

**Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen
Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Handgretinger**

**Implementierung, Evaluation und vergleichende
Untersuchungen des Powerplex[®] 16 Systems zur
quantitativen Chimärismusanalyse**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Stefanie Joachim

aus

Karlsruhe

2010

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. P. Bader

2. Berichterstatter:

Privatdozent Dr. W. Bethge

Meinen Eltern Kornelia und Christoph, meinen Geschwistern und meiner
kleinen Familie Lasse Finn, Max Carlo und Wolfgang gewidmet



Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Verzeichnis der Abkürzungen.....	V
Verzeichnis der Abbildungen.....	VIII
Verzeichnis der Tabellen.....	IX
1 Einleitung.....	1
1.1 Definition der Stammzelltransplantation (SZT).....	1
1.2 Entwicklung der Stammzelltransplantation.....	1
1.3 Transplantatgewinnung.....	4
1.3.1 Knochenmark.....	4
1.3.2 Fetales Lebergewebe.....	4
1.3.3 Nabelschnurblut-Stammzellen.....	4
1.3.4 Periphere Blutstammzellen.....	4
1.4 T-Zelldepletion.....	6
1.5 Einteilung der Stammzelltransplantation.....	6
1.5.1 Allogene Transplantation.....	6
1.5.2 Syngene Transplantation.....	7
1.5.3 Autologe Transplantation.....	7
1.6 Ablauf der Stammzelltransplantation.....	7
1.6.1 Remissionsinduktionstherapie.....	7
1.6.2 Konditionierung.....	8
1.6.3 Transplantation.....	8
1.6.4 Lymphohämatopoetische Rekonstitution.....	8
1.7 Der Graft-Versus-Leukemia (GVL) Effekt.....	8
1.8 Transplantationsindikationen bei Kindern.....	9
1.9 Komplikationen der Stammzelltransplantation.....	9
1.9.1 Die Transplantatabstoßung (<i>host-versus-graft reaction</i>).....	9
1.9.2 Die Spender-gegen-Empfänger-Reaktion (<i>graft-versus-host reaction, GVHD</i>).....	10
1.9.3 Transplantationsassoziierte Infektionen.....	11

Inhaltsverzeichnis

1.10 Therapieversagen nach SZT	13
1.11 Rezidivtherapie nach Stammzelltransplantation.....	14
1.12 Möglichkeiten der Rezidivfrüherkennung.....	15
1.12.1 Minimale Resterkrankung (<i>MRD, minimal residual disease</i>).....	16
1.12.2.1 Die Chimärismusanalyse	17
1.12.2.2 Definitionen in der Chimärismusanalyse.....	17
1.12.2.3 Methoden zur Detektion des Chimärismusstatus.....	18
1.12.2.4 Bedeutung des gemischten Chimärismus für das Auftreten eines Rezidivs	21
1.12.2.5 STR-Marker in der Chimärismusanalyse	21
1.13 Ziel dieser Arbeit	22
2 Material	24
2.1 Untersuchungsmaterial.....	24
2.2 Patientenkollektiv	25
2.3 Reagenzien	28
2.3.1 DNA-Extraktion der Donor- und Rezipientenvorprobe	28
2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion.....	28
2.3.3 Kapillarelektrophorese	29
2.4 Geräte	30
3 Methoden.....	32
3.1 Isolation der DNA aus Blut- und KM-Proben	32
3.1.1 Anwendungsvorzüge des QIAmp [®] DNA Blood Midi Kit	32
3.1.2 Vorbereitung der Reagenzien	32
3.1.3 Protokoll zur DNA-Isolation der Vor- und Spenderprobe aus Vollblut- und Körperflüssigkeiten	33
3.2 Photometrische Bestimmung des DNA-Gehalts.....	34
3.2.1 Berechnung des einzusetzenden Volumens der DNA-Lösung	35
3.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	35
3.3.1 Prinzip der PCR.....	35
3.3.2 PCR mit Powerplex [®] 16	36
3.3.3 PCR-Ansatz	38
3.3.4 Thermocyclerprogramm des PCR-Ansatzes.....	39

3.4 Verdünnungsreihe als Methode zur Sensitivitäts-prüfung	39
3.4.1 Herstellung der Primer D3 und D21 für die Verdünnungsreihe	42
3.4.2 Berechnung des einzusetzenden Volumens der DNA-Lösung in die Singleplex- und Multiplex-Verdünnungsreihe	42
3.4.3 PCR-Ansatz der Verdünnungsreihe	43
3.4.4 Thermocyclerprogramm der Verdünnungsreihe	44
3.5 Kapillarelektrophorese	44
3.5.1 Prinzip der Kapillarelektrophorese	44
3.5.2 Instrumenteneinstellung des ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer ...	45
3.5.3 Vorbereitung der Proben für den ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer	45
3.5.4 Kapillarelektrophorese der Proben mit dem ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer	46
4 Ergebnisse	47
4.1 Informativität der im Powerplex® 16 System enthaltenen STR-Primer ...	47
4.2 Sensitivität der im Powerplex® 16 System enthaltenen STR-Primer	68
4.2.1 Testung der Nachweisgrenze der Multiplex PCR (mit Verdünnungsreihen aus Spender und Empfänger-DNA)	68
4.2.2 Sensitivität der Singleplex-Verdünnungsreihen (Primer D3S1358 und D21S11)	100
4.3 Quantitative Analyse von Proben mit gemischtem Chimärismus durch das PowerPlex®16 System	105
5 Diskussion	107
5.1 Bedeutung der Chimärismusanalyse nach SZT	107
5.2 Die Methode: Chimärismusanalyse mittels Powerplex® 16	108
5.3 Anwendbarkeit und Durchführbarkeit der Methode	109
5.4 Informativität der Methode	110
5.5 Sensitivität der Methode	113
5.5.1 Sensitivität der Multiplex-Verdünnungsreihen	113
5.5.2 Sensitivität der Singleplex-Verdünnungsreihen mit den Primern D3S1358 und D21S11	114
5.6 Ausblick	115

Inhaltsverzeichnis

6 Zusammenfassung	116
7 Literaturverzeichnis.....	118
8 Danksagung.....	131
9 Curriculum vitae	135

Verzeichnis der Abkürzungen

ADV	Adenovirus
ALD	Adrenoleukodystrophie
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
AMP-FLP	<i>amplified fragment length polymorphism</i>
bp	Basenpaar
CC	<i>complete chimerism</i>
CLL	Chronisch Lymphatische Leukämie
CML	Chronisch Myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalievirus
CR	<i>complete remission</i>
CSA	Cyclosporin A
DBA	Diamond-Blackfan-Anämie
DKMS	Deutsche Knochenmarkspenderdatei
DLI	Donor-Lymphozyten Infusion
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFS	<i>eventfree survival</i>
FISH	Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung
G-CSF	<i>granulozyte colony-stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>granulozyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GVH	<i>graft versus host</i>
GVHD	<i>graft versus host disease</i>
GVL	<i>graft versus leukemia</i>
HHV-6	Humanes Herpesvirus Typ 6

Abkürzungen

HLA	<i>human leucocyte antigen</i>
HSV	Herpes-simplex-Virus
IFN- γ	Interferon- γ
IL-1	Interleukin-1
IL-2	Interleukin-2
JMML	Juvenile Myelomonozytäre Leukämie
kb	Kilobase
KM	Knochenmark
KMT	Knochenmarktransplantation
KOF	Körperoberfläche
MC	<i>mixed chimerism</i>
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MFD	<i>matched family donor</i>
mHags	Minor-Histokompatibilitäts-Antigene
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MLC	<i>mixed-lymphocyte culture</i>
MMRD	<i>mismatched related donor</i>
MMUD	<i>mismatched unrelated donor</i>
MRD	<i>minimal residual disease</i>
MRD	<i>matched related donor</i>
MSD	<i>matched sibling donor</i>
MUD	<i>matched unrelated donor</i>
NHL	Non Hodgkin Lymphom
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBSC	<i>peripher blood stem cells</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PNET	Primitiver Neuroektodermaler Tumor
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpoly- morphismus
rfu	relative Fluoreszenzeinheiten
rpm	<i>rounds per minute</i>

Abkürzungen

RQ-RT-PCR	<i>real-time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
RSD-Code	<i>Recipient-Shared-Donor-Code</i>
RSV	Respiratory-Syncytial-Virus
RT-PCR	<i>real-time polymerase chain reaction</i>
SAA	Schwere aplastische Anämie
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i>
STR	<i>short tandem repeats</i>
SZT	Stammzelltransplantation
TCR	<i>T-cell receptor</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRM	<i>transplant-related mortality</i>
UPN-Nr.	Patientennummer
VNTR	<i>variable number of tandem repeats</i>
VZV	Varicella-Zoster-Virus
ZNS	Zentrales Nervensystem

Verzeichnis der Abbildungen

- Abb. 1.12.2.1:** Chimäre von Arezzo
- Abb. 3.1.3:** Schematische Darstellung des QIAmp Spinsäulen-Verfahrens
- Abb. 3.3.3:** Pipettieranleitung zur Herstellung des PCR-Ansatzes
- Abb. 3.3.4:** Thermocyclerprogramm
- Abb. 3.4:** Vorgehensweise beim Anlegen einer Standardverdünnungsreihe
- Abb. 3.4.3:** Pipettieranleitung zur Herstellung des PCR-Ansatzes der Verdünnungsreihe
- Abb. 3.4.4:** Thermocyclerprogramm der Verdünnungsreihe
- Abb. 4.1.1:** Powerplex[®] 16-Ausdruck eines Donor-Rezipienten-Paares
- Abb. 4.1.2:** Homozygote Allelkonstellationen
- Abb. 4.1.3:** Heterozygote Allelkonstellationen
- Abb. 4.1.4:** Diskriminationsfähigkeit der STR-Primer
- Abb. 4.1.5:** Häufigkeit der Allelkonstellation D im Kollektiv von 76 Patienten
- Abb. 4.1.6:** Häufigkeit der Allelkonstellation d im Kollektiv von 76 Patienten
- Abb. 4.1.7:** Häufigkeit der Allelkonstellation D kurz im Kollektiv von 76 Patienten
- Abb. 4.1.8:** Häufigkeit der Allelkonstellation R im Kollektiv von 76 Patienten
- Abb. 4.1.9:** Häufigkeit der Allelkonstellation r im Kollektiv von 76 Patienten
- Abb. 4.1.10:** Häufigkeit der Allelkonstellation R kurz im Kollektiv von 76 Patienten
- Abb. 4.1.11:** Darstellung der Powerplex[®] 16-STR-Primer mit Auswertung sämtlicher möglicher Allelkonstellationen

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 2.2:	Patientenkollektiv
Tabelle 2.3.1:	DNA-Isolationsmaterialien
Tabelle 2.3.2:	Polymerase-Kettenreaktion
Tabelle 2.3.3:	Kapillarelektrophorese
Tabelle 2.4:	Geräte
Tabelle 3.3.2:	Short tandem repeat Loci und allelische Leiter
Tabelle 3.4.1:	Charakteristika der STR-Primer D3S1358 und D21S11
Tabelle 4.1.1:	Auswertung der Patienten-/Spenderpaare gemäß RSD-Code
Tabelle 4.1.2:	Übersicht der mittels RSD-Code erhaltenen Ergebnisse
Tabelle 4.1.3:	Mittelwerte der Allelkonstellationen im analysierten Patientenkollektiv
Tabelle 4.1.4:	Punktwertung der Allelkonstellationen bezogen auf den Mittelwert
Tabelle 4.1.5:	Punktwerte der einzelnen STR-Primer
Tabelle 4.2.1.1:	Multiplex-Verdünnungsreihe des Patientenpaars 2302/2320
Tabelle 4.2.1.2:	Multiplex-Verdünnungsreihe des Patientenpaars 2364/2499
Tabelle 4.2.1.3:	Multiplex-Verdünnungsreihe des Patientenpaars 2298/2393
Tabelle 4.2.1.4:	Multiplex-Verdünnungsreihe des Patientenpaars 2311/2492
Tabelle 4.2.1.5:	Sensitivität der Patientenpaare
Tabelle 4.2.1.6:	Sensitivität der einzelnen Multiplex-Primer
Tabelle 4.2.2.1:	Verdünnungsreihen der Primer D3S1358 und D21S11
Tabelle 4.2.2.2:	Übersicht der Singleplex-Verdünnungsreihen

1 Einleitung

1.1 Definition der Stammzelltransplantation (SZT)

Die Stammzelltransplantation ist ein Therapieverfahren, bei dem nach Eradikation des Knochenmarks mittels Konditionierung (Chemotherapie und/oder fraktionierter Ganzkörperbestrahlung) hämatopoetische Stammzellen infundiert werden, die über eine Kaskade bestimmter Homing- und Adhäsionsrezeptoren den Weg in den leeren Knochenmarkraum finden, sich im Stroma ansiedeln und, beeinflusst durch Signale des Stroma, sich zu teilen und differenzieren beginnen.

Der ursprüngliche Begriff der Knochenmarktransplantation (KMT) wurde zugunsten des Überbegriffs hämatologische Stammzelltransplantation verlassen, da neben dem Knochenmark auch aus Nabelschnurblut und nach entsprechender Stimulation mit G-CSF (*granulozyte colony-stimulating factor*) bzw. GM-CSF (*granulozyte macrophage colony-stimulating factor*) aus dem peripheren Blut Stammzellen gewonnen werden können.

1.2 Entwicklung der Stammzelltransplantation

Bereits 1937 führten Osgood et al. eine intravenöse Gabe sternalen Knochenmarks bei einer 19-jährigen Patientin mit aplastischer Anämie durch, die Patientin verstarb fünf Tage später an einer Infektion. Bei der Autopsie konnten einzelne regenerierte Knochenmarkinseln gefunden werden; einen Beweis für einen Therapieerfolg konnten sie allerdings nicht liefern.¹

1951 konnte gezeigt werden, dass Mäuse, die eine Ganzkörperbestrahlung erhalten hatten und unmittelbar danach Knochenmark infundiert bekamen, sowohl dem Strahlentod entgehen als auch eine spenderspezifische Immuntoleranz entwickeln und somit ein Hauttransplantat derselben Spendermaus akzeptieren.²⁻⁴

Desweiteren konnten Jacobson et al. 1951 in Mausversuchen zeigen, dass eine Bleiabschirmung der Milz eine annähernd doppelte Dosis der Ganzkörperbestrahlung zulässt.⁵

1954 führte J. E. Murray die erste erfolgreiche Nierentransplantation bei genetisch identischen Zwillingen am Bringham Hospital in Boston durch, nachdem er zuvor Erfahrungen auf dem Gebiet der Nierentransplantation bei Hunden gesammelt hatte.⁶ E. D. Thomas, als Kollege von Murray inspiriert, wagte 1957 bei sechs Patienten und 1959 bei genetisch identischen Zwillingspaaren die ersten noch erfolglosen allogenen Knochenmarktransplantationsversuche. 1990 erhielten er und J. E. Murray für ihre Errungenschaften betreffend Organ- und Zelltransplantation den Nobelpreis für Medizin.^{7,8}

1959 gelang G. Mathe die erste erfolgreiche allogene KMT bei einem an akuter lymphatischer Leukämie erkrankten Patienten.⁹

Ein bedeutender Schritt in der Entwicklung der Stammzelltransplantation stellt die Entdeckung der Histokompatibilitätsantigene und deren Klassifikation im humanen Leukozytenantigensystem (HLA-System) durch Dausset im Jahre 1958 dar.¹⁰ HLA-Antigene sind membrangebundene Glykoproteine, die von einer Gruppe von Genen lokalisiert auf dem kurzen Arm des Chromosom sechs, mit der Bezeichnung Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex, MHC*) codiert werden.¹¹

Die Merkmale HLA-A, -B und -C werden als Klasse I zusammengefasst. Die Merkmale HLA-DR, -DQ und -DP formieren die Klasse II. Der Vererbungsmodus erfolgt nach den Mendelschen Regeln, d.h. die Wahrscheinlichkeit, einen HLA-identischen Geschwisterspender zu finden, beträgt 0,25. HLA-Antigene sind auf der Oberfläche fast aller kernhaltigen Körperzellen vorhanden und präsentieren den T-Zellen Peptidantigene, das bedeutet, das HLA-System bedingt die immunologische Selbstdefinition des Organismus; es unterscheidet, welche Gewebe körpereigen sind und welche nicht. Dieses Überwachungssystem ist ungeheuer wichtig zur Krankheitserkennung, für eine Transplantation ist es prinzipiell nicht günstig. Der Polygenismus und Polymorphismus des MHC führt theoretisch zu einer HLA-A-,

-B-, -C-, -DR-, -DQ- und -DP-Genotyp-Vielfalt, die die Zahl der Erdbevölkerung übersteigt. Da einige Merkmale frequenter sind als andere, und bestimmte Haplotypen sich überzufällig häufig aus den gleichen Merkmalen zusammensetzen, können HLA-kompatible, unverwandte Spender durch weltweit vernetzte Fremdspenderdatenbanken, wie z.B. die Deutsche Knochenmarkspenderdatei (DKMS) vermittelt werden.^{12,13}

Der ideale Spender für eine allogene Stammzelltransplantation ist ein HLA-genotypisch identisches Geschwisterkind; ein unmodifiziertes Transplantat eines Fremdspenders darf maximal eine singuläre Differenz (*mismatch*) an den Genorten HLA-A, -B, -DRB1 oder -DQB1 haben. Alternativ kann bei Fehlen eines Fremd- oder Geschwisterspenders seit einigen Jahren durch Optimierung der T-Zelldepletion auch eine HLA-haploidentische Transplantation z.B. von einem Elternteil auf ein Kind erfolgen.¹⁴

Im Vorfeld einer Transplantation muss sichergestellt werden, dass Spender und Empfänger in Bezug auf die HLA-Antigene kompatibel sind. Zur Typisierung standen für den HLA-Klasse-I-Komplex zunächst serologische Methoden (Mikrolymphozytotoxizitätstest) und für den HLA-Klasse-II-Komplex die gemischte Lymphozytenkultur (*mixed-lymphocyte culture, MLC*) zur Verfügung.¹⁵

Heute werden mittels PCR (*polymerase chain reaction*) und Gentyppisierung (DNA-Sequenzierung) alle HLA-Allele exakt festgestellt.

Erste erfolgreiche HLA-kompatible Transplantationen folgten bei einem Kind mit Immundefekt durch die Gruppe um Good 1968.¹⁶

1971 transplantierte E. D. Thomas in Seattle erstmals einem Leukämiepatienten das Knochenmark seiner HLA-identischen Schwester; ein Jahr später befand sich der Patient weiterhin in kompletter Remission.¹⁷

Ende der siebziger Jahre führte F. R. Appelbaum die ersten erfolgreichen autologen Knochenmarktransplantationen bei Lymphompatienten durch.¹⁸

1.3 Transplantatgewinnung

1.3.1 Knochenmark

Knochenmark als Quelle der Stammzellen wird seit den 50er Jahren benutzt und ist das klassische Verfahren der Stammzellgewinnung.^{7,8} In Vollnarkose oder Periduralanästhesie werden dem Spender durch Punktionen an den Beckenkämmen maximal 20% des eigenen Knochenmarks entnommen, das schnell wieder nachgebildet wird.

1.3.2 Fetales Lebergewebe

In den 70er Jahren wurde zum ersten Mal fetales Lebergewebe als Ursprung der Stammzellen in der Behandlung von Kindern mit Immundefekt angewandt.¹⁹

1.3.3 Nabelschnurblut-Stammzellen

1989 wurde erstmals Nabelschnurblut, das eine hohe Konzentration an Stammzellen während der fetalen Entwicklung und kurz nach der Geburt enthält, für Transplantationen verwendet.^{20,21} Aufgrund der niedrigen T-Zell-Last und der funktionellen Unreife des neonatologischen Immunsystems werden bei unverwandten Nabelschnurbluttransplantationen weniger GVH (*graft versus host*)-Reaktionen beobachtet.²²

Die Zeitspanne bis zum *Engraftment* ist vergleichbar mit Patienten, die eine KMT eines unverwandten Spenders erhalten, wenn mindestens $1,7 \times 10^5$ /kg CD34+ Zellen aus dem Nabelschnurtransplantat gewonnen werden können.²³ Auch hier wurde ein Netzwerk von Nabelschnurblut-Stammzellbanken aufgebaut, wie z.B. Eurocord in Europa, die Spender für unverwandte Transplantationen vermittelt.

1.3.4 Periphere Blutstammzellen

Die Transplantation peripherer Blut- statt Knochenmarkstammzellen begann mit dem Nachweis dieser Zellen im Blut durch Storb et al.²⁴ Unter physiologischen

Bedingungen sind 0,06% aller kernhaltigen Zellen im peripheren Blut CD34+-Progenitoren. Durch die Gabe hämatopoetischer Wachstumsfaktoren wie rekombinantem, humanen *granulozyte colony stimulating factor* (rhG-CSF) und/oder *granulozyte/monozyte colony stimulating factor* (rhGM-CSF) für vier bis sechs Tage lässt sich die Ausbeute peripherer Stammzellen um ein vielfaches erhöhen.²⁵

Durch ein bis zwei Leukapheresen werden anschließend die mobilisierten Stammzellen aus dem peripheren Blut gesammelt,²⁶ bei autologen Transplantationen kryokonserviert, in Flüssigstickstoff unter Verwendung des Kryoprotektors DMSO (Dimethylsulfoxid) bei -130° gelagert und zu gegebenem Zeitpunkt nach dem Auftauen wieder retransplantiert.

1993 konnten Bensinger et al. zeigen, dass die hämatologische Regeneration nach autologer Transplantation, im Gegensatz zur KMT nicht-invasiv gewonnener peripherer Blutstammzellen, durch einen höheren Anteil sogenannter determinierter Stammzellen, schneller verläuft als unter der historischen Knochenmarktransplantation.²⁷ Die erstmals 1995 durch Schmitz durchgeführte allogene Transplantation peripherer Stammzellen, weist nicht nur eine schnellere hämatologische und immunologische Rekonstitution des Empfängers auf, sondern auch eine verstärkte *graft versus leukemia-reaction*, da im Transplantat eine größere Anzahl natürlicher Killerzellen (NK-Zellen) enthalten sind.²⁸

Für den Spender hat das Verfahren den Vorteil, dass es weder einer Narkose noch einer Hospitalisierung bedarf. Als häufige Nebenwirkung der Zytokine werden durch den massiven Zellanstieg ausgelöste Kopfschmerzen beobachtet.

Ein weiterer Nachteil der unmodifizierten allogenen peripheren Stammzelltransplantation ist die, auf Grund ihrer etwa 10-fach höheren T-Zell-Zahl, größere Inzidenz für die durch T-Zellen vermittelte chronische GVHD (*graft versus host disease*).²⁹

1.4 T-Zelldepletion

T-Zell-depletierte PBSC (*peripher blood stem cells*) vermindern einerseits die Inzidenz für eine akute oder chronische GVHD, und sind somit eine Therapieoption für Patienten, die ein erhöhtes Risiko für eine schwere GVHD haben, andererseits können Transplantatabstoßung, ein Rezidiv der Grunderkrankung und späte opportunistische Infektionen häufiger beobachtet werden.³⁰⁻³²

Bei Vorliegen einer Differenz von zwei oder mehr HLA-Antigenen ist eine T-Zell-Elimination auf eine Restgröße von $<0,5 \cdot 10^5$ /kg Körpergewicht des Empfängers durch z.B. ein immunmagnetisches Verfahren obligat.^{12,33}

1.5 Einteilung der Stammzelltransplantation

1.5.1 Allogene Transplantation

Bei der allogenen Transplantation handelt es sich um die Gabe von fremden Spender-Zellen; es kann sich um einen HLA-genotypisch oder phänotypisch identischen Familienspender (*matched family donor*, MFD; Synonym: *matched related donor*, MRD), oder ein HLA-genotypisch oder phänotypisch identischer Geschwisterspender, (*matched sibling donor*, MSD), einen HLA-differenten Familienspender (*mismatched related donor*, MMRD), oder einen HLA-phänotypisch möglichst angepassten unverwandten Spender (Fremdspender; *matched unrelated donor*, MUD) handeln.¹² Durch die allogene Transplantation wird versucht, nach Konditionierung mittels einer myeloablativen oder immunsuppressiven Therapie zur Beseitigung des defekten Systems und Vermeidung einer Transplantatabstoßung, das fehlerhafte oder maligne transformierte lymphohämatopoetische System des Empfängers zu ersetzen. Die allogene Transplantation hat den Vorteil, dass das neue Immunsystem des Donors einen antileukämischen Effekt aufweist, die sogenannte *graft versus leucemia-reaction*, kurz GVL-Reaktion und im Gegensatz zur autologen Transplantation ein niedrigeres Rezidivrisiko der Grunderkrankung aufweist.

1.5.2 Syngene Transplantation

Dies ist eine Sonderform der allogenen Transplantation. Der Spender ist ein eineiiges Zwillingsgeschwister.

