelosuppressiven Wirkung. Meist verursacht RIC eine ernsthafte Panzytopenie. (65,67)

In mehreren Studien wurde gezeigt, dass die behandlungsinduzierte Mortalität bei RIC niedriger ist als bei MA. (68-70) Außerdem können häufige toxizitätsbedingte Komplikationen wie Fruchtbarkeitsverlust und Wachstumsstörungen verhindert werden. (67) Dies ist insbesondere im pädiatrischen Setting von großer Bedeutung.

1.8.3 Non-Myeloablative Konditionierung (NMA)

Die hohe Toxizität der MAC führt sowohl zu einer limitierten Anwendbarkeit bei

Hochrisikopatienten als auch zu einer Altersbeschränkung der MAC für Patienten unter 50 Jahre. (71) Um das Verfahren auch diesen Patientengruppen ermöglichen zu können, begab man sich auf die Suche nach weniger intensiven Konditionierungsmethoden. Die sogenannte non-myeloablative Konditionierung (NMA) entstand.

Die NMA ruft eine milde Zytopenie im Knochenmark hervor, jedoch eine ausreichend starke Immunsuppression um das Ansiedeln des hämatopoetischen Systems des Spenders zu gewährleisten. (65) Hohe Zahlen an Spender-Stammzellen und Spender-T-Lymphozyten erhöhen die Wahrscheinlichkeit eines Anwachsens des Transplantats (Engraftment). (72)

Verwendet werden unter anderem Fludarabin, Cyclophosphamid, Antithymozytenglobulin (ATG), TBI in schwächeren Dosierungen (meist 1-2Gy) und TLI (*total lymphoid irradiation*). (65,73,74) Die geringe Intensität der Behandlung führt besonders in fortgeschrittenen Stadien maligner Erkrankungen zu höheren Rückfallraten. Patienten mit fortgeschrittenen Erkrankungen können daher nur von Konditionierungsverfahren höherer Intensität (RIC, MAC) profitieren. (75)

1.9 Der Graft versus Tumor Effekt

Bereits 1956 erkannte man, dass transplantierte allogene immunkompetente Zellen in der Lage waren, leukämische Tumorzellen in Mäusen ohne Mithilfe von Chemotherapeutika zu vernichten. (76) Bei Patienten mit Leukämie lieferten geringere Rückfallraten bei Entwicklung einer akuten oder chronischen GvHD weitere Hinweise für einen GvT Effekt. (77,78) Höhere Rückfallraten bei Patienten mit T-Zell-depletierten (79) oder syngenen (80) Transplantaten sowie die Wirksamkeit der Infusion von Spender-Lymphozyten (DLI) bei Patienten mit Rezidiven maligner hämatopoetischer Erkrankungen nach allogener HSCT (81-83) befürworteten die Existenz eines GvT Effekts ebenfalls.

Im Gegensatz zur MAC, bei der die hohe Toxizität der Behandlung zur Abtötung von

Tumorzellen führen soll, liegt der Kampf gegen die malignen Zellen bei der RIC und NMA in der Hand der immunkompetenten Spenderzellen. Ist die Reaktion gegen maligne Zellen gerichtet, so spricht man vom GvT Effekt. Die GvT Reaktion ist das einzig kurative Prinzip einer NMA bzw. RIC. (84) Leider kann sich die Reaktion transplantiertes Lymphozyten auch gegen gesunde Zellen des Empfängers richten. Diese Verhaltensweise wird als GvH Reaktion bezeichnet.

Einen Hinweis auf den GvT Effekt liefert die Tatsache, dass Patienten, die eine akute oder chronische GvHD entwickeln, eine geringere Wahrscheinlichkeit haben, einen Rückfall zu erleiden. (77,78) Es konnte gezeigt werden, dass syngene Transplantate höhere Rückfallraten haben als allogene Transplantate. Dies führt zu der Erkenntnis, dass eine gewisse genetische Abweichung von Spender und Empfänger für das Entstehen eines GvT Effekts von Nöten ist. (80,85) Es gibt auch Hinweise darauf, dass übriggebliebene regulatorische T-Zellen (T_{regs}) des Empfängers einen Anti-Tumor Effekt durch transplantierte allogene Immunzellen hemmen könnten. (86)

Eine wichtige Zellpopulation für den GvT-Effekt scheinen auch die NK-Zellen zu sein. Da NK-Zellen an MHC-1 Moleküle binden, können sie ihren Effekt nur dann entfalten, wenn eine MHC-Ungleichheit beim Spender-Empfängerpaar besteht. In einer Studie mit Leukämiepatienten, die sich einer haploiden HSCT unterzogen, wurde festgehalten, dass NK-Zellen zu einem großen Teil für einen Graft versus Leukämie Effekt verantwortlich sind und vor Rückfall, Transplantatabstoßung und GvHD schützen können. Eine wichtige Rolle spielt dabei der KIR-Rezeptor von NK-Zellen. Patienten-Spenderpaare mit unterschiedlichen KIR-Rezeptoren hatten bessere Überlebensraten als Paare mit übereinstimmenden KIR-Rezeptoren. (87)

NK-Zellen scheinen besonders wertvoll zu sein, weil sie in der Lage sind, einen GvT-Effekt zu vermitteln, ohne dabei eine GvHD zu verursachen.

1.10 T-Zell Depletion und Immunsuppression

Transplantierte T-Zellen können bei Kontakt mit Antigenen des Empfängers eine GvH Reaktion verursachen. Diese Komplikation soll mit Hilfe einer T-Zell Depletion

verhindert werden.

Bei einer T-Zell Depletion werden spezielle Verfahren angewandt, die zu einer signifikanten Reduktion der T-Zellzahl führen. Dies kann einerseits durch Positivselektion von CD34+ Zellen oder Negativselektion von CD3+ Zellen geschehen. Durch diese Methoden kann die Wahrscheinlichkeit für allogene Reaktionen immunkompetenter Spenderzellen deutlich gesenkt werden.

Als man herausfand, dass nicht alle T-Zellen an der Vermittlung von GvHD beteiligt sind, wurde mit der selektiven Depletion von α^+ und β^+ Zellen begonnen. Obwohl eine T-Zell Depletion die Zahl an GvH Reaktionen senkt, ergeben sich zwei andere immunologische Probleme. Einerseits kommt es häufiger zu Abstoßungsreaktionen und andererseits wird die Regenerationsphase des Immunsystems nach einer Transplantation verlängert, was das Entstehen von Infektionen im immungeschwächten Patienten begünstigt. (88)

Eine Immunsuppression ist Voraussetzung für das Engraftment von transplantierten Stammzellen im Knochenmark des Empfängers. Sie soll einerseits eine Abstoßung durch verbliebene autologe T-Zellen im Rahmen einer Host-versus-Graft und andererseits eine GvH Reaktion verhindern. Gebräuchliche Medikamente sind unter anderem Methotrexat, die Calcineurininhibitoren Ciclosporin und Tacrolimus sowie Mycophenolat-Mofetil (MMF). Methotrexat und MMF werden meist in Kombination mit einem Calcineurininhibitor verabreicht. (88)

Da die Immunsuppression auch den GvT Effekt unterdrücken kann, entsteht ein Balanceakt aus der Befähigung der Spenderzellen zur Beseitigung von Tumorzellen einerseits und dem Verhindern einer schweren GvH Reaktion andererseits. (84)

1.11 Donor Lymphocyte Infusion (DLI)

Erleidet ein Patient nach HSCT einen Rückfall, ist eine Immuntherapie in Form einer DLI eine mögliche Intervention, um einen Relaps von Tumorzellen zu beseitigen. Die

Wirksamkeit einer DLI wird auf den GvT Effekt zurückgeführt, der vor allem durch T-Zellen vermittelt wird.

Mehrere klinische Studien belegen die Wirksamkeit von DLIs bei Patienten mit Rezidiven. Besonders wirksam ist die DLI bei CML, welche bei Kindern äußerst selten vorkommt. Auch bei Krankheiten wie Lymphomen, AML, MDS, Multiples Myelom konnten mit Hilfe von DLIs Erfolge erzielt werden. Bei ALL ist die DLI nur begrenzt wirksam. (89,90) Die begrenzte Wirksamkeit bei ALL ist möglicherweise auf die rasche Proliferation maligner Zellen zurückzuführen. Aus diesem Grund wird an einigen Kliniken zuerst eine Chemotherapie durchgeführt, um die Zahl leukämischer Zellen zu dezimieren. (91) Bei Ansprechen auf DLI wird eine klinische Antwort meist innerhalb von 2 bis 3 Monaten beobachtet. (92)

Die häufigste Komplikation einer DLI ist die GvHD, die bei 40 bis 60% der Patienten beobachtet wird. Die Häufigkeit scheint unabhängig von der zugrundeliegenden Erkrankung zu sein und mit der Höhe der Dosierung zu steigen. Dosierungen in verschiedenen Studien reichen von $0,01 \times 10^8$ bis $8,8 \times 10^8$ T-Zellen/kg, wobei eine Dosierung über $4,5 \times 10^8$ T-Zellen/kg den GvT Effekt nicht zu verbessern, die Rate an Komplikationen jedoch zu erhöhen scheint. (92)

1.12 HSCT in der Pädiatrie

Seit mehr als 30 Jahren ist die allogene HSCT eine häufig genutzte Therapieoption für Kinder mit malignen und non-malignen Erkrankungen.

Eine groß angelegte Studie von Miano et al. (93) analysierte die Entwicklung der pädiatrischen HSCT in Europa zwischen 1970 und 2002. Daten von über 30 000 Patienten zeigen, dass sich die HSCT über diesen Zeitraum zu einer gängigen Therapieform entwickelt hat, deren Anzahl an Anwendungen sich jährlich um 5-10% erhöhte. Vor 1996 stammten 70% der allogenen Transplantate von HLA übereinstimmenden Geschwistern. In den Jahren darauf folgte eine Tendenz in Richtung Stammzellen alternativer Herkunft. Vor allem freiwillige nicht-verwandte

Spender aus Spenderdatenbanken, HLA-kompatible verwandte Spender und Nabelschnurblut gewannen an Bedeutung. Zwischen 1999 und 2002 stammten 61% der Transplantate von solchen alternativen Quellen. Die häufigsten Indikationen für eine HSCT gereiht nach ihrer Häufigkeit waren akute lymphoblastische Leukämie (ALL), solide Tumoren, non-maligne Pathologien, akute myeloische Leukämie (AML), Lymphome, chronische myeloische Leukämie (CML), myelodysplastische Syndrome (MDS) und Autoimmunkrankheiten. Zwei Faktoren gingen mit einer erhöhten behandlungsbezogenen Mortalität einher: Alter über 16 Jahren und Transplantation vor dem Jahr 1996.

Zwei retrospektive Studien verglichen die Infusion von Knochenmarkzellen mit der von PBSC (*peripheral blood stemcells*) bei Kindern und Jugendlichen mit akuter Leukämie (94) und SAA (95). Beide konkludierten, dass die Infusion von Knochenmarkzellen zu besseren Ergebnissen führte.

Besonders im pädiatrischen Setting spielt die Vermeidung von schweren therapiebezogenen Langzeitschäden und die Erhaltung von Lebensqualität eine beachtenswerte Rolle. Dazu gehören vor allem schwere Wachstumsstörungen, Unfruchtbarkeit, sekundären Malignitäten und Beeinträchtigung der intellektuellen Leistungsfähigkeit. Die Einführung von Konditionierungsregimen von niedrigerer Intensität stellte einen wichtigen Schritt in diese Richtung dar. (96)

1.13 Chimärismusanalyse

Der Begriff „Chimäre“ stammt aus der griechischen Mythologie und beschreibt ein Mischwesen aus Löwe, Ziege und Schlange. Homer beschreibt die Kreatur in seinem Werk Ilias als feuerspeiendes Ungeheuer, das Teile Kleinasiens terrorisierte, bis es schließlich der heldenhafte Bellerophon zur Strecke brachte. (97) Ford verwendete den Begriff bereits 1956 für den Fachbereich der Transplantationsmedizin, da ein Mensch nach erfolgter Transplantation gewissermaßen ein Mischwesen aus Empfänger- und Spender-Zellen darstellt. (98)

Unmittelbar nach einer HSCT besteht das hämatopoetische System des Patienten aus einer Mischung autologer und allogener Zellen. Mit Hilfe der Chimärismusanalyse kann nach einer HSCT festgestellt werden, ob die Leukozyten im Blut oder Knochenmark des Patienten von autologen oder allogenen Stammzellen stammen. Die Chimärismusanalyse ermöglicht einen tiefen Einblick in die Dynamik des Engraftments im Körper des Patienten. Zahlreiche Studien bestätigen, dass eine genaue quantitative Analyse des Chimärismusstatus bei der frühzeitigen Erkennung von Abstoßungsreaktionen, eines Wiederauftretens der zugrundeliegenden malignen oder non-malignen Erkrankung und bei der Identifizierung von Risikopatienten für GvHD helfen kann. (84,99,100)

Abhängig von Zusammensetzung und Dynamik der hämatopoetischen Zellen im Blut bzw. Knochenmark des Patienten wird das Ergebnis als MC (*mixed chimerism*), CC (*complete chimerism*), dMC (*decreasing MC*) oder iMC (*increasing MC*) bezeichnet. Ursprünglich wurde angenommen, dass ein vollständiger Chimärismus essentiell für ein erfolgreiches Engraftment sei. Als man beobachtete, dass die hämatopoetischen Systeme des Empfängers und des Spenders nach einer HSCT temporär parallel existieren können, nannte man dieses Phänomen MC. Stammen nach einer HSCT alle hämatopoetischen Zellen vom Spender, wird dies als CC bezeichnet. In einem Patienten mit MC kann die Zahl an autologen Zellen steigen oder sinken. Dieses Geschehen wird iMC bzw. dMC genannt. (101)

Ein nicht stattfindender Übergang zur Spenderhämatopoese oder die Unfähigkeit einen CC aufrechtzuerhalten ist meist mit einer Abstoßungsreaktion oder einer Wiederkehr der zugrundeliegenden Erkrankung assoziiert. Im Gegensatz dazu steht die Entstehung eines CC in Verbindung mit einem geringeren Rückfallrisiko. (102-105) Einen Sonderfall bilden non-maligne Erkrankungen wie SAA (Schwere Aplastische Anämie), Knochenmarksinsuffizienz, Immunschwächekrankheiten und Stoffwechselerkrankungen. Bei diesen Erkrankungen reicht oft ein MC aus, um zu einer dauerhaften Heilung zu führen. Aber auch bei non-malignen Erkrankungen ist ein CC ein erwünschtes Ergebnis, da MC, insbesondere bei Anwesenheit von >30% autologer Zellen, in Verbindung mit höheren Raten an Transplantatversagen und Abstoßungsreaktionen zu stehen scheint. (106)

Bei der Differenzierung von CC und MC spielt natürlich die Sensitivität der Chimärismusanalyse, welche sich bei den verschiedenen Analysemethoden erheblich unterscheidet, eine entscheidende Rolle. Sensitive Methoden sind in der Lage, auch minimale Anteile autologer Zellen zu detektieren. (101) Die Sensitivität und Reliabilität der Methode ist daher essentiell für eine korrekte Darstellung und Interpretation des Chimärismusstatus. (108)

Während qualitative Chimärismusanalysen lediglich das Vorhandensein von Spenderzellen anzeigen, können quantitative Analysen die Ausprägung des Chimärismus in % beurteilen. Analysen in festgelegten Abständen ermöglichen die Beurteilung des Engraftments über Zeit.

Für die Chimärismusanalyse wird meist Blut oder Knochenmark verwendet. Die zu analysierenden Zellen können auch in deren Subpopulationen analysiert werden. Es ist möglich, dass eine Subpopulation, zum Beispiel NK-Zellen, zu 100% vom Spender stammen, während andere vollständig oder teilweise vom Empfänger ausgehen. Diese Konstellation wird auch als „*split chimerism*“ (geteilter Chimärismus) bezeichnet. (107,108)

Es gibt verschiedene Möglichkeiten Spender- von Empfängerzellen zu unterscheiden. Die meisten Methoden bedienen sich einer PCR (polymerase chain reaction), um die benötigten informationsgebenden DNA-Fragmente zu vervielfachen. Eine Ausnahme stellt FISH (Fluorescence in situ Hybridisation) dar, die Zellen anhand der Geschlechtschromosomen XY unterscheidet. Die Methode ist somit lediglich für Empfänger-Spenderpaare mit ungleichen Geschlechtern anwendbar. (109)

Die gängigste Methode zur Unterscheidung von Empfänger- und Spender-DNA stützt sich auf sogenannte Polymorphismen. Die Menschheit ist genetisch zu 99.7% identisch. Die Ungleichheit der restlichen 0.3% beruht vor allem auf Polymorphismen. Polymorphismen sind genetische Varianten, die in der Bevölkerung relativ häufig vorkommen und zum größten Teil für die individuelle genetische Vielfalt der Menschen verantwortlich sind. Zu diesen Polymorphismen gehören STR (*short tandem repeats*), SNP (*single nucleotide polymorphism*) und VNTR (*variable number*

tandem repeats). (110)

1.13.1 STR-PCR

STRs sind Abschnitte der DNA in dem sich bestimmte Sequenzen von 2 bis 6 Basenpaaren wiederholen. Die Anzahl der Wiederholungen dieser Sequenzen bestimmt die Länge der betroffenen Abschnitte. Diese ist sehr variabel, sodass sie sich von Person zu Person meist unterscheidet. (111)

Bei der Chimärismusanalyse ist der Einsatz von STR-PCR weit verbreitet. Mit dieser Methode lässt sich nahezu jedes Spender-Empfängerpaar unterscheiden. Mit einer Sensitivität von 0,4 - 5% ist diese Methode der SNP-PCR unterlegen. (101,105,112)

Besonders Patienten mit iMC stehen in der Gefahr, einen Rückfall zu erleiden. Huisman et al. (105) stellte in einer Studie mit AML Patienten fest, dass Rückfälle in der Regel sehr plötzlich und schnell auftreten, sodass die Sensitivität der STR-PCR nicht ausreicht, um diese Patienten früh genug zu identifizieren. Man benötige sensitivere Methoden und engmaschige Beobachtung des Chimärismusstatus, um Risikopatienten frühzeitig erkennen zu können.

Eine solche sehr sensitive Methode stellt die SNP-PCR dar.

1.13.2 SNP-PCR

In dieser Studie wurde eine relativ neue und sehr sensitive Methode zur Chimärismusanalyse mittels SNP Technologie verwendet.

SNPs sind Variationen einzelner Basenpaare an bestimmten Stellen des Genoms. Sie repräsentieren die häufigste Form genetischer Variation in der DNA des Menschen. Es wird angenommen, dass ein Mensch zwischen 2.8 und 3.9 Millionen dieser individuellen Varianten einzelner Basenpaare besitzt. SNPs sind nicht gleichmäßig auf der humanen DNA verteilt. Manche Regionen der DNA sind sehr konstant, während andere, wie zum Beispiel der MHC-Komplex am Chromosom 6,

sehr heterozygot sind, stark variieren und zahlreiche SNPs beinhalten können. (113,114) In kodierenden Regionen der DNA kommen rund 30% weniger SNPs vor als in nicht-kodierenden Abschnitten. SNPs existieren in Form von Transitionen, Substitutionen und Transversionen. SNPs in kodierenden Regionen können Veränderungen der verschlüsselten Aminosäure hervorrufen oder stumm verlaufen. (110)

Seit 1998 gab es mehrere Versuche, ein schnelles und verlässliches System zur Chimärismusanalyse herzustellen, das sich auf die Detektion von SNPs stützt. Im Jahr 2002 gelang es Alizadeh et al. (112) eine auf real time PCR basierende Methode zu entwickeln, die sich auf die TaqMan Technologie (Applied Biosystems, USA) stützt und quantitative SNP-Analysen nach allogener HSCT ermöglicht. Mit Hilfe der relativ neuen real time PCR kann die Wachstumsrate eines PCR-Produkts in jedem Zyklus bestimmt werden.

Ein großer Vorteil der real time SNP-Technologie ist ihre Sensitivität von <0.1%. (115) Diese ermöglicht das Aufspüren von sehr geringen Mengen an Empfänger DNA in den Proben. Die SNP-PCR ist in der Lage, bereits früh einen MC festzustellen, wo andere Methoden noch einen CC anzeigen würden. Somit ist diese Methoden für die frühzeitige Identifizierung von Patienten mit drohendem leukämischen Rückfall besser geeignet als die STR- oder FISH-Methode. Ein zusätzlicher Vorteil der SNP-Analyse gegenüber der STR-Analyse ist deren kurze Dauer. (116) Man benötigt 7 SNPs mit einer Allelfrequenz von 50% um 99% aller Spender-Empfänger-Paare voneinander unterscheiden zu können. (117)

2 Patienten, Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

In Rahmen dieser Arbeit werden die Daten aller pädiatrischen Patienten herangezogen, die seit dem Jahr 2004 an der Klinischen Abteilung für Pädiatrische Hämato-Onkologie im LKH-Universitätsklinikum Graz eine allogene HSCT erhielten, deren Erfolg mittels SNP-Technologie beurteilt wurde und die zum Zeitpunkt der Datensammlung am Leben waren. Die klinischen Daten wurden in Retrospektive aus den ambulanten und stationären Krankenakten sowie aus dem Patientendokumentationsprogramm MEDOCS entnommen und in Excel-Tabellen festgehalten.

Untersucht wurden 29 Jungen (64%) und 16 Mädchen (36%) im Alter von 2 Monaten bis 23 Jahren. Das mittlere Alter zum Zeitpunkt der Transplantation betrug $10,0 \pm 6,7$ Jahre. Da vier Patienten zwei Mal und ein Patient drei Mal transplantiert wurden, handelt es sich um insgesamt 45 Transplantationen bei 39 Patienten. Aufgrund der neuerlichen Konditionierung wurde jede Transplantation als eigenständiges Ereignis betrachtet.