1.5.3 Autologe Transplantation

Nach myelosupprimierender Behandlung mittels Hochdosisradio-/Chemotherapie erfolgt die Gabe eigener, während der Remission nach Stimulation mit G-CSF und Leukapherese gewonnener, meist kryokonservierter Stammzellen. Dies ermöglicht eine schnelle hämatologische Rekonstitution nach zytostatischer Therapie bei soliden Tumoren und lymphoproliferativen Erkrankungen, die für die Hämatopoese letal wäre. Die autologe Transplantation hat eine signifikant geringere Transplantations-assoziierte Mortalität (*transplant-related mortality*; TRM);³⁴ die Toxizität ist durch das Ausbleiben einer GVHD und einer Transplantatabstossung geringer. Die Nachteile der autologen SZT bestehen in einem fehlenden GVL-Effekt und dem Risiko der Retransfusion von Tumorzellen. Patienten nach autologer SZT haben ein signifikant höheres Risiko für ein Rezidiv als nach allogener SZT.³⁵

Durch die Methode des *in vitro purging* kann autologes Knochenmark von residualen Leukämiezellen befreit werden und ist somit bei jungen Patienten eine Alternative bei Fehlen eines HLA-identischen Spenders.³⁶

1.6 Ablauf der Stammzelltransplantation

Die Stammzelltransplantation kann in vier Phasen eingeteilt werden: Remissionsinduktionstherapie, Konditionierung, Transplantation und die lymphohämatopoetische Regeneration.

1.6.1 Remissionsinduktionstherapie

Diese Therapieform erfolgt v.a. bei Leukämien vor der Konditionierung, um den Patienten in Remission zu bringen, d.h. dass im Knochenmark weniger als 5% und im peripheren Blut keine Blasten vorhanden sind.

1.6.2 Konditionierung

Der Patient wird zunächst einer myeloablativen Vorbehandlung (Konditionierung) mittels Radio- und/oder Chemotherapie unterzogen.³⁷ Bei der autologen Transplantation kann damit eine maximale zytostatische Wirkung erreicht werden, bei der allogenen Transplantation dient dies zudem der intensiven Immunsuppression zur Verhinderung einer Transplantatabstossung. Während dieser Phase ist der Patient maximal immunsupprimiert. Er wird in einem sogenannten Zelt untergebracht; dies ist ein Raum mit Überdruck und Hochleistungsfiltern, um das Infektionsrisiko zu verringern.³⁸

1.6.3 Transplantation

Die Transplantation erfolgt am Tag 0 durch Infusion von Knochenmarkstammzellen, Nabelschnurstammzellen oder mobilisierten peripheren Blutstammzellen über einen zentralen Venenkatheter. Die Stammzellen siedeln sich in den Knochenmarksräumen, Milz und Leber an und beginnen mit der Formierung neuer Blutbildungsinself.

1.6.4 Lymphohämatopoetische Rekonstitution

Die Regeneration von Granulo- und Erythropoese dauert zwei bis vier Wochen; bis zur Normalisierung der Thrombopoese können Monate vergehen.

Die Rekonstitution des Immunsystems benötigt bei autologen Transplantationen drei Monate und schließt auch die spezifische Immunität mit ein. Bei allogenen Transplantationen werden nach ca. drei Monaten T-Zellen und nach ungefähr einem halben Jahr B-Zellen gebildet.³⁹ 6-12 Monate nach der Transplantation kann mit dem Aufbau eines neuen Impfschutzes begonnen werden.

1.7 Der *Graft Versus Leukemia* (GVL)-Effekt

Der *graft versus leukemia*-Effekt beruht auf der Fähigkeit des neuen, nicht-identischen Immunsystems, nach SZT oder KMT Tumorzellen zu erkennen, zu zerstören und zu eliminieren. Sowohl der GVL-Effekt als auch die GVHD

werden durch eine T-Zell-Antwort auf Minor-Histokompatibilitätsantigene induziert.⁴⁰

Empfänger einer allogenen SZT haben ein geringeres Rezidivrisiko als Patienten, die eine syngene SZT oder eine T-Zell-depletierte allogene SZT erhalten haben; bei der autologen SZT fehlt der GVL-Effekt.^{31,41} Eine akute GVHD bis Grad II und eine chronische GVHD bringen einen antileukämischen Effekt mit sich;⁴² eine intensive GVHD-Prophylaxe ist dagegen mit einer erhöhten Rezidivrate assoziiert.⁴³

1.8 Transplantationsindikationen bei Kindern

Indikationen für eine Transplantation sind maligne und nicht maligne hämatologische Erkrankungen, z.B. ALL (Akute Lymphatische Leukämie) mit spezifischen Chromosomenabberationen, AML (Akute Myeloische Leukämie) mit zytogenetischen Befunden, CML (Chronisch Myeloische Leukämie), MDS (Myelodysplastisches Syndrom), Morbus Hodgkin- und Non Hodgkin Lymphom-Rezidiv, Sichelzellanämie, Thalassämie, solide Tumoren in fortgeschrittenem Stadium oder nach Rezidiv, aplastische Anämien, konstitutionelle Aplasiesyndrome, primäre Immundefekte, Stoffwechselerkrankungen und Autoimmunerkrankungen.⁴⁴

1.9 Komplikationen der Stammzelltransplantation

1.9.1 Die Transplantatabstoßung (*host versus graft-reaction*)

Die allogene Transplantatabstoßung ist gekennzeichnet durch eine fehlende hämatopoetische Rekonstitution induziert durch eine klassische, T-Zell-vermittelte Abstoßung.

Storb et al. macht sowohl für die Transplantatabstoßung als auch für die GVH-Reaktion genetisch bedingte Histokompatibilitätsfaktoren verantwortlich.⁴⁵ Eine präventive Immuntherapie durch Transfusion niedrig dosierter Donor-T-

Lymphozyten auf der Grundlage eines wachsenden gemischten Chimärismus kann eine Transplantatabstoßung vermeiden.⁴⁶

1.9.2 Die Spender-gegen-Empfänger-Reaktion (*graft versus host-reaction*, GVHD)

Je größer die Zahl der unterschiedlichen HLA-Antigene zwischen Spender und Empfänger, umso höher ist in der Regel die Gefahr einer tödlichen *graft versus host-reaction*.⁴⁷ Mausversuche haben gezeigt, dass die Pathophysiologie der GVHD in drei Stufen abläuft. Das Konditionierungsregime führt zunächst zu einer Schädigung des Empfängergewebes, das die Sekretion inflammatorischer Zytokine induziert. Als Folge dessen werden mehr MHC-Antigene exprimiert, die durch die Spender-T-Zellen besser erkannt werden können. Die Donor-T-Zellen interagieren mit antigenpräsentierenden Zellen (APC) des Empfängers; dies führt zu einer T-Zellaktivierung mit T-Zell-Proliferation, -Differenzierung und Sekretion von Zytokinen wie IL-2 (Interleukin-2) und IFN- γ (Interferon- γ). Zytokine erzeugen eine zytotoxische T-Zell- sowie NK-Zell-Antwort und regen mononukleäre Phagozyten zur Produktion von TNF- α (Tumornekrosefaktor- α) und IL-1 (Interleukin-1) an. Diese inflammatorischen Zytokine stimulieren wiederum die Produktion von Chemokinen; dadurch werden die Effektoren in die Zielorgane gelockt. Im letzten Schritt führen mononukleäre Phagozyten zu einer Leckage der intestinalen Mukosa; daraus resultiert eine Gewebeerstörung und die Unterhaltung einer Entzündungsreaktion.⁴⁸ Prophylaktische Maßnahmen zur Verhinderung der GVHD durch Gabe von Methotrexat oder Cyclosporin A und niedrigdosierte Steroide.

Mit zunehmendem Alter nehmen Schweregrad und Inzidenz sowohl der akuten als auch der chronischen Form zu; bei Kindern unter 10 Jahren sieht man schwere Formen der GVHD extrem selten.

Klinisch werden zwei Formen der GVHD unterschieden:

Akute GVHD: 7 Tage bis 4-6 Wochen nach Transplantation. Therapie in Form von hochdosierten Steroiden. Graduierung je nach Beteiligung von Darm

(Diarrhoe in ml/d), Haut (Exanthem in % der KOF) und Leber (Bilirubin in mg/dl) nach dem Seattle-Schema in I° bis IV°.

Chronische GVHD: Kann sich aus der akuten Form entwickeln oder 2-3 Monate nach Transplantation plötzlich ausbilden. Immunsuppressive Therapie mit einer variablen Kombination aus Steroiden, Azathioprin und Cyclosporin A.

Symptome der akuten und chronischen GVHD:

- Haut: Makulopapulöses, konfluierendes Exanthem, bezieht im Besonderen auch Handinnenflächen und Fußsohlen mit ein. Weiterhin kann es zur Erythrodermie und schließlich zur Blasenbildung und Desquamation mit eventuell völligem Verlust der Haut kommen. Bei der chronischen GVHD können Sklerodermie-ähnliche Veränderungen der Haut bis hin zu Gelenkkontrakturen auftreten.
- Leber: Anstieg der Leberenzyme, Ausbildung eines Stauungsikterus; kann in eine biliäre Zirrhose münden.
- Darm: Enteritis, in schweren Fällen hämorrhagisch, mit extremen Flüssigkeits- und Eiweißverlusten.
- Knochenmark: Dysfunktionen mit Transfusionsabhängigkeit besonders im Bereich der Thrombopoese bei chronischer GVHD.
- Allgemeinsymptome: Fieber und Krankheitsgefühl sowie Ulzerationen und Leukoplakiebildungen der Mundschleimhaut.

1.9.3 Transplantationsassoziierte Infektionen

1.9.3.1 Bakterielle Infektionen

Bakterielle Infektionen sind besonders in den ersten vier Wochen nach Transplantation, abhängig vom Ausmaß der Neutropenie und des Antikörpermangels sowie der Mukosabeteiligung von Oropharynx und Gastrointestinaltrakt als ernsthafte Komplikation anzusehen.

Fieber ist potentiell als Sepsis zu werten und es sollte umgehend eine, das gesamte Spektrum der gramnegativen und zunehmend auch der grampositiven

Bakterien abdeckende, intravenöse antibiotische Therapie eingeleitet werden.⁴⁹ Die Gabe von Immunglobulinen als Prävention oder Granulozytenkonzentraten und Zytokinen zur Unterstützung in der Neutropeniephase sind zu erwägen.⁵⁰

1.9.3.2 Virusinfektionen

Eine der häufigsten Komplikationen im Rahmen der SZT sind endogene Reaktivierungen oder Neuinfektionen durch Herpesviren (Herpes-simplex-Virus, HSV; Varicella-Zoster-Virus, VZV; Cytomegalievirus, CMV; Epstein-Barr-Virus, EBV; Humanes Herpesvirus Typ 6, HHV-6) z.B. durch kontaminierte Blutprodukte oder das Transplantat selbst.

Auch das saisonabhängige Respiratory-Syncytial-Virus (RSV) und Adenoviren (ADV) führen vor allem bei Kindern mit T-Zell-depletierten Transplantaten, HLA-Mismatch und gleichzeitiger Erkrankung an einer GVHD zu Morbidität und Mortalität.⁵¹

Die prophylaktische Gabe von Aciclovir gegen HSV- und VZV-Infektionen wurde routinemässig eingeführt; mit Ganciclovir, Ribavirin, Foscarnet und Cidofovir stehen weitere Virostatika zur Verfügung.⁵² Der adoptive T-Zell-Transfer ist eine neue, nebenwirkungsärmere Therapieoption viraler Infektionen.⁵³

1.9.3.3 Pilzinfektionen

Neutropenien nach SZT, die länger als sieben Tage andauern, sind der größte Risikofaktor für die Entwicklung einer systemischen Pilzinfektion.

Pilze lassen sich sowohl in Kulturverfahren, PCR- (*polymerase chain reaction*) und Antigentests als auch in Computertomographieuntersuchungen schwer diagnostizieren. Am häufigsten verursachen Candida-, Aspergillus-, Cryptococcus neoformans- und Mucorspezies systemische Pilzinfektionen. Bei Fieber unklarer Genese nach SZT ist eine antimykotische Therapie mit Amphotericin, alternativ mit Itraconazol, Voriconazol oder Caspofungin Therapie der Wahl. Auch hier ist die Gabe von Granulozytenkonzentraten oder Zytokinen unterstützend wirksam.⁵⁴

1.9.4 Spätschäden

Patienten nach SZT haben, abhängig von der durchgeführten Therapie (Chemotherapie, Radiatio), ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung sekundärer Malignome wie B-Zell-Erkrankungen, T-Zell-Lymphome, Morbus Hodgkin, Leukämien, MDS, Karzinome, Sarkome und Tumoren des ZNS (Zentrales Nervensystem).⁵⁵⁻⁵⁷

Der größte Risikofaktor bezüglich nichtmalignen Spätkomplikationen nach SZT ist eine chronische GVHD und der mit ihr einhergehende Immundefekt sowie die Ganzkörperbestrahlung im Rahmen der Konditionierungstherapie; es kann zur Bildung eines Katarakt, einer Keratokonjunctivitis sicca, chronischen obstruktiven und restriktiven Lungenerkrankungen, hinsichtlich der Leber zur Venocclusiven Verschlusskrankheit, am Skelett zur Osteoporose und avaskulären Knochennekrosen, zu endokrinen Störungen mit Schilddrüsen- und Gonadendysfunktion sowie fehlendem Wachstum und zur Infertilität führen.^{58,59}

1.10 Therapieversagen nach SZT

Die therapieassoziierte Mortalität durch lebensbedrohliche Infektionen mit opportunistischen Erregern konnte durch die Entwicklung sowie den prophylaktischen und therapeutischen Einsatz antibiotischer und antimykotischer Chemotherapeutika deutlich gesenkt werden. Auch die Inzidenz der akuten und chronischen GVHD wurde durch die Etablierung der T-Zell-Depletion bei Vorliegen eines *HLA-mismatch* reduziert.^{60,61} Das Wiederauftreten der Grunderkrankung ist heute die Hauptursache des Therapieversagens nach Stammzelltransplantation.⁶²

Abhängig von Behandlungsregime, Art der Erkrankung, Zeitpunkt der SZT und *follow up* beträgt die Rezidivrate 10-40%; Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung und Vorhandensein zytogenetischer Abnormalitäten wie beispielsweise bei ALL und CML können eine Rückfallwahrscheinlichkeit bis zu 70% aufweisen.^{63,64}

Für die Entstehung eines Rezidivs werden verschiedene Ursachen diskutiert; bei T-Zell-depletiertem Transplantat muss von einem fehlenden *graft versus*

leukemia -Effekt ausgegangen werden.³¹ Die Resistenz gegenüber Chemotherapeutika kann durch verschiedene Mechanismen induziert werden, wie z.B. durch Defekte in der Apoptose, DNA-Reparaturmechanismen, Genmutationen im p-Glycoprotein-Membrantransporter oder genetische Abweichungen bezüglich der arzneimittelmetabolisierenden Enzyme.^{65,66}

Auch die erworbene Resistenz nach erfolgter Chemotherapie gegenüber Methotrexat, das die Dihydrofolatreduktase hemmt und dadurch in den Folsäurestoffwechsel und konsekutiv in die DNA-Synthese eingreift, durch z.B. Zunahme der Dihydrofolatreduktase oder der γ -Glutamyl-Hydrolase, ist in der Resistenzentwicklung von Bedeutung.^{67,68}

In Studien konnte gezeigt werden, dass die Persistenz und das Wiederauftreten von autologen Zellen nach Transplantation mit einem signifikant höheren Rezidivrisiko assoziiert sind.⁶⁹⁻⁷²

Auch die Höhe der Leukämieast sowie das Stadium der Erkrankung zum Zeitpunkt der Transplantation haben Einfluss auf das eventfreie Überleben (EFS).^{73,74}

1.11 Rezidivtherapie nach Stammzelltransplantation

Die optimale Behandlungsstrategie von Patienten, die ein Rezidiv nach autologer oder allogener Stammzelltransplantation erfahren haben, ist eine kontroverse Streitfrage.⁷⁵

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass das Auftreten eines Rezidivs einer akuten Leukämie nach SZT innerhalb der ersten 100 Tage und erneuter Reinduktionschemotherapie mit einem eventfreien Überleben von weniger als 10% gekennzeichnet ist, während Patienten, die ein Jahr nach SZT rezidivieren von einer erneuten Chemotherapie profitieren und in 65% eine Remission erreichen können.⁷⁶⁻⁷⁸

Die Aussicht, Patienten mit Rezidiv nach SZT mit Chemotherapie allein in Remission zu halten, ist schlecht.

Eine weitere Möglichkeit der Rezidivtherapie ist die zweite SZT,⁷⁵ diese ist mit einer hohen transplantat-assoziierten Mortalitäts- und Morbiditätsrate von 30-

40% verbunden.⁷⁹ Patienten, die ein frühes Rezidiv nach zweiter SZT (<1a) entwickeln, haben ein schlechteres EFS (*eventfree survival*) von 27% verglichen mit Patienten, die ein spätes Rezidiv (>1a) erleiden, deren EFS 51% beträgt.⁸⁰ Da die Nebenwirkungen einer zweiten Transplantation beträchtlich sind, werden alternative Therapieformen, wie z.B. die Immuntherapie, favorisiert. Die Gabe von Donor-Lymphozyten (DLI) mit oder ohne Zytokine ist v.a. bei CML-Patienten erfolgreich, die unter einem Rezidiv nach SZT leiden, aber auch bei Patienten mit AML, MDS und Multiplem Myelom. Die transfundierten T-Zellen applizieren einen *graft versus leukemia*-Effekt und übertragen eine neue Immunität, so dass die Immunreaktion gegen Antigene verbessert wird.^{81,82}

Eine weitere Option ist durch Reduktion der immunsuppressiven Therapie (CSA) die Induktion einer milden GVHD; diese weist einen positiven Effekt im Sinne einer Spender-gegen-Tumor-Reaktion auf.⁸³⁻⁸⁵

Der durch DLI-Gabe induzierte GVL-Effekt ist das Ergebnis einer T-Zell-Antwort auf Minor-Histokompatibilitäts-Antigene (mHags). Die mHags HA-1 und HA-2 werden ausschließlich auf hämatologischen Zellen exprimiert. HLA-A*0201 restringierte, HA-1-, und HA-2-spezifische zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) lysieren leukämische Zellen, jedoch keine Zellen, die Ziel einer GVHD sind (z.B. Fibroblasten, Keratinozyten). Durch die Identifikation der Peptidsequenz der HA-1- und HA-2-Antigene ist es möglich, ex vivo HA-1- und HA-2 spezifische CTL von gesunden Spendern zu generieren. HA-1- und HA-2-spezifische T-Zellen können so zur Elimination der Leukämie genutzt werden, mit einem im Gegensatz zur DLI-Gabe geringeren Risiko, eine GVHD auszulösen.⁸⁶

1.12 Möglichkeiten der Rezidivfrüherkennung

Von einer kompletten hämatologischen Remission (*complete remission, cr*) wird gesprochen, wenn die lichtmikroskopische morphologische Nachweisgrenze von 5% Leukämieblasten im Knochenmark nicht überschritten wird; dabei kann die Menge leukämischer Zellen bis zu 10^{10} betragen. Die molekulare oder

immunologische Nachweisgrenze liegt bei 10^6 Zellen und kann mit Methoden der minimalen Resterkrankung nachgewiesen werden.⁸⁷

1.12.1 Minimale Resterkrankung (*MRD, minimal residual disease*)

Definitionsgemäß bezeichnet der Begriff minimale Resterkrankung residuelle Tumorzellmengen unterhalb der Nachweisgrenze morphologischer Untersuchungsmethoden, deren Sensitivität etwa 1-5% beträgt.⁸⁸ Da ein direkter Zusammenhang zwischen Tumorzellmasse und Therapieerfolg bei akuten Leukämien besteht und die Persistenz leukämischer Zellen mit einem sehr hohen Rezidivrisiko assoziiert ist, stellen MRD-Untersuchungen eine gute Verlaufskontrolle zur Dokumentation der Tumorlast dar. Prinzipiell stehen verschiedene Methoden für die Detektion der minimalen Resterkrankung zur Verfügung:

- die durchflusszytometrische Immunphänotypisierung aberranter Antigenexpressions-Profile⁸⁹
- die durch RT (*real-time*)-PCR-Verfahren molekulare Analyse spezifischer Immunglobulin (Ig)- und *T-cell-receptor (TCR)-Gen-Rearrangements* bei ALL- und Lymphompatienten⁹⁰
- Der RQ-RT- (*real time quantitative reverse transcriptase*) PCR-gestützte Nachweis Leukämie-assoziiierter Fusionsgentranskripte, wie z.B. das TEL/AML1-Gen-Rearrangement.⁹¹ Bei 40% der pädiatrischen Patienten mit ALL und AML sowie bei über 95% der Patienten mit CML⁹² (hier spielt v.a. das BCR-ABL-Gen-Rearrangement eine Rolle) kann diese Methode für das MRD-Monitoring verwendet werden.

Nach Stammzelltransplantation kann zusätzlich mittels der sogenannten Chimärismusanalyse untersucht werden, ob die Zellen von Empfänger oder Spender stammen, d.h. ob ein Rezidiv oder eine autologe Rekonstitution auf molekularer Ebene bereits nachweisbar sind.⁹³⁻⁹⁶

1.12.2.1 Die Chimärismusanalyse

Die Chimäre (griechisch *Χίμαιρα*, *Chímaira*, „die Ziege“) ist ein Geschöpf der griechischen Mythologie.

Homer beschreibt sie im sechsten Gesang der Ilias als feuerspeiendes, dreiköpfiges Mischwesen mit dem Kopf eines Löwen, dem Körper einer Ziege und dem Schweif eines Drachen, das in der Lage war, Feuer zu speien und Kleinasien bis zu seinem Tode terrorisierte.



Abbildung 1.12.2.1: Chimäre von Arezzo, 5. Jahrhundert. v. Chr., Florenz, Museo Archeologico

In der Medizin und Biologie nennt man Chimäre einen Organismus, der aus genetisch unterschiedlichen Zellen bzw. Geweben aufgebaut ist und dennoch ein einheitliches Individuum darstellt.⁹⁷ 1956 wurde der Begriff von Ford et al. zunächst im Zusammenhang mit Organtransplantationen verwendet.²

1.12.2.2 Definfitionen in der Chimärismusanalyse

Im Bereich der SZT spricht man von einem gemischten Chimärismus (*mixed chimerism; MC*), wenn nach Transplantation eine Coexistenz von Spender- und Empfängerhämatoopoese vorliegt. Dabei spielt die Dynamik eine entscheidende Rolle: nimmt der autologe Anteil der Zellen im Vergleich zur Vorprobe um wenigstens 5% zu, besteht ein zunehmender gemischter Chimärismus (*increasing mixed chimerism*), nimmt der Anteil der Empfängerzellen ab, geht man von einem abnehmenden gemischten Chimärismus aus (*decreasing mixed chimerism*). Weist ein Patient nach SZT über eine Zeit lang Spender- und

Empfänger-DNA in einem unveränderten Verhältnis auf, wie dies bei Patienten mit SCID (*severe combined immunodeficiency*) oder nicht malignen Erkrankungen häufig vorkommt, wird dies als stabiler Chimärismus (*stable chimerism*) bezeichnet. Wird die Hämatopoese ausschließlich von Spenderzellen gesteuert, so liegt ein vollständiger Chimärismus (*complete chimerism; CC*) vor. Bei Patienten nach reduzierter Konditionierungstherapie oder mit SCID kann man gelegentlich einen gesplitteten Chimärismus (*split chimerism*) beobachten. Dabei ist die DNA des Rezipienten nicht in allen Zelllinien nachweisbar, z.B. nur bei T-Zellen; die anderen Zelllinien bestehen vollständig aus der DNA des Donors. Von einer autologen Rekonstitution spricht man, wenn es sich in der Nachprobe ausschließlich um Zellen des Rezipienten handelt. In den meisten Fällen ist eine Rekonditionierung und zweite SZT notwendig.^{93,98,99}

1.12.2.3 Methoden zur Detektion des Chimärismusstatus

Der Chimärismusstatus kann auf verschiedene Arten analysiert werden:

- Nachweis von Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP) mittels Southern Blot oder Kapillarelektrophorese: Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die die DNA an einer definierten Sequenz spalten. Diese Methode bewertet alle kernhaltigen Zellen, benötigt wenig Probenmaterial, ist sehr informativ, jedoch wenig sensitiv (5-10%) und arbeitsintensiv. Bis zur Etablierung der PCR war sie ein weit verbreitetes Verfahren in der Chimärismusanalyse^{100,101}
- Erythrozyten-Phänotypisierung durch Blutgruppenantigene bei blutgruppendifferenzierter Transplantation: wird v.a. für den Nachweis eines CML-Rezidivs verwendet, da das Rezidiv in der Frühphase der CML durch das Wiederauftreten von Empfängererythrozyten gekennzeichnet ist. Es ist eine einfache Methode zum Nachweis des hämatopoetischen Chimärismus, sehr sensitiv (0,04-3%), jedoch nicht informativ bezüglich der lymphatischen und myeloischen Zellreihen. Nach Bluttransfusion ist eine Interpretation der Ergebnisse schwierig. Direkt nach Transplantation

ist eine sichere Beurteilung nicht möglich, da auf Grund der Lebenszeit der Erythrozyten von 120 Tagen Empfängererythrozyten weiterhin im Blut zirkulieren können^{100,102}

- Zytogenetische Chimärismusuntersuchungen werden v.a. bei verschiedengeschlechtlichen SZT eingesetzt; X- und Y-spezifische Proben können zur Unterscheidung zwischen Spender- und Empfängerzellen beitragen. Bei gleichgeschlechtlichem Donor und Rezipient dienen polymorphe Regionen zur Diskrimination zwischen sich teilenden Zellen von Spender und Empfänger. Verschiedene Leukämien und hämatologische Erkrankungen weisen chromosomale Rearrangements mit Verlust der genetischen Information wie Deletionen oder Monosomien auf. Bei Patienten mit CML kann beispielsweise durch zytogenetische Untersuchungen der Nachweis philadelphiachromosom-positiver Zellen (balancierte Translokation t(9;22)(q34;11)) erbracht werden. Insgesamt ist die zytogenetische Analyse wenig sensitiv (5-10%), es findet sich eine hohe Rate falsch positiver Ergebnisse und nur in Teilung befindliche Zellen können detektiert werden¹⁰³
- Die Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung (FISH) ist eine molekularbiologische Methode, um Nukleinsäuren in Geweben, einzelnen Zellen oder auf Metaphase-Chromosomen nachzuweisen. Dabei wird eine künstlich hergestellte Sonde aus einer Nukleinsäure eingesetzt, die über Basenpaarungen an die nachzuweisende Nukleinsäure hybridisiert. Die FISH ist beschränkt auf Chimärismusanalysen nach verschiedengeschlechtlicher SZT; die Sensitivität ist mit 0,7-5% hoch¹⁰⁴
- X- und Y-Chromosom-spezifische Marker:
Bei Geschlechtsdifferenz von Spender und Empfänger kann der Chimärismusstatus durch PCR-gestützte Typisierung geschlechtsspezifischer Sequenzen vorgenommen werden. Die Sensitivität beträgt 0,1-4%^{105,106}
- Das Amelogenin-System kann nach SZT für die Chimärismusanalyse verwendet werden, wenn der Donor weiblich und der Rezipient männlich ist. Amelogenin zeigt eine 212bp (Basenpaare) lange X-spezifische

Bande und eine 218bp lange Y-spezifische Bande bei Amplifikation durch die PCR; auch geringe Mengen DNA können detektiert werden¹⁰⁷

- Real-time-quantitative PCR mit Hilfe der TaqMan Technologie: Dies ist mit 0,1-1% die sensitivste Methode, eine Chimärismusanalyse vorzunehmen. Die Real-Time-quantitative PCR ist eine Amplifizierungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR beruht, und zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA ermöglicht. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen durchgeführt, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Mittels der Real-time-quantitativen PCR kann schnell und exakt eine Chimärismusuntersuchung vorgenommen werden; die Methode ist jedoch sehr kostspielig und in der Regel nur mit biallelischen Markern durchführbar¹⁰⁸
- Durchflusszytometrie nach HLA-diskrepanter SZT mit Hilfe von anti-HLA-Antikörpern: Nach HLA-diskrepanter SZT ist eine Abstoßungsreaktion häufiger als nach HLA-identischer Transplantation. Um frühzeitig eine Diagnose stellen zu können und entsprechende therapeutische Maßnahmen einzuleiten, sind regelmäßige Chimärismusuntersuchungen der Zell-Subpopulationen angezeigt. Unterschiede in den HLA-Antigenen ermöglichen Donor und Rezipient an Hand dieser Antigene mittels monoklonaler Antikörper zu differenzieren. Mittels der Durchflusszytometrie können gleichzeitig verschiedene Zellsubpopulationen schnell analysiert werden; es ist möglich, bereits eine Zelle/ μ l zu detektieren.^{109,110}
- Amplifikation von *variable number of tandem repeats* (VNTR) und *short tandem repeats* (STR) mit Hilfe der PCR: Die Genotypisierung von Mikrosatelliten (STR) und Minisatelliten (VNTR) ist der Goldstandard, um den Chimärismusstatus nach hämatologischer SZT zu untersuchen. STRs und VNTRs sind sich wiederholende Sequenzen innerhalb der DNA. Die Grundsequenz ist immer dieselbe, jedoch variiert die Anzahl der Wiederholungen von Individuum zu Individuum. STRs und VNTRs

sind hochpolymorphe Regionen, das menschliche Genom umfasst etwa 10^6 STRs. Die Analyse von STRs und VNTRs ist die schnellste und eine sehr sensitive Methode zur Ermittlung des Chimärismus, unabhängig von HLA-mismatch und Geschlechtsunterschieden und kann zeitnah nach Transplantation, auch in der Phase der Aplasie, eingesetzt werden.^{108,111-113}

1.12.2.4 Bedeutung des gemischten Chimärismus für das Auftreten eines Rezidivs

Nachdem initial das Auftreten eines gemischten Chimärismus nur für Patienten mit CML mit einer erhöhten Rezidivwahrscheinlichkeit assoziiert werden konnte¹¹⁴ und es kontroverse Diskussionen bezüglich eines MC und dem Wiederauftreten der Erkrankung bei akuten Leukämien und Myelodysplastischen Syndromen gab,¹¹⁵ wies in den letzten Jahren u.a. die Arbeitsgruppe um Bader et al nach, dass das Auftreten eines gemischten Chimärismus sowie die Dynamik der Zunahme eines *increasing MC* mit einem Rückfall der Grunderkrankung korrelieren.^{69,116-118}

1.12.2.5 STR-Marker in der Chimärismusanalyse

Das menschliche Genom ist von sogenannten hypervariablen Regionen, *variable number of tandem repeats* (VNTR) oder *short tandem repeats* (STR) bezeichnet, durchzogen.

STR sind kurze VNTR-Sequenzen; sie werden auch als Mikrosatelliten bezeichnet und bestehen aus kurzen, sich 7-80mal wiederholenden Nukleotidfolgen von drei bis sieben Basenpaaren (bp) und einer Gesamtlänge von 70 bis 400bp. Diese Wiederholungen sind über das gesamte nicht-codierende menschliche Genom etwa alle 300-500kb verteilt und reich an Polymorphismen, die in der PCR durch Anlagerung sensitiver Primer, die die Tandemrepeats flankieren, amplifiziert werden können.¹¹⁹ Der Polymorphismus der STR-Marker variiert innerhalb und zwischen verschiedenen Völkern.¹²⁰

Allele der STR-Loci unterscheiden sich durch die Anzahl der Kopien der Wiederholungssequenzen, die die zu amplifizierende Region enthält und werden voneinander durch radioaktive-, silber- oder fluoreszenzgelabelte Primer in der Gelelektrophorese aufgetrennt. Diese Sequenzen enthalten üblicherweise interindividuelle Unterschiede und wurden zunächst zur Bestimmung des Genotyps bei Verwandtschaftsnachweisen und zur Identitätsbestimmung in der forensischen Medizin verwendet.¹¹⁹

Short tandem repeats benötigen nur geringe Mengen DNA, lassen sich in kürzester Zeit analysieren und eignen sich dadurch ausgezeichnet für die Chimärismusanalyse.¹²¹

1.13 Ziel dieser Arbeit

Chimärismusanalysen stellen einen festen und regelmäßigen Bestandteil in der Nachbetreuung stammzelltransplantierter Patienten dar, um ein Rezidiv oder eine Transplantatabstoßung bereits auf molekularer Ebene zu erkennen, bevor diese klinisch relevant werden, um zeitnah therapeutische Maßnahmen einleiten zu können.

Im Chimärismusalabor der Kinderklinik Tübingen werden monatlich etwa 500 Proben mit Hilfe der PCR und anschließender Kapillarelektrophorese untersucht. Dazu wird nach Transplantation von Donor und Rezipient ein Suchtest mit drei Primern durchgeführt, um einen informativen Primer auszumachen. Bei manchen Spender-Patientenpaaren gestaltet es sich schwierig, einen Primer zu finden, der zwischen Donor und Rezipient differenziert. Es liegt Nahe, hierfür eine Methode zu etablieren, die rationell eine Übersicht über eine Vielzahl an Primern liefert, um den informativsten Primer auswählen zu können. Mit dem ursprünglich aus der Rechtsmedizin stammenden PowerPlex[®] 16 System, das 15 STR Primer und das Amelogenin enthält, soll in dieser Arbeit untersucht werden, inwieweit es möglich ist, dieses System in der Chimärismusanalyse zu etablieren, um ein einheitliches Protokoll für die 13 europäischen Zentren, die am Eurochimärismus-Konsortium beteiligt sind, zu entwickeln.

Im Detail sollten folgende Fragen untersucht werden:

1. Welche STR-Primer liefern bezüglich der Informativität optimale Ergebnisse?
2. Wie hoch ist die Sensitivität der Multiplex-Primer?
3. Wie hoch ist die Sensitivität der durch das Eurochimärismus-Konsortium zugestellten Singleplex-Primer D3S1358 und D21S11?
4. Kann bei einem gemischten Chimärismus der Anteil des Rezipienten und des Donors ermittelt werden?

2 Material

2.1 Untersuchungsmaterial

Für die Chimärismusuntersuchung mit dem PowerPlex®16 System nimmt man sowohl dem Spender (Donor) als auch dem Empfänger (Rezipienten) vor der KMT bzw. SZT in Abhängigkeit von der Leukozytenkonzentration im peripheren Blut, bei Leukozytenzahlen unter 1000/ μ l 5ml, bei Leukozytenzahlen über 1000/ μ l 3ml Knochenmark oder peripheres Blut ab, das mit EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) versetzt wird. Heparin als Inhibitor der TaqPolymerase und somit der PCR ist als Gerinnungshemmer weniger geeignet.¹²² Bei Blutproben, die durch Zugabe von Heparin ungerinnbar gemacht wurden, empfiehlt es sich, zusätzlich über einen Ficollgradient die Lymphozytenfraktion anzureichern, um ausreichend Zellen zu erhalten. Bis zur Bearbeitung der Proben werden diese bei 4°C aufbewahrt.

Da menschliche Erythrozyten und Thrombozyten keinen Zellkern und somit keine DNA besitzen, erfolgt die Isolierung der DNA mit dem QIAmp® DNA Blood Midi Kit der Firma Qiagen ausschließlich aus den Leukozyten; die erhaltenen Proben entsprechen demnach einer 100% Empfänger-DNA-Vorprobe bzw. einer 100% Spender-DNA-Vorprobe und dienen als Vergleich zu den Nachproben nach KMT. Die DNA-Aliquots des Donors und des Rezipienten sowie der Nachproben werden bei -20°C eingelagert.

Um die Dynamik im Verlauf eines eventuell auftretenden gemischten Chimärismus besser erfassen zu können, werden im Chimärismuslabor der Universitätskinderklinik Tübingen bis zum *Engraftment* bei nicht malignen Erkrankungen wöchentlich Nachproben aus dem peripheren Blut entnommen. Von Patienten, die einen kompletten Chimärismus (CC) entwickeln, wird nur noch alle zwei Monate bis zwei Jahre nach SZT ein Chimärismusstatus analysiert. Weisen die Patienten einen gemischten Chimärismus (MC) auf, werden für die Verlaufskontrollen kürzere Abstände gewählt. Analysen der Subpopulationen werden bei verzögertem *Engraftment* und bei Verdacht auf Transplantatabstossung vorgenommen. Dienen die Chimärismusanalysen der

Remissionsüberwachung einer malignen Krankheit wie ALL, AML, CML, MDS, oder JMML (Juvenile Myelomonozytäre Leukämie), ist es wichtig, dass die Intervalle zwischen den Nachuntersuchungen kurz gehalten werden. Bader et al. empfehlen eine wöchentliche Nachprobe bis zum Tag 200 nach SZT, danach monatliche Kontrollen bis zwei Jahre nach SZT. Zusätzlich werden an Tag 30, 60, 100, sowie nach 6, 9, 12, 15 und 18 Monaten Chimärismusanalysen aus Knochenmarkproben vorgenommen, da sich ein beginnendes Rezidiv bei manchen Patienten zuerst im Knochenmark manifestiert.

Patienten, die ein Lymphom oder eine andere maligne Krankheit haben, bekommen bis zum *Engraftment* eine wöchentliche Untersuchung. Danach erfolgen die Nachkontrollen in dreimonatigen Abständen bis zwei Jahre nach der Transplantation. Subpopulationen werden untersucht, wenn eine Transplantatsabstossung zu befürchten ist, die MRD-Daten nicht erhältlich sind oder im Falle einer AML-KM-Probe die Zelllinien CD 33 und 34.

Bei Patienten, die einen schweren kombinierten Immundefekt (SCID) aufweisen oder die eine reduzierte Konditionierungstherapie erhalten haben, kann ein sogenannter *split chimerism* auftreten. Das bedeutet, dass die DNA des Rezipienten nicht in allen Zelllinien auftritt, sondern z.B. nur in T-Zellen feststellbar ist, während die anderen Zelllinien nur aus Donor-DNA bestehen. Durch eine zusätzliche Analyse der Zellsubpopulationen von NK-Zellen oder T-Zellen auf ihren Chimärismusstatus kann eine Differenzierung zwischen residuellen malignen Zellen und nicht-maligner Hämatopoese detektiert werden.⁹³

2.2 Patientenkollektiv

Mit dem Powerplex[®] 16 System wurden 76 Patienten auf ihren Chimärismusstatus untersucht; diese erhielten an verschiedenen Transplantationszentren Deutschlands zwischen 06/2000 und 08/2004 eine allogene Stammzell- bzw. Knochenmarktransplantation.

29 Patienten bekamen Zellen eines HLA-MRD (*matched related donor*), 41 eines HLA-MUD (*matched unrelated donor*), drei eines HLA-MMRD

2 Material

(*mismatched related donor*) und drei eines HLA-MMUD (*mismatched unrelated donor*). Anschließend erfolgten mittels einer Standardverdünnungsreihe Sensitivitätstests zur Quantifizierung eines detektierten gemischten Chimärismus. Die Multiplex Assays wurden mit den Patienten UPN 2302/2320, 2364/2499, 2298/2393 und 2311/2492 durchgeführt. Singleplex-Untersuchungen fanden mit dem Primer D3S1358 an den Patienten UPN 2320 und 2364 und mit dem Primer D21S11 an den Patienten UPN 2311 und 2393 statt. Die klinischen Daten der mit dem PowerPlex® 16 System untersuchten Patienten sind in Tabelle 2.2 aufgelistet.

Tabelle 2.2: Patientenkollektiv

UPN	Diagnose	Alter	Spender	Chimärismusstatus	Krankheitsverlauf
1878	AML	20	MRD	CC	Complete Rem
2206	ALL	27	MMUD	MC 5-10%	Rlps
2208	ALL	20	MMRD	CC	Complete Rem
2226	AML	4	MUD	CC	Complete Rem
2294	MDS	13	MUD	CC	Complete Rem
2295	ALL	10	MUD	MC 60-80%	Rlps
2298	ALL	11	MMRD	MC mehr als 80%	Rlps
2301	ALL	10	MUD	CC	TRM
2302	ALL	15	MRD	CC	Complete Rem
2303	ALL	6	MMRD	CC	Complete Rem
2307	MDS	20	MRD	CC	Complete Rem
2311	ALL	7	MRD	CC	Complete Rem
2312	Blackfan-Diamond Anämie	4	MRD	CC	
2316	CML	14	MRD	CC	
2320	Lymphom	18	MRD	CC	
2324	ALL	3	MMUD	CC	TRM
2327	Morbus Hodgkin	14	MUD	CC	
2328	MDS	3	MUD	MC 60-80%	
2329	Rhabdomyosarkom	20	MRD	CC	
2333	ALL	18	MUD	MC 30-40%	Complete Rem
2340	ALL	15	MRD	MC 0-1%	
2341	MDS	4	MRD	CC	Complete Rem
2345	ALL	15	MUD	CC	
2346	ALL	6	MUD	MC 5-10%	Rlps
2348	ALD	14	MUD	MC 5-10%	
2355	Morbus Kostmann	5	MUD	CC	
2364	Osteopetrosis	3	MUD	CC	Complete Rem
2365	MDS/JMML	3	MUD	MC mehr als 80%	Rlps
2373	CML	25	MUD	CC	Rlps
2384	ALL	5	MUD	CC	
2387	ALL	17	MRD	MC 0-1%	Complete Rem
2392	ALL	14	MRD	CC	TRM
2393	NHL		MRD		
2395	AML	2	MUD	MC	
2396	AML	17	MUD	CC	
2406	ALL	13	MRD	CC	Complete Rem
2407	Thalassämie major	12	MRD	AR	
2414	ALL	12	MUD	CC	

2 Material

2418	Morbus Hodgkin	14	MRD	CC	Complete Rem
2420	MDS	6	MRD	AR	
2423	MDS	11	MUD	CC	Complete Rem
2426	MDS	18	MMUD	TRM	
2427	MDS	6	MUD	MC 40-60%	Rlps
2429	AML	35	MUD	CC	Rlps
2430	CML	6	MUD	CC	Rlps
2432	ALL	3	MUD	CC	
2437	ALL	1	MUD	MC 5-10%	
2440	AML	9	MUD	CC	Complete Rem
2445	ALL	6	MUD	MC 60-80%	
2446	AML	8	MUD	MC 10-20%	Complete Rem
2450	Sideroblastische Anämie	11	MRD	MC 0-1%	Rlps
2453	CML	12	MUD	CC	Complete Rem
2458	ALL	4	MUD	CC	Complete Rem
2461	Hämophagozytierende Phagozytose	2	MUD	CC	
2464	SCID	1	MRD	CC	
2465	Bernard-Soulier-Syndrom	8	MUD	CC	
2468	ALL	17	MUD	CC	
2469	DBA	13	MRD	CC	
2470	ALL	6	MUD	CC	
2472	ALL	11	MRD	CC	
2479	SAA	26	MUD	CC	Complete Rem
2480	ALL	14	MRD	CC	TRM
2482	MDS	2	MUD	CC	
2488	ALL	14	MRD	CC	
2489	ALL	6	MRD	CC	
2492	MDS	5	MUD	CC	Complete Rem
2499	AML	13	MUD	CC	Complete Rem
2501	PNET-Rez. Rhabdomyosarkom	14	MRD	CC	
2504	ALL	9	MRD	CC	
2505	ALL	18	MUD	CC	
2509	Mukopolysaccharidose	2	MUD	MC	Complete Rem
2517	CML	20	MRD	CC	Complete Rem
2518	MDS	12	MUD	CC	
2523	Morbus Kostmann	5	MRD	CC	
2532	ALL	6	MUD	CC	Complete Rem
2546	Thalassämie major	15	MRD	MC 1-5%	

ALD=Adrenoleukodystrophie, ALL=Akute Lymphatische Leukämie, AML=Akute Myeloische Leukämie, CML=Chronisch Myeloische Leukämie, DBA=Diamond-Blackfan-Anämie, JMML=Juvenile Myelomonozytäre Leukämie, MDS=Myelodysplastisches Syndrom, NHL= Non Hodgkin Lymphom, PNET=Primitiver Neuroektodermaler Tumor, SAA= Schwere Aplastische Anämie, SCID=severe combined immunodeficiency

MRD=matched related donor, MUD=matched unrelated donor, MMRD=mismatched related donor, MMUD=mismatched unrelated donor

CC=complete Chimerism, MC=mixed Chimerism

TRM=Transplant Related Mortality

2.3 Reagenzien

2.3.1 DNA-Extraktion der Donor- und Rezipientenvorprobe

Tabelle 2.3.1: DNA-Isolationsmaterialien

Substanzbezeichnung	Hersteller
QIAmp® DNA Blood Midi Kit Katalog Nr. 51185	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAmp® Midi Spin Columns 100 Collection Tubes (15 ml) 100 Lysepuffer AL (265 ml) Reinigungspuffer AW 1 (95 ml) Reinigungspuffer AW 2 (66 ml) Lysepuffer AE (60 ml) QIAGEN® Protease (5,5ml)	
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland

2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion

Das PowerPlex® 16 System enthält eine gelbe Präamplifikationskomponentenbox für die PCR mit 1x300µl Gold Star 10X Buffer, 1x250µl PowerPlex® 16 10X Primer Pair Mix und 25µl 9947A Standard DNA-Vorlage und eine magenta-farbene Postamplifikationskomponentenbox für die Kapillarelektrophorese, die 1x25µl PowerPlex® 16 Allelic Ladder Mix, 1x150µl International Lane Standard (ILS) 600 und 1x1ml Blue Dextran Loading Solution beinhaltet. Das PowerPlex® 16 System enthält alle Materialien, die für die Amplifikation von STR-Regionen genomischer DNA, mit Ausnahme von AmpliTaq Gold Polymerase, nötig sind. Es wird empfohlen, Prä- und Postamplifikationskomponenten getrennt voneinander bei –20 °C, sowie lichtgeschützt, aufzubewahren.

Tabelle 2.3.2: Polymerase-Kettenreaktion

Substanzbezeichnung	Hersteller
Gold STAR 10X Puffer	PowerPlex® 16 System, Promega Corporation, Madison, USA
PowerPlex® 16 10X Primer Pair Mix	PowerPlex® 16 System, Promega Corporation, Madison, USA
9947A Standard DNA-Template (10ng/μl)	PowerPlex® 16 System, Promega Corporation, Madison, USA
Oligonucleotid Primer D3S1358	MWG-BIOTECH AG, Ebersberg, Deutschland
Oligonucleotid Primer D21S11	MWG-BIOTECH AG, Ebersberg, Deutschland
AmpliTaq Gold® DNA Polymerase	Applied Biosystems, Foster City, USA
Ampuwa®	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland
LiChrosolv	Merck KG aA, Darmstadt, Deutschland

2.3.3 Kapillarelektrophorese

Tabelle 2.3.3 Kapillarelektrophorese

Substanzbezeichnung	Hersteller
Formamid	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
PowerPlex® 16 Allelic Ladder Mix	PowerPlex® 16 System, Promega Corporation, Madison, USA
International Lane Standard (ILS) 600	PowerPlex® 16 System, Promega Corporation, Madison, USA
Blue Dextran Loading Solution	PowerPlex® 16 System, Promega

Substanzbezeichnung	Hersteller
	Corporation, Madison, USA
310 Genetic Analyzer POP-4™ Polymer Kapillarelektrophoreseegel	Applied Biosystems, Foster City, USA
Puffer (10x) mit EDTA Bestellnr.:402824	Applied Biosystems, Foster City, USA

2.4 Geräte

Tabelle 2.4: Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Pipetten 2µl, 10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen 10µl	Molecular BioProducts, Inc., San Diego, USA; bezogen über VWR International GmbH, Bruchsal, Deutschland
Pipettenspitzen 100µl, 1000µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Multipette® pro	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Safelock Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäße ThermoStrip™, Standard Strip Tubes und Cap Strips	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Wasserbad	Memmert GmbH+Co.KG, Schwabach, Deutschland
GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems, Foster City, USA
Fotometer RNA/DNA Calculator Gene	Pharmacia Biotech, Cambridge,

2 Material

Bezeichnung	Hersteller
Quant™ II	England
Thermal Printer DPU-414	Seiko Instruments Inc., Japan
Tischzentrifuge Mikro 22 R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc., Bohemia, USA
ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Foster City, USA

3 Methoden

3.1 Isolation der DNA aus Blut- und KM-Proben

3.1.1 Anwendungsvorzüge des QIAmp[®] DNA Blood Midi Kit

Die DNA der Vor- und Spenderproben wurden mit dem QIAmp[®] DNA Blood Midi Kit, die der Nachproben mit dem Mini Kit der Firma Qiagen isoliert. Dies ist ein zuverlässiges System, mit dem DNA aus Blut, Plasma, Serum, Knochenmark, Lymphozyten, Zellsuspensionen und anderen Körperflüssigkeiten isoliert werden kann.

Das Midi Kit ist optimiert für ein Probenvolumen von 2ml; bzw. eine Zellzahl bis zu 2×10^7 Zellen, aber auch Proben bis zu 300µl können durch Zugabe von 1ml PBS (*phosphate buffered saline*) extrahiert werden.

Im Gegensatz zu anderen DNA-Isolationsmethoden beinhaltet diese weder eine giftige Phenol/Chloroform-Extraktion noch eine Alkohol-Fällung. Die erhaltene gereinigte DNA ist frei von Proteinen, Nukleasen und anderen Kontaminationen und weist eine Länge bis zu 50kb auf, wobei Fragmente von 30kb überwiegen. DNA von dieser Grösse denaturiert vollständig und weist in der PCR die höchste Amplifikationseffizienz auf. Sie wird in AE-Puffer oder Wasser gelöst und kann entweder direkt für die PCR eingesetzt werden oder bei -20 °C für eine spätere Nutzung eingefroren werden (Handbuch für QIAmp[®] Blood Kits und QIAmp Tissue Kits 09/1997).