Die Indikationen lassen in 4 Gruppen unterteilen: Leukämien (n=20), erworbene nicht maligne Krankheiten (n=11), Solide Tumoren (n=8), und Angeborene Störungen (n=6). Mit Abstand die häufigste maligne Erkrankung war ALL (n=9), gefolgt von AML (n=7), MDS (n=2) und Neuroblastom (n=4). Zu den malignen Grunderkrankungen zählen des Weiteren Osteosarkom (n=2), JMML (n=1), Morbus Hodgkin (n=1), Rhabdomyosarkom (n=1) und Medulloblastom (n=1). Die häufigste non-maligne Indikation für eine HSCT war SAA (n=8), gefolgt von Morbus Hurler (n=2), SCID (n=2), XLPS (n=1), EBV-AHS (n=1), Evans Syndrom (n=1), refraktäre Zytopenie (n=1) und ALPS (n=1). Eine Übersicht zu den verschiedenen Grunderkrankungen ist in Abbildung 4 dargestellt.

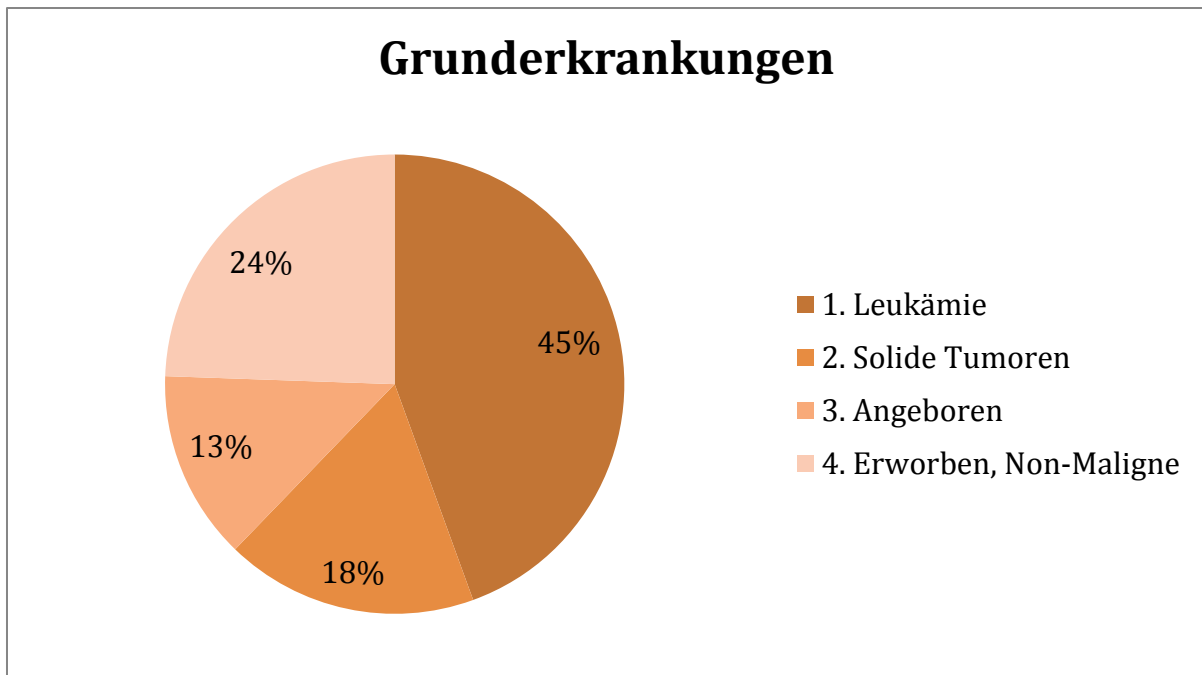


Abbildung 4 Grafische Darstellung der Grunderkrankungen. Diese lassen sich einteilen in Leukämien (20), Solide Tumoren (8), Angeborene (6) und erworbene non-maligne Krankheiten (11) unterteilen.

Als Vorbereitung auf die HSCT wurde bei 16 Patienten (36%) MAC und bei 22 Patienten (49%) RIC angewandt. Die NMA Konditionierung wurde bei 6 Patienten (13%) bevorzugt und in einem Fall wurde auf eine Konditionierung verzichtet.

In 17 Fällen wurden Stammzellen eines haploidenten Stammzellspenders, in 15 Fällen von einem Elternteil und in jeweils einem Fall von einem Bruder bzw. einer Tante genutzt. 13 Patienten erhielten Stammzellen eines HLA-identen Geschwisters (*matched sibling donor*, MSD). 12 Patienten erhielten die eines HLA-identen Fremdspenders (*matched unrelated donor*, MUD), 2 Patienten die eines mismatched Fremdspenders (*mismatched unrelated donor*, MMUD) und ein Patient erhielt die Stammzellen eines HLA-identen verwandten Spenders (*matched related donor*, MRD), in diesem Fall handelte es sich um die Mutter des Patienten.

Die Stammzellen wurden in 24 Fällen (53%) aus dem peripheren Blut gewonnen, wobei die Stammzellen zuvor durch die Gabe von G-CSF aus dem Knochenmark mobilisiert wurden. In 17 Fällen (38%) wurde das Knochenmark als Quelle herangezogen und in 3 Fällen (7%) sowohl peripheres Blut, als auch Knochenmark. In einem Fall wurden Stammzellen aus Nabelschnurblut gewonnen.

In Abhängigkeit von der jeweiligen Grunderkrankung wurden einige der gewonnenen Stammzellsuspensionen manipuliert. Bei 15 davon wurden die T-Zellen anhand der CD3-Rezeptoren depletiert und in 8 Fällen dienten α - und β -Rezeptoren als Erkennungsmerkmal für die Depletion. In 20 Transplantaten wurden CD34+ Zellen (HSC) selektiert. Bei 20 Patienten wurde das Transplantat nicht manipuliert.

	N	hi(%)
Geschlecht		
Buben	29	64
Mädchen	16	36
Konditionierung		
MAC	16	36
RIC	22	49
NMA	6	13
keine Konditionierung	1	2
Stammzellenspende		
haploident	17	38
MSD	13	29
MUD	12	27
MMUD	2	4
MRD	1	2
Übereinstimmung		
match	26	58
mismatch	19	42
Ressource		
KM	17	38
PB	24	53
KM + PB	3	7
Nabelschnurblut	1	2
Manipulation		
unmanipuliert	20	44
$\alpha/\beta/CD19$ Depletion	14	31
CD3/19 Depletion	8	18
andere	3	7
Grunderkrankungen		
Leukämien	21	47
solide Tumoren	8	18
angeborene Erkrankungen	5	11
erworben; nicht maligne	11	24
Malignität		
maligne	28	62
non-maligne	17	38
Haplo-Spender		
	N	hi(%)
Elternteil	14	82
Bruder	2	12
Tante	1	6
MSD-Spender		
Bruder	11	85
Schwester	2	15
Datumsvariablen		
	Min	Max
Transplantationsdatum	24.03.04	05.12.13

Tabelle 1 – Übersicht Patientenkollektiv

2.2 SNP-Chimärismusanalyse

2.2.1 Unterscheidung von Empfänger- und Spender-DNA

Um Spender-DNA von der des Empfängers unterscheiden zu können, wird vor der Transplantation nach informativen SNPs gesucht. Informativ ist ein SNP wenn es ausschließlich in der DNA des Spenders bzw. des Empfängers vorkommt. Bei einer idealen Analyse wird ein SNP identifiziert, das lediglich beim Spender und ein SNP, das allein beim Empfänger besteht. Nur in diesem Fall ist eine zuverlässige Unterscheidung möglich.

Um ein SNP-Profil von Spender und Empfänger erstellen zu können, wird vor der Transplantation DNA aus peripherem Blut des Empfängers bzw. des Spenders extrahiert. Diese wird anschließend mittels PCR analysiert. Im Rahmen dieser PCR wird die DNA auf vorhandene SNPs überprüft. Es handelt sich um 30 SNPs (S1a, S1b, S3, S4a, S4b, S5a, S5b, S6, S7, S8a, S8b, S9, S10a, S10b, S11a, S11b, PECAM1a, PECAM1b, ICAM1a, ICAM1b, HA1a, HA1b, MLH1a, MLH1b, SUR1a, SUR1b, G42863a, G42863b, G42888a, G42888b). Das entstandene SNP-Profil des Empfängers kann anschließend mit dem SNP-Profil des Spenders auf informative Marker überprüft werden. Bei Anwesenheit mehrerer informativer Marker wird jener SNP mit der höchsten PCR-Effizienz ausgewählt.

Folgendes Beispiel soll den Vorgang verdeutlichen:

	EmpfängerIn	SpenderIn	
S1a	+	+	Nicht informativ
S1b	+	+	Nicht informativ
S3	+	-	SNP-Marker für EmpfängerIn positiv, informativ
S4a	-	-	Nicht informativ
S4b	-	-	Nicht informativ
S5a	+	+	Nicht informativ
S5b	-	-	Nicht informativ
S6	-	+	SNP-Marker für SpenderIn positiv, informativ
Etc.	Etc.	Etc.	

2.2.2 SNP Chimärismusanalyse aus WBC

Durchflusszytometrie

Nach 12minütiger Erythrozytolyse mit einem Ammoniumchlorid-Puffer (pH 7,3) werden die Zellen für 10min mit 1.300 rpm zentrifugiert und das Zellpellet nach Dekantieren des Überstandes einmal mit PBS (Gibco) gewaschen. Nach Dekantieren des Überstandes wird die Zellzahl mit PBS/10% Schafserum (Gibco) auf ca. 1×10^6 /ml eingestellt und unspezifische Bindungen 15 min auf Eis blockiert.

Die 20minütige Inkubation der Zellen mit Antikörpern wird im Kühlschrank durchgeführt. Die verwendeten Antikörper sind anti-mouse IgG, anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD14, anti-CD19, anti-CD31, anti-CD34, anti-CD45, anti-CD45RA, anti-CD56, anti-TCR α,β , anti-TCR γ,δ gekoppelt mit den Farbstoffen FITC, PE, ECD, PC5, PC7 (Beckman) und anti-CD62L FITC (BD). Nach Ablauf der Inkubationszeit werden überschüssige Antikörper durch Waschen mit 1 ml HUGO (PBS/0,1% Natrium-Azid, BSA) entfernt und das Zellpellet in 200 μ l HUGO resuspendiert.

Zur Intrazellulärfärbung mit anti-Ki-67 PE (BD) werden die Zellen nach der Extrazellulärfärbung 15 min mit Reagenz 1 des IntraPrep™ Leucocytic Permeabilization Reagent Kits (Beckman) fixiert, 5 min mit 300 x g zentrifugiert, mit Reagenz 2 desselben Kits 5 min permeabilisiert und anschließend 15 min bei Raumtemperatur und dunkel mit dem Antikörper inkubiert.

Nach Waschen mit 1 ml PBS und Zentrifugation für 5 min mit 300 x g werden die Zellen in 200 μ l 1X IOTest 3 Fixative Solution (Beckman Coulter) resuspendiert und müssen innerhalb von 2 Stunden gemessen werden.

Die durchflusszytometrische Messung erfolgt an einem FC500 (Beckman Coulter). Die Auswertung mit der Software CxP.

DNA Extraktion

DNA wird aus Peripherblut bzw. Knochenmark mittels QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN) lt. Herstellervorschrift extrahiert. Dabei wird das Probenmaterial mit Proteinase und einem Lysepuffer bei 56°C für 10 Minuten inkubiert. Nach DNA-

Fällung mit absolutem Ethanol wird die Probe auf eine Säule aufgetragen, zweimal gewaschen und mit einem Elutionspuffer aus der Säule gelöst.

Konzentrationsmessung

Die Probe wird nach Extraktion 1:10 mit Aqua dest. (Promega) verdünnt und mit dem Biophotometer plus (Eppendorf) bei 260 nm und 280 nm gegen Aqua dest. vermessen. Die Berechnung der Konzentration erfolgt nach folgender Formel:

$$OD_{260nm} * 50 * 10/1000 = \mu\text{g DNA}/\mu\text{l}$$

Die Ratio (OD_{260nm}/OD_{280nm}) soll für DNA zwischen 1,5 und 2,0 liegen.

Real Time PCR SNP

Nach Verdünnung der DNA auf 50ng/ μl erfolgt der PCR-Ansatz in der Laminar Air Flow. Je SNP bzw. Gapdh werden eine Negativkontrolle, eine Empfänger-Kalibrator-DNA, eine Spender-Kalibrator-DNA und die Probe im Doppelansatz pipettiert. Eingesetzt werden 600nM Forward-Primer, 600nM Reverse-Primer und 200nM FAM-TAMRA-Sonde (Ingenetix), 1X LightCycler 480 Probesmaster (Roche) und 250 ng DNA. In Tabelle X ist eine Auflistung der gebräuchlichen Oligonucleotide und TaqMan Probes zu finden.

Nach einer 10 minütigen Denaturierung bei 95°C folgen 50 Zyklen mit 95°C für 10 Sekunden und 60°C für 45 Sekunden. PCR und Analyse werden an einem LightCycler 480 II (Roche) durchgeführt.

Berechnung

Die Berechnung der Ergebnisse wird mit MS-Excel durchgeführt. Es werden die Ct-Werte herangezogen (Threshold-Cycle):

- $\Delta\text{Ct}_{\text{Sample}}$: $\text{Ct}_{\text{SNP d. Probe}} - \text{Ct}_{\text{GAPDH d. Probe}}$
- $\Delta\text{Ct}_{\text{Calibrator}}$: $\text{Ct}_{\text{SNP d. Kalibrators}} - \text{Ct}_{\text{GAPDH d. Kalibrators}}$
- $\Delta\Delta\text{Ct}$: $\Delta\text{Ct}_{\text{Calibrator}} - \Delta\text{Ct}_{\text{Sample}}$
- $\text{SNP in \%} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} * 10$

Name	5'- 3'
S1a F	GGT ACC GGG TCT CCA CAT GA
S1b F	GTA CCG GGT CTC CAC CAG G
S1 R	GGG AAA GTC ACT CAC CCA AGG
S3 F	CTT TTG CTT TCT GTT TCT TAA GGG C
S3 R	TCA ATC TTT GGG CAG GTT GAA
S4F	CTG GTG CCC ACA GTT ACG CT
S4a R	AAG GAT GCG TGA CTG CTA TGG
S4b R	AGG ATG CGT GAC TGC TCC TC
S5a F	AAA GTA GAC ACG GCC AGA CTT AGG
S5b F	AGT TAA AGT AGA CAC GGC CTC CC
S5 R	CAT CCC CAC ATA CGG AAA AGA
S6 F	CAG TCA CCC CGT GAA GTC CT
S6 R	TTT CCC CCA TCT GCC TAT TG
S7 F	TGG TAT TGG CTT TAA AAT ACT GGG
S7 R	TGT ACC CAA AAC TCA GCT GCA
S8a F	CTG GAT GCC TCA CTG ATC CA
S8b F	GCT GGA TGC CTC ACT GAT GTT
S8 R	TGG GAA GGA TGC ATA TGA TCT G
S9 F	GGG CAC CCG TGT GAG TTT T
S9 R	TCA GCT TGT CTG CTT TCT GGA A
S10a F	GCC ACA AGA GAC TCA G
S10b F	TTA GAG CCA CAA GAG ACA ACC AG
S10 R	TGG CTT CCT TGA GGT GGA AT
S11a F	TAG GAT TCA ACC CTG GAA GC
S11b F	CCC TGG ATC GCC GTG AA
S11 R	CCA GCA TGC ACC TGA CTA ACA
Gapdh F	GGA CTG AGG CTC CCA CCT TT
Gapdh R	GCA TGG ACT GTG GTC TGC AA
PECAM1 F	GGA TCT ATG ACT CAG GGA CAT ATA AAT G
PECAM1a R	GAC TCA CCT TCC ACC AAC CCG
PECAM1b R	GGA CTC ACC TTC CAC CAA CCT C
ICAM1 F	GCA CTT TCC CAC TGC CCA T
ICAM1a R	AGA GCA CAT TCA CGG TCA CCC AC
ICAM1b R	AGA GCA CAT TCA CGG TCA CCA TT
HA1 F	TGC TGG CGG ACG TGG
HA1a R	GCT CTC ACC GTC ACG CAA
HA1b R	GCT CTC ACC GTC ATG CCG
MLH1 F	GAG ACC CAG CAA CCC ACA GA
MLH1a R	TCG TGC TCA CGT TCT TCC TCC
MLH1b R	TCG TGC TCA CGT TCT TCC ATT
SUR1 F	GTC TTC CAG AGT CCC CGA CAG
SUR1a R	TGC CAC CCT CCC TCC CTA C
SUR1b R	TGC CAC CCT CCC TCC CTA T
G42863 F	TGG CAC ATC TGG CAA AAT CTC
G42863a R	GCT TGT GGA TGA AGG AGA A
G42863b R	GGC TTG TGG AAT GAA GGA GTC
G42888 F	TTG GTG CTG CTG TAA TCA CTT TTC AT
G42888a R	GGG AGG GGA GGA AGA GAC T
G42888b R	GGG AGG GGA GGA AGA GAG C
SRY F	TGG CGA TTA AGT CAA ATT CGC
SRY R	CCC CCT AGT ACC CTG ACA ATG TAT T

Tabelle 2 - Auflistung der verwendeten Oligonukleotide für die SNP Analyse

Name	5' - 3'
S1 P	CTG GGC CAG AAT CTT GGT CCT CAC A
S3 P	CAT ACG TGC ACA GGG TCC CCG AGT
S4 P	TCC TGG CAG TGT GGT CCC TTC AGA A
S5 P	CCT GGA CAC TGA AAA CAG GCA ATC CT
S6 P	CCC ATC CAT CTT CCC TAC CAG ACC AGG
S7 P	TCC TCA CTT CTC CAC CCC TAG TTA AAC AG
S8 P	CTC CCA ACC CCC ATT TCT GCC TG
S9 P	TGG AGG ATT TCT CCC CTG CTT CCA GAC AG
S10 P	CAG TGT CCC ACT CAA GTA CTC CTT TGG A
S11 P	CAA GGC TTC CTC AAT TCT CCA CCC TTC C
Gapdh P	CAT CCA AGA CTG GCT CCT CCC TGC
PECAM1 P	TGT GAA CAA CAA AGA GAA AAC CAC TGC AGA GT
ICAM1 P	CAG TGA CTG TCA CTC GAG ATC TTG AGG GC
HA1 P	CCG CTT CGC TGA GGG CCT TGA
G42863 P	ACA GGG AGA GTG ATG TTG GAG CTG GGT
G42888 P	TTC TCT CTC GGG ATT TTC TGG GAA TCA AAA
MLH1 P	ATT CAA GCT GTC CAA TCA ATA GCT GCC G
SUR1 P	CAG GTG GGC TGC GGC AAG TCC
SRY P	AGC AGT AGA GCA GTC AGG GAG GCA GA

Tabelle 3 - TaqMan Probes (3'-TAMRA, 5'-FAM) für die SNP-Chimärismusanalyse

2.2.3 SNP Chimärismusanalyse aus Subpopulationen

Kriterien für eine Chimärismusanalyse aus Subtypen der Leukozyten sind die Klinik, das vorhandene Abstoßungsrisiko und die Entwicklung eines iMC. Im Rahmen der Subtypenanalyse werden T-Zellen (CD3+), B-Zellen (CD19+), Monozyten (CD14+), Natürliche Killerzellen (CD56+) und Granulozyten analysiert.

Dichtegradientenzentrifugation

Nach Verdünnung des Probenmaterials mit PBS (Gibco) im Verhältnis 1:3 und der Vorlage von 15 ml Ficoll (GE Healthcare) für ein Ficoll-Probenverhältnis 1:3 wird dieser mit der Probe vorsichtig überschichtet. Nach der Zentrifugation mit 2.000 rpm für 20 min bei Raumtemperatur und ohne Bremse kann die Intermediärzellschicht, die alle mononukleären Zellen enthält, abgehoben werden. Nach einmaligem Waschen mit PBS wird die Zellzahl mikroskopisch ermittelt.

Granulozytenselektion

Nach Dichtegradientenzentrifugation und Abheben der Intermediärzellschicht wird die Granulozytenschicht (weiße Schicht zwischen Erythrozyten und Ficoll) abgehoben. Die vorhandenen Erythrozyten werden mittels Ammoniumchloridpuffers für 12 min lysiert, 10 min mit 1.300 rpm zentrifugiert, das Granulozytenpellet ad 50 ml mit PBS aufgefüllt und ein weiteres Mal zentrifugiert. Das Pellet wird dann mit 1 ml PBS resuspendiert.

MACS, Selektion der Subtypen CD3+, CD19+, CD14+, CD56+

Die Selektion wird mit den entsprechenden MicroBeads (Miltenyi Biotec) durchgeführt. Dabei werden die mononukleären Zellen mit Antikörpern, die mit magnetischen Partikeln gekoppelt sind, inkubiert. Pro 1×10^7 Zellen werden 20 μ l Antikörper und 80 μ l autoMACS Running Buffer (Miltenyi Biotec) verwendet. Nach 15 minütiger Inkubation im Kühlschrank werden überschüssige Antikörper durch Waschen mit autoMACS Running Buffer und Zentrifugation (10 min mit 300 x g) entfernt und das Zellpellet in 500 μ l autoMACS Running Buffer resuspendiert.

Pro Probe wird eine Säule (Miltenyi Biotec) in den Magneten eingespannt, mit 500 μ l autoMACS Running Buffer äquilibriert und die markierte Probe aufgetragen, wobei die magnetisch markierten Zellen in der Säule bleiben und die unmarkierten Zellen durchfließen. Nach dreimaligem Waschen mit autoMACS Running Buffer wird die Säule aus dem Magneten entfernt und die Probe mit einem Stempel und 1 ml autoMACS Running Buffer durchgedrückt. Um die Zellen anzureichern, werden sie 10 min mit 300 x g zentrifugiert und das Pellet in 200 μ l PBS resuspendiert.

Analyse der Reinheit der Populationen

Je Probe werden 50 μ l entnommen und mit einem Antikörperstockmix, bestehend aus anti-CD14 FITC, anti-CD56 PE, anti-CD45 ECD, anti-CD20 PC5 und anti-CD3 PC7 (Beckman Coulter) 20 min im Kühlschrank inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit werden überschüssige Antikörper durch Waschen mit 1 ml HUGO (PBS/0,1% Natrium-Azid, BSA) entfernt und das Zellpellet in 200 μ l HUGO resuspendiert. Die durchflusszytometrische Messung erfolgt an einem FC500 (Beckman Coulter). Die Auswertung mit der Software CxP. Die Angabe der Reinheit erfolgt in Prozent der Gesamtzellen.