3.1.2 Vorbereitung der Reagenzien

Die Proben sollten vor Isolationsbeginn auf Raumtemperaturniveau (15-25 °C) gebracht werden.

Der Lösungspuffer AL wird in ein auf 70 °C vorgeheiztes Wasserbad gestellt.

Der lyophilisierten QIAGEN[®] Protease wird 5,5ml destilliertes Wasser zugegeben und bei 2-8 °C im Kühlschrank bzw. bei -20 °C eingefroren aufbewahrt.

Puffer AW1 wird 125ml, Puffer AW2 150ml Ethanol zugefügt und bei 15-25°C gelagert.

Da der Puffer AL lichtempfindlich ist, wird empfohlen, ihn lichtgeschützt aufzubewahren. Falls sich im Puffer AL ein Niederschlag gebildet hat, sollte er durch Erwärmen auf 70°C gelöst werden.

3.1.3 Protokoll zur DNA-Isolation der Vor- und Spenderprobe aus Vollblut- und Körperflüssigkeiten

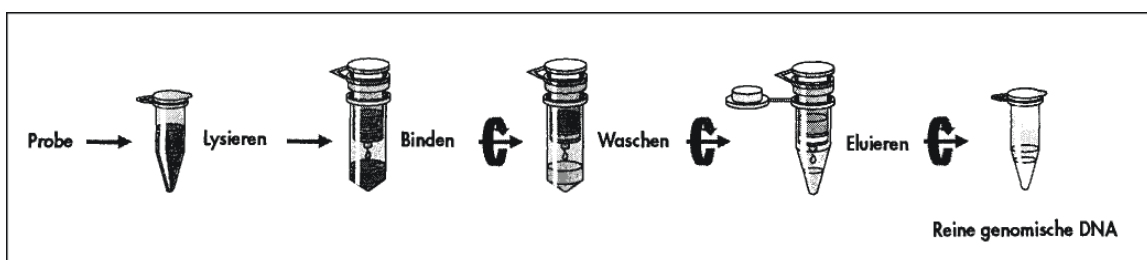


Abbildung 3.1.3: Schematische Darstellung des QIAmp Spinsäulen-Verfahrens. (überarbeitet aus dem Handbuch für QIAmp Blood Kits und QIAmp Tissue Kits (09/1997))

Modifiziertes Vorgehen nach dem QIAmp[®] DNA Blood Midi Kit und QIAmp DNA Blood Maxi Kit Handbuch der Firma Qiagen GmbH, Hilden, Germany, Version September 2001.

Von den auf Raumtemperatur erwärmten Proben werden je 2ml Blut bzw. KM in mit einer fortlaufenden Nummerierung versehene Reaktionsgefäße pipettiert, so dass mehrere Proben gleichzeitig bearbeitet werden können. Anschließend gibt man zu jeder Probe 200µl QIAGEN[®] Protease und 2,5ml Puffer AL und durchmischt die Ansätze 15s lang auf einem Vortex bis eine homogene Lösung entstanden ist; dabei muss darauf geachtet werden, dass die QIAGEN[®] Protease nicht direkt auf den Puffer AL gegeben wird. Nun werden die Proben für 15min. in einem 70°C-Wasserbad inkubiert. Durch den Lysepuffer AL werden alle Zellen lysiert und die Kerne stabilisiert. Anschließend wird 2ml Ethanol zu jeder Probe gegeben und auf einem Vortex durchmischt. Spinsäule und Auffanggefäß werden erneut beschriftet und ineinandergestellt. Der Inhalt der Probe wird vorsichtig, ohne den Rand zu benetzen, auf die Spinsäule gegeben, der Deckel verschlossen und bei 1850xg (3000rpm) für 3min.

zentrifugiert. Das Auffanggefäß wird nach der Zentrifugation mitsamt Filtrat verworfen und die Spinsäule in ein sauberes Gefäß gestellt. Um ein zellkernhaltiges Pellet, frei von Zelltrümmern und Hämoglobin zu erhalten, wird zu jeder Probe 2ml Waschpuffer AW 1 hinzugefügt und bei 4500xg (5000rpm) eine Minute in die Zentrifuge gestellt. Dieser Vorgang wird mit dem Waschpuffer AW 2 und einer Zentrifugationsdauer von 15min. wiederholt. Die Ethanolreste in der Säule werden vor der Elution durch die Zentrifugation entfernt. Die Säule wird auf ein neues Röhrchen überführt, das Auffanggefäß erneut verworfen und jeder Probe wird 300µl im Wasserbad auf 70°C erwärmter Puffer AE zugegeben und für 5min. bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend werden die Proben für 5min. bei 4500xg (5000rpm) zentrifugiert. Die Röhrchen mit dem Eluat werden bei 70°C im Wasserbad 2min. lang inkubiert. Um eine maximale DNA-Konzentration zu erhalten, wird die Probe über die Membran der QIAmp Midi Säule laufen gelassen und bei Raumtemperatur 5min. inkubiert und anschließend bei 4500xg (5000rpm) für 5min. zentrifugiert. Zuletzt wird das Eluat, das etwa 300µl beträgt, auf zwei Eppendorff-Cups verteilt.

3.2 Photometrische Bestimmung des DNA-Gehalts

Zur Konzentrationsbestimmung der DNA in den Aliquots muss zunächst die DNA auf 1:20 verdünnt werden, um im linearen Messbereich des Photometers mit der Extinktion zu liegen. Dazu pipettiert man 5µl DNA und 95µl *Aqua ad injectabilia* in ein Eppendorff-Cup.

Die photometrische Messung erfolgt anschließend in einer 100µl Quarzglas-küvette bei einer Wellenlänge von 260nm.

Um Messfehler auszuschließen, wird die Küvette zwischen den Messungen mit *Aqua ad injectabilia* gespült.

Außer der DNA-Konzentration gibt das Gerät die Ratio an; dies ist ein Maß für die Verunreinigung der DNA. Werte von 1,7-1,9 sind als rein einzustufen. Proben mit einer Ratio von über 2 enthalten viel RNA, Werte unter 1,4 zeigen eine Kontamination mit Proteinen an.

3.2.1 Berechnung des einzusetzenden Volumens der DNA-Lösung

Das Powerplex® 16 Handbuch von Promega empfiehlt, 0,5-1,0ng DNA bei einem Reaktionsvolumen von 25µl vorzulegen. Der von uns modifizierte Ansatz à 12,5µl enthielt anfänglich 0,5ng DNA; um den Ausschlag der Peaks zu perfektionieren und höhere Peaks in den niedrigeren Genloci und relativ niedrigere Peaks in den höher gelegenen Genloci zu erhalten, erhöhten wir die Menge der DNA-Vorlage auf zwischenzeitlich 1,0ng und letztendlich auf 2,0ng. Die DNA wurde 1:100 verdünnt, indem man 2µl DNA in 200µl LiChrosolv pipettierte und bei 4°C aufbewahrte; die gewünschte DNA-Menge errechnete sich nach der Formel:

$$\text{DNA-Menge } [\mu\text{l}] = \frac{5\text{ng bzw. } 10\text{ng bzw. } 20\text{ng}}{\text{photometrisch gemessene DNA } [\text{ng}/\mu\text{l}]}$$

Das erhaltene Volumen wurde auf 50µl mit LiChrosolv® aufgefüllt; davon wurden 5µl für den PCR-Ansatz entnommen.

3.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

3.3.1 Prinzip der PCR

Durch die 1984 von dem amerikanischen Biochemiker K. B. Mullis veröffentlichte und 1994 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnete Methode der Polymerase-Kettenreaktion kann selektiv eine spezifische Sequenz eines DNA-Doppelstranges bis zu 10⁵-fach amplifiziert werden. Der DNA-Doppelstrang wird zunächst durch Erhöhung der Temperatur auf etwa 90°C denaturiert, danach wird das Gemisch auf etwa 50°C abgekühlt und zwei Primer zugesetzt, die der Sequenz an den 5'-Enden der beiden Einzelstränge komplementär sind. Durch Zusatz einer thermophilen Taq-Polymerase werden die beiden Einzelstränge zum Doppelstrang komplementiert. Dieser Reaktionszyklus bestehend aus

1. Denaturierung
2. Anheften der Primer sowie

3. Extension zu neuen Doppelsträngen

kann mehrfach wiederholt werden und führt zu einer exponentiellen Vervielfältigung der gewünschten DNA-Sequenz.¹²³

3.3.2 PCR mit Powerplex® 16

Das PowerPlex® 16 System ermöglicht die Amplifikation der in drei verschiedenen Farben markierten sechzehn Loci (fünfzehn STR-Loci und Amelogenin). PowerPlex® 16 beinhaltet die Loci Penta E, D18S51, D21S11, TH01, D3S1358, FGA, TPOX, D8S1179, vWA, Amelogenin, Penta D, CSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317 und D5S818.

Der Primer für Penta E, D18S51, D21S11, TH01, D3S1358 ist mit Fluorescein (FL) markiert; der Primer für FGA, TPOX, D8S1179, vWA und Amelogenin ist mit Carboxy-Tetramethylrhodamin (TMR) gefärbt und der Primer für Penta D, CSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317 und D5S818 ist mit 6'-Carboxy-4',5'-Dichlor-2',7'-Dimethoxy-Fluorescein (JOE) markiert. Alle sechzehn Loci können in einem Tube gleichzeitig amplifiziert und in einer Gel- oder Kapillarelektrophorese analysiert werden.

Tabelle 3.3.2: Short tandem repeat Loci, chromosomale Lokation, Länge der amplifizierten DNA in Basenpaare (bp) und allelische Leiter der im PowerPlex® 16 System enthaltenen Primer

STR-Locus und Label	Chromosomale Lokation	Oligonukleotidsequenz	Wiederholungss equenz 5 ->3	L nge der ampli. DNA in bp	Wiederholungen der allelischen Leiter
Penta E FL	15q	Forward: ATTACCAACATGAAAGGGTACCAATA Reverse: TGGGTTATTAATTGAGAAAACCTCTTACAATTT	AAAGA	379-474	5-24
D18S51 FL	18q21.3	Forward: TTCTTGAGCCAGAGGTTA Reverse: ATCTACCAGCAACAACAATAAACA	AGAA	290-366	8-10,10.2,11-13,13.2, 14-27
D21S11 FL	21q11-21q21	Forward: ATATGTGAGTCAATTCGCCAAG Reverse: TGTATTAGTGAATGTTCTCCAGAGAC	TCTA Komplex	203-259	24,24.2,25,25.2,26-28,28.2,29,29.2,30,30.2, 31,31.2,32,32.2,33,33.2,34,34.2,35,35.2,36-38
TH01 FL	11p15.5	Forward: GTGATTCCTCCATTGGCCTGTTT Reverse: ATTCCTGTGGGCTGAAAAGCTC	AATG	156-195	4-9,9.3,10-11,13.3
D3S1358 FL	3p	Forward: ACTGCAGTCCAATCTGQQT Reverse: ATGAAATCAACAGAGGCTTGC	TCTA Komplex	115-147	12-20
FGA	4q28	Forward: GGCTGCAGGGCATAACATTA Reverse: ATCTATQACTTTGGCCTTCAGGA	TTTC Komplex	322-444	16-18,18.2,19,19.2,20,20.2,21,21.2,22,22.2,23, 23.2,24,24.2,25,25.2,26-30,31.2,43.2,44.2,45.2,46.2
TPOX TMR	2p23-2pter	Forward: GCACAGAACAGGCACCTAGG Reverse: CGCTCAAACGTGAGGTTG	AATG	262-290	6-13
D8S1179 TMR	8q	Forward: ATTG CAAC TTATATGATTTTGTATTGATG Reverse: ACCAAATGTGTTTCATGAGTATAGTTTC	TCTA Komplex	203-247	7-18
VWA TMR	12p-12pter	Forward: GCCCTAGTGGATGATAAGAATAATCAGTATGTG Reverse: GGACAGATGATAAATACATAGGATGGATGG	TCTA Komplex	123-171	10-22
Amelogenin TMR	Xp22.1-22.3 und Y	Forward: CCCTGGGCTCTGTAAGAA Reverse: ATCAGAGCTTAAACTGGGAAGCTG	nicht zutreffend	106,112	X,Y
Penta D JOE	21q	Forward: GAAGGTCGAAGCTGAAGTG Reverse: ATTAGAAATCTTAATCTGGACACAAG	AAAGA	376-449	2.2,3.2,5,7-17
CSF1PO JOE	5q33.3-34	Forward: CCGGAGGTAAGGTGCTTAAAGT Reverse: ATTCCTGTGCAGACCCCTGTT	AGAT	321-357	6-15
D16S539 JOE	16q24-qter	Forward: GGGGTCTAAGAGCTGTAAAAAG Reverse: GTTTGTGTGCATCTGTAAGCATGTATC	GATA	264-304	5,8-15
D7S820 JOE	7q11.21-22	Forward: ATGTTGGTCAGGCTGACTATG Reverse: GATCCACATTTATCCTCATTGAC	GATA	215-247	6-14
D13S317 JOE	13q22-q31	Forward: ATTACAGAAAGCTGGGATGTGGAGGA Reverse: GGCAGCCCCAAAAAGACAGA	TATC	169-201	7-15
D5S818 JOE	5q23.3-32	Forward: GGTGATTTTCCTCTTTGGTATCC Reverse: AGCCACAGTTTACAACAATTTGTATCT	AGAT	119-155	7-16

3.3.3 PCR-Ansatz

Das Volumen eines PCR-Ansatzes beträgt 12,5µl, bestehend aus 7,5µl sogenanntem Mastermix und 5µl DNA-Lösung. LiChrosolv[®] und DNA werden, wie unter 3.2.1 beschrieben, pipettiert. Die folgenden Arbeitsschritte werden auf Eis durchgeführt:

Ampuwa, Gold Star 10X Puffer, PowerPlex[®] 16 Primer Paar Mix und AmpliTaq[®] Gold DNA Polymerase werden zuerst durch vortexen gemischt und anschließend als Mastermix in ein Eppendorff-Cup pipettiert. Die Menge des Mastermix richtet sich nach der Anzahl der zu untersuchenden Proben (in den meisten Fällen wurden 10 Proben gleichzeitig bearbeitet) inklusive einem Ansatz für den PowerPlex[®] 16 Allelic Ladder Mix, der beim ersten Lauf mitgemessen wird und einer positiven Amplifikationskontrolle bestehend aus der 9947A DNA-Probe. Zusätzlich wurde als Sicherheit von zwei Proben mehr ausgegangen, um Pipettierfehler auszugleichen. Vom Mastermix werden 7,5µl in jedes nach Patientennummern beschriftete Microtube vorgelegt; darauf wird in Reaktionsgefäß 1 der Allelic Ladder Mix und in die Reaktionsgefäße 2 bis 11 werden die entsprechenden 5,0µl DNA gegeben. Microtube 12 enthält die positive Amplifikationskontrolle. Die Proben werden in den Thermocycler eingesetzt und unter dem entsprechenden Programm amplifiziert.

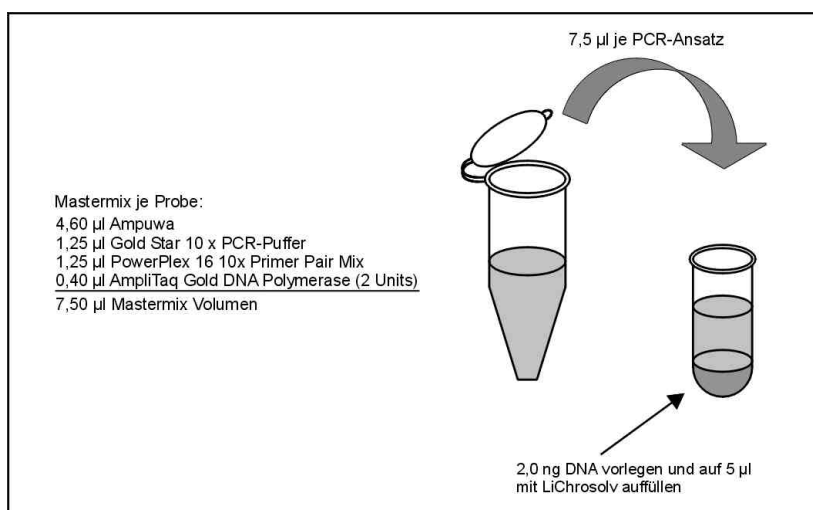


Abbildung 3.3.3: Pipettieranleitung zur Herstellung des PCR-Ansatzes.

3.3.4 Thermocyclerprogramm des PCR-Ansatzes

Protokoll für das Perkin-Elmer GeneAmp PCR System Thermocycler 9700
Initiale Denaturierung: 95°C 11 min.
Denaturierungsschritt: 96°C 1 min.
Primer-Annealing: 100% 94°C 30 s 29% 60°C 30 s 23% 70°C 45 s 10 Zyklen
Primer-Extension: 100% 90°C 30 s 29% 60°C 30 s 23% 70°C 45 s 19 Zyklen
60°C 30 min.
4°C

Abbildung 3.3.4: Thermocyclerprogramm.

3.4 Verdünnungsreihe als Methode zur Sensitivitätsprüfung

Um die Sensitivität der Primer zu testen, wurde eine Verdünnungsreihe, in der Spender- und Empfänger-DNA in bestimmten Verhältnissen zueinander gemischt werden, angelegt.

Ausgangspunkt ist ein Verhältnis aus 50% Spender- und 50% Empfängeranteilen.

Legt man in ein Reaktionsgefäß gleiche Mengen, z. B. 100% Spender-DNA, vor, und mischt dazu eine 50/50%-Donor-/Rezipientenmischung, so erhält man ein 75%-Spender- zu 25%-Empfängergemisch.

Führt man die Reihe auf diese Weise fort, so halbiert sich bei jedem Schritt der Anteil des Empfängers.

3 Methoden

Durch eine Verdünnungsreihe lässt sich die individuelle Sensitivität für den jeweiligen Patienten und den getesteten Singleplex Primern D3S1358 und D21S11 bzw. den 16 enthaltenen Primern des Multiplex-Kits PowerPlex® 16 bestimmen. Für die Chimärismusanalyse von großer Bedeutung ist es, minime Empfängeranteile in einer Probe nachweisen zu können. Aus diesem Grund werden die Verdünnungsreihen bis zu einem Anteil von 0,78% Rezipienten-DNA fortgeführt.

Die vorzulegende DNA-Menge von 80ng/20µl bzw. 4ng/µl wird aus der photometrisch bestimmten Probenkonzentration errechnet und auf 20µl mit *Aqua ad injectabilia* aufgefüllt. Beim Mischen der DNA werden die 20µl in das der Reihe folgende Reaktionsgefäß pipettiert und durch mehrfaches Füllen und Entleeren der Pipette die verschiedenen Konzentrationen miteinander vermischt.

Dabei ist es wichtig, dass nur mit einer Pipettenspitze gearbeitet wird.

Abbildung 3.4 soll schematisch den Aufbau einer Verdünnungsreihe veranschaulichen.

Standard-Verdünnungsreihe für Sensitivitätstests

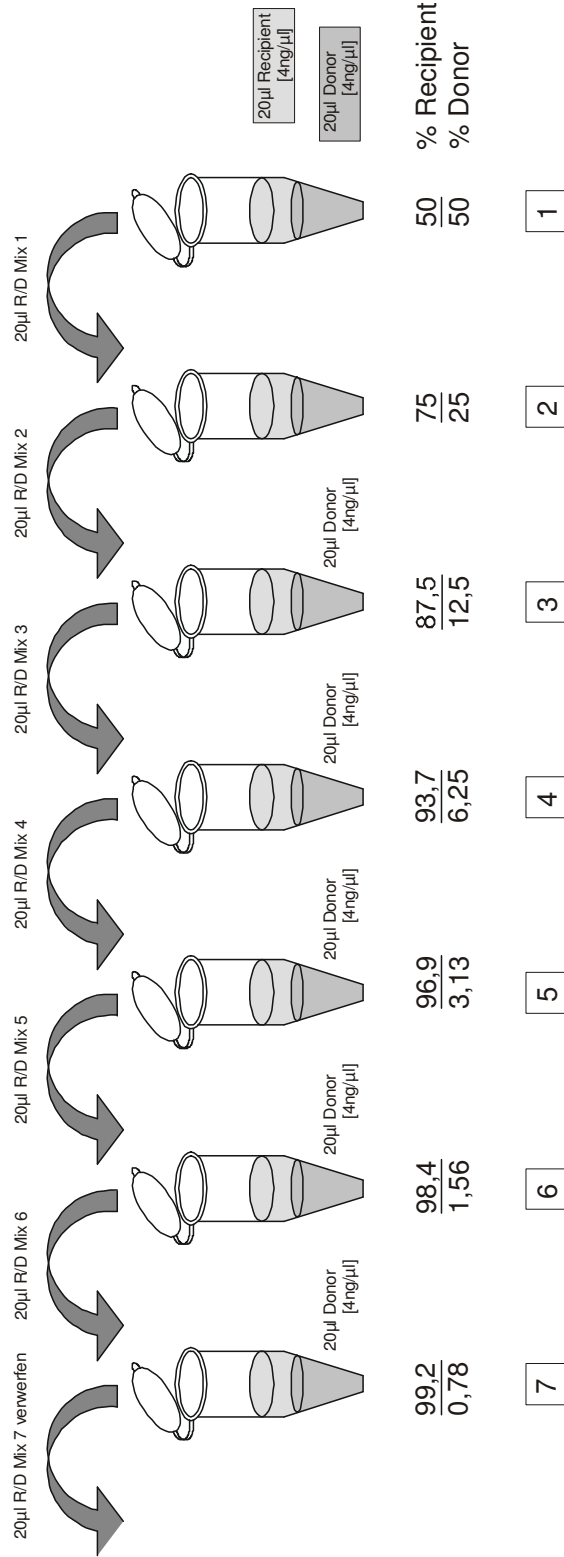


Abbildung 3.4: Vorgehensweise beim Anlegen einer Standardverdunnungsreihe.

3.4.1 Herstellung der Primer D3 und D21 für die Verdünnungsreihe

D21S11-F sowie der fluoreszenzmarkierte Primer D21S11-R-FL und das Primer-Paar D3S1358-F und D3S1358-R-FL (fluoreszenzmarkiert) liegen in unterschiedlichen Konzentrationen vor; durch Zugabe von RNase-freiem Wasser werden beide *forward* und *reversed* Primer in ihren Konzentrationen auf 1,0µM (D21S11) bzw. 0,8µM (D3S1358) angeglichen.

Tabelle 3.4.1: Charakteristika der STR-Primer D3S1358 und D21S11

Human gene mapping	Länge der ampl. DNA (bp)	Chromosomale Lokalisation	Sequenz
D3S1358-F	115-147	3p	5` - ACT GCA GTC CAA TCT GGG T - 3`
D3S1358-R-FL	115-147	3p	5` - ATG AAA TCA ACA GAG GCT TGC - 3`
D21S11-F	203-259	21q11-21q21	5` - ATA TGT GAG TCA ATT CCC CAA G - 3`
D21S11-R-FL	203-259	21q11-21q21	5` - TGT ATT AGT CAA TGT TCT CCA GAG AC - 3`

3.4.2 Berechnung des einzusetzenden Volumens der DNA-Lösung in die Singleplex- und Multiplex-Verdünnungsreihe

Die vorgelegte DNA-Menge soll laut Eurochimärismus-Protokoll 10ng betragen bei einem Reaktionsvolumen von 25µl.

Die Herstellung der DNA des Donors bzw. in einem zweiten Versuch des Rezipienten berechnete sich nach folgender Formel:

$$\text{DNA-Menge } [\mu\text{l}] = \frac{4\text{ng}/\mu\text{l}}{\text{photometrisch gemessene DNA } [\text{ng}/\mu\text{l}]} \times 200\mu\text{l}$$

Das erhaltene Volumen wurde auf 200µl mit LiChrosolv[®] aufgefüllt; je 20µl (entspricht 80ng DNA) wurden in die neun Tubes vorgelegt. Die DNA des Rezipienten bzw. in einem Folgeversuch des Donors wurde 1:5 verdünnt, indem man 4µl DNA in 16µl LiChrosolv[®] pipettierte; die gewünschte DNA-Menge berechnete sich nach der Formel:

$$\text{DNA-Menge } [\mu\text{l}] = \frac{4\text{ng}/\mu\text{l}}{\text{photometrisch gemessene DNA } [\text{ng}/\mu\text{l}] / 5} \times 40\mu\text{l}$$

Das erhaltene Volumen wurde auf 40µl mit LiChrosolv[®] aufgefüllt, je 20µl wurden in das 50/50%-Donor/Rezipienten- und das 100%-Rezipienten-Tube gegeben.

Von den neun in der Verdünnungsreihe erhaltenen Donor/Rezipienten-Gemischen wurden je 2,5µl für den PCR-Ansatz entnommen.

3.4.3 PCR-Ansatz der Verdünnungsreihe

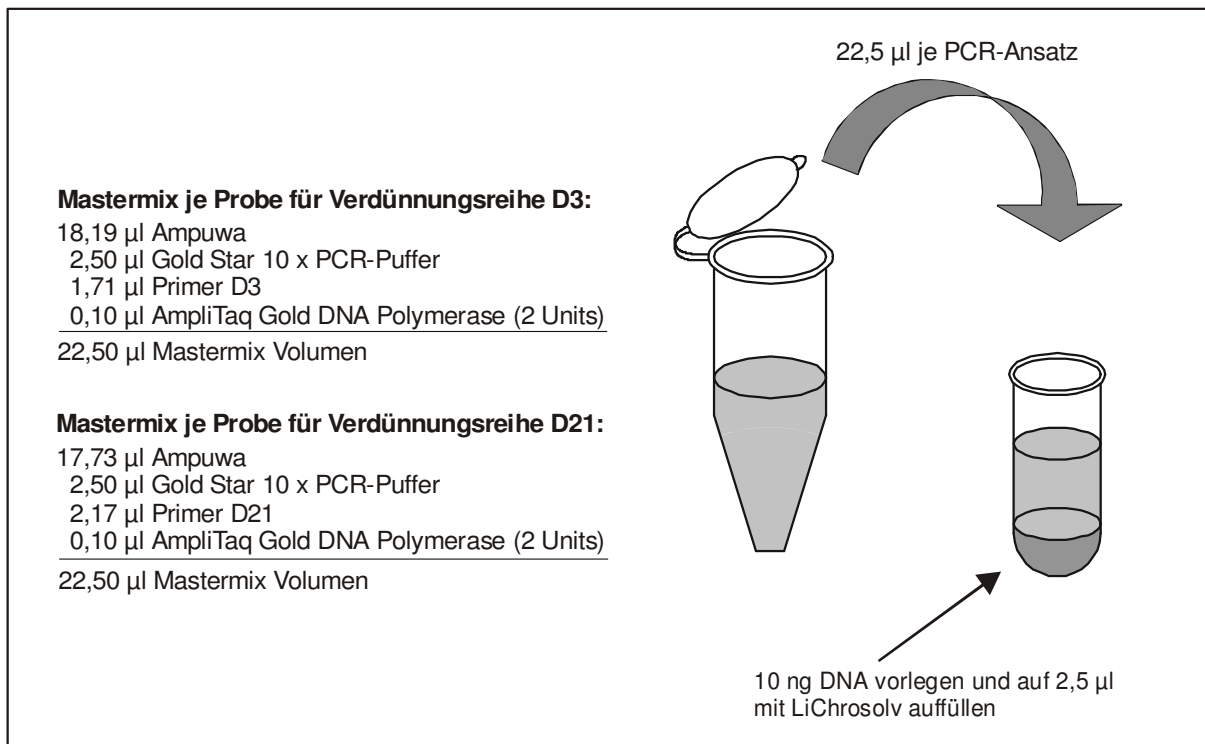


Abbildung 3.4.3.: Pipettieranleitung zur Herstellung des PCR-Ansatzes der Verdünnungsreihe zur Durchführung von Sensitivitätstests.

3.4.4 Thermocyclerprogramm der Verdünnungsreihe

Protokoll für das Perkin-Elmer GeneAmp PCR System Thermocycler 9700 Verdünnungsreihe
Initiale Denaturierung: 95°C 15 min.
Denaturierungsschritt: 96°C 1 min.
Primer-Annealing: 100% 94°C 30 s 29% 60°C 30 s 23% 70°C 45 s 10 Zyklen
Primer-Extension: 100% 90°C 30 s 29% 60°C 30 s 23% 70°C 45 s 19 Zyklen
60°C 30 min.
4°C

Abbildung 3.4.4: Thermocyclerprogramm der Verdünnungsreihe. Modifiziert wurde die initiale Denaturierung von 11 auf 15 min.

3.5 Kapillarelektrophorese

Nach Amplifikation der Donor- und Rezipientenproben in der PCR erfolgt die Analyse der DNA mittels Kapillarelektrophorese durch den ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer der Firma Applied Biosystems.

3.5.1 Prinzip der Kapillarelektrophorese

Unter dem Begriff Elektrophorese, der durch den schwedischen Forscher und Nobelpreisträger Arne Tiselius geprägt wurde, versteht man die Wanderung von Ionen in einem meist flüssigen Medium unter Einfluss eines elektrischen Feldes. Die Bewegungsgeschwindigkeit der Ionen hängt von der Ladung des

Teilchens, seiner Form und Größe, der Umgebung sowie der Stärke des elektrischen Feldes ab.

Bei der Kapillarelektrophorese findet diese Trennung in einem dünnen Kapillarrohr mit einem Innendurchmesser von 20-100µm in einer Elektrolytlösung statt. Weil die Oberfläche in diesem System im Vergleich zum Gelvolumen sehr groß ist, kann die bei der Elektrophorese entstehende Wärme sehr schnell abgeführt werden. Analysezeiten werden dadurch auf Minuten reduziert. Fluoreszenzmarkierte DNA-Fragmente lassen sich in sehr geringen Mengen (bis 10fg) nachweisen.¹²⁴

3.5.2 Instrumenteneinstellung des ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer

Zunächst wird ein Gene Scan Probenblatt analog des ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer Handbuchs erstellt.

Die Geräteeinstellung des ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer wird wie folgt vorgenommen:

Modul:	GS STR POP4 (1ml) A
Injektionszeit:	3s; bei Verdünnungsreihen 5s
Injektionsspannung:	15.0kV
Laufspannung:	15.0kV
Lauftemperatur:	60 °C
Laufzeit:	30 min. bei Powerplex; 20min. bei Monoplex

3.5.3 Vorbereitung der Proben für den ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer

Ansatz pro Tube:

- 14µl Formamid
- 0,7µl ILS 600 (um die Präzision der Analysen zu maximieren, fügt man jeder Probe ILS 600 als Größenstandard hinzu. Dieser beinhaltet 22 DNA -Fragmente, die zwischen 60 und 600bp lang sind; jedes Fragment ist mit Carboxy-X-Rhodamin gefärbt und kann als vierte Farbe vom ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer analysiert werden)

- Tube 1: 1,0µl allelischer Ladder-Mix
- Tube 2-11: 1,0µl amplifizierte Patienten- oder Spenderprobe

Die Proben werden bei 95°C 2min, 90s im Thermocycler denaturiert, anschließend auf Eis 3 Minuten abgekühlt und in die Autosampler-Ablage des ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer platziert.

3.5.4 Kapillarelektrophorese der Proben mit dem ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer

Der Autosampler bringt die Proben nacheinander in Kontakt mit der Kathodenelektrode einer polymergefüllten Glaskapillare; die Anodenelektrode befindet sich in einer Pufferlösung.

Sobald Strom von der Kathode zur Anode fließt, wird ein Teil der Probe von der Kapillare aufgenommen; dies nennt man elektronische Injektion. Das Kapillarende mit der Kathode wird in Pufferlösung getaucht; es wird erneut Strom angelegt, um die Elektrophorese fortzusetzen.

Wenn die fluoreszenzmarkierten Nukleotide ein Detektorfenster in der Kapillare passieren, regt ein Laser diese an; die emittierte Fluoreszenz wird von einer Kamera aufgenommen. Die Genescan® Analyse-Software interpretiert das Ergebnis: anhand der Intensität der Fluoreszenz kann eine Aussage bezüglich der Größe und Quantität der Fragmente gemacht werden.

Um die Auswertung der Daten, die mit dem PowerPlex® 16 System generiert wurden, zu vereinfachen, wurde eine Datei kreiert, die ABI Genotyper® Software, die eine automatische Bestimmung der Genotypen ermöglicht; im Anschluss können diese mit dem PowerTyper™ 16 Macro analysiert werden.

4 Ergebnisse

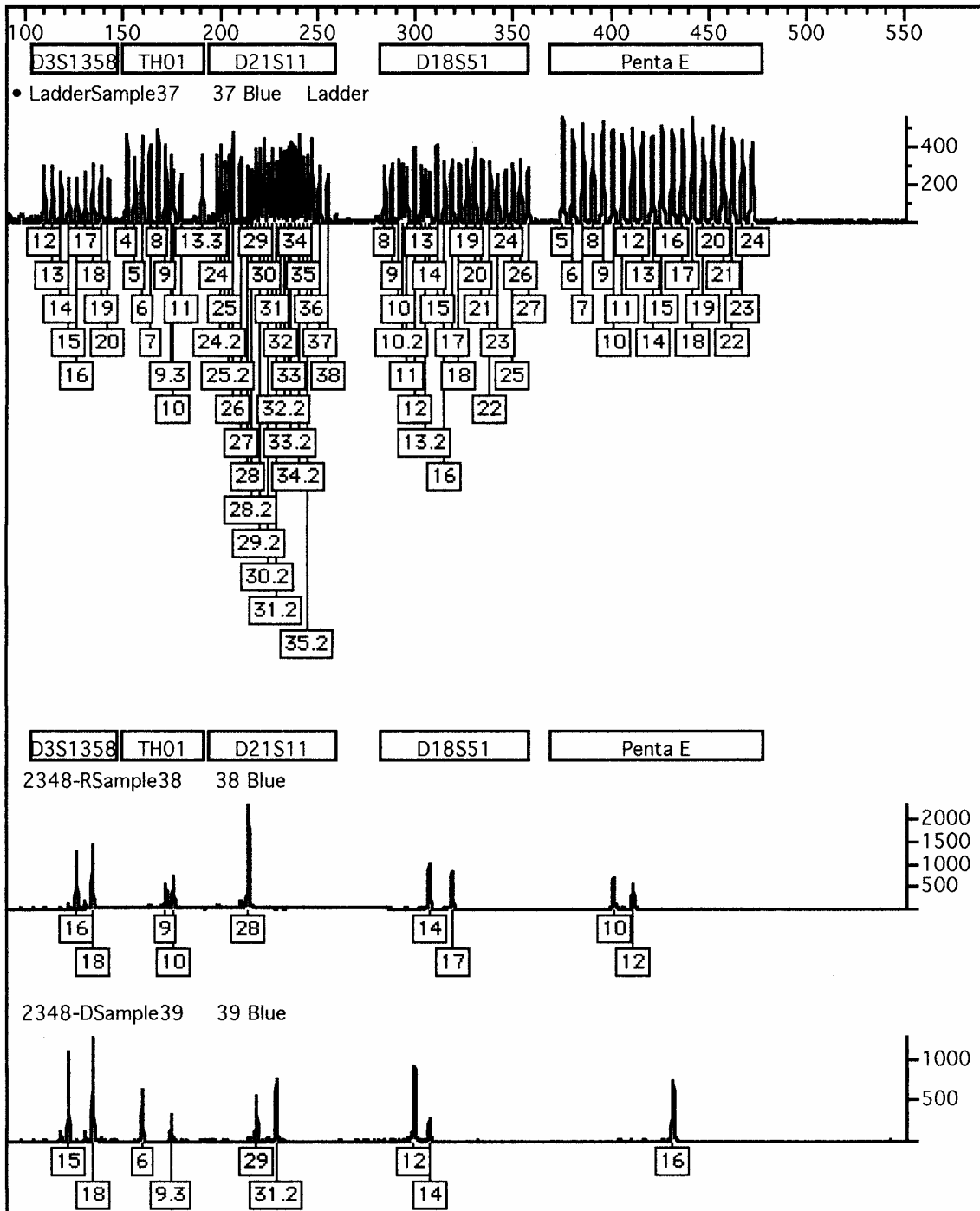
4.1 Informativität der im Powerplex® 16 System enthaltenen STR-Primer

Um die Informativität der STR-Primer zu untersuchen, wurden 76 Patienten-Spender-Proben, deren Blut zu Routinekontrollen im Chimärismuslabor der Universitätskinderklinik Tübingen eingingen, mit dem Powerplex® 16 System getestet.

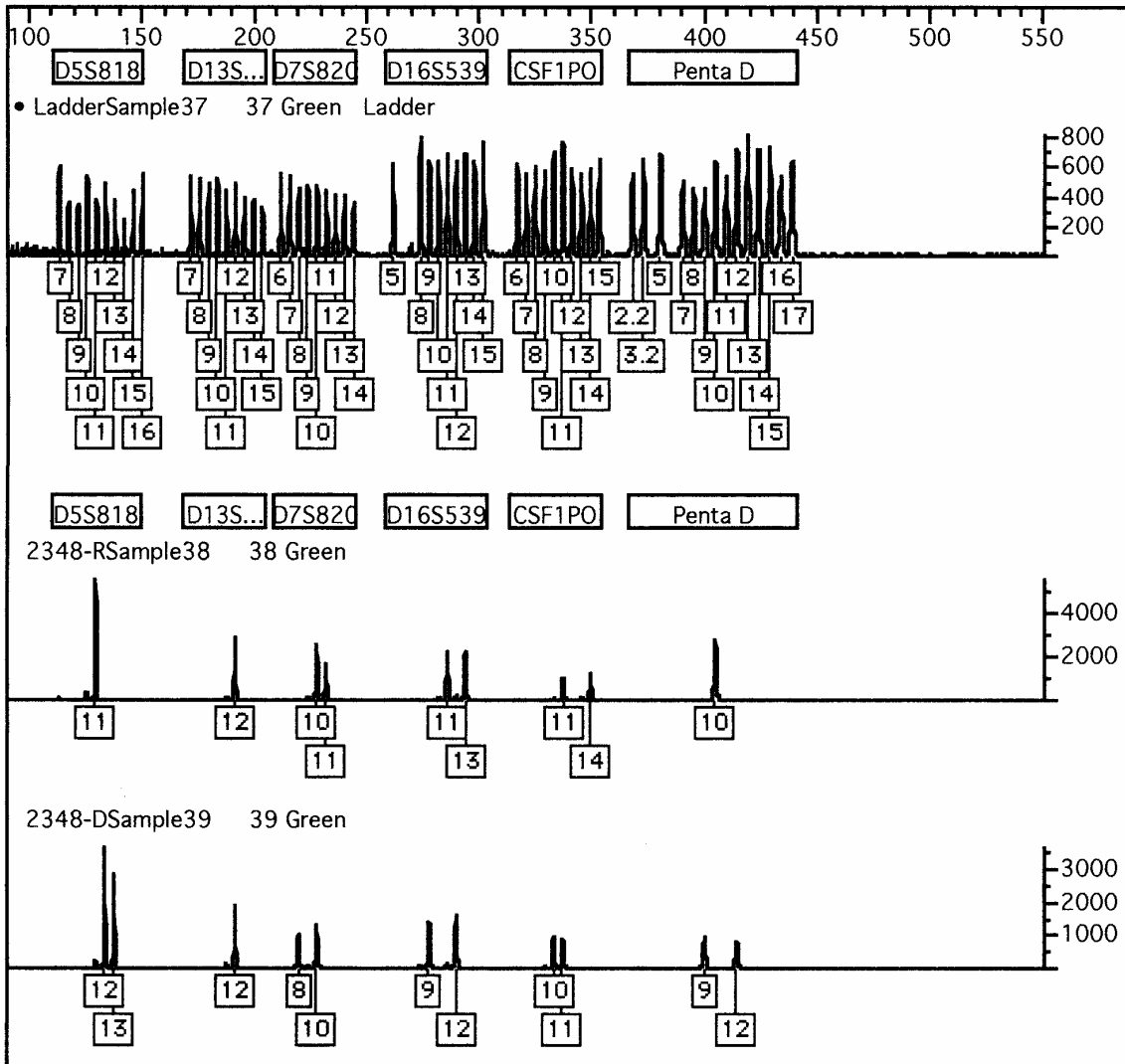
Bei den Primern handelt es sich um die fünfzehn STR-Marker D3S1358, TH01, D21S11, D18S51, Penta E, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, CSF1PO, Penta D, vWA, D8S1179, TPOX und FGA. Das Amelogenin, das die Differenzierung des Geschlechts anzeigt, wurde in den folgenden Auswertungen nicht berücksichtigt. Weitere Einzelheiten zu den STR-Primern sind der Tabelle 3.3.2 im Kapitel 3 zu entnehmen.

4 Ergebnisse

Die im Folgenden dargestellte Abbildung zeigt exemplarisch eine der 76 mit der Genotyper[®] 2.5 Software ausgewertete Untersuchung eines Empfänger-Spender-Paares.



4 Ergebnisse



4 Ergebnisse

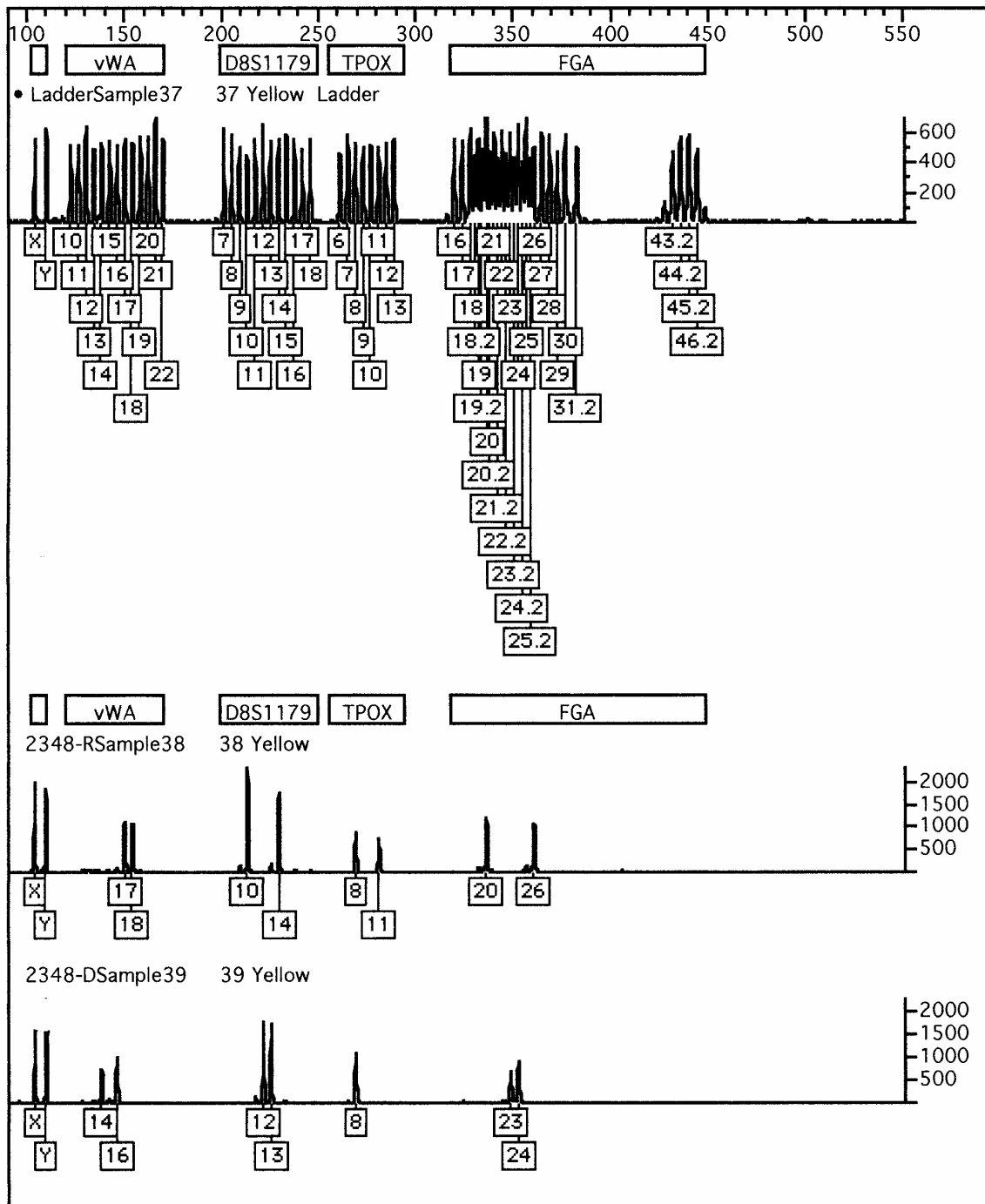


Abbildung 4.1.1: Powerplex® 16-Ausdruck eines Donor-Rezipienten-Paares. Primer D3S1358, TH01, D21S11, D18S51, Penta E, D5S818, D7S820, D16S539, CSF1PO, Penta D, vWA, D8S1179, TPOX und FGA zeigen Diskriminationsfähigkeit.

In Anlehnung an die von der Arbeitsgemeinschaft Eurochimärismus in Leukemia 2006 publizierte Nomenklatur des RSD (*Recipient-Shared-Donor*)-Codes wurden die Auswertungen vorgenommen.¹²⁵ (siehe Abbildungen 4.1.2 und 4.1.3).

Im Rahmen der Chimärismusuntersuchung mit Powerplex® 16 werden bestimmte Sequenzen der DNA von Rezipient und Donor durch eine STR-PCR mit fluoreszenzmarkierten Sonden amplifiziert; die PCR-Produkte werden mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt. Die Genescan-Software ordnet den DNA-Fragmenten anhand der Fragmentlänge die Allelbezeichnungen der jeweiligen STR-Loci zu.

Die Allele der Empfänger-Spender-Paare werden als sogenannte Peaks dargestellt; die Fragmentlängen der Peaks werden in Basenpaaren (bp), die Amplitude der Peaks entspricht der Fluoreszenzintensität und wird in relativen Fluoreszenzeinheiten (rfu) angegeben. Homozygote Allele werden als ein Gipfel, heterozygote Allele als zwei Gipfel abgebildet. Entsprechend der Anzahl der Basenpaare kommen die Peaks früher oder später zur Darstellung.

Eine Diskrimination bezüglich Donor und Rezipient ist möglich, wenn beide unterschiedliche Allele haben oder wenigstens ein Allel spezifisch für Spender oder Empfänger ist.

Die Länge eines Allels ist abhängig von der Anzahl der Wiederholungseinheiten (*repeat units*), die aus sich 7-80mal wiederholenden Nukleotidfolgen von drei bis sieben Basenpaaren und einer Gesamtlänge von 70 bis 400bp bestehen. Eine *repeat unit* vor und nach einem Gipfel liegt die sogenannte „*stutter peak area*“. In diesem Bereich treten Signale auf, die als Artefakte während der PCR-Reaktion entstehen. Diese Artefakte haben immer eine *repeat unit* Differenz von der tatsächlichen Länge der Zielsequenz. Bevorzugt findet man kürzere Produkte 1. „*downstream stutter*“ (- eine *repeat unit*), 2. *down stream stutter*; aber auch „*upstream stutter*“ (+ eine Wiederholungseinheit).

Wenn sich z.B. das Allel des Rezipienten mit der Stutter-Region eines dominanten Spenderallels deckt, ist eine quantitative Chimärismusanalyse nur möglich, wenn der Chimärismus hochgemischt ist. Da jedoch die Nachweisgrenze sehr stark heraufgesetzt ist, eignet sich eine solche Konstellation nur bedingt zur Bewertung der vollständigen Chimärismen. Ein als informativ geltender Primer weist Peaks auf, die außerhalb der *stutter peak area* (> eine *repeat unit*) liegen; eine Interferenz mit *stutter peaks* lässt sich sonst nicht sicher ausschließen.

Abhängig von der Länge des Amplicon können im Rahmen der PCR, bei der mehr als ein Produkt generiert wird, bestimmte Sequenzen bevorzugt vervielfältigt werden. Obwohl die Längendifferenz zwischen den einzelnen STR-Allelen sehr klein ist, können erhebliche Unterschiede bezüglich der Amplifikation beobachtet werden; kürzere PCR-Produkte werden bevorzugt vervielfältigt. Bei der Auswahl eines geeigneten Markers müssen daher die relative Position sowie die Längendifferenz zwischen Spender- und Empfängerallel berücksichtigt werden. Um ein Maximum an Sensitivität zu erreichen, ist es erstrebenswert, einen Marker zu benutzen, bei dem das Allel des Rezipienten das Kürzere von beiden ist, so dass diese Population besser detektiert werden kann. Dies findet in der Auswertung durch die Unterteilung in Rkurz und Dkurz Berücksichtigung.

Auch eine große Längendifferenz zwischen Spender- und Empfängerallel kann zu einer unausgeglichener Amplifikation der Allele führen, die eine präzise Chimärismusanalyse stark beeinflussen kann.