DNA-Extraktion

DNA wird aus den Subtypenpopulationen mittels QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN) lt. Herstellervorschrift extrahiert. Dabei wird das Probenmaterial mit Proteinase und einem Lysepuffer bei 56°C für 10 Minuten inkubiert. Nach DNA-Fällung mit absolutem Ethanol wird die Probe auf eine Säule aufgetragen, zweimal gewaschen und mit einem Elutionspuffer aus der Säule gelöst.

Konzentrationsmessung

Die Probe wird nach Extraktion 1:10 mit Aqua dest. verdünnt und mit dem Biophotometer plus (Eppendorf) bei 260 nm und 280 nm gegen Aqua dest. vermessen. Die Berechnung der Konzentration erfolgt nach folgender Formel:

$$OD_{260nm} * 50 * 10 / 1000 = \mu g \text{ DNA} / \mu l$$

Die Ratio (OD_{260nm} / OD_{280nm}) soll für DNA zwischen 1,5 und 2,0 liegen.

RealTime PCR SNP

Nach Verdünnung der DNA auf 50ng/μl erfolgt der PCR-Ansatz in der Laminar Air Flow. Je SNP bzw. Gapdh werden eine Negativkontrolle, eine Empfänger-Kalibrator-DNA, eine Spender-Kalibrator-DNA und die Probe im Doppelansatz pipettiert. Eingesetzt werden 600nM Forward-Primer, 600nM Reverse-Primer und 200nM FAM-TAMRA-Sonde (Ingenetix), 1X LightCycler 480 Probesmaster (Roche) und 250 ng DNA.

Nach einer 10 minütigen Denaturierung bei 95°C folgen 50 Zyklen mit 95°C für 10 Sekunden und 60°C für 45 Sekunden. PCR und Analyse werden an einem LightCycler 480 II (Roche) durchgeführt.

Berechnung

Die Berechnung der Ergebnisse wird mit MS-Excel durchgeführt. Es werden die Ct-Werte herangezogen (Threshold-Cycle):

- $\Delta Ct_{\text{Sample}}$: $Ct_{\text{SNP d. Probe}} - Ct_{\text{GAPDH d. Probe}}$
- $\Delta Ct_{\text{Calibrator}}$: $Ct_{\text{SNP d. Kalibrators}} - Ct_{\text{GAPDH d. Kalibrators}}$
- $\Delta\Delta Ct$: $\Delta Ct_{\text{Calibrator}} - \Delta Ct_{\text{Sample}}$
- SNP in % = $2^{-\Delta\Delta Ct} * 100$

2.2.4 Messpunkte für die Chimärismusanalyse

Bei der Chimärismusanalyse wird der prozentuale Anteil des Empfängers bzw. des Spenders anhand der gesamten Population der Leukozyten bzw. der Subpopulationen weißer Blutzellen bestimmt. Die Analyse wird bis zum 28. Tag nach der Transplantation wöchentlich (Tag 7, 14, 21, 28) und danach ca. alle 30 Tage (Tag 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330, 360) durchgeführt. Nach einem Jahr erfolgt die Analyse halbjährlich (Tag 540, 720).

2.2.5 Einteilung des Chimerismus

In der vorliegenden Arbeit wird der Chimärismus in CC, MC, iMC und tMC (transient MC bzw. passagerer MC) eingeteilt.

CC geht mit einem prozentualen Anteil von $\geq 99\%$ Spenderzellen einher. Ein MC besteht dementsprechend bei der Anwesenheit autologer Zellen von $>1\%$. Wird die Chimärismusanalyse über einen Zeitraum in gewissen Abständen beobachtet, lässt sich der MC neben dem stabilen Chimärismus in zwei weitere Subtypen unterteilen. Als iMC wird der Chimärismus bezeichnet, wenn der Anteil autologer Zellen zwischen zwei Messpunkten um $\geq 5\%$ steigt. Dieser Zustand wird mit höheren Rückfallraten in Verbindung gebracht. (118,119) Als tMC wird ein kurzzeitiger Übergang in einen MC bezeichnet, der bis zum darauffolgenden Messpunkt wieder in einen CC übergeht.

2.3 Statistik

Zu Beginn der statistischen Analysen wurden sämtliche Variablen auf deren Voraussetzungen hin überprüft. Die Überprüfung auf Normalverteilung der Variablen erfolgte mittels Shapiro Wilk Test ($p > 0.05$ Normalverteilung der Daten wird angenommen) und der visuellen Dateninspektion mittels Q-Q Plots.

Für den Vergleich von zwei unabhängigen Stichproben wurde der verteilungsfreie Mann-Whitney-U-Test zur Untersuchung der Fragestellungen herangezogen. Die Darstellung erfolgte hierbei unter Angabe der Mediane und der Signifikanzen in einem Boxplot Diagramm. Der Mann-Whitney U-Test ist ein nichtparametrischer Test, der zwei unpaarige Gruppen untersucht. Ziel des Testes ist es, die Signifikanz der Übereinstimmung von zwei Verteilungen zu überprüfen. Die Testwahrscheinlichkeit wurde beim einem p-Wert $< 0,05$ als statistisch signifikant betrachtet. Zur Vermeidung eines Alphafehlers durch multiples Testen wurden die Ergebnisse einer Bonferroni-Korrektur unterzogen.

Für Mehrgruppenvergleiche bei unabhängigen Stichproben wurde der verteilungsfreie Kruskal-Wallis Test durchgeführt. Die Darstellung der deskriptiven Statistik erfolgte auch hier mittels Median und den Perzentilen (25-Perzentil und 75-Perzentil). Die einzelnen paarweisen Vergleiche wurden mittels, der in der Software SPSS 21, zum Kruskal-Wallis Test implementieren paarweisen Gruppenvergleiche durchgeführt. Diese Gruppenvergleiche wurden aufgrund des erhöhten Alphafehlers durch multiples Testen in derselben Stichprobe einer Bonferroni-Korrektur unterzogen. Ein p-Wert von 0.05 wurde auch bei diesen Tests als statistisch signifikant betrachtet.

Alle grafischen Darstellungen wurden in der Statistiksoftware GraphPad Prism 6 beziehungsweise in Excel Version 2010 erstellt. Sämtliche statistischen Auswertungen erfolgten mittels der Software SPSS 21.

3 Ergebnisse

Im Zeitraum März 2004 bis April 2013 wurden 25 Buben und 14 Mädchen im Alter von 2 Monaten bis 23 Jahren an der Klinischen Abteilung für pädiatrische Hämatologie im LKH Universitätsklinikums Graz transplantiert. Die Grunderkrankungen waren Leukämien (ALL n=9, AML n=7, MDS n=2, JMML n=1, Mb. Hodgkin n=1), Solide Tumoren (Neuroblastom n=4, Medulloblastom n=1, Rhabdomyosarkom n=1, Osteosarkom n=2), erworbene non-maligne (SAA n=8, refraktäre Zytopenie n=1, refraktäre EBV AHS n=1, Evans Syndrom n=1) und angeborene Erkrankungen (Mb. Hurler n=2, SCID n=2, X-LPS n=1, ALPS n=1).

3.1 Chimärismusanalyse aus WBC

Die Chimärismusanalysen der Patienten erfolgte am Tag 7, 14, 21, 28, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330, 360 und 720.

Am Tag 7 wurde ein arithmetisches Mittel von 61,23% ausgemacht, das bis zum Tag 14 auf 85,88% stieg. Am Tag 28 lag der Durchschnittswert bei 92,44%. Bis zum Tag 720 hielt sich der Chimärismus-Mittelwert >90%. Tabelle 4 zeigt eine Übersicht über die gemessenen Chimärismuswerte, sowie deren Standardabweichungen und Verteilung.

Zeit	N	Mittelwert	SD	Median	25 Perz.	75 Perz.	Min	Max
		%	%	%	%	%	%	%
Tag7	43	61,23%	31,82%	73,65%	33,36%	88,20%	1,73%	99,90%
Tag14	44	85,88%	26,82%	97,51%	87,42%	99,83%	1,50%	100,00%
Tag21	44	89,10%	24,81%	97,62%	93,08%	99,64%	0,00%	100,00%
Tag28	44	92,44%	20,59%	98,27%	95,94%	99,77%	1,91%	100,00%
Tag60	43	94,73%	14,38%	99,36%	96,19%	99,81%	16,38%	100,00%
Tag90	43	92,75%	16,89%	99,16%	93,77%	99,89%	15,99%	100,00%
Tag120	41	93,27%	16,20%	98,80%	95,61%	99,85%	16,49%	100,00%
Tag150	42	93,90%	15,92%	99,80%	96,34%	99,97%	20,17%	100,00%
Tag180	39	90,95%	22,43%	99,53%	96,06%	99,97%	3,07%	100,00%
Tag210	34	92,54%	18,25%	99,77%	97,69%	100,00%	20,38%	100,00%
Tag240	35	93,33%	16,26%	99,31%	96,76%	100,00%	33,04%	100,00%
Tag270	33	93,96%	16,29%	99,56%	97,21%	100,00%	30,35%	100,00%
Tag300	29	98,55%	2,80%	99,80%	98,17%	100,00%	87,80%	100,00%
Tag330	29	96,28%	12,10%	99,64%	98,58%	100,00%	35,23%	100,00%
Tag360	34	97,22%	9,78%	99,63%	98,89%	100,00%	42,93%	100,00%
Tag540	32	95,65%	11,45%	99,78%	98,42%	100,00%	42,63%	100,00%
Tag720	28	95,48%	11,83%	99,49%	97,23%	99,90%	43,83%	100,00%

Tabelle 4 - Chimärismusanalyse des Patientenkollektivs aus WBC

Der Verlauf der Mittelwerte aller Chimärismusmessungen ist in Abbildung 5 dargestellt.

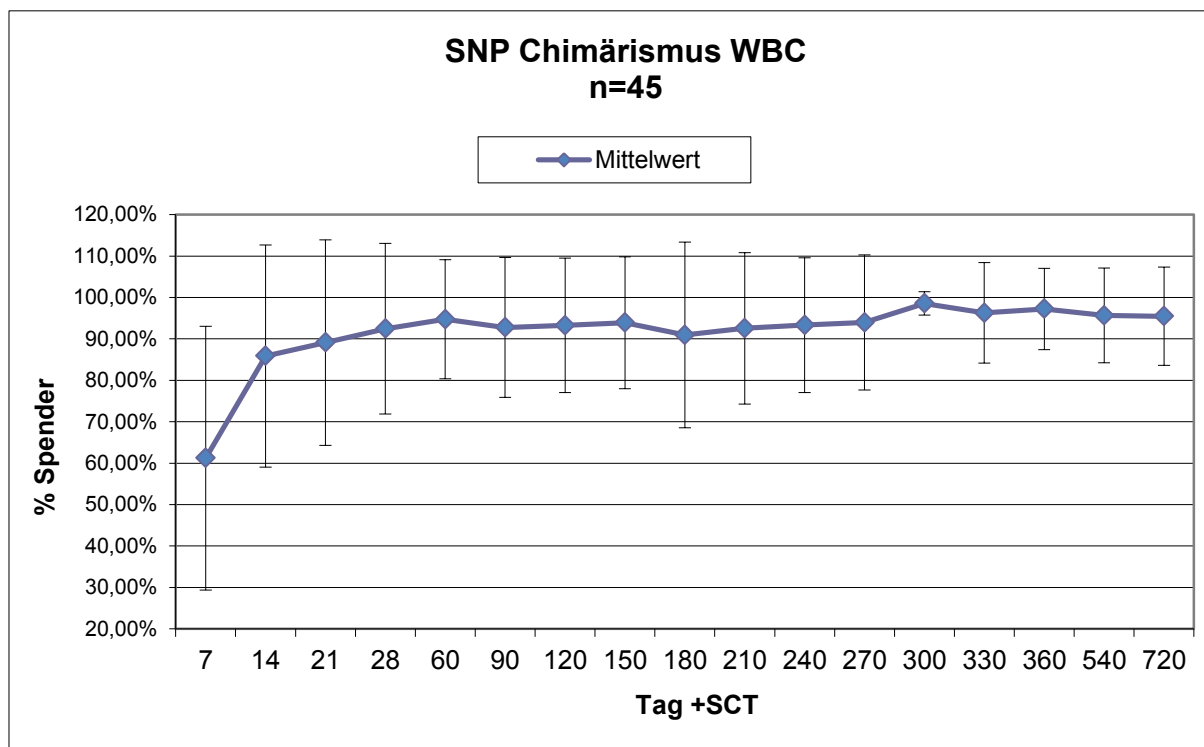


Abbildung 5 – Verlauf der WBC Chimärismus-Mittelwerte und deren Standardabweichungen

Der Median steigt von 73,65% an Tag 7 auf 97,51% an Tag 14. Danach hält sich der Median bei >98%. Der Verlauf ist in Abbildung 6 dargestellt.

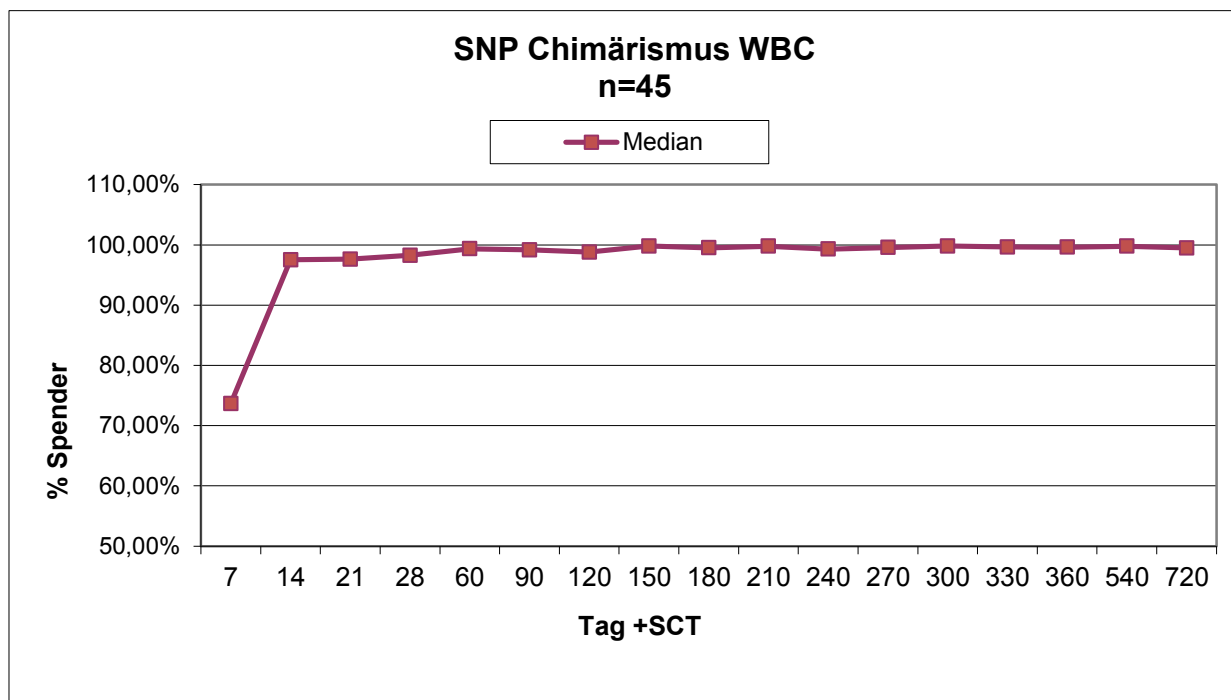


Abbildung 6 – Verlauf der Mediane der WBC Chimärismuszerte

3.1.1 Mismatch vs. Match

In der Detailanalyse wurden Patienten nach mismatch Transplantationen ($\leq 7/10$) mit HLA-identen (matched) Transplantationen verglichen. In Abbildung 7 wird der Verlauf der matched (n=26) und mismatched (n=19) Mediane verglichen. Dabei zeigen sich vor allem in den ersten 28 Tagen Unterschiede. Der Median der matched-Patienten liegt an allen Messpunkten unter dem der mismatched-Patienten.

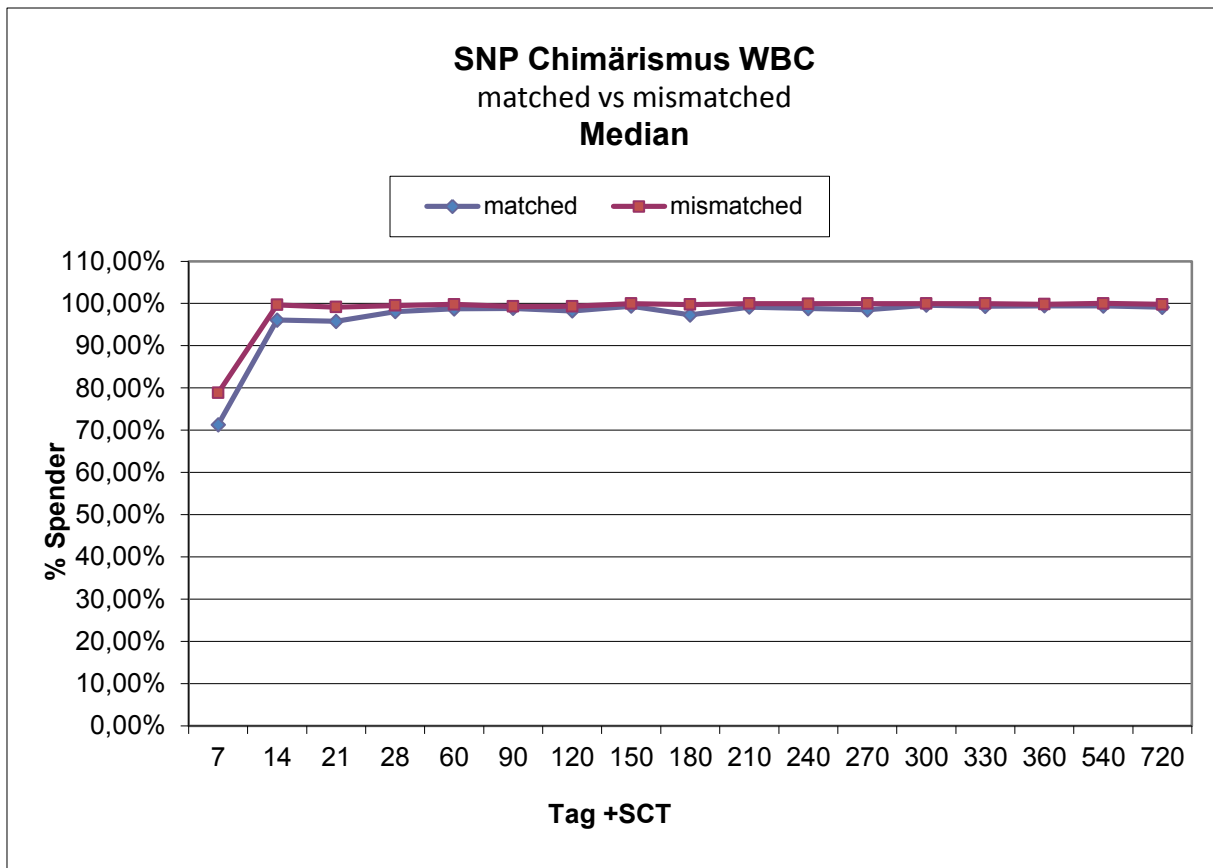


Abbildung 7 – Gegenüberstellung der Mediane von matched und mismatched

Es ergaben sich signifikante Unterschiede an Tag 14, 60, 120, 150, 210, 270 und 540 (siehe Tabelle 5). An fünf der sieben signifikanten Zeitpunkte befindet sich der Median der mismatch-Gruppe im Bereich eines CC ($\geq 99\%$) während in der match-Gruppe ein MC ($< 99\%$) vorliegt. Nach der Durchführung einer Bonferroni-Korrektur zur Vermeidung einer α -Fehler-Kumulierung durch multiples Messen war allerdings keiner der Unterschiede signifikant.

	mismatched			matched			p-Wert	p-Wert adj.
	Median	25 Perzentil	75 Perzentil	Median	25 Perzentil	75 Perzentil		
Tag7	78,85%	38,56%	94,15%	71,28%	32,74%	84,09%	,600	1,000
Tag14	99,68%	92,95%	99,99%	96,09%	84,78%	99,05%	,038	,646
Tag21	99,17%	93,81%	99,95%	95,79%	92,21%	98,88%	,108	1,000
Tag28	99,53%	96,93%	99,94%	98,08%	95,41%	99,59%	,137	1,000
Tag60	99,79%	99,11%	99,91%	98,74%	94,78%	99,78%	,039	,671
Tag90	99,31%	97,07%	99,90%	98,85%	93,30%	99,89%	,632	1,000
Tag120	99,33%	98,62%	99,97%	98,25%	89,88%	99,72%	,035	,592
Tag150	99,96%	99,30%	100,00%	99,37%	93,67%	99,93%	,026	,435
Tag180	99,96%	99,19%	100,00%	98,80%	92,43%	99,93%	,057	,968
Tag210	99,76%	98,70%	99,98%	97,31%	89,49%	99,77%	,011	,186
Tag240	99,96%	99,80%	100,00%	99,15%	89,24%	99,82%	,127	1,000
Tag270	99,97%	99,42%	100,00%	98,49%	93,58%	99,89%	,043	,739
Tag300	99,97%	99,08%	100,00%	99,58%	97,84%	99,99%	,308	1,000
Tag330	99,98%	98,85%	100,00%	99,34%	93,79%	99,94%	,077	1,000
Tag360	99,84%	99,33%	100,00%	99,43%	98,39%	99,93%	,218	1,000
Tag540	100,00%	99,71%	100,00%	99,43%	94,27%	99,88%	,044	,744
Tag720	99,79%	96,88%	99,97%	99,09%	96,93%	99,88%	,555	1,000

*Mann Whitney U-Test: Vergleich von 2 Gruppen (PBSC vs. KMT) im Zeitverlauf. Überprüfung auf Normalverteilung erfolgt mittels visueller Dateninspektion und des Shapiro Wilk Tests.

Tabelle 5 - Gegenüberstellung von matched und mismatched Patienten. Angegeben sind die 25- und 75-Perzentile, sowie die berechneten p-Werte vor und nach Bonferroni-Korrektur. Signifikante Ergebnisse ($p < 0,05$) wurden grün hinterlegt.

Die Verteilung der Werte zu einzelnen signifikanten Messpunkten wird in Abbildung 8 dargestellt. Die Werte der matched-Patienten sind breiter gestreut als die der mismatched-Patienten. Am Tag14 wurde bei 58% der mismatched-Gruppe und bei 27% der matched-Gruppe ein CC gemessen.

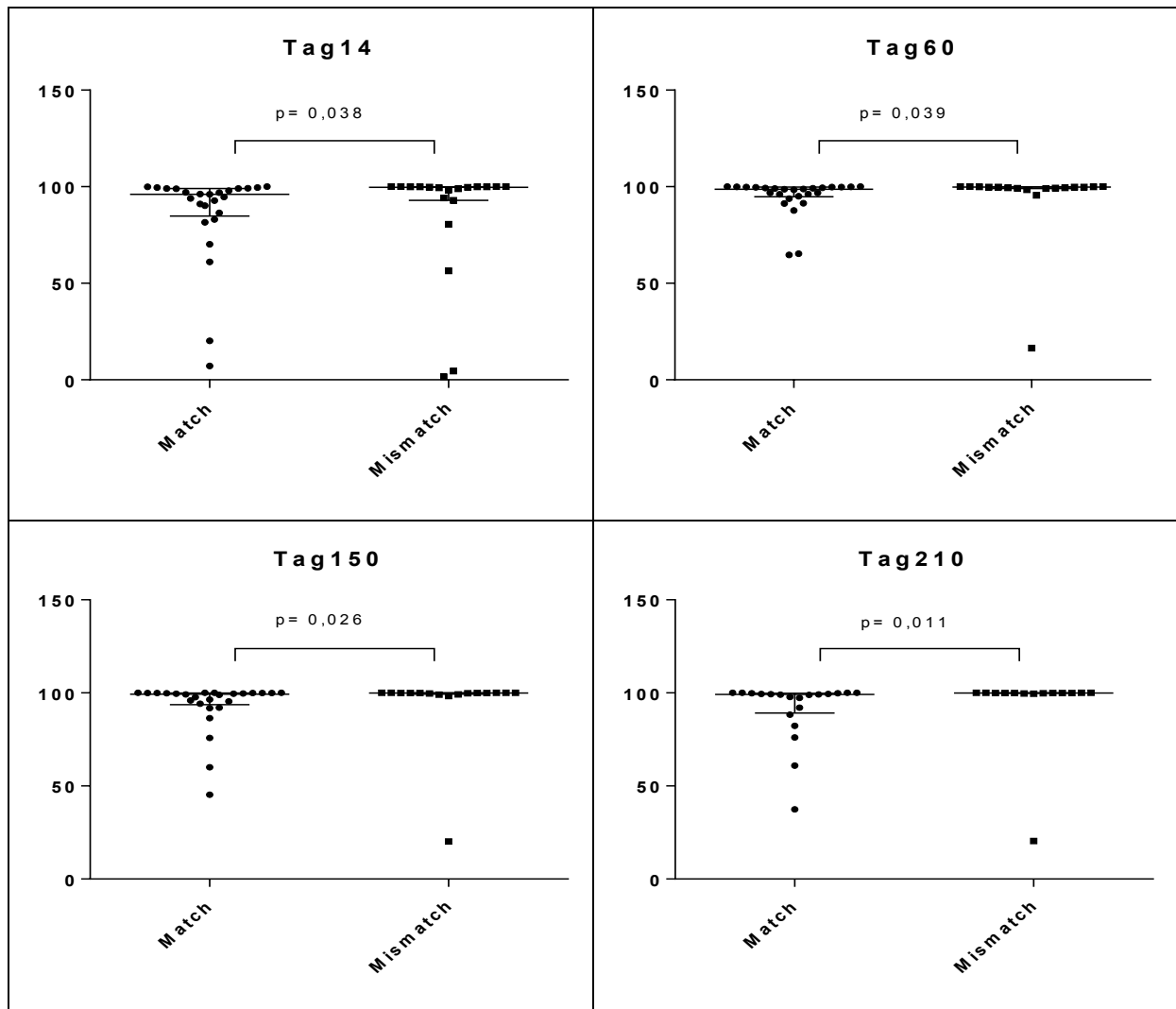


Abbildung 8 - Match vs. Mismatch. Die Grafik zeigt die gemessenen Chimärismuswerte nach 14, 60, 150 und 210 Tagen.

3.1.2 PBSC vs. KM

Im folgenden Abschnitt werden KMT (n=17) mit der Transplantation von peripheren Stammzellen (PBSC, n=24) verglichen. Abbildung 9 zeigt einen niedrigeren Median bei KMT Patienten im Verlauf der ersten 28 Tage. Danach besteht kein Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen. Bei KMT steigen die Chimärismuswerte der ersten Woche deutlich langsamer als bei PBSC Transplantation.

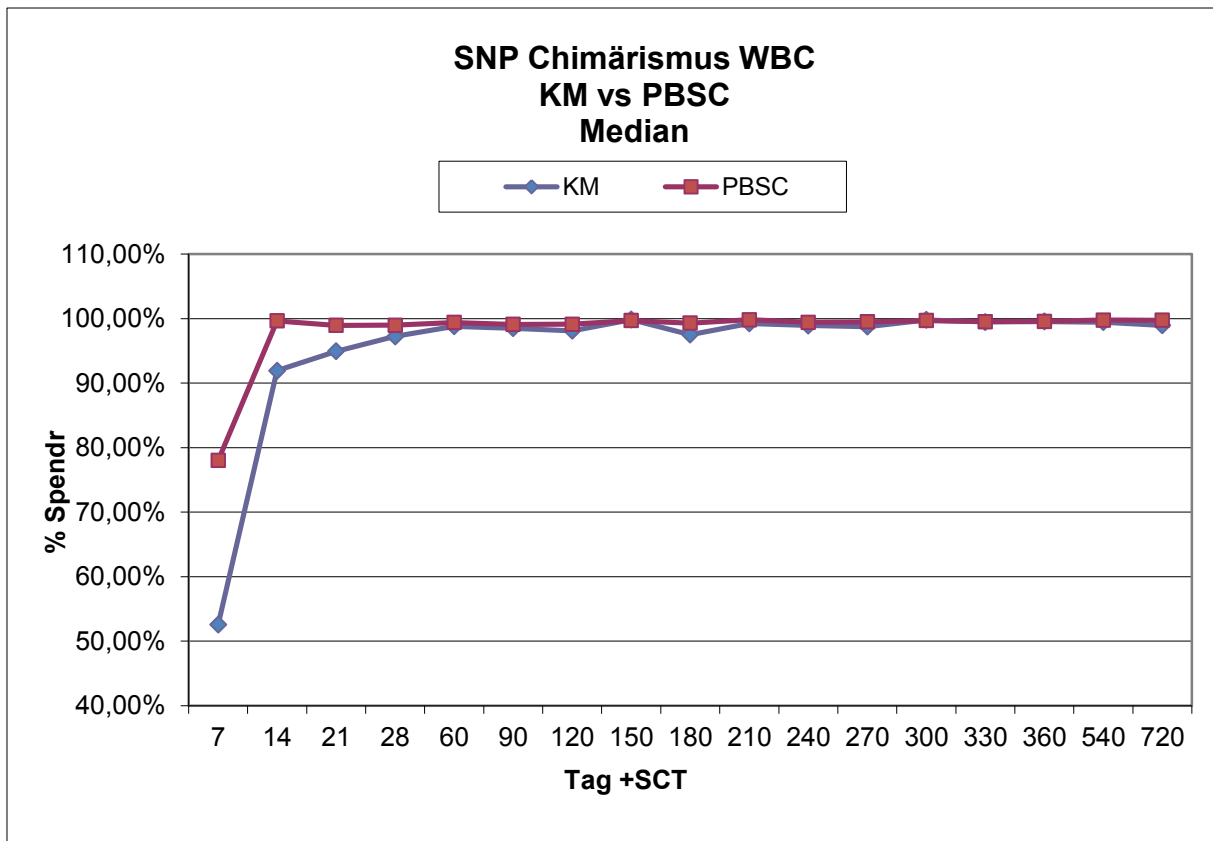


Abbildung 9 KM vs. PBSC – Verlauf der Mediane in der KM- und PBSC-Gruppe nach HSCT.

Tabelle 6 zeigt die Mediane zu den verschiedenen Messpunkten mit den zugehörigen Perzentilen. Der Median der PBSC liegt an 14, der Median der KM-Gruppe an 6 Messpunkten im Bereich eines CC. Lediglich an zwei Messpunkten ist er bei KMT höher als bei PBSC-Transplantationen.

Ein signifikanter Unterschied ist nur an Tag 14 (p 0,002) zu erkennen. Zu diesem Zeitpunkt liegt in der PBSC-Gruppe bereits ein CC vor, während in der PBSC-Gruppe ein MC vorliegt. Auch nach der Bonferroni-Korrektur bleibt der Unterschied signifikant (p 0,29).

	PBSC			KM			p-Wert	p-Wert adj.
	Median	25 Perzentil	75 Perzentil	Median	25 Perzentil	75 Perzentil		
Tag7	78,01%	50,86%	88,20%	52,56%	15,22%	79,28%	,121	1,000
Tag14	99,65%	94,67%	99,99%	91,94%	73,00%	97,72%	,002	,029
Tag21	98,96%	94,92%	99,89%	94,95%	90,57%	98,46%	,051	,867
Tag28	98,98%	97,26%	99,91%	97,24%	93,81%	99,58%	,173	1,000
Tag60	99,40%	95,47%	99,86%	98,82%	96,13%	99,80%	,726	1,000
Tag90	99,11%	93,84%	99,86%	98,52%	93,03%	99,89%	,790	1,000
Tag120	99,14%	95,61%	99,77%	98,11%	91,11%	99,79%	,421	1,000
Tag150	99,69%	97,15%	99,97%	99,87%	94,83%	99,94%	,839	1,000
Tag180	99,44%	95,74%	99,99%	98,94%	94,42%	99,97%	,727	1,000
Tag210	99,31%	93,33%	99,87%	97,53%	95,52%	99,82%	,535	1,000
Tag240	99,82%	92,09%	99,97%	99,26%	98,10%	99,90%	,779	1,000
Tag270	99,51%	95,42%	100,00%	98,77%	96,97%	99,90%	,594	1,000
Tag300	99,72%	97,86%	99,99%	99,80%	98,09%	100,00%	,746	1,000
Tag330	99,54%	97,82%	100,00%	99,49%	97,77%	99,96%	,863	1,000
Tag360	99,59%	97,98%	100,00%	99,56%	98,91%	100,00%	,823	1,000
Tag540	99,77%	98,38%	100,00%	99,45%	93,94%	100,00%	,935	1,000
Tag720	99,76%	97,16%	99,93%	98,97%	96,13%	99,88%	,792	1,000

*Mann Whitney U-Test: Vergleich von 2 Gruppen (PBSC vs. KMT) im Zeitverlauf. Überprüfung auf Normalverteilung erfolgt mittels visueller Dateninspektion und des Shapiro Wilk Tests.

Tabelle 6 - Gegenüberstellung von KM und PBSC. Angegeben sind die 25- und 75%-Perzentile, sowie die berechneten p-Werte vor und nach Bonferroni-Korrektur. Signifikante Ergebnisse ($p < 0,05$) wurden grün hinterlegt.

Die Abbildung 10 zeigt die Verteilung der Werte am Tag 14. Die Chimärismuswerte nach KMT sind breiter gestreut, als nach PBSC Transplantation. Am Tag 14 lagen 12% ($n=2$) der KM-Patienten und 63% ($n=15$) der PBSC-Patienten im Bereich eines CC.

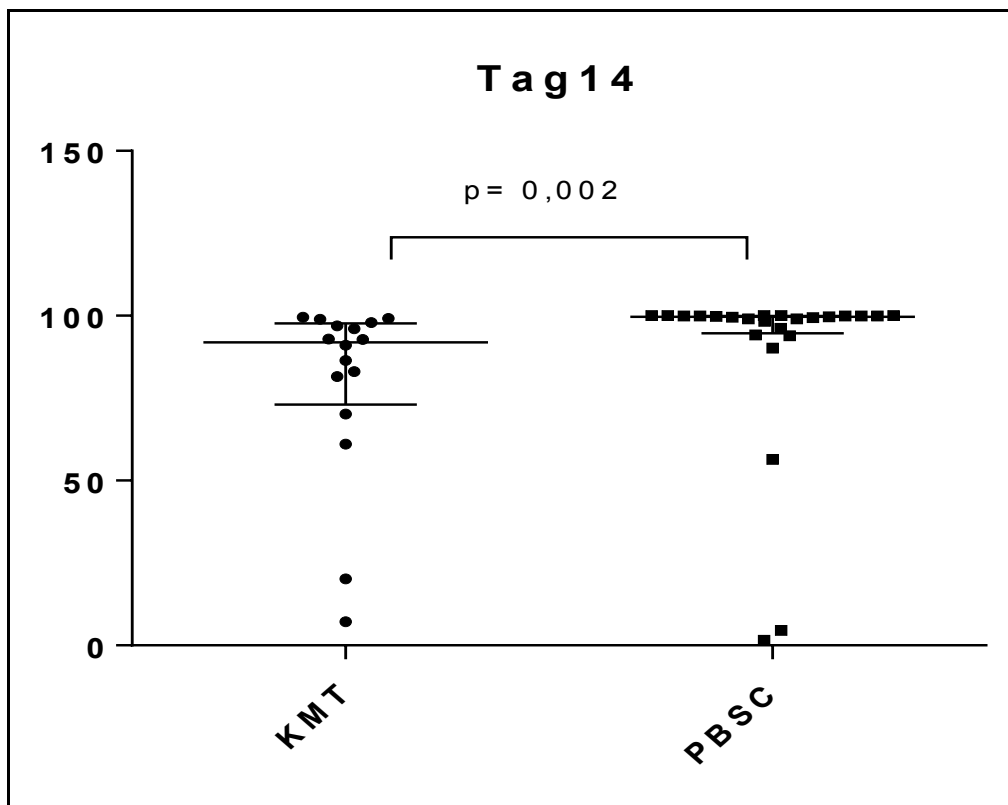


Abbildung 10 – Gegenüberstellung der gemessenen Chimärismuswerte am Tag 14.

3.1.3 MAC vs. RIC

Im folgenden Vergleich werden Patienten, die einer MAC unterzogen wurden (n=16) und Patienten nach RIC (n=22) gegenübergestellt. Der Verlauf der Mediane von MAC und RIC ist in Abbildung 11 dargestellt. Dieser unterscheidet sich lediglich innerhalb der ersten 28 Tage.

Nach einem langsamen Anstieg des Chimärismus in der MAC-Gruppe in der ersten Woche steigt er in der zweiten Woche rapide an.

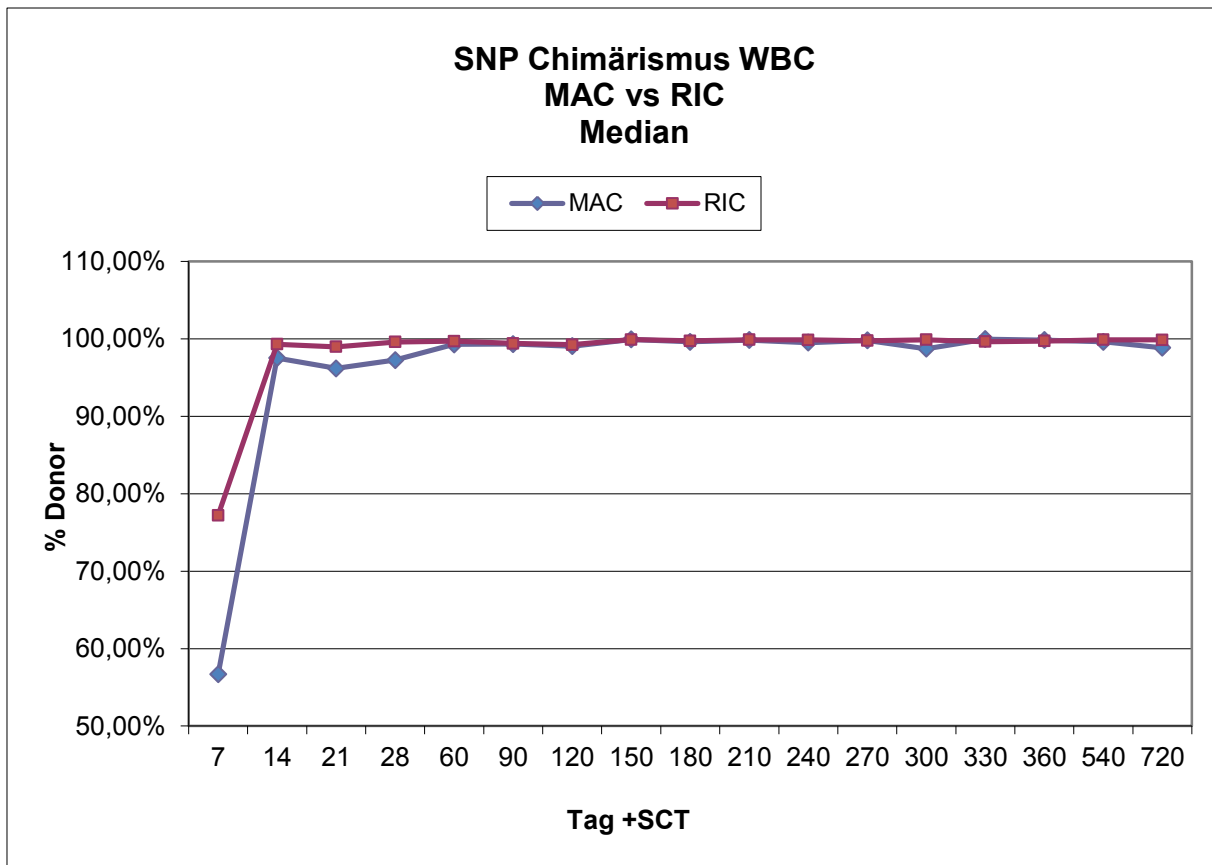


Abbildung 11 - MAC vs. RIC. Verlauf der Mediane der MAC- und RIC-Gruppe nach HSCT

In Tabelle 7 sind die Mediane und Perzentilen der verschiedenen Messpunkte aufgelistet. An 15 Zeitpunkten liegt der Median der RIC-Gruppe im Bereich eines CC, während dies in der MAC-Gruppe an 11 Zeitpunkten der Fall ist. An lediglich 4 der 17 Messpunkte liegt der Median von MAC-Patienten höher bei RIC-Patienten.

Der Mann Whitney U-Test ergibt nur für Tag 28 (p 0,021) einen signifikanten Unterschied zwischen MAC und RIC. Zu diesem Zeitpunkt liegt der Median beider Gruppen im Bereich eines MC. Nach Bonferroni-Korrektur ist dieser Unterschied nicht signifikant. In Tabelle 7 sind die Mediane von MAC und RIC mit den zugehörigen Perzentilen abgebildet.

	MAC			RIC			p-Wert	p-Wert adj.
	Median	25 Perzentil	75 Perzentil	Median	25 Perzentil	75 Perzentil		
Tag7	56,68%	32,43%	91,49%	77,20%	54,39%	90,91%	,370	1,000
Tag14	97,51%	83,93%	99,47%	99,30%	93,87%	99,98%	,162	1,000
Tag21	96,18%	93,97%	99,56%	98,97%	97,04%	99,87%	,073	1,000
Tag28	97,25%	95,94%	99,81%	99,58%	98,26%	99,94%	,021	,358
Tag60	99,28%	96,35%	99,81%	99,70%	98,84%	99,91%	,370	1,000
Tag90	99,32%	97,34%	99,96%	99,41%	98,40%	99,87%	,916	1,000
Tag120	99,05%	96,37%	99,99%	99,23%	98,31%	99,78%	,780	1,000
Tag150	99,92%	98,66%	99,99%	99,89%	99,13%	99,99%	,912	1,000
Tag180	99,51%	97,20%	100,00%	99,86%	99,16%	100,00%	,957	1,000
Tag210	99,61%	96,19%	100,00%	99,73%	98,64%	99,91%	,950	1,000
Tag240	99,83%	98,14%	100,00%	99,87%	99,26%	100,00%	,592	1,000
Tag270	99,78%	97,11%	100,00%	99,75%	99,05%	100,00%	,879	1,000
Tag300	98,73%	96,25%	99,99%	99,88%	99,53%	100,00%	,114	1,000
Tag330	99,96%	97,26%	100,00%	99,64%	99,14%	100,00%	,760	1,000
Tag360	99,83%	97,55%	100,00%	99,70%	99,43%	100,00%	,363	1,000
Tag540	99,60%	98,57%	100,00%	99,88%	99,66%	100,00%	,427	1,000
Tag720	98,84%	96,88%	99,84%	99,85%	98,69%	99,94%	,074	1,000

*Mann Whitney U-Test: Vergleich von 2 Gruppen (MAC vs. RIC) im Zeitverlauf. Überprüfung auf Normalverteilung erfolgt mittels visueller Dateninspektion und des Shapiro Wilk Tests.

Tabelle 7 – Gegenüberstellung von MAC und RIC. Angegeben sind die 25- und 75%-Perzentile, sowie die berechneten p-Werte vor und nach Bonferroni-Korrektur. Signifikante Ergebnisse ($p < 0,05$) wurden grün hinterlegt

Die Verteilung der Chimärismus-Werte am Tag 28 ist in Abbildung 12 dargestellt. Diese zeigt eine breitere Streuung und tiefere Werte in der MAC Gruppe. Im Mittel liegen die Chimärismuswerte in der MAC-Gruppe am Tag 28 bei $96,91\% \pm 3,38\%$ und in der RIC-Gruppe bei $99,05\% \pm 1,32\%$.