Als eines der Hauptprobleme wurde die Vergleichbarkeit hinsichtlich der Auswahl eines STR-Markers für die Chimärismus-Analyse gesehen. Der RSD-Code soll nun als gemeinsame Nomenklatur die Allelkonstellation objektiv beschreiben:

- R Das Allel des Rezipienten liegt außerhalb der *stutter peak area* der Spenderallele; der Abstand der Peaks beträgt mehr als eine *repeat unit*.
- r Empfängerallel liegt innerhalb der *stutter peak area* der Spenderallele; der Abstand der Peaks beträgt eine *repeat unit*.
- D Das Allel des Donors liegt außerhalb der *stutter peak area* der Empfängerallele; der Abstand der Peaks beträgt mehr als eine *repeat unit*.
- d Spenderallel liegt innerhalb der *stutter peak area* der Empfängerallele; der Abstand der Peaks beträgt eine *repeat unit*.
- S Gemeinsames Allel von Donor und Rezipient.

Die Buchstabenfolge richtet sich nach der Allelgröße, beginnend mit dem kürzesten Allel.

Groß- und Kleinbuchstaben lassen erkennen, ob ein Allel von einer *stutter peak* Formation beeinträchtigt wird.

Ein Primer gilt als informativ, wenn mindestens ein Allel des Rezipienten mit „R“ (Nachweis oder Verlaufskontrolle von Empfängerzellen) oder ein Allel des Donors mit „D“ (Kontrolle bei Donor-Lymphozyten-Infusionen) bezeichnet werden kann, d. h., dass der Primer Peaks aufweist, die außerhalb der *stutter peak area* (> eine *repeat unit*) liegen.

Eurochimärismus wendet diesen RSD-Code routinemässig an, um Marker und Allelkonstellationen zu vergleichen, mit dem Ziel, die besten Voraussetzungen für eine präzise und reproduzierbare Chimärismusuntersuchung festzulegen.

4 Ergebnisse

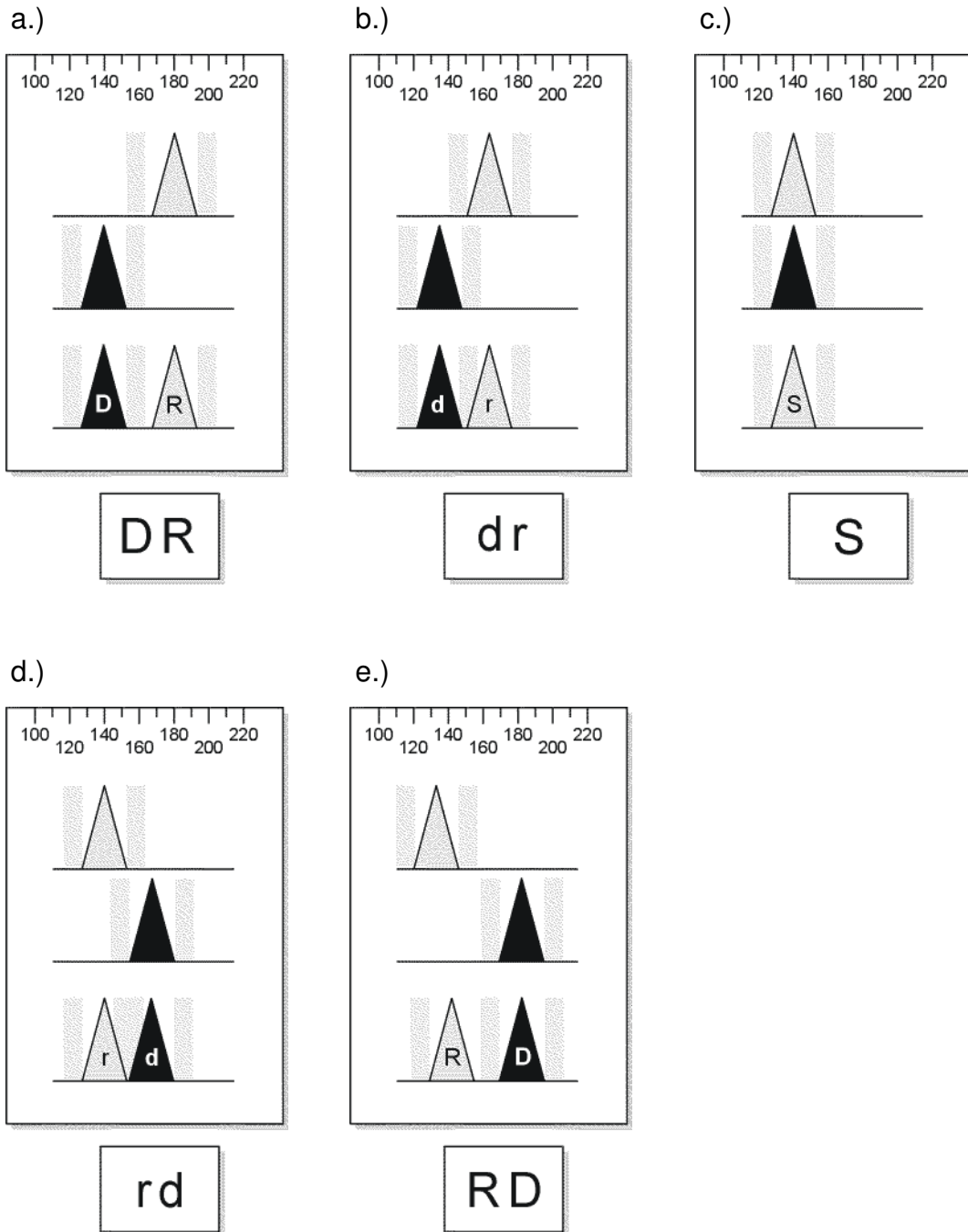


Abbildung 4.1.2: Homozygote Allelkonstellationen

- R Empfängerallel > 1 repeat unit vom Spenderallel entfernt
- D Spenderallel > 1 repeat unit vom Empfängerallel entfernt
- r Empfängerallel ≤ 1 repeat unit vom Spenderallel entfernt
- d Spenderallel ≤ 1 repeat unit vom Empfängerallel entfernt
- SS Spender und Empfänger teilen sich ein gemeinsames Allel

In a.) und e.) sind diskriminierbare Allelkonstellationen abgebildet; b.), c.) und d.) können nicht zur Unterscheidung zwischen Donor und Rezipient genutzt werden, da die Allele weniger als 1 repeat unit voneinander entfernt liegen bzw. Spender und Empfänger sich ein Allel teilen

4 Ergebnisse

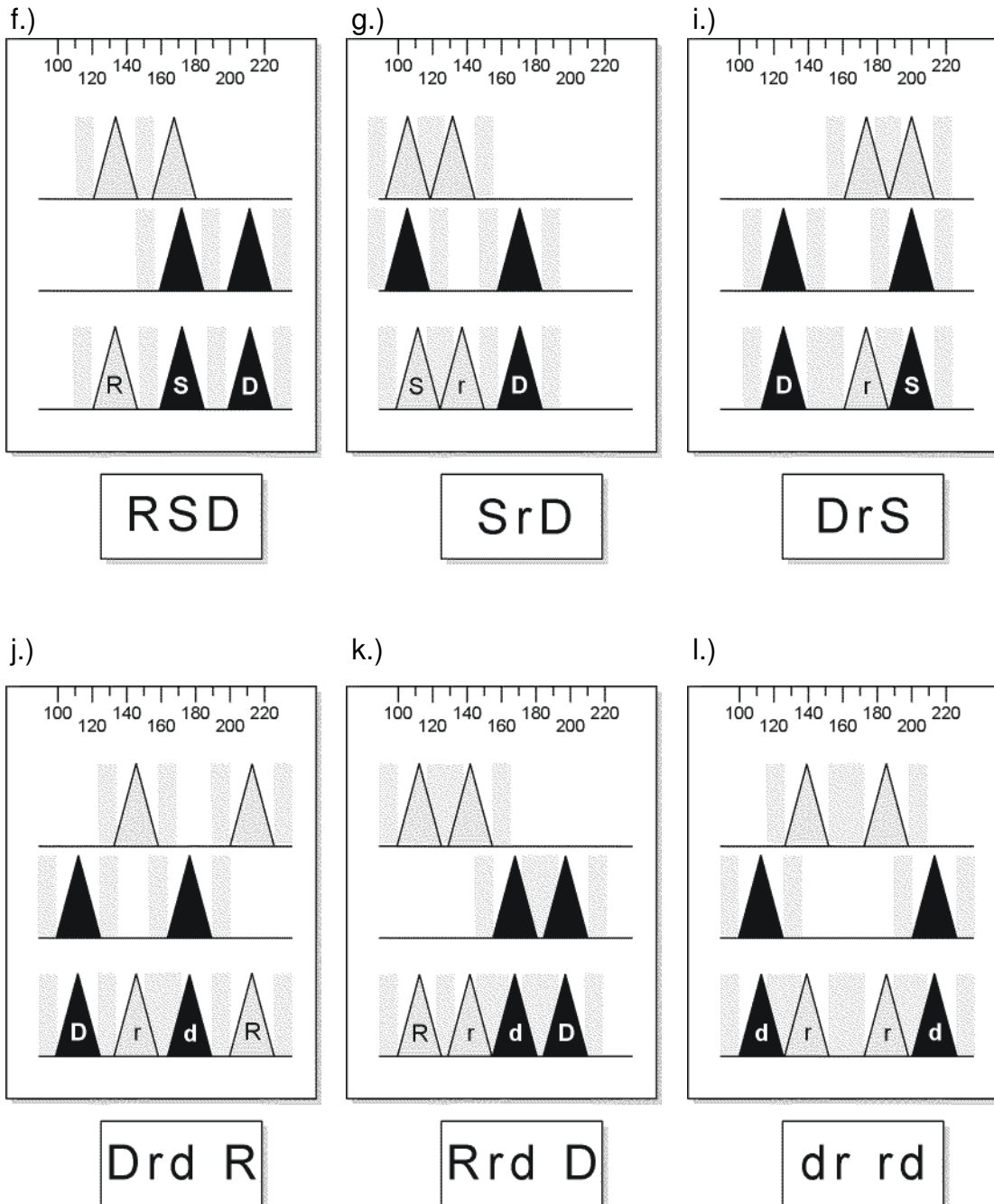


Abbildung 4.1.3: Heterozygote Allelkonstellationen

- R Empfängerallel > 1 repeat unit vom Spenderallel entfernt
- D Spenderallel > 1 repeat unit vom Empfängerallel entfernt
- r Empfängerallel ≤ 1 repeat unit vom Spenderallel entfernt
- d Spenderallel ≤ 1 repeat unit vom Empfängerallel entfernt
- SS Spender und Empfänger teilen sich ein gemeinsames Allel

In f.), j.) und k.) sind diskriminierbare Allelkonstellationen abgebildet. g.), i.) und l.) können nicht zur Unterscheidung zwischen Donor und Rezipient herangezogen werden; in g.) und i.) teilen sich Spender und Empfänger ein Allel; das Allel des Rezipienten liegt jeweils weniger als 1 repeat unit vom Donor bzw. in i.) vom gemeinsamen Allel entfernt. Bei l.) liegen alle Allele weniger als 1 repeat unit voneinander entfernt.

4 Ergebnisse

Tabelle 4.1.1: Auswertung der Patienten-/Spenderpaare gemäß RSD-Code
(Patienten: n=76; Primer: n=16):

UPN-Nr/ Pat.Nr.	D3S1358	TH01	D21S11	D18S51	Penta E	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	CSF1PO	Penta D	vWA	D8S1179	TPOX	FGA
1878/01	D rd	dr rd	S rD	rS D	DS R	S r	D S	S	S S	S D	r S	S dr	S S	S	Rr dd
2206/02	S S	S S	S S	S S	S S	S	S	S S	S	S S	S S	S S	S S	S	S S
2208/03	S	rS D	rd S	S	RD S	S dr	D S	S	S S	R S	S	S d	DS R	S S	S dR
2226/04	dr S	dr dr	d S	rd S	S DR	rd S	dr S	RS D	Dr S	rd d	Rd S	Dr r	DR rd	S R	dR RD
2294/05	S S	S S	dr rD	S rD	S	dd r	rd rd	Dr S	DS R	S RD	dr S	S S	Rd S	S R	dr rD
2295/06	dr dr	dd R	Dr dR	rd DR	0 0	dS r	r d	S rd	rd S	DS r	rd d	Rr dd	D S	S R	DR RD
2298/07	S r	RS d	S S	S rD	S d	S rd	R S	dr S	S S	S r	S D	DS r	S d	S D	S R
2301/08	DS r	S R	rd rd	rS D	Rd rD	rd dR	rd RD	S rd	R S	S R	DR D	Rr dd	S R	rd D	rd DR
2302/09	S dr	S D	S D	RD S	S S	S rd	rS d	S	D S	S R	dr S	S S	S S	Dr S	S S
2303/10	S S	dS R	RS d	S dr	S R	S S	S RD	S	S d	R S	R S	S R	S r	S r	DR S
2307/11	R S	dr S	S d	DS r	S dr	S	DS R	S R	r S	r S	dr S	S dr	R S	S	S DR
2311/12	rS D	DS R	S S	S S	0 0	S S	r S	S S	S S	rd S	S	S S	S S	R S	S R
2312/13	dS r	S S	S d	S S	RR dd	S rD	S S	S dr	S	S rd	Dr S	DS r	S rd	S R	S S
2316/14	rS D	rS D	S S	DR S	S S	S d	rd rd	S S	S	S dr	S S	d S	dS r	S dr	S dr
2320/15	S S	rS D	S S	dr S	DR D	S S	S D	Dr d	DS R	dS R	S S	DS r	dS R	r d	rr dd
2324/16	DS r	dd r	dr R	DS R	0 0	r d	S dr	DR S	dd rr	rd d	0 0	r S	d S	R D	Rd d
2327/17	dS r	R S	dS r	S dR	RR D	S S	dr dR	S rd	rd rd	dr r	DR D	Rd d	S dr	S r	d S
2328/18	S S	Rd rd	S dR	rd DR	Dd rR	Rr dd	dr R	Rd S	RS d	Rr d	S dR	dd rr	Dr dr	S dR	Rr d
2329/19	S R	Dr S	S S	D S	S dr	S dr	S	S S	RS d	S rd	dr dr	S d	Dr dr	S D	dd r
2333/20	S S	DS r	S R	S dr	RD R	DR S	rS d	dS R	S S	S d	dr S	Rd d	d S	S S	S S
2340/21	DR S	RD dr	S S	S S	S S	RS d	S S	R S	S S	S d	rS D	RS D	DS R	S S	S S
2341/22	d S	S	R S	S D	S S	S S	S rd	S DR	S S	S S	DS r	DR S	rS d	S D	D S
2345/23	S rD	Rr dd	dr dR	S rD	rd dR	rd S	RS d	rr dd	S S	rd r	Rr dd	RD rd	S dr	S S	S D
2346/24	dr rd	dS R	dr rD	S rd	S dr	dr D	DR DR	R S	d S	S r	dr S	Rr dd	dr dr	S dR	Rd S
2348/25	dr S	Dr dr	rd D	DS R	RR D	r dd	S	DS r	Dr dr	dS R	dr D	Dd rr	Rd dr	S R	Rd dR
2355/26	Sr D	D S	rr dD	rd d	Dd r	S S	Dr dr	Rd S	DS r	dS r	Rd r	RD S	dr rd	Dr r	Rd dR
2364/27	DR S	dr R	rd S	rd rD	R S	D S	rS d	Dd rr	Dr r	r S	dd R	RS d	Dd rr	S S	S S
2365/28	R S	Rd S	Dr dR	RD DR	DS R	d r	DR R	RS D	S dr	Rd r	rS D	S dr	S dr	dr rd	RS d
2373/29	Rd dr	Dr rd	Dr S	rS D	DR DR	S r	RS d	S rd	d S	S rd	Dr dr	rr dd	S d	S D	Rd rD
2384/30	S S	RR D	dS R	S d	R S	rS D	RS d	dS r	dr d	S d	d r	dr S	Rd dr	S D	Dr d
2387/31	dr R	S	r S	S S	R S	D S	S S	S S	S R	S S	S R	S S	dr d	S S	rd S
2392/32	Dr d	S D	rS D	rS d	Rr dD	S S	Rr d	S r	dr D	S S	rS D	S d	S S	S S	S
2393/33	S	R S	rD S	RS D	S DR	S S	rd r	S S	RS d	S S	S r	S DR	S S	D R	dS R
2395/34	RS d	rd D	S rd	dr S	D S	dr r	Rd dr	dd rr	d S	rd D	rS d	S S	rd S	S R	Dr rD
2396/35	S dR	Dr d	S d	rd dR	RD S	RS D	DS r	Dd rr	R S	Dr S	rd RD	dr R	rr dD	S S	R S
2406/36	S dr	S S	S D	S RD	RD S	S S	RS d	S d	d S	S S	rS d	Dr S	S rd	S	RS D

4 Ergebnisse

UPN-Nr/ Pat.Nr.	D3S1358	TH01	D21S11	D18S51	Penta E	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	CSF1PO	Penta D	vWA	D8S1179	TPOX	FGA
2407/37	S S	RD dr	S S	RS d	D S	r S	S dR	S r	S	rS d	rd S	D S	dr d	S R	R S
2414/38	rd rd	dr S	rd R	dr rD	dd rR	Rd r	Dr D	rd D	Dd r	S D	DR S	D R	Dr d	S R	dr rD
2418/39	d S	S S	S S	dr rD	Dr rD	S d	dS r	S r	S S	S S	S RD	dS r	rr D	S S	S S
2420/40	S	S	dr S	DS r	rS d	Dr S	S S	S	S	r S	rd S	dr S	S	S	S R
2423/41	Dr d	Rr d	DR d	DS r	dr DR	S S	rr dd	dr S	rr DD	rd S	dr rd	rd dR	Rr d	S rd	dS r
2426/42	dS r	Rr d	S R	rd RD	DR dr	S r	S dr	Rd S	dr rD	S R	dr rd	rd dr	R S	S rD	rd D
2427/43	dr D	rd rd	rd rd	DS r	R D	S	dr dr	S rd	S S	S D	r S	dr S	DDRR	S D	Dr dr
2429/44	S S	S S	S S	dS r	S S	d S	S	dS R	D S	Rd S	DR R	S S	S S	Dr S	d S
2430/45	dr R	Rd S	RR dd	rd rd	Dd rR	S S	dr D	S rd	Rd S	Dr S	dd RR	D S	DR S	S r	DD rr
2432/46	dd r	Dr d	d S	S rD	DD R	S S	DR RD	RD R	S	DS r	dd r	S D	Dr dr	S D	S S
2437/47	Dr d	dd rr	dr DR	rd S	DR D	rr dD	R S	S r	S dr	d S	S S	S r	dr dr	S d	Dr d
2440/48	S S	Dr d	Dr rD	RD D	dd RR	Rd d	R D	D R	S dr	rr dd	S RD	S	RD S	d r	S rd
2445/49	rd D	rd D	R D	DD R	S dr	dS r	DD rr	Rr dd	D S	S D	RD R	D R	Rd rd	S S	Dr rD
2446/50	R S	S R	rd DR	rd RD	RD DR	Rr dd	R S	S r	S rd	r S	Dr dR	S rD	dS r	S S	dr RD
2450/51	dS R	S	S r	S S	S DR	S S	S dR	S S	r S	S	RS d	dr S	DS R	S S	S S
2453/52	dS R	RR D	S rd	S DR	rd S	S rd	S S	D S	r S	rd S	S d	dS R	S RD	S dr	Dr rD
2458/53	D S	rd dr	rd R	S dr	RD S	RS D	R S	dr S	rd dr	S rD	S R	S d	Rr dd	S r	dr rd
2461/54	rr dd	DS R	S D	DR D	rd rd	S d	Dr rd	D S	dr S	dr D	S	D S	Dr d	D S	RD D
2464/55	S S	dS r	RS d	dS R	Rd rd	S S	S S	d S	S S	S	rS d	S S	S d	S S	S
2465/56	rd rd	rd S	rd R	rd S	D RR	r S	DS r	rS d	dd rR	r d	rd rd	Dr rd	DR D	D S	RR D
2468/57	dr d	Rr dd	DS R	dS r	Dr r	S d	r d	rd S	dr r	rd dr	R D	S dr	DS r	Rd S	Rd S
2469/58	S dr	Rd dr	D S	rd r	RR DD	S S	D R	S R	r S	S S	Dr S	S rD	rd S	S	S dR
2470/59	Dr S	S S	rd dR	rd DR	RD R	d r	dr S	S rd	DS r	d S	rd S	rd DR	R D	R S	SR D
2472/60	S S	S dR	rd r	S D	S D	S r	S rd	S R	S S	S S	S S	D S	S dr	S dr	S r
2479/61	S S	S S	R S	S S	R S	DS r	D S	S S	S RD	S	Rd S	rd dr	D S	rd D	S RD
2480/62	S S	RS D	dS R	S dr	Dr S	S S	S	RS d	R S	S D	S	dr S	S r	S	rS D
2482/63	rd D	dS R	S rd	dr R	DS R	S S	rd dr	Rd d	DS r	S rd	dr rd	rd rd	S d	dr R	DS R
2488/64	S R	d r	dd rr	rr dd	Rd dR	Rd S	dS R	rS d	d S	Rd d	S R	S	d dR	S S	dr S
2489/65	DS r	dr S	S S	S d	S S	S S	Rd dR	rd DR	Rd S	S dr	S S	rS d	S D	S	S S
2492/66	rS d	D S	rd D	dr S	DD RR	d r	r S	DS r	dr r	D S	S dr	rd dR	dd rr	S	Dr S
2499/67	Dr dr	Rd d	RS d	rS D	DR rd	dr S	S dr	r S	DS r	r d	S dR	rd r	S S	S dR	rS d
2501/68	Rd S	S S	rS D	RD D	S D	S S	S	S S	S dr	S S	DS r	Rd S	D S	S S	S S
2504/69	Dr d	S D	r S	S rD	S S	rS d	S S	S r	rS d	rS d	S D	S d	S S	S R	S dr
2505/70	Dr rd	S rd	rd rD	DR rd	DD rr	Rr dd	Rd dR	S S	S dR	S S	dr S	Dr S	dS r	S S	Dr S
2509/71	rd rd	D S	S R	S dr	d dR	rd S	dr D	Dr dR	Rd S	dS r	S rd	dr D	S dr	S R	rd S
2517/72	r S	DS R	dr r	Dr S	DS r	S S	S	RS d	S S	r S	rd S	Dr S	R S	S D	S S
2518/73	rr dd	S S	r S	S S	Rd dR	dd rr	rd S	Dr dR	dr d	rr dd	S rd	dd RR	S rD	S dr	S dr
2523/74	rd S	S S	S S	S rd	RD DR	S S	S S	S S	S	S S	S S	R S	S S	S S	S S
2532/75	dr S	S dr	D DR	rd RD	S R	r S	DR R	Dr S	dS R	rd S	S DR	Dr d	dr rd	S	S rD
2546/76	S S	dr S	S	S S	S	S d	D S	S S	RS d	dS r	rd S	S rD	S S	S S	S S

4 Ergebnisse

Tabelle 4.1.2: Übersicht der mittels RSD-Code erhaltenen Ergebnisse:

Primer	D3S1358	Th01	D21S11	D18S51	PentaE	D5S818	D13S317
SS	15	12	11	8	8	21	8
S	3	4	1	1	2	3	7
SS+S	18	16	12	9	10	24	15
R	15	28	26	24	45	11	26
D	21	26	24	39	41	11	22
R kurz	6	17	7	6	22	9	13
D kurz	14	13	8	12	21	5	16
r	22	14	16	20	7	27	22
d	22	15	17	22	8	26	20
0	0	0	0	0	3	0	0

Primer	D7S820	D16S539	CSF1PO	PentaD	vWA	D8S1179	TPOX	FGA
SS	12	13	12	7	8	11	18	14
S	5	7	3	4	2	1	10	2
SS+S	17	20	15	11	10	12	28	16
R	23	17	12	24	22	22	19	29
D	19	17	13	22	27	24	18	29
R kurz	12	10	6	8	11	11	4	14
D kurz	13	13	5	10	17	17	6	13
r	24	19	31	28	19	21	12	13
d	19	21	29	26	23	26	9	14
0	0	0	0	1	0	0	0	0

- R ein Empfängerallel > 1 repeat unit vom Spenderallel entfernt
D ein Spenderallel > 1 repeat unit vom Empfängerallel entfernt
r ein Empfängerallel ≤ 1 repeat unit vom Spenderallel entfernt
d ein Spenderallel ≤ 1 repeat unit vom Empfängerallel entfernt
R kurz ein Empfängerallel > 1 repeat unit vom Spenderallel entfernt; R ist kürzer als das Spenderallel
D kurz ein Spenderallel > 1 repeat unit vom Empfängerallel entfernt; D ist kürzer als das Empfängerallel
SS Spender und Empfänger teilen sich zwei gemeinsame Allele
0 kein Ergebnis

Der Primer Penta E zeigt in 45 Spender-Patienten-Paaren die Allelkonstellation „R“; damit liegt bei diesem Primer die optimale Allelkonstellation am häufigsten vor, gefolgt von den Primern FGA (29) und Th01 (28). Aus Tabelle 4.1.1 sind die Ergebnisse aller Primer zu entnehmen; die zugehörigen graphischen Darstellungen finden sich in den Abbildungen 4.1.4-4.1.10.