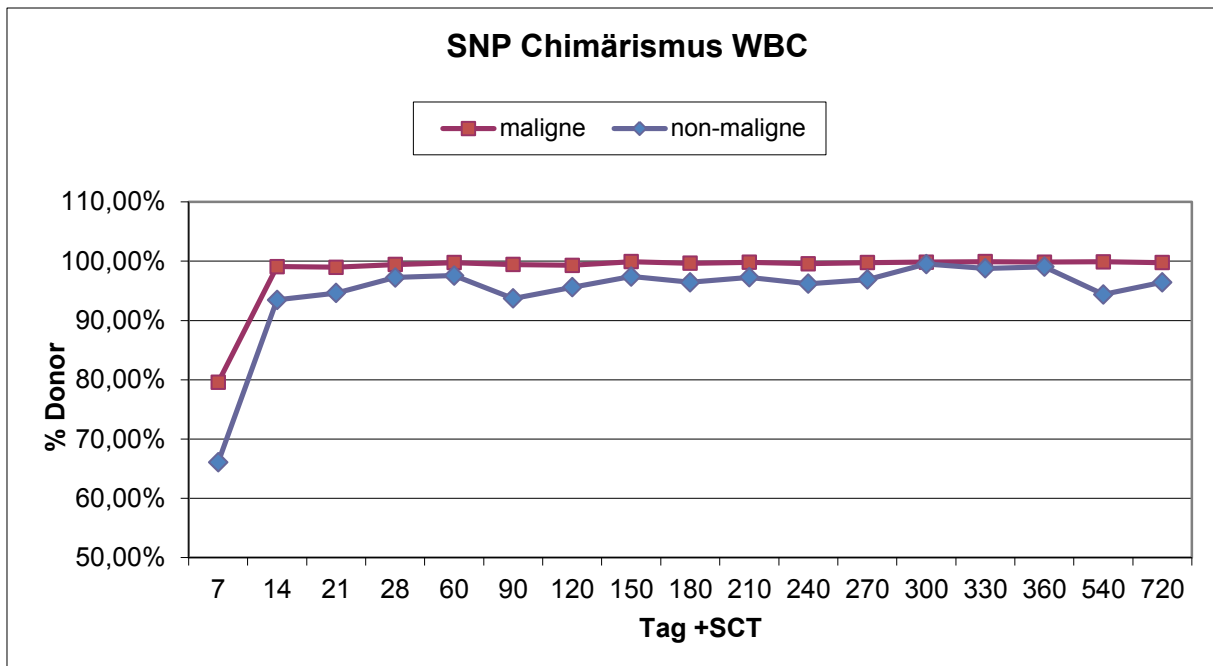


Abbildung 13 - Maligne vs. non-maligne. Verlauf der Mediane der maligne- und non-maligne-Gruppe

In Tabelle 8 sind die Mediane und Perzentile der beiden Gruppen zu den verschiedenen Zeitpunkten angeführt. Die Unterschiede zwischen den beiden Vergleichsgruppen sind von Tag 14 bis 150 und am Tag 240, sowie 330 bis 720 signifikant. Die berechneten p-Werte sind in Tabelle 6 angeführt. Nach Bonferroni-Korrektur der p-Werte sind diese allerdings nicht signifikant.

Am Tag 14, 21, 28, 60, 90, 120, 150, 240, 330, 540 und 720 liegt der Median der Maligne-Gruppe im Bereich eines CC, während die Benigne-Gruppe einen MC aufweist.

Tag	maligne			benigne			p-Wert	p-Wert adj.
	Median	25 Perzentil	75 Perzentil	Median	25 Perzentil	75 Perzentil		
7	79,57%	44,33%	91,81%	66,06%	11,07%	76,87%	,111	1,000
14	99,09%	91,81%	99,98%	93,47%	80,85%	98,53%	,020	,339
21	98,97%	95,08%	99,84%	94,63%	84,46%	98,27%	,012	,203
28	99,42%	97,24%	99,88%	97,26%	86,38%	99,39%	,027	,462
60	99,77%	98,66%	99,93%	97,59%	91,36%	99,36%	,004	,060
90	99,43%	98,52%	99,90%	93,71%	91,06%	99,45%	,023	,397
120	99,31%	98,34%	99,93%	95,61%	82,31%	99,48%	,014	,244
150	99,92%	99,16%	99,98%	97,40%	87,80%	99,96%	,024	,406
180	99,57%	98,94%	100,00%	96,20%	87,23%	99,96%	,135	1,000
210	99,65%	97,63%	99,97%	96,45%	80,64%	99,96%	,112	1,000
240	99,82%	99,26%	100,00%	97,27%	79,19%	99,98%	,040	,680
270	99,75%	98,49%	100,00%	96,90%	90,86%	99,96%	,058	,986
300	99,85%	98,81%	100,00%	99,53%	93,47%	99,99%	,317	1,000
330	99,93%	99,32%	100,00%	98,79%	92,85%	99,96%	,012	,212
360	99,83%	99,35%	100,00%	99,07%	93,88%	99,80%	,008	,129
540	99,88%	99,45%	100,00%	94,39%	84,97%	99,89%	,014	,239
720	99,77%	98,38%	99,97%	96,43%	85,08%	99,77%	,016	,266

*Mann Whitney U-Test: Vergleich von 2 Gruppen (maligne vs. benigne) im Zeitverlauf. Überprüfung auf Normalverteilung erfolgt mittels visueller Dateninspektion und des Shapiro Wilk Tests.

Tabelle 8 – Gegenüberstellung maligne und benigne. Angegeben sind die 25- und 75%-Perzentile, sowie die berechneten p-Werte vor und nach Bonferroni-Korrektur. Signifikante Ergebnisse ($p < 0,05$) wurden grün hinterlegt

Die einzelnen signifikanten Messpunkte werden anhand von Punktgrafiken in Abbildung 14 dargestellt. Dabei zeigt sich die breitere Streuung der Messwerte in der Gruppe der benignen Erkrankungen.

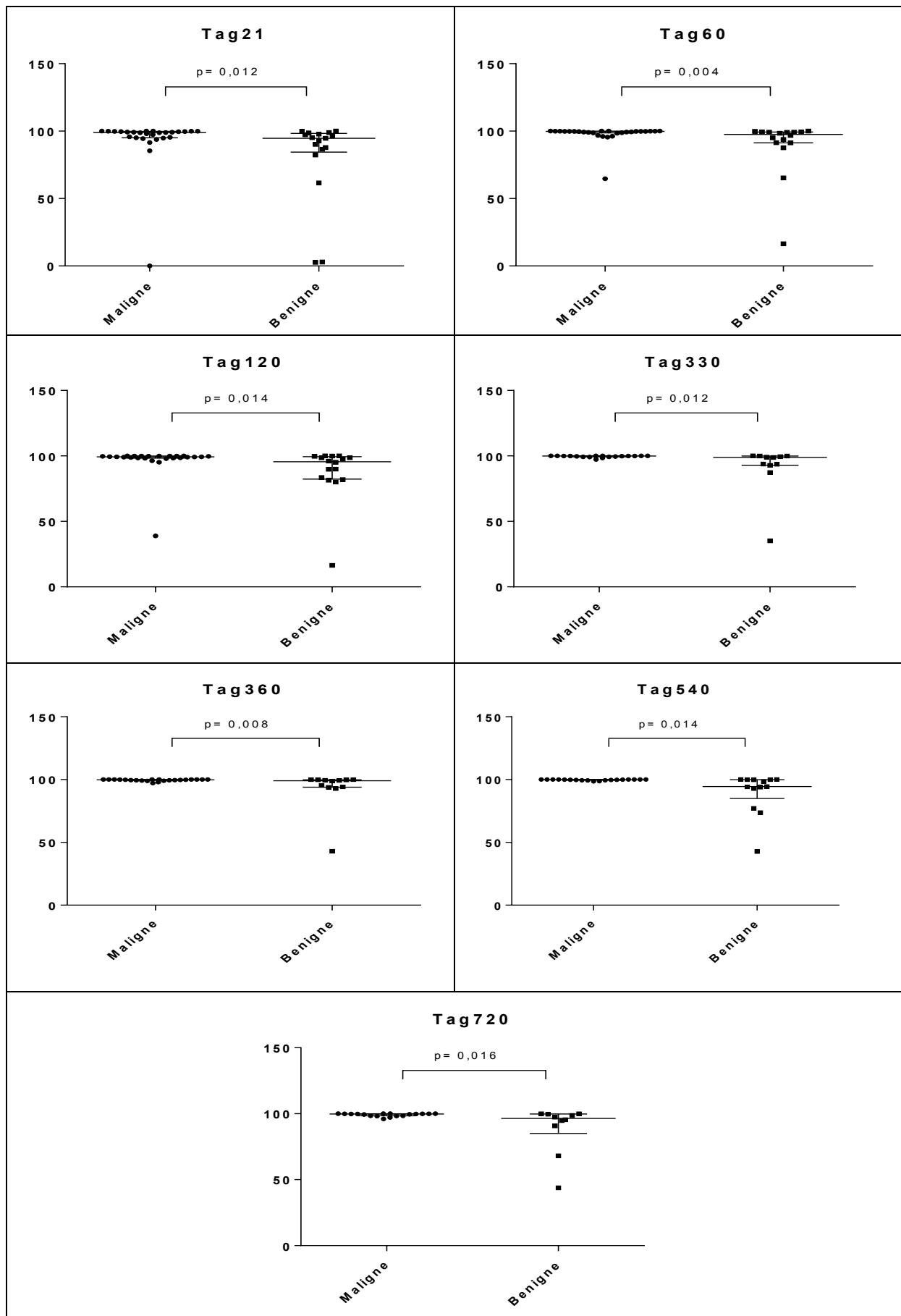


Abbildung 14 Maligne vs. Benigne. Gegenüberstellung der gemessenen Chimärismuswerte am Tag 21, 60, 120, 330, 360, 540, 720

3.1.5 Unmanipuliert vs. CD3/19 Depletion vs. α/β Depletion

Je nach Graft-Manipulation wurden die Patienten in 3 Gruppen gegliedert und deren Mediane über 720 Tage miteinander verglichen. Hierbei unterscheiden wir unmanipulierte (17) von CD3/19 depletierten (14) und α/β -depletierten (8) Grafts. In Abbildung 15 lässt sich ein schnellerer Anstieg bei T-Zell depletierten Grafts als in der unmanipulierten Vergleichsgruppe erkennen.

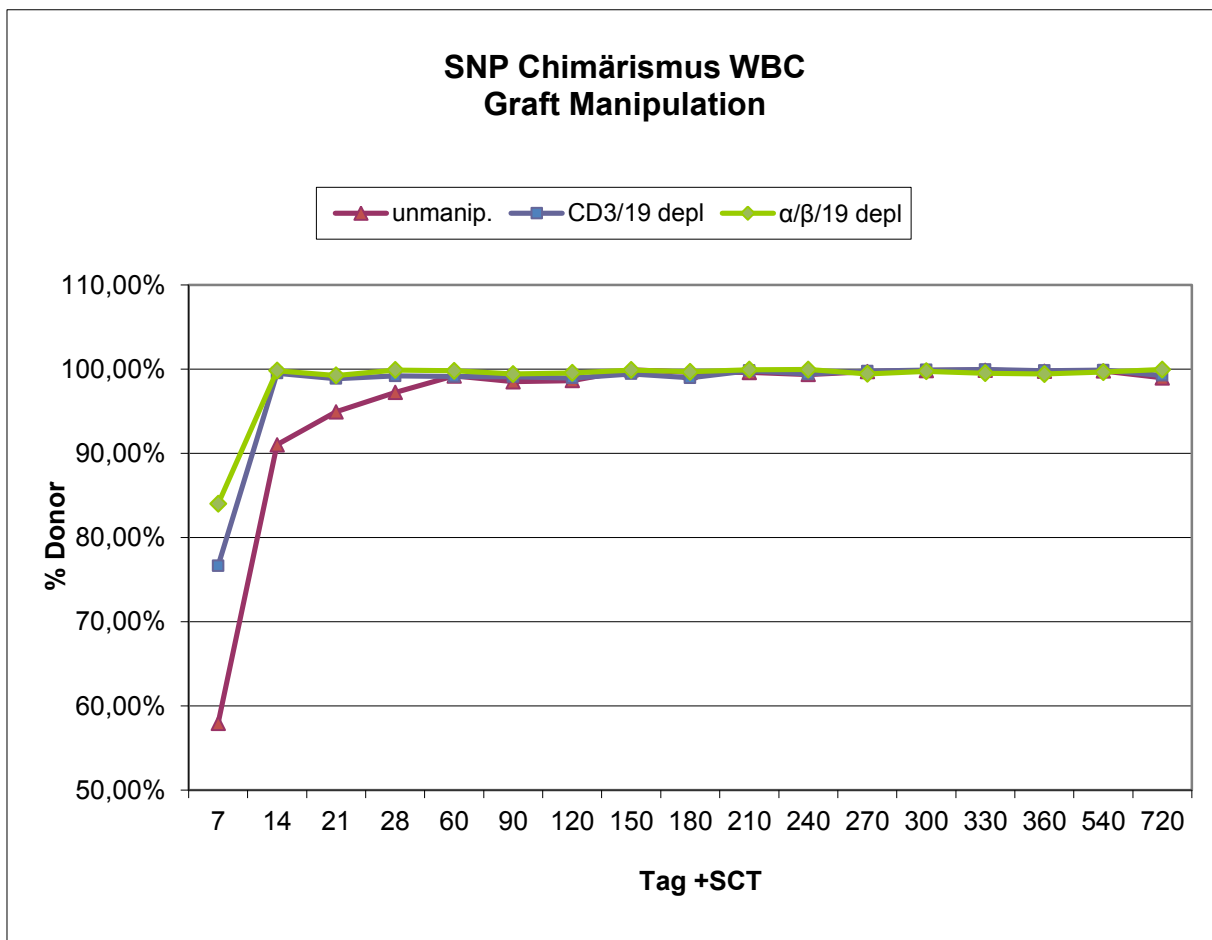


Abbildung 15 Vergleich nach Art der Graftmanipulation. Verlauf der Mediane nach HSCT.

In Tabelle 9 befindet sich eine tabellarische Übersicht über die Mediane und Perzentile zu den verschiedenen Zeitpunkten. In der Gruppe der unmanipulierten Transplantate liegt der Median am Tag 150 zum ersten Mal im Bereich eines CC. Aufgrund der niederen Anzahl an Messwerten konnte die Gruppe der α/β depletierten Transplantate ab Tag 170 nicht verglichen werden.

Der einzige Messzeitpunkt, bei dem ein signifikanter Unterschied festgestellt werden

konnte, ist der Tag 14. Auch nach Bonferroni-Korrektur bleibt der p-Wert signifikant. Es konnte sowohl ein Unterschied im Vergleich von Unmanipuliert mit α/β Depletion/Cd34+, als auch von Unmanipuliert mit C3/19 Depletion festgestellt werden. Der Median liegt bei den T-Zell depletierten Gruppen am Tag 14 im Bereich eines CC, während in der unmanipulierten Gruppe ein MC vorliegt.

Im Durchschnitt liegt der Chimärismus von unmanipulierten Grafts am Tag 14 bei $79,93 \pm 27,32\%$, in der CD3/19 depletierten Gruppe bei $98,13 \pm 2,88\%$ und in der α/β depletierten Gruppe bei $93,64 \pm 15,15\%$.

	unmanip			CD3/19depl			α/β /depl/CD34+			p-Wert
	Median	25 Perz.	75 Perz.	Median	25 Perz.	75 Perz.	Median	25 Perz.	75 Perz.	
Tag7	57,92%	13,20%	88,20%	77,10%	56,68%	87,69%	82,71%	57,15%	96,96%	,123
Tag14	92,87%	80,60%	97,97%	99,41%	96,61%	100,00%	99,68%	96,49%	99,99%	,001
Tag21	95,08%	90,23%	98,81%	98,95%	96,77%	99,83%	99,17%	78,68%	99,93%	,059
Tag28	97,73%	93,62%	99,59%	99,42%	97,37%	99,80%	99,09%	98,09%	99,95%	,129
Tag60	99,28%	96,34%	99,79%	99,19%	96,99%	99,82%	99,62%	73,65%	99,92%	,887
Tag90	98,84%	93,18%	99,88%	99,31%	97,92%	99,90%	98,13%	78,58%	99,89%	,669
Tag120	98,39%	95,13%	99,91%	99,11%	97,18%	99,74%	99,35%	81,38%	99,99%	,812
Tag150	99,81%	95,72%	99,94%	99,69%	98,62%	100,00%	99,85%	60,09%	99,97%	,779
Tag180	99,16%	95,78%	99,93%	99,57%	97,00%	100,00%	99,60%	49,59%	99,98%	,894
Tag210	99,57%	95,83%	99,90%	99,31%	97,24%	99,96%	99,66%	30,71%	99,97%	,389
Tag240	99,34%	98,65%	99,94%	99,90%	97,82%	100,00%	99,83%	55,04%	99,96%	,782
Tag270	99,23%	97,30%	99,90%	99,97%	97,21%	100,00%	99,42%			,433
Tag300	99,76%	98,41%	99,99%	99,90%	96,66%	100,00%	99,75%	98,85%	99,98%	,976
Tag330	99,74%	99,17%	99,96%	99,96%	98,03%	100,00%	99,54%			,758
Tag360	99,62%	98,94%	100,00%	99,84%	97,98%	100,00%	99,44%			,794
Tag540	99,63%	96,28%	100,00%	99,88%	98,42%	100,00%	99,66%			,937
Tag720	99,44%	96,84%	99,90%	99,25%	97,23%	99,91%	99,96%			,523

*Kruskal-Wallis Test: Vergleich von 3 Gruppen im Zeitverlauf. Überprüfung auf Normalverteilung erfolgt mittels visueller Dateninspektion und des Shapiro Wilk Tests.

pairwise comparison			
	pairwise comp.	p-Wert adj.	p-Wert adj.
Tag 14	unmanip.- α/β /depl/CD34+	0.017	unmanip - CD3/19depl 0.005

*Pairwise Comparison mittels Mann-Whitney U-Test.

Tabelle 9 – Gegenüberstellung nach Graft Manipulation. Angegeben sind die 25- und 75%-Perzentile, sowie die berechneten p-Werte vor und nach Bonferroni-Korrektur.

Signifikante Ergebnisse (p<0,05) wurden grün hinterlegt. Der paarweise Vergleich ergab Unterschiede am Tag 14.

In Abbildung 16 sehen wir eine Grafik, die die Verteilung der einzelnen Messwerte in den verschiedenen Gruppen darstellt. Bei unmanipulierten Grafts zeigt sich eine breitere Streuung und ein größerer interquartiler Abstand als bei T-Zell depletierten Grafts.

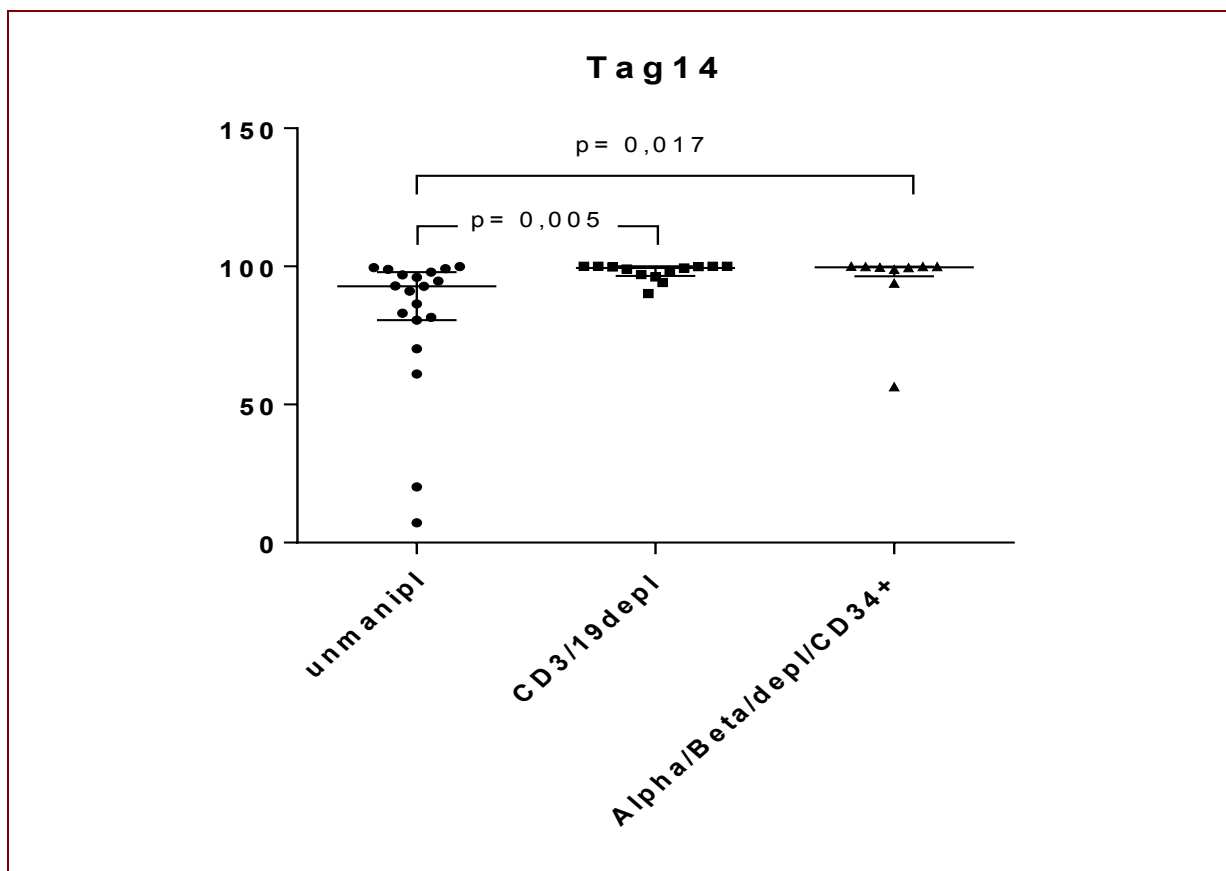


Abbildung 16 – Gegenüberstellung nach Art der Graftmanipulation. Chimärismuszerte am Tag 14 nach HSCT

3.1.6 Vergleich nach Grunderkrankung

Im Vergleich nach Grunderkrankungen wurden die Patienten in die 4 Gruppen Leukämien (n=20), erworbene nicht maligne Krankheiten (n=11), Solide Tumoren (n=8), und Angeborene Störungen (n=6) eingeteilt. In Abbildung 17 ist der Verlauf der Mediane dargestellt. Es fallen die höheren Chimärismuszerte in der Gruppe der Leukämien und soliden Tumoren auf. Patienten mit angeborenen Störungen sind den größten Schwankungen unterworfen.

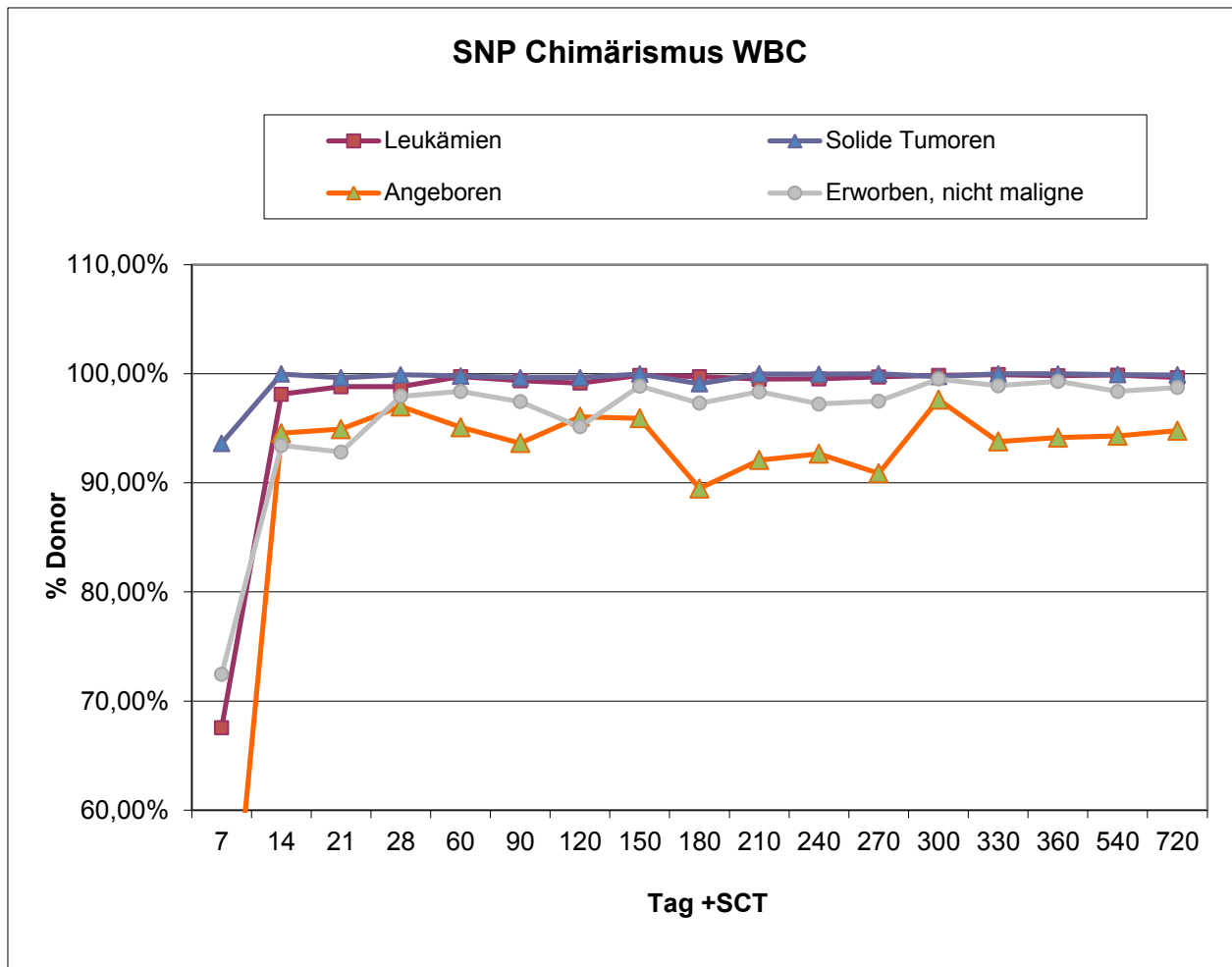


Abbildung 17 – Verlauf der Mediane im Vergleich nach Grunderkrankungen

In Tabelle 10 sind die Mediane und Perzentilen der jeweiligen Gruppen angeführt. Signifikante Unterschiede konnten an den Tagen 14 und 21 festgestellt werden. An Tag 14 waren es Unterschiede zwischen den soliden Tumoren und den angeborenen Erkrankungen ($p=0,017$) bzw. der erworbenen non-malignen Erkrankungen ($p=0,05$). An Tag 21 konnte bei den paarweisen Vergleichen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Tag	Leukämien			Solide Tumoren			Angeborene Erkrankungen			Erworben, nicht maligne			p-Wert
	Median	25 Perzentil	75 Perzentil	Median	25 Perzentil	75 Perzentil	Median	25 Perzentil	75 Perzentil	Median	25 Perzentil	75 Perzentil	
7	57,92%	32,74%	86,10%	93,63%	79,65%	96,33%	21,27%	1,76%	78,37%	72,46%	48,18%	77,32%	,061
14	98,28%	88,75%	99,65%	99,98%	99,24%	100,00%	92,95%	3,05%	96,61%	93,42%	81,35%	99,17%	,012
21	98,88%	94,88%	99,64%	99,63%	98,29%	99,99%	94,63%	2,79%	96,25%	92,83%	86,57%	98,72%	,028
28	98,27%	97,15%	99,77%	99,91%	98,26%	100,00%	96,75%	3,27%	99,67%	97,94%	88,28%	99,21%	,095
60	99,70%	97,75%	99,87%	99,80%	98,49%	100,00%	97,14%	36,06%	99,40%	98,39%	91,34%	99,42%	,084
90	99,31%	97,55%	99,89%	99,66%	98,91%	99,97%	93,44%	35,27%	98,44%	97,45%	90,43%	99,49%	,167
120	99,13%	98,04%	99,78%	99,65%	98,50%	100,00%	96,81%	36,39%	98,30%	95,15%	81,91%	99,92%	,079
150	99,85%	98,01%	99,95%	99,98%	99,77%	100,00%	97,93%	39,11%	99,98%	98,88%	86,45%	99,96%	,047
180	99,51%	97,64%	100,00%	99,97%	99,16%	100,00%	94,69%	48,51%	99,99%	97,23%	86,43%	99,90%	,648
210	99,69%	97,03%	99,98%	99,09%	98,27%	99,74%	94,73%	36,24%	99,99%	97,31%	78,16%	99,91%	,184
240	99,46%	98,96%	99,93%	99,98%	99,89%	100,00%	94,11%	37,36%	99,98%	98,36%	77,60%	99,99%	,319
270	99,68%	97,68%	99,96%	100,00%	99,42%	100,00%	95,40%	45,49%	99,98%	97,49%	92,67%	99,97%	,191
300	99,80%	98,09%	100,00%	99,75%	98,34%	100,00%	99,88%	91,55%		99,53%	93,02%	99,99%	,966
330	99,88%	99,24%	100,00%	100,00%	98,96%	100,00%	96,40%	49,64%	99,96%	98,90%	92,07%	99,56%	,205
360	99,75%	98,99%	100,00%	100,00%	99,33%	100,00%	96,84%	55,64%	99,92%	99,31%	95,31%	99,70%	,160
540	99,84%	99,33%	100,00%	99,93%	99,71%	100,00%	94,39%	42,63%		98,38%	84,97%	99,89%	,203
720	99,54%	98,27%	99,91%	99,89%	96,97%	99,99%	70,63%	43,83%		98,75%	90,75%	99,88%	,149

*Kruskal-Wallis Test: Vergleich von 4 Gruppen im Zeitverlauf. Überprüfung auf Normalverteilung erfolgt mittels visueller Dateninspektion und des Shapiro Wilk Tests.

	<i>pairwise comp.</i>	<i>p-value adj.</i>	<i>pairwise comp.</i>	<i>p-value adj.</i>
Tag 14	angeborene Erkrankungen - solide Tumoren	0.017	erworben, nicht maligne - solide Tumoren	0.050

*Pairwise Comparison mittels Mann-Whitney U-Test der signifikanten Messzeitpunkte.

Tabelle 10 - Gegenüberstellung nach Grunderkrankung. Angegeben sind die 25- und 75%-Perzentile, sowie die berechneten p-Werte vor und nach Bonferroni-Korrektur. Signifikante Ergebnisse ($p < 0,05$) wurden grün hinterlegt. Der paarweise Vergleich ergab Unterschiede am Tag 14.

Die Abbildung 18 zeigt eine Punktgrafik, die eine Übersicht der Ergebnisse am Tag14 darstellt.

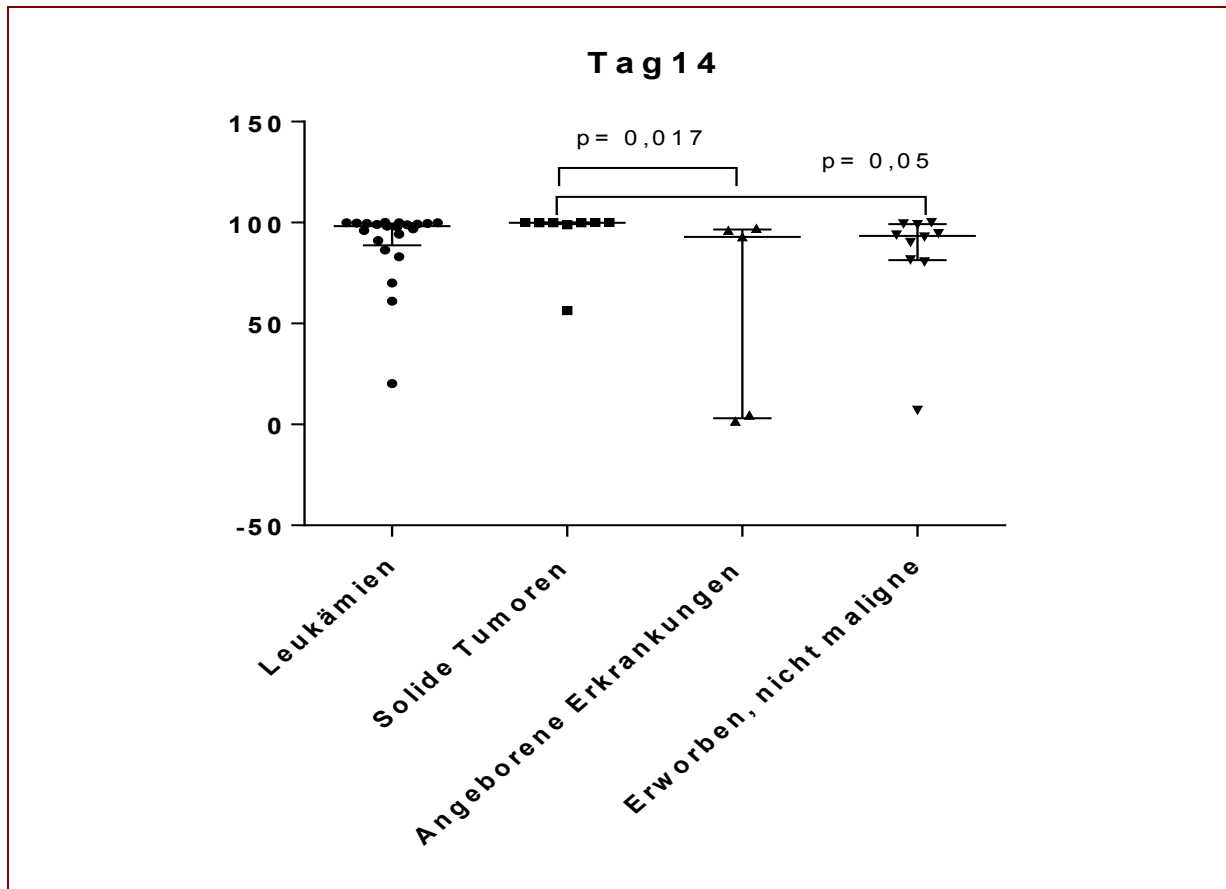


Abbildung 18 - Gegenüberstellung der Chimärismuszerte nach Grunderkrankung am Tag 14

3.2 Chimärismusanalyse aus Subpopulationen

Die Chimärismusanalyse aus Subpopulationen ermöglicht die Beobachtung einzelner Leukozyten-Subgruppen. Dies gewährt uns einen tieferen Einblick in die immunologischen Vorgänge und Dynamik nach HSCT. Besonderes Augenmerk wird dabei auf T-Zellen und NK-Zellen gelegt, die eine wichtige Rolle bei der Entwicklung einer Abstoßungsreaktion, GvHD oder GvT Reaktion spielen.

Da die SNP-Analyse aus Subpopulationen eine aufwändige Untersuchung darstellt, wird sie nur unter besonderen Kriterien angewandt. Diese sind die Entwicklung eines MC, die Verschlechterung des klinischen Zustandsbildes und ein erhöhtes

Abstoßungsrisiko. Insgesamt wurde die SNP-Analyse der Subpopulationen bei 13 Patienten (28%) durchgeführt.

Die folgenden Patientenkasuistiken sollen den Wert der SNP-Chimärismusanalyse aus Subpopulationen veranschaulichen.

3.3 Kasuistik 1 - SAA

Ein 8 jähriger Junge wurde im Februar 2011 an die Klinische Abteilung für pädiatrische Hämato-Onkologie im LKH-Universitätsklinikum Graz überwiesen. Sowohl Anamnese, Klinik, laborchemische Parameter und zwei Knochenmarksbiopsien führten zur Diagnose einer SAA mit begleitender Parvovirus B19 (PVB19) Infektion. Der Patient wurde daraufhin für eine allogene HSCT vorbereitet. Nach MAC mittels Cyclophosphamid (4x50mg/kg/Tag) und ATG (3x20mg/kg/Tag) wurde der Patient im März 2011 einer allogenen KMT unterzogen. Als Spender fungierte der 18 jährige Bruder. Danach erfolgte eine immunsuppressive Therapie mit Ciclosporin A.

Der Patient zeigte ein reguläres 3-Linienengraftment innerhalb von 28 Tagen. Verlaufskontrollen mittels SNP-Chimärismusanalyse zeigten durchwegs einen MC. Die laborchemischen Blutwerte verbesserten sich trotzdem kontinuierlich. Die immunsuppressive Therapie wurden 4 Monate nach der Transplantation gestoppt. Weitere Verlaufskontrollen verliefen unauffällig.

18 Monate nach der ersten KMT entwickelte der Patient ein SAA Rezidiv. Die daraufhin durchgeführte Chimärismusanalyse ergab einen Spenderchimärismus von 44,12% der WBC. Bei der Analyse der Subpopulationen zeigte sich ein steigender Anteil an Spender-T-Zellen und einen sinkenden Anteil an Spender-Granulozyten. Eine Übersicht der gemessenen Chimärismuswerte zeigt Abbildung 19. Die durchgeführte KM PCR ergab abermals ein positives Resultat für PVB19.

Die Entwicklung wurde als späte Transplantatabstoßung interpretiert. Dem Patienten wurde ATG (40mg/kg/Tag, für 4 Tage) und ein Boost CD34+ selektionierter bzw.

CD3- α/β depletierter Stammzellen verabreicht, die aus peripherem Blut des selben Spenders gewonnen und an zwei aufeinanderfolgenden Tagen verabreicht wurden.

Es folgte die immunsuppressive Therapie mit MMF für 17 Tage. Symptome einer GvHD wurden zu keinem Zeitpunkt beobachtet. In weiteren Verlaufskontrollen zeigte sich ein sehr langsamer Anstieg der Spender-DNA bis zu einem Maximum von 93,98%. Am Tag 18 nach der Verabreichung der PBSC fiel der WBC-Chimärismus auf 70% ab. Auch der Anteil an Spender-Lymphozyten und -Granulozyten sank zusehends. Gleichzeitig stieg die Anzahl an WBC im peripheren Blut. Diese Befunde wurden als Transplantatversagen mit einer teilweisen autologen Rekonstitution der Hämatopoese interpretiert. Mehrere Versuche, den Spender-Chimärismus mittels DLIs zu konvertieren, blieben erfolglos. Die Werte der 3 Zellreihen des peripheren Blutes blieben für 4,5 Monate annähernd im Normalbereich, danach entwickelte der Patient erneut eine Panzytopenie. Regelmäßige Chimärismusanalysen zeigten einen rückläufigen Spenderanteil der Lymphozyten und Granulozyten. Der Befund wurde als Transplantatabstoßung interpretiert und eine zweite HSCT geplant.

Nach RIC mittels Thiotepa, Fludarabin, Cyclophosphamid und ATG erhielt der Patient erneut KM-Stammzellen seines HLA-identen Bruders. Regelmäßige Verlaufskontrollen in den darauffolgenden 6,5 Monaten ergaben einen stabilen MC mit einem Spenderanteil von 99,87% an Tag +180. Trotz immunsuppressiver Therapie entwickelte der Patient eine chronische GvHD mit Beteiligung der Haut und Leber.

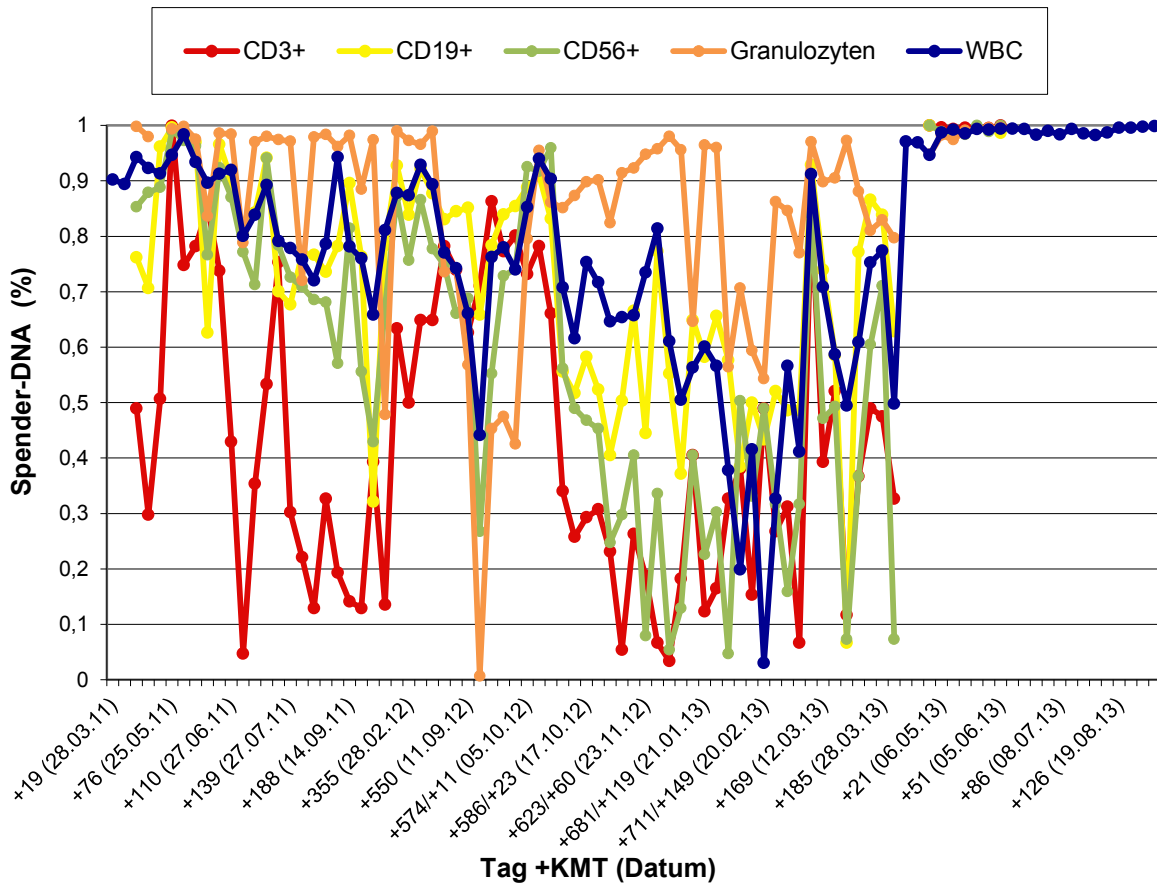


Abbildung 19 - Chimärismusanalyse der Subpopulationen bei SAA

3.4 Kasuistik 2 - AML

Ein männliches Neugeborenes wird im August 2013 mit Makrosomie, initialer Hyperleukozytose (596.620/ μ l) mit Liquorbefall, Hepatosplenomegalie und ausgeprägten Hautinfiltraten (Leukaemia cutis) geboren. Anhand von zytomorphologischen und zytogenetischen Untersuchungen der Zellen wurde eine kongenitale AML FAB M5 mit t(9;11) diagnostiziert. Der von Anfang an kritische Gesundheitszustand des Neugeborenen konnte durch intensive interdisziplinäre Kooperation stabilisiert werden.

Mit Hilfe von Austauschtransfusionen und Chemotherapie nach dem AML-BFM (Berlin-Frankfurt-Münster) Protokoll 2004 konnten die hohen Leukozytenzahlen deutlich gesenkt werden (<1000/ μ l). Eine lichtmikroskopisch und molekulargenetisch

bestätigte Remission konnte am Tag 16 nach der Geburt erreicht werden.

Der Patient erhielt eine Induktionstherapie bestehend aus Cytarabin (3,3mg/kg/d, Tag 1-8), liposomalem Daunorubicin (2,66mg/kg/d, Tag 3, 5, 7) und Etoposid (5mg/kg/d, Tag 6-8). Zusätzlich erfolgte eine dreimalige intrathekale Chemotherapie mittels Cytarabin, Methotrexat und Prednisolon.

Supportive Behandlung beinhalteten Antibiotika und –mykotika zur Infektionsprophylaxe, intensivtherapeutische Maßnahmen mit Ventilation über 29 Tage und Granulozytentransfusionen (insgesamt 60).

Bei der Remissionsbeurteilung am Tag 15 zeigte sich eine Markaplasie mit einem Blastenanteil von <5% und bei Knochenmarkpunktion eine lichtmikroskopische Remission ohne molekulargenetischen Nachweis eines MLL-Genrearrangements. Der zweite Chemotherapieblock erfolgte nach dem HAM-Schema bestehend aus Cytarabin (20% von 3g/m² alle 12 Stunden für 3 Tage), Mitoxantron (0,33mg/kg/d, Tag 3 und 4) und intrathekale Tripletherapie (Cytarabin, Prednisolon, Methotrexat).