Teilen sich Spender und Empfänger zwei gemeinsame Allele (Konstellation SS) bzw. bei Homozygotie ein gemeinsames Allel (S), ist eine Chimärismusanalyse mit diesem Primer nicht möglich. Primer TPOX zeigt diese Allelkonstellation in 28 von 76 Analysen, Primer D5S818 in 24 von 76, und Primer D16S539 in 20 von 76 Fällen. Abbildung 4.1.1 veranschaulicht die Diskriminationsfähigkeit aller STR-Primer bei 76 Patienten.

Kriterien für den Informativitätsvergleich der einzelnen STR-Primer:

- Diskriminationsfähigkeit; die Allelkonstellation SS erlaubt keine Unterscheidung bezüglich der Herkunft der DNA. Im Mittel wurde diese Konstellation bei 16 Patienten-Spender-Paaren vorgefunden.
- Summe von R und D; das Auftreten von einem Rezipientenallel R bzw. Donorallel D im Abstand von > 1 *repeat unit* ergab einen Mittelwert von 23 (R) bzw. 24 (D).
- Summe von R_{kurz} und D_{kurz}; die Situation, dass ein Empfänger- bzw. Spenderallel > 1 *repeat unit* vom Spender- bzw. Empfängerallel entfernt und kürzer ist, fand sich durchschnittlich 10 (R_{kurz}) bzw. 12 (D_{kurz}) mal.
- Summe von r und d; das Vorliegen von einem Donor- bzw. Rezipientenallel, das ≤ 1 *repeat unit* vom Rezipient- bzw. Donorallel entfernt ist, wurde in jeweils 20 der 76 Analysen gesehen.

4 Ergebnisse

Tabelle 4.1.3 Mittelwerte der Allelkonstellationen im analysierten Patientenkollektiv (n=76)

Allelkonstellation	Mittelwert (Bandbreite)
SS	16 (9-28)
R	23 (11-45)
D	24 (11-41)
R kurz	10 (4-22)
D kurz	12 (5-21)
r	20 (7-31)
d	20 (8-29)

- R ein Empfängerallel > 1 repeat unit vom Spenderallel entfernt
D ein Spenderallel > 1 repeat unit vom Empfängerallel entfernt
r ein Empfängerallel \leq 1 repeat unit vom Spenderallel entfernt
d ein Spenderallel \leq 1 repeat unit vom Empfängerallel entfernt
R kurz ein Empfängerallel > 1 repeat unit vom Spenderallel entfernt; R ist kürzer als das Spenderallel
D kurz ein Spenderallel > 1 repeat unit vom Empfängerallel entfernt; D ist kürzer als das Empfängerallel
SS Spender und Empfänger teilen sich zwei gemeinsame Allele

Für die Belange der Chimärismusanalyse reicht die Bestimmung der allelischen Frequenz nicht aus, daher muss die Konstellation der Allele im Vergleich Spender/Empfänger in Betracht gezogen werden. Für die Chimärismusanalyse kann man drei Konstellationen postulieren:

- SS-Konstellation, nicht informativ
- r/d-Konstellation, diese ist informativ, aber nur bedingt anwendbar wegen der stutter-Artefakte
- D/R-Konstellation, diese ist informativ und optimal für die Chimärismusbestimmung

Um die einzelnen Primer miteinander vergleichen zu können, wurde aus den Mittelwerten der Allelkonstellationen eine Neutrallinie gebildet (siehe Abbildung 4.1.4-4.1.10).

Tabelle 4.1.4 veranschaulicht die Punktwertung der Allelkonstellationen bezogen auf den Mittelwert. Für die Parameter R, D, Rkurz, Dkurz, r und d wurden +3 Punkte vergeben, wenn die ermittelten Werte über dem Durchschnitt lagen bzw. mit -3 Punkten bewertet, wenn sich diese unterhalb des Mittelwerts

4 Ergebnisse

befanden. Bei den Analysen zur Diskriminationsfähigkeit wurden die Primer, die über dem Mittelwert und somit eine schlechtere Diskrimination aufweisen, mit -3 Punkten versehen; Primer, die unterhalb des Durchschnitts lagen und damit eine gute Trennung zwischen Donor und Rezipient zeigen, wurden mit +3 Punkten bewertet.

Tabelle 4.1.4 Punktwertung der Allelkonstellationen bezogen auf den Mittelwert:

	3 Punkte	0 Punkte	-3 Punkte	
Anzahl Allel SS	Weniger als	Genauso viele wie	Mehr als	Mittelwert
Anzahl Allele R/D, R kurz/D kurz, r/d	Mehr als	Genauso viele wie	Weniger als	Mittelwert

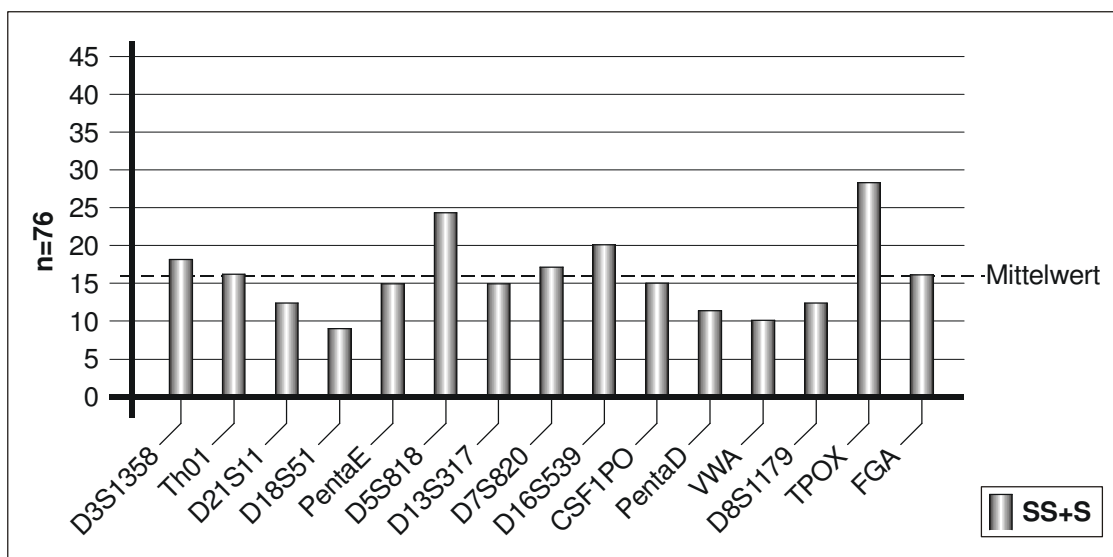


Abbildung 4.1.4: Diskriminationsfähigkeit der im Powerplex® 16-Kit enthaltenen STR-Primer bei 76 Patienten.

SS+S: Heterozygote und homozygote gemeinsame Allele von Donor und Recipienten.

4 Ergebnisse

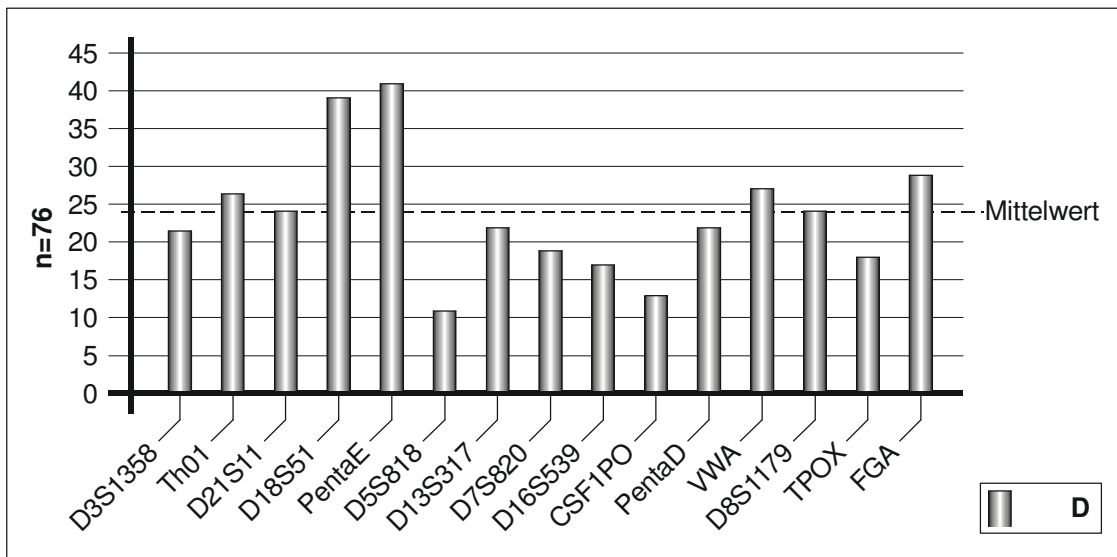


Abbildung 4.1.5: Häufigkeit der Allelkonstellation D im Kollektiv von 76 Patienten.
D: Das Allel des Donors liegt außerhalb der stutter peak area der Empfängerallele; der Abstand der Peaks beträgt mehr als eine repeat unit.

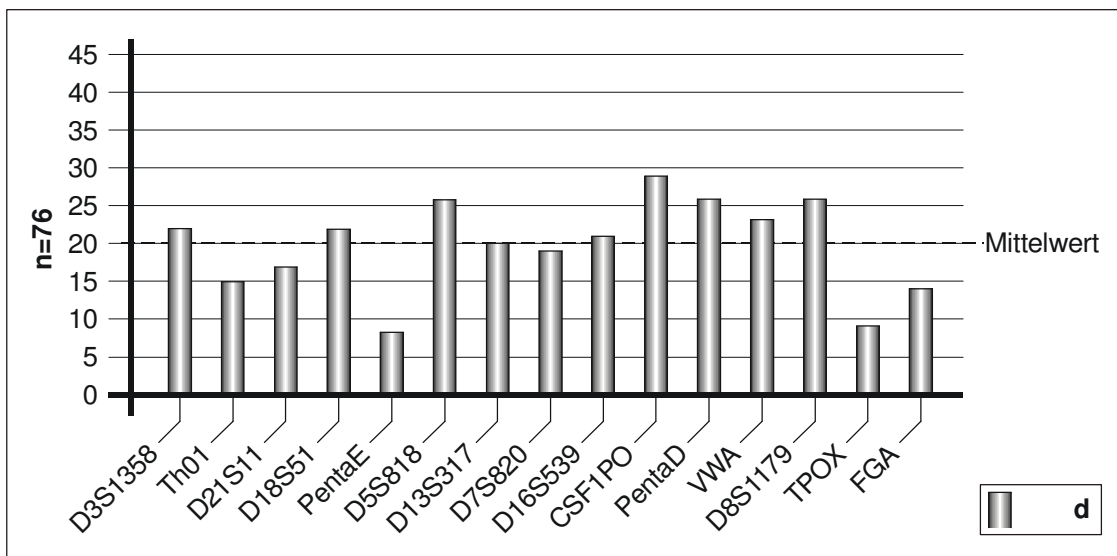


Abbildung 4.1.6: Häufigkeit der Allelkonstellation d im Kollektiv von 76 Patienten.
d: Das Spenderallel liegt innerhalb der stutter peak area der Empfängerallele; der Abstand der Peaks beträgt weniger als oder eine repeat unit.

4 Ergebnisse

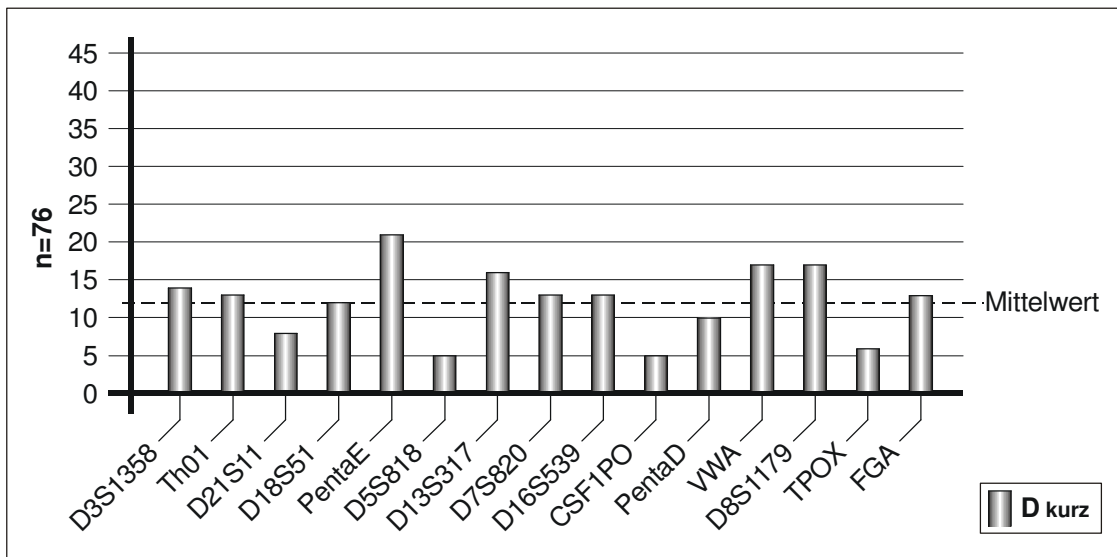


Abbildung 4.1.7: Häufigkeit der Allelkonstellation D kurz im Kollektiv von 76 Patienten. D kurz: Das Spenderallel ist das kürzeste Allel und liegt außerhalb der stutter peak area der Spenderallele; der Abstand der Peaks beträgt mehr als eine repeat unit.

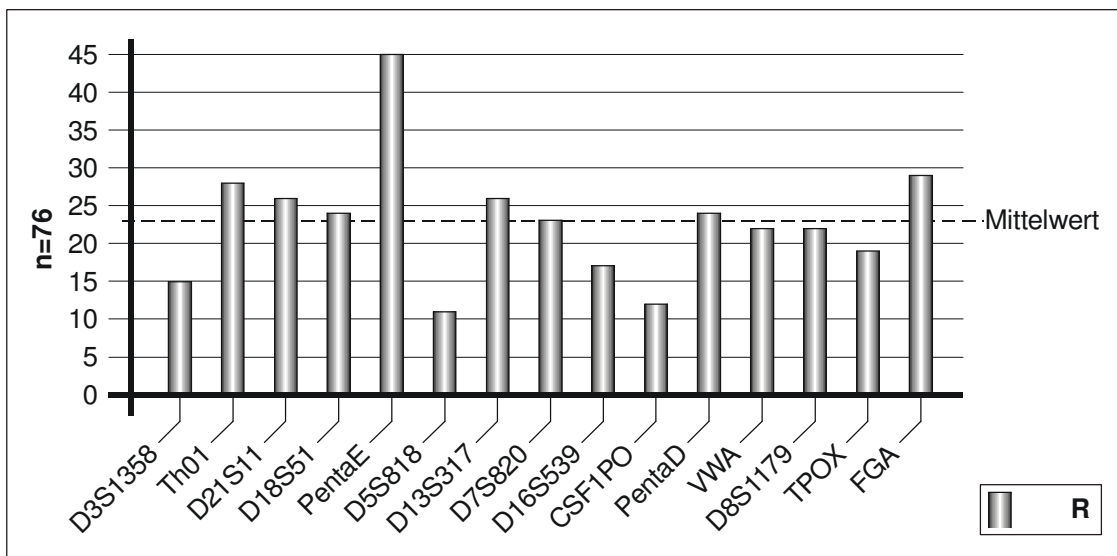


Abbildung 4.1.8: Häufigkeit der Allelkonstellation R im Kollektiv von 76 Patienten. R: Das Allel des Rezipienten liegt außerhalb der stutter peak area der Spenderallele; der Abstand der Peaks beträgt mehr als eine repeat unit.

4 Ergebnisse

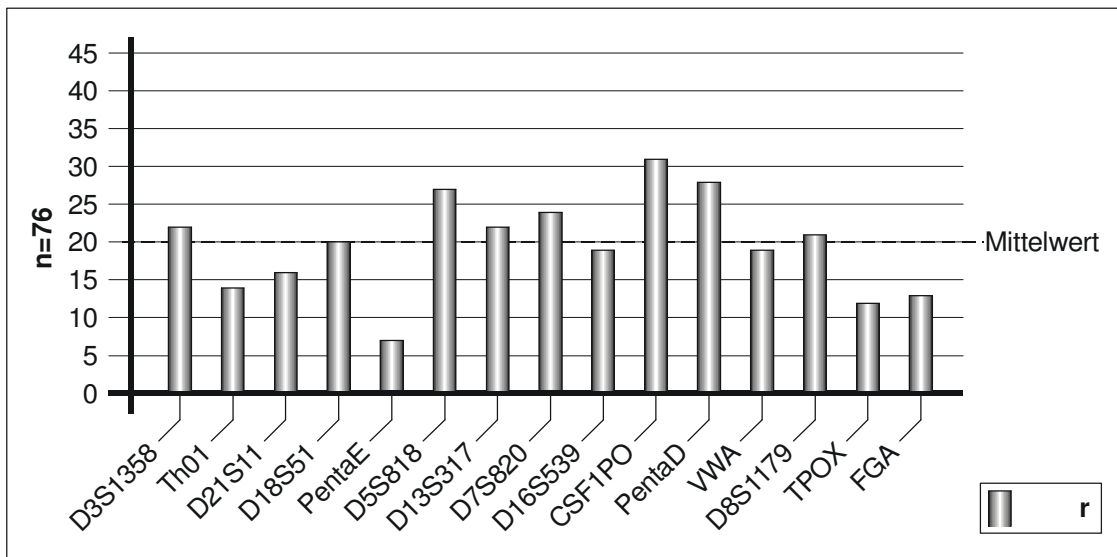


Abbildung 4.1.9: Häufigkeit der Allelkonstellation r im Kollektiv von 76 Patienten.
 r: Das Empfängerallel liegt innerhalb der stutter peak area der Spenderallele; der Abstand der Peaks beträgt weniger als oder eine repeat unit.

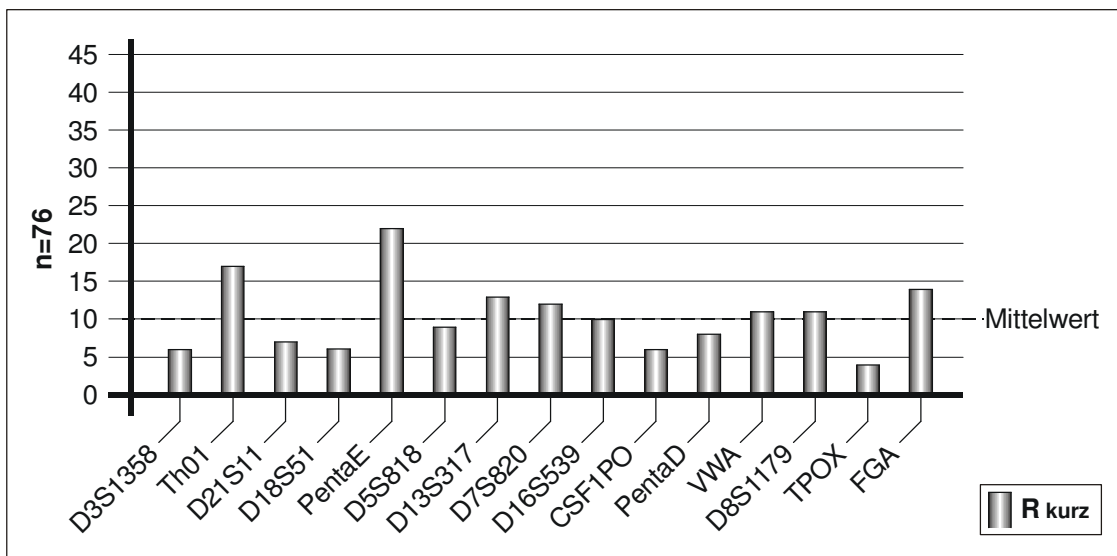


Abbildung 4.1.10: Häufigkeit der Allelkonstellation R kurz im Kollektiv von 76 Patienten.
 R kurz: Das Empfängerallel ist das kürzeste Allel und liegt außerhalb der stutter peak area der Spenderallele; der Abstand der Peaks beträgt mehr als eine repeat unit.

4 Ergebnisse

Tabelle 4.1.5: Nach Auswertung mit der von der Arbeitsgemeinschaft Eurochimärismus herausgegebenen Nomenklatur ergibt sich für die einzelnen STR-Primer folgende Punktwerte:

Primer	D3S1358	Th01	D21S11	D18S51	PentaE	D5S818	D13S317
SS+S	-3	0	+3	+3	+3	-3	+3
R	-3	+3	+3	+3	+3	-3	+3
D	-3	+3	0	+3	+3	-3	-3
R kurz	-3	+3	-3	-3	+3	-3	+3
D kurz	+3	+3	-3	0	+3	-3	+3
r	+3	-3	-3	0	-3	+3	+3
d	+3	-3	-3	+3	-3	+3	0
gesamt	-3	+6	-6	+9	+9	-9	+12

Primer	D7S820	D16S539	CSF1PO	PentaD	vWA	D8S1179	TPOX	FGA
SS+S	-3	-3	+3	+3	+3	+3	-3	0
R	0	-3	-3	+3	-3	-3	-3	+3
D	-3	-3	-3	-3	+3	0	-3	+3
R kurz	+3	0	-3	-3	+3	+3	-3	+3
D kurz	+3	+3	-3	-3	+3	+3	-3	+3
r	+3	-3	+3	+3	-3	+3	-3	-3
d	-3	+3	+3	+3	+3	+3	-3	-3
gesamt	0	-6	-3	+3	+9	+12	-21	+6

4 Ergebnisse

In Abbildung 4.1.11 sind die Bewertungen aller Powerplex® 16-STR-Primer graphisch veranschaulicht:

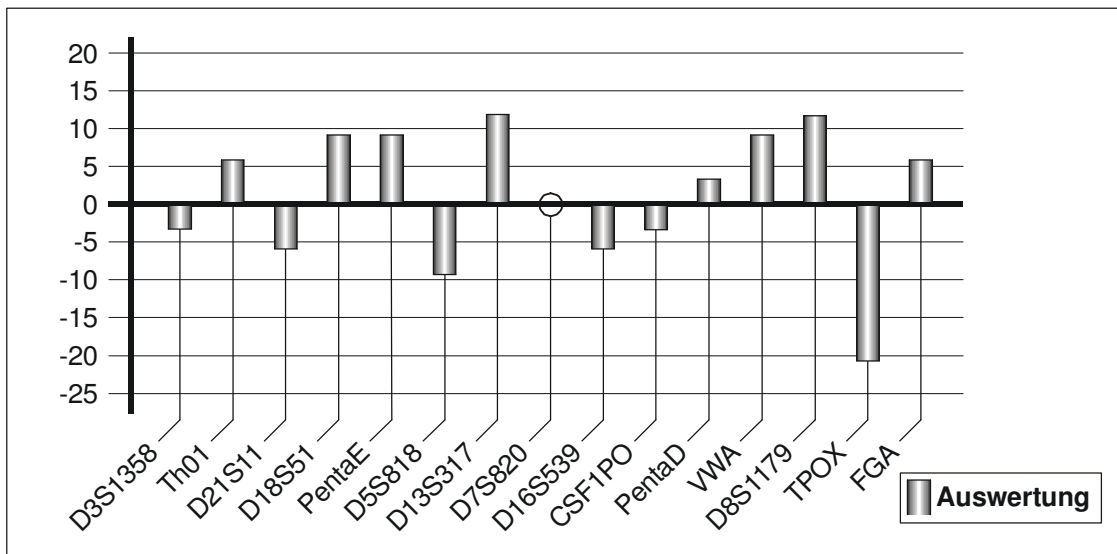


Abbildung 4.1.11: Darstellung der Powerplex® 16-STR-Primer mit Auswertung sämtlicher möglicher Allelkonstellationen.

Die Primer D13S317 und D8S1179 haben mit +12 Punkten die besten Ergebnisse und damit die höchste Informativität in den hier analysierten Patientenproben, gefolgt von den Primern D18S51, Penta E und vWA, die jeweils +9 Punkte aufweisen. Der Primer TPOX zeigt mit -21 Punkten den mit Abstand geringsten Informativitätsgehalt; auch die Primer D5S818 mit -9 Punkten und die Primer D21S11 sowie D16S539 mit jeweils -6 Punkten sind wenig informativ.

In der Praxis besteht die Möglichkeit, bei neuen Donor-Rezipienten-Paaren einen sogenannten Primertest zunächst mit den in unserem Patientengut untersuchten informativsten Primern D13S317 und D8S1179 durchzuführen. Bei fehlender Diskriminationsfähigkeit kann auf weitere Primer wie D18S51, Penta E und vWA zurückgegriffen werden.