Nachdem eine Knochenmarkpunktion am Tag 25 eine vollständige Remission zeigte, wurde eine Konsolidierungstherapie mit Cytarabin (16,66mg/kg/d, Tag 1-4 Tage), 2-CDA (Cladribin; 0,2mg/kg/d, für Tag 1-3) und Idarubicin (0,23mg/kg/d an Tagen 3 und 5). Nach Erholung aus der Myelodepression wurde ein modifizierter haM-Block angeschlossen, bestehend aus hochdosiertem Cytarabin (4 mal 20% von 1 g/m²/Tag, Tag 1-3), Mitoxantron (0,33mg/m²/Tag, Tag 2) und einer intrathekalen Applikation von Cytarabin.

Aufgrund der schlechten Prognose der Erkrankung wurde eine allogene HSCT zur Remissionskonsolidierung geplant. Binnen kurzer Zeit konnte ein männlicher HLA-identer Spender (12/12) in einer Spenderdatenbank gefunden werden. Es wurde eine RIC (FLAMSA) bestehend aus Fludarabin (30mg/m²/Tag, Tag -12 bis -9), Amsacrine (100mg/m²/Tag, Tag -12 bis -9), Cytarabin (2g/m²/Tag, Tag -12 bis -9), Busulfan (4mg/kg/Tag, Tag -6 bis -5), Cyclophosphamid (60mg/kg/Tag, Tag -4 bis -3) und ATG Fresenius (20mg/kg/Tag, Tag -4 bis -2) verabreicht. Stammzellen wurden mittels CSF aus dem Knochenmark des Spenders mobilisiert und aus dem peripheren Blut gewonnen.

Die HSCT erfolgte vier Monate nach der Geburt. Ein Teil des Stammzellprodukts wurde dem Patienten unmanipuliert verabreicht, der andere Teil zuvor einer α/β

Depletion bzw. CD34+ Selektion unterzogen. MMF und Methotrexat wurden zur GvH Prophylaxe verabreicht.

Regelmäßige Überprüfungen des Blutbildes und wöchentliche Chimärismusanalysen zeigten stabiles hämatologisches Engraftment und stabilen MC zwischen 90 und 100% bis zum Tag +55. Eine Übersicht der Chimärismusanalysen ist in Abbildung 20 zu sehen. Ab Tag +55 fielen die Chimärismuswerte der WBC, Monozyten und B-Zellen auf Werte zwischen 30 und 40% ab, während der Chimärismus der T- und NK-Zellen stabil zwischen 90 und 100% blieb.

Aufgrund dieser Entwicklungen wurde MMF bis Tag +57 reduziert und 2 DLIs am Tag +61 und +71 verabreicht. Knochenmarkspunktionen am Tag +60 und +97 zeigten vollständige Remission. Die molekulargenetische Suche nach minimaler Resterkrankung verlief negativ.

Am Tag +93 wurde eine Erhaltungstherapie mit Thioguanin ($40\text{mg}/\text{m}^2/\text{Tag}$) begonnen, gefolgt von vier intrathekalen Dreifachtherapien (Cytarabin 16mg, Prednisolon 4mg, Methotrexat 6mg).

Der Junge entwickelte MC mit einer Wiederherstellung der autologen CD14+ und CD19+ Zellen. Am Tag +288 wurden sinkende CD56+ Werte gemessen. CD3+ Zellen hielten sich konstant $>95\%$. 300 Tage nach der Transplantation befindet sich der Patient in vollständiger Remission bei MC, ohne Symptome der Grunderkrankung und ohne Zeichen einer GvHD. Die Zahl der Blutzellen befindet sich durchwegs im Normalbereich.

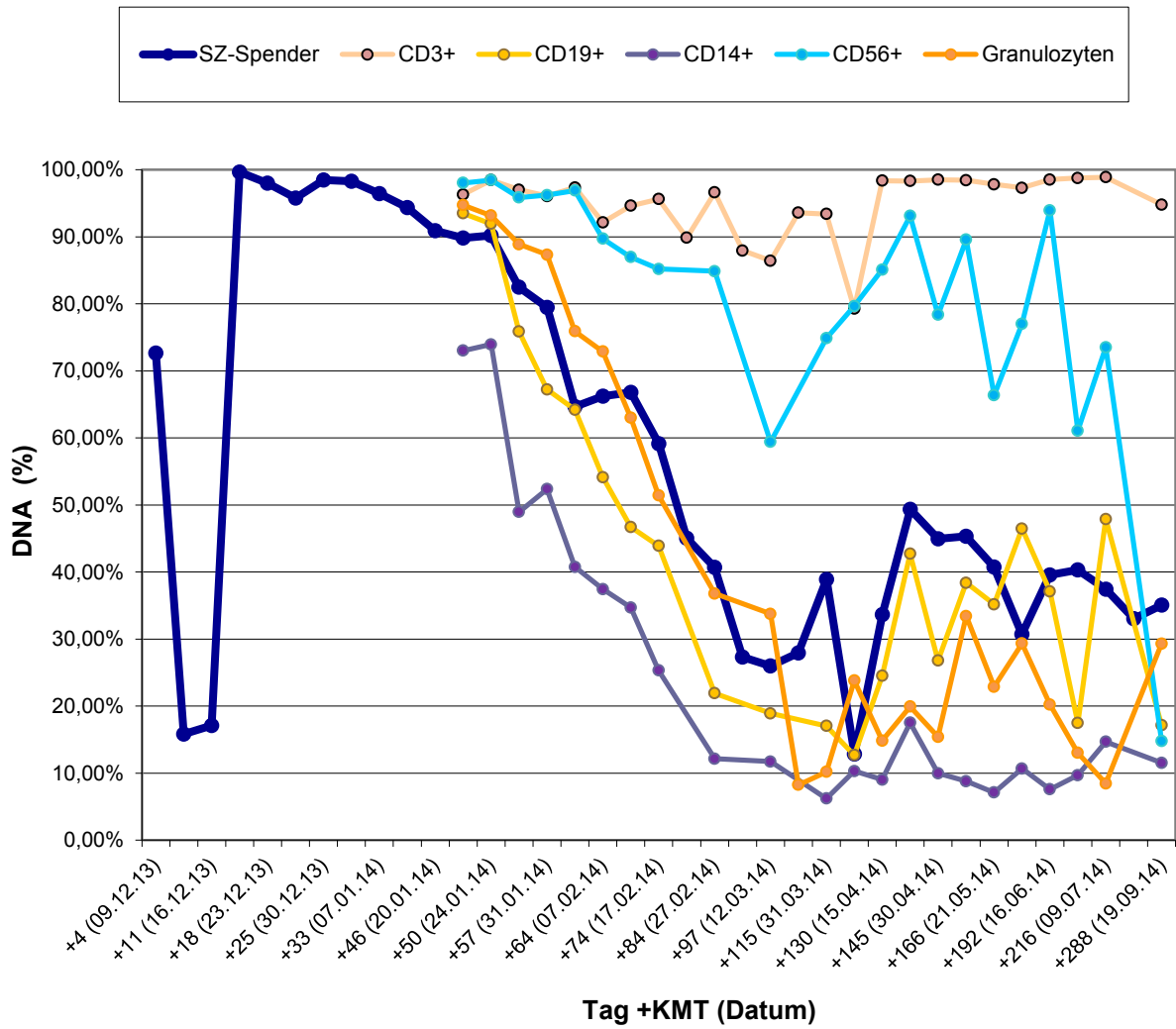


Abbildung 20 - Chimärismusanalyse der Subpopulationen bei AML

4 Diskussion

Über die letzten Jahrzehnte ist die HSCT zu einer gebräuchlichen Therapie für zahlreiche maligne und non-maligne Erkrankungen herangereift. Die Fortschritte auf dem Gebiet der HSCT machten die immer häufiger werdende Verwendung von alternativen Spendern (haploidente Spender, MMUD), moderneren Konditionierungsprotokollen mit geringerer Intensität (RIC, NMA) und Graftmanipulationen (T-Zell Depletion, CD34+ Selektion) möglich. Einerseits führten diese Entwicklungen zu einer sinkenden therapieassoziierten Mortalität und Morbidität, andererseits zu einer zunehmenden Inzidenz von MC nach HSCT. Die Höhe des Empfängeranteils eines MC scheint in mehreren Studien mit drohendem Rückfall, der Entwicklung von GvHD und Transplantatversagen in Verbindung zu stehen. (120-122) Aus diesem Grund sind engmaschige und präzise Chimärismusanalysen zur Vorhersage negativer Ereignisse von entscheidender Bedeutung. Chimärismusanalysen in regelmäßigen Abständen ermöglichen die frühe Identifikation von Risikopatienten und ein frühes Einschreiten durch Anpassung der immunsuppressiven Therapie bzw. der Verabreichung von DLIs um einen drohenden Graft-Verlust zu korrigieren. Die Detektion der Zunahme bereits kleiner Mengen autologer Zellen kann bei der Diagnose eines Rezidivs helfen. Insbesondere bei Risikopatienten kann die Chimärismusanalyse aus Subpopulationen entscheidende Informationen über die Graftdynamik und mögliches Abstoßungsrisiko beisteuern. (123)

Für die Unterscheidung der Spender- von Empfängerzellen sind mehrere Methoden geeignet. Ein verlässliches Monitoring wird vor allem durch eine hohe Sensitivität gewährleistet. Die von uns verwendete real time SNP-PCR zur Chimärismusanalyse ist mit einer Sensitivität von <0,1% anderen Techniken wie der STR-PCR (0,4-5%) überlegen. Insbesondere bei geringen Anteilen autologer Zellen (<10%) ermöglicht die SNP-PCR eine genauere Chimärismusbestimmung und zuverlässige Identifizierung von MC. (101,112,116) Weitere Vorteile der real time SNP-PCR sind eine hohe Unterscheidungsrate von Spender und Empfänger, die schnelle

Durchführbarkeit und die Anwendbarkeit der Technik unabhängig von Grunderkrankung und Geschlecht des Spenders bzw. Empfängers.

Ein Nachteil der SNP-PCR ist die Möglichkeit der Beimischung von nicht-hämatopoetischen Zellen, beispielsweise im Rahmen der Knochenmarkpunktion. Des Weiteren kann die SNP-PCR ein beginnendes Rezidiv nicht von einem beginnendem Transplantatverlust unterscheiden. Dazu wird eine durchflusszytometrische Typisierung benötigt.

Diese Arbeit vergleicht den Chimärismusverlauf von 45 Patienten nach HSCT mittels real time SNP-PCR. Die Verläufe wurden entsprechend HLA-Übereinstimmung, Stammzellressource, Konditionierung, Dignität, Graftmanipulation und Grunderkrankung ausgewertet.

Der Gegenüberstellung von benignen und malignen Grunderkrankungen ergab signifikante Unterschiede am Tag 7 bis 150 und 330 bis 720. Die höheren Chimärismuswerte bei Patienten mit malignen Erkrankungen könnten durch die meist intensiveren Konditionierungsregime bedingt sein. Im Unterschied zu malignen Erkrankungen, wo ein vollständiger Spenderchimärismus immer das erwünschte Ziel darstellt, wird bei non-malignen Erkrankungen ein CC zwar angestrebt, er ist jedoch in vielen Fällen keine Voraussetzung für eine Heilung der Grunderkrankung. MC ist bei non-malignen Grunderkrankungen ein häufiges Resultat und verkörpert einen Zustand der Immuntoleranz mit niederen Raten an GvH Reaktionen. Park et al. (106) berichtet beispielsweise von 48% MC bei 48 Kindern mit non-malignen Grunderkrankungen und erhöhtem Risiko eines Transplantatversagens bei Patienten mit einem autologen Anteil von >30%.

Über einen längeren Zeitraum beobachtet, ergaben die Vergleiche zwischen den verschiedenen Patientengruppen keine signifikanten Unterschiede. Lediglich an einzelnen Zeitpunkten konnten signifikante Differenzen gemessen werden, welche nach Bonferroni-Korrektur meist ihre Signifikanz verloren. Bei der Bonferroni-Korrektur handelt es sich allerdings um die konservativste Korrekturmethode, um das multiple α -Niveau anzupassen. (124)

Die Interpretation der signifikanten Abschnitte beim Vergleich der verschiedenen Methoden wird durch die Heterogenität des Patientenkollektivs, insbesondere durch die Vielfalt an Grunderkrankungen und die verschiedenen hohen Dosen an CD34+ Zellen erschwert.

Die von uns bei 16 Patienten angewandte RIC Methode führte in den meisten Fällen zu einem schnellen 100% Donorchimärismus, ohne die in der Literatur oftmals erwähnten hohen Raten an MC. (101,106) Dies ist wahrscheinlich auf die von uns angestrebten hohen Dosierungen an CD34+ Zellen zurückzuführen. Am Tag 28 beobachteten wir CC bei 64% der Patienten nach RIC bzw. 37% nach MAC. Die Tatsache, dass der Vergleich von MAC mit RIC keine andauernden signifikanten Unterschiede zeigte, unterstreicht den Stellenwert und die Berechtigung der Transplantation mit reduzierter Konditionierungsintensität.

Der Einsatz der SNP-Chimärismusanalyse von Subpopulationen bei Risikopatienten erwies sich als hilfreiche Methode zur frühzeitigen Identifizierung von Abstoßungspotential und Transplantatversagen. Da die Subgruppenanalyse lediglich bei 13 Patienten durchgeführt wurde, wird sie in dieser Arbeit im Rahmen von zwei Patientenkasuistiken besprochen.

Beim ersten Fall handelt es sich um einen 8 jährigen Jungen mit SAA und Parvovirus B19 Infektion. Nach einer durchgeführten MSD KMT erlitt der Patient ein SAA Rezidiv. Der Versuch, das Graft mittels ATG und einem Boost peripherer Stammzellen zu erhalten, resultierte in MC mit partieller autologen Rekonstitution. Trotz der Verabreichung mehrerer DLIs folgten Graftversagen und SAA Rezidiv. Durch eine zweite KMT mit dem selben Spender wurde dauerhafter CC erreicht. Transplantatversagen bei SAA mit HLA-identen MSD ist ein bekanntes klinisches Problem mit einer Inzidenz von 5 bis 50%. (125-127) Eine Graftabstoßung als Ursache des Transplantatversagens konnte anhand des stabilen Donorchimärismus der T-Zellen ausgeschlossen werden.

Autologe Rekonstitution bei SAA ist ein seltenes Phänomen. Elebute et al. (128) berichteten von einer hohen Anzahl (4 von 9 Patienten) autologer Rekonstitutionen bei SAA nach reduzierter Konditionierung.

Der zweite Patient, ein Neugeborenes mit angeborener AML FAM M5, wurde aufgrund der schlechten Prognose der Grunderkrankung einer MUD PBSC Transplantation unterzogen. Aufgrund von sinkenden Chimärismuswerten (WBC, Monozyten, B-Zellen) wurden im Verlauf mehrere DLIs verabreicht und der Patient entwickelte einen stabilen MC mit Wiederherstellung der autologen Produktion von

CD14+ und CD19+ Zellen. Knochenmarkspunktionen und molekulargenetische Untersuchungen zeigten eine vollständige Remission bis zum Tag +300. Ein gutes interdisziplinäres Management der prä- und postoperativen Therapie und engmaschige Chimärismusanalysen waren maßgeblich am Behandlungserfolg beteiligt. Auch in diesem Fall könnte die teilweise Rekonstitution der autologen Hämatopoese auf den Einsatz von RIC zurückzuführen sein.

Beide Kasuistiken veranschaulichen komplexe Verläufe nach HSCT. Die Darstellung und engmaschige Beobachtung der WBC Subpopulationen über Zeit ermöglichte in beiden Fällen ein frühes Einschreiten durch die Anpassung der immunsuppressiven Therapie und Verabreichung von DLIs. Die sehr schnelle und sensitive real time SNP-PCR macht eine exakte und frühe Identifizierung von Risikopatienten durch frühe Detektion von Schwankungen des autologen Zellanteils möglich.

Die immunologischen Vorgänge nach HSCT sind, insbesondere durch moderne Konditionierungsregimen und die Einführung der haploidenten Transplantationen, komplexer geworden. Um die Dynamik und Rolle der einzelnen Subgruppen der WBC besser verstehen zu können, werden mehr Studien zu diesem Thema, insbesondere in pädiatrischem Setting, benötigt.

5 Literaturverzeichnis

- (1) Deetjen P, Speckmann E, Hescheler J. Physiologie. 4. Auflage ed.: Urban & Fischer; 2005.
- (2) Vunjak-Novakovic G, Tandon N, Godier A, Maidhof R, Marsano A, Martens TP, et al. Challenges in cardiac tissue engineering. Tissue Engineering Part B: Reviews 2009;16(2):169-187.
- (3) Lüllmann-Rauch R. Taschenlehrbuch Histologie. 2. Auflage ed.: Georg Thieme Verlag KG; 2006.
- (4) Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. Science 1996;273(5272):242-245.
- (5) Alenzi FQ, Alenazi BQ, Ahmad SY, Salem ML, Al-Jabri AA, Wyse RK. The haemopoietic stem cell: between apoptosis and self renewal. Yale J Biol Med 2009;82(1):7.
- (6) Carlo-Stella C, Tabilio A. Stem cells and stem cell transplantation. Haematologica 1996;81(6):573-587.
- (7) Uthaisangsook S, Day NK, Bahna SL, Good RA, Haraguchi S. Innate immunity and its role against infections. Annals of Allergy, Asthma & Immunology 2002;88(3):253-265.
- (8) Gadner H, Gaedicke G, Niemeyer C, Ritter J. Pädiatrische Hämatologie und Onkologie. : Springer; 2006.
- (9) Murphy KM. Janeway's Immunobiology 8th Ed. : Garland Science; 2012.
- (10) Hägele M. Immunrekonstitution nach haploidenter hämatopoetischer Stammzelltransplantation: Einfluss eines CD3/CD19 depletierten gegenüber einem CD34 selektionierten Transplantat. 2009.
- (11) Kärre K. Role of target histocompatibility antigens in regulation of natural killer activity: a reevaluation and a hypothesis. : Academic Press, Orlando, FL; 1985.
- (12) Cooley S, Weisdorf DJ, Guethlein LA, Klein JP, Wang T, Le CT, et al. Donor selection for natural killer cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia. Blood 2010 Oct 7;116(14):2411-2419.
- (13) Cooley S, Trachtenberg E, Bergemann TL, Saeteurn K, Klein J, Le CT, et al. Donors with group B KIR haplotypes improve relapse-free survival after unrelated hematopoietic cell transplantation for acute myelogenous leukemia. Blood 2009 Jan 15;113(3):726-732.

- (14) Leung W, Iyengar R, Turner V, Lang P, Bader P, Conn P, et al. Determinants of antileukemia effects of allogeneic NK cells. *The Journal of Immunology* 2004;172(1):644-650.
- (15) Farag SS, Caligiuri MA. Human natural killer cell development and biology. *Blood Rev* 2006;20(3):123-137.
- (16) Mak TW, Saunders ME, Jett BD. *Primer to the immune response.* : Newnes; 2013.
- (17) Lown R, Shaw B. Beating the odds: factors implicated in the speed and availability of unrelated haematopoietic cell donor provision. *Bone Marrow Transplant* 2013;48(2):210-219.
- (18) Bieber C, Baenkler H, Arastéh K, Brandt R, Chatterjee T. *Duale Reihe Innere Medizin.* : Georg Thieme Verlag; 2012.
- (19) Jacobson L, Marks E, Robson M, Zirkle R. The effect of spleen protection on mortality following X-irradiation 1949.
- (20) Lorenz E, Uphoff D, Reid TR, Shelton E. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J Natl Cancer Inst* 1951 Aug;12(1):197-201.
- (21) Little M, Storb R. History of haematopoietic stem-cell transplantation. *Nature Reviews Cancer* 2002;2(3):231-238.
- (22) Thomas ED, Lochte Jr HL, Cannon JH, Sahler OD, Ferrebee JW. Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *J Clin Invest* 1959;38(10 Pt 1-2):1709.
- (23) Beilby J, Cade IS, Jelliffe A, Parkin DM, Stewart J. Prolonged survival of a bone-marrow graft resulting in a blood-group chimera. *Br Med J* 1960;1(5166):96.
- (24) Barnes D, Loutit J, Micklem H. "Secondary disease" of radiation chimeras: A syndrome due to lymphoid aplasia. *Ann N Y Acad Sci* 1962;99(3):374-385.
- (25) Tomsitz D. *Aus der III. Medizinischen Klinik und Poliklinik der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.*
- (26) Mathe G, Amiel J, Schwarzenberg L, Cattani A, Schneider M. Adoptive immunotherapy of acute leukemia: experimental and clinical results. *Cancer Res* 1965;25(9 Part 1):1525-1531.
- (27) van Bekkum DW, De Vries M. *Radiation chimaeras.* : Logos Press [London][New York] Academic Press; 1967.
- (28) Storb R, Rudolph RH, Thomas ED. Marrow grafts between canine siblings matched by serotyping and mixed leukocyte culture. *J Clin Invest* 1971;50(6):1272.

- (29) Epstein R, Storb R, Ragde H, Thomas E. Cytotoxic typing antisera for marrow grafting in littermate dogs. *Transplantation* 1968;6(1):45-58.
- (30) Deeg H, Raff R, Grosse-Wilde H, Bijma A, Buurman W, Doxiadis I, et al. Joint Report of the Third International Workshop on Canine Immunogenetics: I. Analysis of Homozygous Typing Cells. *Transplantation* 1986;41(1):111.
- (31) Bull R, Vriesendorp H, Cech R, Grosse-Wilde H, Bijma A, Ladiges W, et al. Joint report of the Third International Workshop on Canine Immunogenetics: II. Analysis of the serological typing of cells. *Transplantation* 1987;43(1):154-161.
- (32) Burnett R, DeRose S, Wagner J, Store R. Molecular analysis of six dog leukocyte antigen class I sequences including three complete genes, two truncated genes and one full-length processed gene. *Tissue Antigens* 1997;49(5):484-495.
- (33) Bach F, Albertini R, Joo P, Anderson J, Bortin M. Bone-marrow transplantation in a patient with the Wiskott-Aldrich syndrome. *The Lancet* 1968;292(7583):1364-1366.
- (34) Gatti R, Meuwissen H, Allen H, Hong R, Good R. Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. *The Lancet* 1968;292(7583):1366-1369.
- (35) Thomas E, Buckner C, Rudolph R, Fefer A, Storb R, Neiman P, et al. Allogeneic marrow grafting for hematologic malignancy using HL-A matched donor-recipient sibling pairs. *Blood* 1971;38(3):267-287.
- (36) Thomas E, Storb R, Clift RA, Fefer A, Johnson FL, Neiman PE, et al. Bone-marrow transplantation (first of two parts). *N Engl J Med* 1975 Apr 17;292(16):832-843.
- (37) Thomas ED, Storb R, Clift RA, Fefer A, Johnson L, Neiman PE, et al. Bone-marrow transplantation (second of two parts). *N Engl J Med* 1975 Apr 24;292(17):895-902.
- (38) Weiden PL, Flournoy N, Thomas ED, Prentice R, Fefer A, Buckner CD, et al. Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *N Engl J Med* 1979 May 10;300(19):1068-1073.
- (39) Oudshoorn M, Van Leeuwen A, Zanden Hv, Van Rood J. Bone marrow donors worldwide: a successful exercise in international cooperation. *Bone Marrow Transplant* 1994;14(1):3-8.
- (40) Deeg HJ, Storb R, Weiden PL, Raff RF, Sale GE, Atkinson K, et al. Cyclosporin A and methotrexate in canine marrow transplantation: engraftment, graft-versus-host disease, and induction of tolerance. *Transplantation* 1982;34(1):30-35.
- (41) Prentice H, Janossy G, Price-Jones L, Trejdosiewicz L, Panjwani D, Graphakos S, et al. Depletion of T lymphocytes in donor marrow prevents significant graft-

versus-host disease in matched allogeneic leukaemic marrow transplant recipients. *The Lancet* 1984;323(8375):472-476.

- (42) Santos GW, Tutschka PJ, Brookmeyer R, Saral R, Beschorner WE, Bias WB, et al. Marrow transplantation for acute nonlymphocytic leukemia after treatment with busulfan and cyclophosphamide. *N Engl J Med* 1983;309(22):1347.
- (43) Mutz ID, Tilz GP, Urban C. Bone marrow transplantation for aplastic anaemia in a ten-year-old girl (author's transl). *Wien Klin Wochenschr* 1981 Feb 6;93(3):83-86.
- (44) Giralt S, Estey E, Albitar M, van Besien K, Rondón G, Anderlini P, et al. Engraftment of allogeneic hematopoietic progenitor cells with purine analog-containing chemotherapy: harnessing graft-versus-leukemia without myeloablative therapy. *Blood* 1997;89(12):4531-4536.
- (45) Gupta V, Tallman MS, He W, Logan BR, Copelan E, Gale RP, et al. Comparable survival after HLA-well-matched unrelated or matched sibling donor transplantation for acute myeloid leukemia in first remission with unfavorable cytogenetics at diagnosis. *Blood* 2010 Sep 16;116(11):1839-1848.
- (46) Martin PJ. Overview of hematopoietic cell transplantation immunology. *Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation: Stem Cell Transplantation, Fourth Edition* 1999:129-144.
- (47) Flomenberg N, Baxter-Lowe LA, Confer D, Fernandez-Vina M, Filipovich A, Horowitz M, et al. Impact of HLA class I and class II high-resolution matching on outcomes of unrelated donor bone marrow transplantation: HLA-C mismatching is associated with a strong adverse effect on transplantation outcome. *Blood* 2004 Oct 1;104(7):1923-1930.
- (48) Horan J, Wang T, Haagenson M, Spellman SR, Dehn J, Eapen M, et al. Evaluation of HLA matching in unrelated hematopoietic stem cell transplantation for nonmalignant disorders. *Blood* 2012 Oct 4;120(14):2918-2924.
- (49) Speiser DE, Tiercy JM, Rufer N, Grundschober C, Gratwohl A, Chapuis B, et al. High resolution HLA matching associated with decreased mortality after unrelated bone marrow transplantation. *Blood* 1996 May 15;87(10):4455-4462.
- (50) Frassoni F, Labopin M, Powles R, Mary J, Arcese W, Bacigalupo A, et al. Effect of centre on outcome of bone-marrow transplantation for acute myeloid leukaemia. *The Lancet* 2000;355(9213):1393-1398.
- (51) Handgretinger R, Klingebiel T, Lang P, Schumm M, Neu S, Geiselhart A, et al. Megadose transplantation of purified peripheral blood CD34(+) progenitor cells from HLA-mismatched parental donors in children. *Bone Marrow Transplant* 2001 Apr;27(8):777-783.
- (52) Lang P, Handgretinger R, Niethammer D, Schlegel PG, Schumm M, Greil J, et al. Transplantation of highly purified CD34+ progenitor cells from unrelated donors in pediatric leukemia. *Blood* 2003 Feb 15;101(4):1630-1636.

- (53) Sacchi N, Costeas P, Hartwell L, Hurley C, Raffoux C, Rosenmayr A, et al. Haematopoietic stem cell donor registries: World Marrow Donor Association recommendations for evaluation of donor health. *Bone Marrow Transplant* 2008;42(1):9-14.
- (54) Kollman C, Howe CW, Anasetti C, Antin JH, Davies SM, Filipovich AH, et al. Donor characteristics as risk factors in recipients after transplantation of bone marrow from unrelated donors: the effect of donor age. *Blood* 2001 Oct 1;98(7):2043-2051.
- (55) Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 2006;354(17):1813-1826.
- (56) Koca E, Champlin RE. Peripheral blood progenitor cell or bone marrow transplantation: controversy remains. *Curr Opin Oncol* 2008;20(2):220-226.
- (57) Styczynski J, Balduzzi A, Gil L, Labopin M, Hamladji RM, Markt S, et al. Risk of complications during hematopoietic stem cell collection in pediatric sibling donors: a prospective European Group for Blood and Marrow Transplantation Pediatric Diseases Working Party study. *Blood* 2012 Mar 22;119(12):2935-2942.
- (58) McCredie KB, Hersh EM, Freireich EJ. Cells capable of colony formation in the peripheral blood of man. *Science* 1971 Jan 22;171(3968):293-294.
- (59) Siena S, Bregni M, Brando B, Ravagnani F, Bonadonna G, Gianni AM. Circulation of CD34+ hematopoietic stem cells in the peripheral blood of high-dose cyclophosphamide-treated patients: enhancement by intravenous recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1989 Nov 1;74(6):1905-1914.
- (60) Socinski M, Elias A, Schnipper L, Cannistra S, Antman K, Griffin J. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor expands the circulating haemopoietic progenitor cell compartment in man. *The Lancet* 1988;331(8596):1194-1198.
- (61) Sheridan W, Fox R, Begley C, Maher D, McGrath K, Begley C, et al. Effect of peripheral-blood progenitor cells mobilised by filgrastim (G-CSF) on platelet recovery after high-dose chemotherapy. *The Lancet* 1992;339(8794):640-644.
- (62) Pulsipher MA, Chitphakdithai P, Logan BR, Shaw BE, Wingard JR, Lazarus HM, et al. Acute toxicities of unrelated bone marrow versus peripheral blood stem cell donation: results of a prospective trial from the National Marrow Donor Program. *Blood* 2013 Jan 3;121(1):197-206.
- (63) Negrin RS. Sources of hematopoietic stem cells . 2013; Available at: <http://www.uptodate.com/contents/sources-of-hematopoietic-stem-cells>. Accessed 23.01.2014, 2014.
- (64) Vriesendorp HM. Aims of conditioning. *Exp Hematol* 2003;31(10):844-854.

- (65) Bacigalupo A, Ballen K, Rizzo D, Giralt S, Lazarus H, Ho V, et al. Defining the intensity of conditioning regimens: working definitions. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2009;15(12):1628-1633.
- (66) Cliff R, Buckner C, Appelbaum F, Sullivan K, Storb R, Thomas E. Long-term follow-up of a randomized trial of two irradiation regimens for patients receiving allogeneic marrow transplants during first remission of acute myeloid leukemia. *Blood* 1998;92(4):1455-1456.
- (67) Yaniv I, Stein J. Reduced-intensity conditioning in children: a reappraisal in 2008. *Bone Marrow Transplant* 2008;41:S18-S22.
- (68) Aoudjhane M, Labopin M, Gorin N, Shimoni A, Ruutu T, Kolb H, et al. Comparative outcome of reduced intensity and myeloablative conditioning regimen in HLA identical sibling allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for patients older than 50 years of age with acute myeloblastic leukaemia: a retrospective survey from the Acute Leukemia Working Party (ALWP) of the European group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Leukemia* 2005;19(12):2304-2312.
- (69) Robinson SP, Goldstone AH, Mackinnon S, Carella A, Russell N, de Elvira CR, et al. Chemoresistant or aggressive lymphoma predicts for a poor outcome following reduced-intensity allogeneic progenitor cell transplantation: an analysis from the Lymphoma Working Party of the European Group for Blood and Bone Marrow Transplantation. *Blood* 2002;100(13):4310-4316.
- (70) Martino R, Iacobelli S, Brand R, Jansen T, van Biezen A, Finke J, et al. Retrospective comparison of reduced-intensity conditioning and conventional high-dose conditioning for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation using HLA-identical sibling donors in myelodysplastic syndromes. *Blood* 2006;108(3):836-846.
- (71) Jamieson CH, Amylon MD, Wong RM, Blume KG. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for patients with high-risk acute lymphoblastic leukemia in first or second complete remission using fractionated total-body irradiation and high-dose etoposide: a 15-year experience. *Exp Hematol* 2003;31(10):981-986.
- (72) Ballen KK, Colvin G, Porter D, Quesenberry PJ. Low dose total body irradiation followed by allogeneic lymphocyte infusion for refractory hematologic malignancy-an updated review. *Leuk Lymphoma* 2004;45(5):905-910.
- (73) Storb R. Nonmyeloablative preparative regimens: how relevant for acute myelogenous leukemia? *Leukemia* 2001 Apr;15(4):662-663.
- (74) Khouri IF, Keating M, Körbling M, Przepiorka D, Anderlini P, O'brien S, et al. Transplant-lite: induction of graft-versus-malignancy using fludarabine-based nonablative chemotherapy and allogeneic blood progenitor-cell transplantation as treatment for lymphoid malignancies. *Journal of Clinical Oncology* 1998;16(8):2817-2824.

- (75) Kahl C, Storer BE, Sandmaier BM, Mielcarek M, Maris MB, Blume KG, et al. Relapse risk in patients with malignant diseases given allogeneic hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning. *Blood* 2007;110(7):2744-2748.
- (76) Barnes D. Treatment of murine leukaemia with x rays and homologous bone marrow. *Br Med J* 1956;2(4993):626.
- (77) Weiden PL, Flournoy N, Thomas ED, Prentice R, Fefer A, Buckner CD, et al. Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *N Engl J Med* 1979;300(19):1068-1073.
- (78) Weiden PL, Sullivan KM, Flournoy N, Storb R, Thomas ED. Antileukemic effect of chronic graft-versus-host disease: contribution to improved survival after allogeneic marrow transplantation. *N Engl J Med* 1981 Jun 18;304(25):1529-1533.
- (79) Maraninchi D, Blaise D, Rio B, Leblond V, Dreyfus F, Gluckman E, et al. Impact of T-cell depletion on outcome of allogeneic bone-marrow transplantation for standard-risk leukaemias. *The lancet* 1987;330(8552):175-178.
- (80) Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman J, Kersey J, Kolb H, et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 1990;75(3):555-562.
- (81) Kolb H, Schattenberg A, Goldman JM, Hertenstein B, Jacobsen N, Arcese W, et al. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party Chronic Leukemia [see comments]. *Blood* 1995;86(5):2041-2050.
- (82) Collins R, Shpilberg O, Drobyski WR, Porter DL, Giralt S, Champlin R, et al. Donor leukocyte infusions in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation. *Journal of clinical oncology* 1997;15(2):433-444.
- (83) Kolb H, Schmid C, Barrett AJ, Schendel DJ. Graft-versus-leukemia reactions in allogeneic chimeras. *Blood* 2004;103(3):767-776.
- (84) Petersen SL. Alloreactivity as therapeutic principle in the treatment of hematologic malignancies. Studies of clinical and immunologic aspects of allogeneic hematopoietic cell transplantation with nonmyeloablative conditioning. *Dan Med Bull* 2007 May;54(2):112-139.
- (85) Gale RP, Horowitz MM, Ash RC, Champlin RE, Goldman JM, Rimm AA, et al. Identical-twin bone marrow transplants for leukemia. *Ann Intern Med* 1994;120(8):646-652.
- (86) Baba J, Watanabe S, Saida Y, Tanaka T, Miyabayashi T, Koshio J, et al. Depletion of radio-resistant regulatory T cells enhances antitumor immunity during recovery from lymphopenia. *Blood* 2012 Sep 20;120(12):2417-2427.

- (87) Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002 Mar 15;295(5562):2097-2100.
- (88) Pulsipher MA. Haplo is the new black. *Blood* 2014 Jul 31;124(5):675-676.
- (89) Kolb HJ, Schmid C, Barrett AJ, Schendel DJ. Graft-versus-leukemia reactions in allogeneic chimeras. *Blood* 2004 Feb 1;103(3):767-776.
- (90) Depil S, Deconinck E, Milpied N, Sutton L, Witz F, Jouet J, et al. Donor lymphocyte infusion to treat relapse after allogeneic bone marrow transplantation for myelodysplastic syndrome. *Bone Marrow Transplant* 2004;33(5):531-534.
- (91) Yan CH, Liu DH, Liu KY, Xu LP, Liu YR, Chen H, et al. Risk stratification-directed donor lymphocyte infusion could reduce relapse of standard-risk acute leukemia patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2012 Apr 5;119(14):3256-3262.
- (92) Deol A, Lum LG. Role of donor lymphocyte infusions in relapsed hematological malignancies after stem cell transplantation revisited. *Cancer Treat Rev* 2010;36(7):528-538.
- (93) Miano M, Labopin M, Hartmann O, Angelucci E, Cornish J, Gluckman E, et al. Haematopoietic stem cell transplantation trends in children over the last three decades: a survey by the paediatric diseases working party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2007;39(2):89-99.
- (94) Eapen M, Horowitz MM, Klein JP, Champlin RE, Loberiza FR, Jr, Ringden O, et al. Higher mortality after allogeneic peripheral-blood transplantation compared with bone marrow in children and adolescents: the Histocompatibility and Alternate Stem Cell Source Working Committee of the International Bone Marrow Transplant Registry. *J Clin Oncol* 2004 Dec 15;22(24):4872-4880.
- (95) Schrezenmeier H, Passweg JR, Marsh JC, Bacigalupo A, Bredeson CN, Bullorsky E, et al. Worse outcome and more chronic GVHD with peripheral blood progenitor cells than bone marrow in HLA-matched sibling donor transplants for young patients with severe acquired aplastic anemia. *Blood* 2007;110(4):1397-1400.
- (96) Ljungman P, Bregni M, Brune M, Cornelissen J, De Witte T, Dini G, et al. Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe 2009. *Bone Marrow Transplant* 2009;45(2):219-234.
- (97) Rose HJ. *Griechische mythologie: ein handbuch.* : CH Beck; 2003.
- (98) Ford C, Hamerton J, Barnes D, Loutit J. Cytological identification of radiation-chimaeras. *Nature* 1956;177.

- (99) Dubovsky J, Daxberger H, Fritsch G, Printz D, Peters C, Matthes S, et al. Kinetics of chimerism during the early post-transplant period in pediatric patients with malignant and non-malignant hematologic disorders: implications for timely detection of engraftment, graft failure and rejection. *Leukemia* (08876924) 1999;13(12).
- (100) Gyger M, Baron C, Forest L, Lussier P, Lagace F, Bissonnette I, et al. Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after allogeneic bone marrow transplantation has predictive value for the occurrence of irreversible graft failure and graft-vs.-host disease. *Exp Hematol* 1998 May;26(5):426-434.
- (101) Bader P, Niethammer D, Willasch A, Kreyenberg H, Klingebiel T. How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation? *Bone Marrow Transplant* 2004;35(2):107-119.
- (102) Antin JH, Childs R, Filipovich AH, Giralt S, Mackinnon S, Spitzer T, et al. Establishment of complete and mixed donor chimerism after allogeneic lymphohematopoietic transplantation: recommendations from a workshop at the 2001 Tandem Meetings of the International Bone Marrow Transplant Registry and the American Society of Blood and Marrow Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2001;7(9):473-485.
- (103) Childs R, Clave E, Contentin N, Jayasekera D, Hensel N, Leitman S, et al. Engraftment kinetics after nonmyeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: full donor T-cell chimerism precedes alloimmune responses. *Blood* 1999 Nov 1;94(9):3234-3241.
- (104) Serrano J, Roman J, Sanchez J, Jimenez A, Castillejo JA, Herrera C, et al. Molecular analysis of lineage-specific chimerism and minimal residual disease by RT-PCR of p210(BCR-ABL) and p190(BCR-ABL) after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: increasing mixed myeloid chimerism and p190(BCR-ABL) detection precede cytogenetic relapse. *Blood* 2000 Apr 15;95(8):2659-2665.
- (105) Huisman C, De Weger R, De Vries L, Tilanus M, Verdonck L. Chimerism analysis within 6 months of allogeneic stem cell transplantation predicts relapse in acute myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant* 2007;39(5):285-291.
- (106) Park M, Koh KN, Seo JJ, Im HJ. Clinical implications of chimerism after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children with non-malignant diseases. *The Korean journal of hematology* 2011;46(4):258-264.
- (107) Niethammer D, Goldmann S, Flad H, Wernet P, Stursberg G, Colombani J, et al. Split chimerism in three patients suffering from severe combined immunodeficiency (SCID). *Immunobiology of Bone Marrow Transplantation*: Springer; 1980. p. 391-401.
- (108) Goldmann SF, Niethammer D, Flad HD, Belohradsky BH, Colombani J, Dieterle U, et al. Hemopoietic and lymphopoietic split chimerism in severe combined immunodeficiency disease (SCID). *Transplant Proc* 1979 Mar;11(1):225-229.

- (109) Kristt D, Stein J, Yaniv I, Klein T. Assessing quantitative chimerism longitudinally: technical considerations, clinical applications and routine feasibility. *Bone Marrow Transplant* 2007;39(5):255-268.
- (110) Gene polymorphisms, inflammatory diseases and cancer. PROCEEDINGS-NUTRITION SOCIETY OF LONDON: Cambridge Univ Press; 2002.
- (111) Weber JL, Wong C. Mutation of human short tandem repeats. *Hum Mol Genet* 1993;2(8):1123-1128.
- (112) Alizadeh M, Bernard M, Danic B, Dauriac C, Birebent B, Lapart C, et al. Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Blood* 2002;99(12):4618-4625.
- (113) Murphy KM, Travers P, Walport M. *Janeway's immunobiology*. : Garland Science New York, NY, USA; 2012.
- (114) Abecasis G, Altshuler D, Auton A, Brooks L, Durbin R, Gibbs RA, et al. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 2010;467(7319):1061-1073.
- (115) Thiede C, Bornhauser M, Ehninger G. Strategies and clinical implications of chimerism diagnostics after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Acta Haematol* 2004;112(1-2):16-23.
- (116) 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;81(10):735-746.
- (117) Hochberg EP, Miklos DB, Neuberg D, Eichner DA, McLaughlin SF, Mattes-Ritz A, et al. A novel rapid single nucleotide polymorphism (SNP)-based method for assessment of hematopoietic chimerism after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2003 Jan 1;101(1):363-369.
- (118) Yoshimi A, Niemeyer CM, Bohmer V, Duffner U, Strahm B, Kreyenberg H, et al. Chimerism analyses and subsequent immunological intervention after stem cell transplantation in patients with juvenile myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2005 May;129(4):542-549.
- (119) Bader P, Kreyenberg H, Hoelle W, Dueckers G, Handgretinger R, Lang P, et al. Increasing mixed chimerism is an important prognostic factor for unfavorable outcome in children with acute lymphoblastic leukemia after allogeneic stem-cell transplantation: possible role for pre-emptive immunotherapy? *J Clin Oncol* 2004 May 1;22(9):1696-1705.
- (120) Serrano J, Roman J, Herrera C, Castillejo JA, Navarro JA, Reina ML, et al. Increasing mixed haematopoietic chimerism after BMT with total depletion of

CD4+ and partial depletion of CD8+ lymphocytes is associated with a higher incidence of relapse. *Bone Marrow Transplant* 1999 Mar;23(5):475-482.

- (121) Mattsson J, Uzunel M, Brune M, Hentschke P, Barkholt L, Stierner U, et al. Mixed chimaerism is common at the time of acute graft- versus- host disease and disease response in patients receiving non- myeloablative conditioning and allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2001;115(4):935-944.
- (122) Nakao S, Nakatsumi T, Chuhjo T, Ohtaguro M, Tsuchiya H, Niki T, et al. Analysis of late graft failure after allogeneic bone marrow transplantation: detection of residual host cells using amplification of variable number of tandem repeats loci. *Bone Marrow Transplant* 1992 Feb;9(2):107-111.
- (123) Harries LW, Wickham CL, Evans JC, Rule SA, Joyner MV, Ellard S. Analysis of haematopoietic chimaerism by quantitative real-time polymerase chain reaction. *Bone Marrow Transplant* 2005 Feb;35(3):283-290.
- (124) Victor A, Elsässer A, Hommel G, Blettner M. Wie bewertet man die p-Wert-Flut. *Dtsch Arztebl Int* 2010;107(4):50-56.
- (125) Akı ŞZ, Sucak GT, Özkurt ZN, Yeğın ZA, Yağcı M, Haznedar R. Allogeneic stem cell transplantation for severe aplastic anemia: Graft rejection remains a problem. *Transfusion Apheresis Sci* 2009;40(1):5-11.
- (126) Al Shanqeeti A, Seth P, Aslam M, El Solh H, Aljurf M, Al-Qurashi F, et al. Second allogeneic bone marrow transplantation after myeloablative conditioning analysis of 43 cases from single institution. *Hematology* 2004;9(2):123-129.
- (127) Chung IJ, Lee JJ, Park MR, Kook H, Cho SH, Hwang TJ, et al. Allogeneic peripheral blood stem cell rescue of late graft failure after bone marrow transplantation in patients with aplastic anemia. *J Korean Med Sci* 2002 Aug;17(4):468-474.
- (128) Elebute M, Ball S, Gordon-Smith E, Sage D, Marsh J. Autologous recovery following non-myeloablative unrelated donor bone marrow transplantation for severe aplastic anaemia. *Ann Hematol* 2002;81(7):378-381.