Mit den informativsten Primern D13S317 und D8S1179 ist in 73,7% der Patientenproben eine Diskrimination zwischen Donor und Rezipient möglich (R/D). Erfolgen weitere Primertests mit den Primern D18S51, Penta E und vWA lässt sich die Diskriminationsfähigkeit auf 94,7% erhöhen.

4 Ergebnisse

Für eine von 76 Patientenproben konnte kein informativer Primer mit dem Powerplex® 16 System ermittelt werden; dies entspricht 1,3%. Es handelt sich dabei um den Patienten mit der UPN-Nummer 2206.

Da kürzere PCR-Produkte bevorzugt amplifiziert und somit besser detektiert werden, ist beim Nachweis von (residuellen) Empfängerzellen unter Berücksichtigung der größtmöglichen Sensitivität wünschenswert, dass „R“ dem kürzesten Allel entspricht (Rkurz). In 10 von 76 Proben (13,1%) konnte diese Konstellation mit dem Powerplex® 16 System nicht erzielt werden.

Vorraussetzung von Chimärismusanalysen, bei denen es um Verlaufskontrollen von Spenderzellen geht, wie z.B. nach Donor-Lymphozyten-Infusionen, ist, dass das Allel des Spenders das Kürzeste ist (Dkurz). Mit dem Powerplex® 16 System konnte diese Anforderung in 7,9% (6 von 70 Proben) nicht erfüllt werden. In diesen Fällen ist eine Chimärismusanalyse mit einem Powerplex® 16-Primer nicht möglich.

4.2 Sensitivität der im Powerplex[®] 16 System enthaltenen STR-Primer

Die Sensitivität wurde mittels Verdünnungsreihen mit Proben vor KMT von Spender und Empfänger (siehe Kapitel 3.4) ermittelt.

Es wurden jeweils zwei Sensitivitätstests mit je einer Wiederholung zur Beurteilung der Reproduzierbarkeit als Singleplex-Untersuchungen für die Primer D3S1358 und D21S11, die uns durch das Eurochimärismus-Konsortium zugewiesen wurden, sowie vier Multiplex-Analysen für die Powerplex[®] 16-Primer durchgeführt.

Für die Chimärismusanalyse ist es wichtig, geringste Empfängeranteile in einer Probe nachzuweisen. Ausgehend von einem 50/50 Verhältnis von Donor zu Rezipient wurde deshalb schrittweise eine Verdünnung bis zu einem Anteil von 0,78% Rezipienten-DNA vorgenommen. Die Minorpopulation (Empfängeranteil) und somit die Sensitivität kann aus den vom Analysegerät gefertigten Ausdrucken errechnet werden.

4.2.1 Testung der Nachweisgrenze der Multiplex PCR (mit Verdünnungsreihen aus Spender und Empfänger-DNA)

Es wurden vier Multiplexverdünnungsreihen mit allen Primern des PowerPlex[®]16 Systems für die Patientenpaare mit den UPN-Nummern 2302/2320, 2364/2499, 2298/2393 und 2311/2492 durchgeführt. Entsprechend den Allelkonstellationen erfolgte die Berechnung des Empfängeranteils in Anlehnung an die von Thiede et al. in Leukemia veröffentlichte Kalkulation des quantitativen Chimärismus.¹²⁶

4 Ergebnisse

Tabelle 4.2.1.1: Multiplex-Verdünnungsreihe des Patientenpaars 2302/2320

UPN Patient/Donor: 2302/2320

Injektionszeit: 5 sec

Injektionsspannung: 15 kV

Marker: **D3S1358**

RSD Code: **RSD**

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	14	16	9.914	17.893	1.378	2.427	16	18	17.893	12.020	2.427	1.138	45,2
75 / 25	14	16	6.771	19.336	934	2.710	16	18	19.336	22.377	2.710	2.205	23,2
87.5 / 12.5	14	16	3.840	20.442	505	2.917	16	18	20.442	22.128	2.917	2.577	14,8
93.7 / 6.3	14	16	2.139	17.619	271	2.490	16	18	17.619	20.663	2.490	2.355	9,4
96.9 / 3.1	14	16	1.033	19.019	115	2.706	16	18	19.019	23.776	2.706	2.610	4,2
98.4 / 1.6	14	16	771	16.208	102	2.269	16	18	16.208	21.469	2.269	2.270	3,5
99.2 / 0.8	14	16		16.081		2.267	16	18	16.081	20.318	2.267	2.443	0,0

Marker: **TH01**

RSD Code: **rdD**

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	6	6	17.426	17.426	1.877	1.877	7	9	10.014	11.004	910	929	47,9
75 / 25	6	6	12.011	12.011	1.175	1.175	7	9	14.268	15.616	1.250	1.489	31,9
87.5 / 12.5	6	6	9.742	9.742	866	866	7	9	20.458	18.817	2.046	1.943	16,5
93.7 / 6.3	6	6	5.357	5.357	497	497	7	9	16.979	18.002	1.786	1.875	15,8
96.9 / 3.1	6	6	4.349	4.349	327	327	7	9	19.930	17.300	2.009	1.889	4,1
98.4 / 1.6	6	6	3.522	3.522	253	253	7	9	14.297	13.272	1.340	1.317	8,0
99.2 / 0.8	6	6	2.860	2.860	210	210	7	9	16.224	16.347	1.767	1.718	8,4

4 Ergebnisse

Marker: **D21S11**

RSD Code: **Sd**

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	29	29	45.306	45.306	4.671	4.671	29	30	45.306	12.882	4.671	1.507	55,7
75 / 25	29	29	35.894	35.894	3.791	3.791	29	30	35.894	20.058	3.791	2.227	28,3
87.5 / 12.5	29	29	33.245	33.245	3.599	3.599	29	30	33.245	22.454	3.599	2.639	19,4
93.7 / 6.3	29	29	26.043	26.043	2.826	2.826	29	30	26.043	19.288	2.826	2.282	14,9
96.9 / 3.1	29	29	26.147	26.147	2.823	2.823	29	30	26.147	21.606	2.823	2.560	9,5
98.4 / 1.6	29	29	21.997	21.997	2.295	2.295	29	30	21.997	18.155	2.295	2.080	9,6
99.2 / 0.8	29	29	27.594	27.594	3.130	3.130	29	30	27.594	23.653	3.130	2.838	7,7

Marker: **D18S51**

RSD Code: **RDdr**

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	12	17	11.984	9.855	1.083	830	14	16	10.974	9.297	937	871	51,9
75 / 25	12	17	5.045	4.405	430	324	14	16	9.615	8.922	884	813	33,8
87.5 / 12.5	12	17	3.083	2.974	242	219	14	16	10.431	10.185	1.102	951	22,7
93.7 / 6.3	12	17	1.524	1.860	129	116	14	16	9.649	10.289	1.021	911	14,5
96.9 / 3.1	12	17	1.550	1.293	112	120	14	16	11.836	10.757	1.146	1.054	11,2
98.4 / 1.6	12	17					14	16	8.854	9.247	931	914	0,0
99.2 / 0.8	12	17					14	16	10.736	10.159	1.109	1.040	0,0

4 Ergebnisse

Marker: **Penta E**

RSD Code: **DRRD**

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	7	11	8.209	8.495	605	539	5	16	7.592	4.046	555	347	58,9
75 / 25	7	11	3.850	3.984	283	262	5	16	8.493	4.381	684	418	37,8
87.5 / 12.5	7	11	2.917	2.633	197	176	5	16	10.139	6.085	857	595	25,5
93.7 / 6.3	7	11	2.035	2.054	114	108	5	16	8.143	5.097	752	493	23,6
96.9 / 3.1	7	11		1.143		101	5	16	10.439	6.560	995	640	6,3
98.4 / 1.6	7	11					5	16	8.489	4.560	728	450	0,0
99.2 / 0.8	7	11					5	16	9.138	5.554	786	515	0,0

Marker: **D5S818**

RSD Code: **RSD**

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	9	11	15.698	29.774	2.635	4.884	11	13	29.774	12.269	4.884	2.070	56,1
75 / 25	9	11	10.470	38.692	1.776	6.180	11	13	38.692	24.140	6.180	4.090	30,3
87.5 / 12.5	9	11	4.870	39.676	814	6.403	11	13	39.676	41.881	6.403	5.435	10,4
93.7 / 6.3	9	11	2.178	34.678	382	5.569	11	13	34.678	37.859	5.569	5.067	5,4
96.9 / 3.1	9	11	986	34.304	171	5.493	11	13	34.304	39.462	5.493	5.232	2,4
98.4 / 1.6	9	11		34.488		5.451	11	13	34.488	34.463	5.451	5.134	0,0
99.2 / 0.8	9	11		31.356		5.052	11	13	31.356	36.887	5.052	5.113	0,0

4 Ergebnisse

Marker: **D13S317**

RSD Code: **RrdD**

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	10	11	14.691	13.160	2.007	1.853	12	14	13.394	10.765	1.702	1.477	53,5
75 / 25	10	11	9.323	9.716	1.200	1.158	12	14	19.460	17.902	2.493	2.281	33,8
87.5 / 12.5	10	11	6.533	7.621	759	875	12	14	23.840	22.586	3.088	2.851	23,4
93.7 / 6.3	10	11	3.840	5.209	397	531	12	14	21.364	20.447	2.794	2.465	17,8
96.9 / 3.1	10	11	2.996	4.380	292	412	12	14	23.331	20.911	2.923	2.740	14,3
98.4 / 1.6	10	11	2.076	3.885	179	328	12	14	20.206	17.363	2.539	2.148	13,7
99.2 / 0.8	10	11	1.604	4.443	161	410	12	14	24.506	21.712	3.122	2.879	11,6

Marker: **D7S820**

RSD Code: **DRD**

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	9	9	28.722	28.722	3.282	3.282	7	11	19.740	12.395	1.686	1.379	47,2
75 / 25	9	9	15.660	15.660	1.820	1.820	7	11	22.194	19.470	2.869	2.155	27,3
87.5 / 12.5	9	9	8.884	8.884	1.021	1.021	7	11	30.024	26.786	3.912	3.136	13,5
93.7 / 6.3	9	9	3.612	3.612	394	394	7	11	25.466	22.706	3.355	2.588	7,0
96.9 / 3.1	9	9	3.108	3.108	312	312	7	11	28.163	25.839	3.699	2.969	5,4
98.4 / 1.6	9	9	2.061	2.061	182	182	7	11	23.159	20.364	3.045	2.374	4,5
99.2 / 0.8	9	9	1.791	1.791	153	153	7	11	26.743	25.987	3.529	3.032	3,3

4 Ergebnisse

Marker: **D16S539**

RSD Code: **DDR**

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	13	13	36.756	36.756	4.257	4.257	9	11	20.873	17.076	2.556	2.081	49,2
75 / 25	13	13	20.035	20.035	2.228	2.228	9	11	31.824	25.462	3.824	3.006	25,9
87.5 / 12.5	13	13	9.982	9.982	1.058	1.058	9	11	35.554	34.770	4.291	4.175	12,4
93.7 / 6.3	13	13	4.905	4.905	465	465	9	11	30.509	27.129	3.655	3.177	7,8
96.9 / 3.1	13	13	2.795	2.795	245	245	9	11	34.390	33.332	4.092	3.905	4,0
98.4 / 1.6	13	13	1.782	1.782	136	136	9	11	26.768	24.916	3.148	2.913	3,3
99.2 / 0.8	13	13	2.355	2.355	146	146	9	11	40.252	35.192	4.814	4.247	3,0

Marker: **CSF1PO**

RSD Code: **SdR**

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	10	14	14.297	6.100	1.688	660	10	11	14.297	6.831	1.688	728	47,2
75 / 25	10	14	14.993	3.401	1.753	380	10	11	14.993	11.750	1.753	1.214	22,4
87.5 / 12.5	10	14	15.707	2.063	1.805	204	10	11	15.707	12.538	1.805	1.381	14,1
93.7 / 6.3	10	14	14.292	1.526	1.605	142	10	11	14.292	12.260	1.605	1.286	11,1
96.9 / 3.1	10	14	13.757	1.333	1.513	110	10	11	13.757	13.225	1.513	1.348	9,2
98.4 / 1.6	10	14	14.181		1.588		10	11	14.181	11.359	1.588	1.246	0,0
99.2 / 0.8	10	14	13.871	1.005	1.498	126	10	11	13.871	11.317	1.498	1.182	8,2

4 Ergebnisse

Marker: **Penta D**

RSD Code: **rSD**

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	11	12	11.855	22.273	1.220	2.265	12	14	22.273	9.927	2.265	997	54,4
75 / 25	11	12	3.515	14.669	340	1.445	12	14	14.669	9.567	1.445	940	26,9
87.5 / 12.5	11	12	2.451	15.358	232	1.586	12	14	15.358	13.661	1.586	1.386	15,2
93.7 / 6.3	11	12	998	13.104	102	1.329	12	14	13.104	11.072	1.329	1.119	8,3
96.9 / 3.1	11	12		14.676		1.502	12	14	14.676	13.386	1.502	1.367	0,0
98.4 / 1.6	11	12		11.838		1.193	12	14	11.838	10.268	1.193	1.028	0,0
99.2 / 0.8	11	12		13.206		1.342	12	14	13.206	12.284	1.342	1.243	0,0

Marker: **vWA**

RSD Code: **Drrd**

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	17	18	19.145	20.658	2.538	2.736	15	19	23.326	15.359	2.999	2.055	50,7
75 / 25	17	18	12.414	13.900	1.591	1.812	15	19	38.673	27.715	4.820	3.634	28,4
87.5 / 12.5	17	18	7.289	9.569	923	1.265	15	19	55.497	35.782	5.838	4.665	15,6
93.7 / 6.3	17	18	3.100	6.277	424	832	15	19	46.034	35.072	5.262	4.583	10,4
96.9 / 3.1	17	18	1.645	4.593	236	612	15	19	48.875	36.685	5.578	4.779	6,8
98.4 / 1.6	17	18	773	3.825	116	508	15	19	47.819	31.853	5.715	4.122	5,5
99.2 / 0.8	17	18		4.215		552	15	19	53.180	33.675	6.103	4.310	4,6

4 Ergebnisse

Marker: **D8S1179**

RSD Code: **dS**

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	11	11	57.920	57.920	5.858	5.858	10	11	28.655	57.920	4.298	5.858	33,8
75 / 25	11	11	52.023	52.023	5.372	5.372	10	11	45.094	52.023	6.685	5.372	7,1
87.5 / 12.5	11	11	58.724	58.724	6.869	6.869	10	11	48.967	58.724	5.954	6.869	9,1
93.7 / 6.3	11	11	51.157	51.157	6.536	6.536	10	11	44.206	51.157	5.815	6.536	7,3
96.9 / 3.1	11	11	49.053	49.053	6.151	6.151	10	11	50.496	49.053	6.727	6.151	0,0
98.4 / 1.6	11	11	46.854	46.854	6.332	6.332	10	11	46.524	46.854	6.543	6.332	0,4
99.2 / 0.8	11	11	49.900	49.900	6.822	6.822	10	11	47.065	49.900	6.252	6.822	2,9

Marker: **TPOX**

RSD Code: **Sr**

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	11	12	29.814	10.385	3.307	1.122	11	11	29.814	29.814	3.307	3.307	51,7
75 / 25	11	12	21.994	3.694	2.440	341	11	11	21.994	21.994	2.440	2.440	28,8
87.5 / 12.5	11	12	24.415	2.362	2.735	184	11	11	24.415	24.415	2.735	2.735	17,6
93.7 / 6.3	11	12	20.726		2.321		11	11	20.726	20.726	2.321	2.321	0,0
96.9 / 3.1	11	12	24.516	1.184	2.745	106	11	11	24.516	24.516	2.745	2.745	9,2
98.4 / 1.6	11	12	18.018		1.991		11	11	18.018	18.018	1.991	1.991	0,0
99.2 / 0.8	11	12	24.420	796	2.708	104	11	11	24.420	24.420	2.708	2.708	6,3

4 Ergebnisse

Marker: **FGA**

RSD Code: **RDdr**

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	20	25	15.310	12.332	1.847	1.473	23	24	13.102	12.675	1.613	1.537	51,7
75 / 25	20	25	7.661	6.207	920	738	23	24	19.382	18.025	2.357	2.119	27,0
87.5 / 12.5	20	25	4.238	3.398	515	431	23	24	24.398	25.821	2.963	3.112	13,2
93.7 / 6.3	20	25	1.525	1.194	185	159	23	24	20.635	18.286	2.500	2.201	6,5
96.9 / 3.1	20	25	1.496	780	204	109	23	24	27.461	24.644	3.295	2.935	4,2
98.4 / 1.6	20	25	900		124		23	24	16.644	16.174	2.001	1.928	2,7
99.2 / 0.8	20	25					23	24	27.747	26.703	3.348	3.180	0,0

4 Ergebnisse

Tabelle 4.2.1.2: Multiplex-Verdünnungsreihe des Patientenpaars 2364/2499

UPN Patient/Donor: 2364/2499

Injektionszeit: 5 sec

Injektionsspannung: 15 kV

Marker: **D3S1358**

RSD Code: **RDS**

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	11	18	6.965	9.328	983	1.344	15	18	5.971	9.328	803	1.344	42,7
75 / 25	11	18	3.529	8.610	481	1.182	15	18	6.864	8.610	957	1.182	29,1
87.5 / 12.5	11	18	1.711	7.841	236	1.100	15	18	8.538	7.841	1.194	1.100	17,9
93.7 / 6.3	11	18	947	8.277	126	1.145	15	18	8.004	8.277	1.108	1.145	10,3
96.9 / 3.1	11	18	820	10.222	148	1.430	15	18	10.406	10.222	1.471	1.430	7,4
98.4 / 1.6	11	18	680	7.259	112	1.020	15	18	7.296	7.259	1.036	1.020	8,6
99.2 / 0.8	11	18	571	7.320	108	1.030	15	18	7.881	7.320	1.132	1.030	7,2

Marker: **TH01**

RSD Code: **rdD**

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	6	6	11.774	11.774	1.394	1.394	7	10	5.292	5.918	555	541	54,0
75 / 25	6	6	6.621	6.621	720	720	7	10	7.473	7.064	790	668	29,4
87.5 / 12.5	6	6	5.461	5.461	560	560	7	10	10.826	10.253	1.237	1.075	18,4
93.7 / 6.3	6	6	3.229	3.229	282	282	7	10	8.923	8.815	987	867	14,9
96.9 / 3.1	6	6	3.192	3.192	251	251	7	10	11.428	10.929	1.227	1.088	10,5
98.4 / 1.6	6	6	1.427	1.427	119	119	7	10	7.691	7.517	907	796	7,5
99.2 / 0.8	6	6	1.711	1.711	144	144	7	10	8.033	8.066	867	790	9,8

4 Ergebnisse

Marker: **D21S11**

RSD Code: **drS**

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	31	31	10.336	14.000	1.076	1.661	30	31	10.611	14.000	1.057	1.661	42,5
75 / 25	31	31	5.629	13.474	623	1.563	30	31	10.405	13.474	1.182	1.563	29,5
87.5 / 12.5	31	31	3.870	13.333	397	1.403	30	31	11.193	13.333	1.321	1.403	22,5
93.7 / 6.3	31	31	2.865	13.440	298	1.435	30	31	10.945	13.440	1.316	1.435	17,6
96.9 / 3.1	31	31	2.936	14.822	299	1.578	30	31	13.252	14.822	1.592	1.578	16,5
98.4 / 1.6	31	31	1.851	8.704	165	918	30	31	7.571	8.704	919	918	17,5
99.2 / 0.8	31	31	2.119	10.276	209	1.181	30	31	9.722	10.276	1.191	1.181	17,1

Marker: **D18S51**

RSD Code: **drdR**

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	14	22	6.750	3.430	766	427	13	15	5.880	5.195	676	573	47,9
75 / 25	14	22	4.667	2.593	454	289	13	15	9.461	8.864	1.023	910	28,4
87.5 / 12.5	14	22	2.533	1.475	221	125	13	15	8.032	7.643	908	817	20,4
93.7 / 6.3	14	22	1.771	1.068	168	113	13	15	8.056	7.895	927	836	15,1
96.9 / 3.1	14	22	1.593		151		13	15	8.573	7.950	960	811	8,8
98.4 / 1.6	14	22					13	15	3.774	4.071	468	515	0,0
99.2 / 0.8	14	22					13	15	5.776	5.511	694	627	0,0

4 Ergebnisse

Marker: **Penta E**

RSD Code: **DSR**

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	7	12	6.713	2.605	629	280	5	7	3.751	6.713	348	629	41,0
75 / 25	7	12	8.576	2.215	774	197	5	7	7.858	8.576	671	774	22,0
87.5 / 12.5	7	12	6.200	1.246	598	101	5	7	6.604	6.200	584	598	15,9
93.7 / 6.3	7	12	6.508		562		5	7	5.807	6.508	544	562	0,0
96.9 / 3.1	7	12	6.255		560		5	7	6.337	6.255	599	560	0,0
98.4 / 1.6	7	12	2.653		290		5	7	2.696	2.653	304	290	0,0
99.2 / 0.8	7	12	4.243		377		5	7	4.580	4.243	429	377	0,0

Marker: **D5S818**

RSD Code: **RS**

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	10	12	16.404	36.508	2.002	5.073	12	12	36.508	36.508	5.073	5.073	62,0
75 / 25	10	12	7.842	36.117	1.015	4.927	12	12	36.117	36.117	4.927	4.927	35,7
87.5 / 12.5	10	12	5.223	36.397	643	5.082	12	12	36.397	36.397	5.082	5.082	25,1
93.7 / 6.3	10	12	3.043	35.950	319	5.030	12	12	35.950	35.950	5.030	5.030	15,6
96.9 / 3.1	10	12	3.239	45.639	301	6.490	12	12	45.639	45.639	6.490	6.490	13,3
98.4 / 1.6	10	12	1.917	28.932	128	4.298	12	12	28.932	28.932	4.298	4.298	12,4
99.2 / 0.8	10	12	1.848	34.344	163	4.993	12	12	34.344	34.344	4.993	4.993	10,2

4 Ergebnisse

Marker: **D13S317**

RSD Code: **dSr**

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	11	12	22.932	13.503	2.814	1.447	10	11	12.057	22.932	1.477	2.814	52,8
75 / 25	11	12	19.344	6.364	2.454	688	10	11	13.591	19.344	1.858	2.454	31,9
87.5 / 12.5	11	12	17.390	4.786	2.195	462	10	11	16.767	17.390	2.226	2.195	22,2
93.7 / 6.3	11	12	16.847	3.444	2.138	286	10	11	16.663	16.847	2.197	2.138	17,1
96.9 / 3.1	11	12	17.740	3.545	2.401	301	10	11	18.539	17.740	2.628	2.401	16,1
98.4 / 1.6	11	12	11.165	2.586	1.477	170	10	11	12.540	11.165	1.685	1.477	17,1
99.2 / 0.8	11	12	14.335	3.018	1.980	199	10	11	14.627	14.335	1.964	1.980	17,1

Marker: **D7S820**

RSD Code: **RrdD**

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	8	10	12.540	10.055	1.319	1.178	11	12	9.454	9.534	994	891	54,3
75 / 25	8	10	7.070	5.867	657	615	11	12	11.175	12.350	1.261	1.223	35,5
87.5 / 12.5	8	10	5.055	4.366	387	426	11	12	12.599	11.716	1.473	1.196	27,9
93.7 / 6.3	8	10	3.921	3.355	220	310	11	12	11.564	11.899	1.363	1.248	23,7
96.9 / 3.1	8	10	4.157	3.884	234	363	11	12	16.000	15.862	1.969	1.700	20,2
98.4 / 1.6	8	10	853	1.842	118	164	11	12	9.057	9.373	1.112	1.059	12,8
99.2 / 0.8	8	10	1.800	2.430	118	216	11	12	10.683	10.573	1.349	1.167	16,6

4 Ergebnisse

Marker: **D16S539**

RSD Code: **Rdd**

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	9	9	30.891	30.891	3.768	3.768	11	12	14.824	13.139	1.640	1.331	67,6
75 / 25	9	9	14.395	14.395	1.685	1.685	11	12	18.875	17.533	2.119	1.839	43,3
87.5 / 12.5	9	9	8.266	8.266	966	966	11	12	21.338	17.724	2.416	1.976	27,9
93.7 / 6.3	9	9	4.006	4.006	484	484	11	12	20.916	19.878	2.430	2.235	16,1
96.9 / 3.1	9	9	3.646	3.646	354	354	11	12	24.655	23.074	2.824	2.569	12,9
98.4 / 1.6	9	9	1.253	1.253	112	112	11	12	16.403	14.894	1.959	1.717	7,1
99.2 / 0.8	9	9	1.078	1.078	104	104	11	12	18.308	17.230	2.235	2.122	5,6

Marker: **CSF1PO**

RSD Code: **DS**

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	11	11	16.386	16.386	1.964	1.964	10	11	7.335	16.386	760	1.964	38,2
75 / 25	11	11	17.677	17.677	2.045	2.045	10	11	11.430	17.677	1.274	2.045	21,5
87.5 / 12.5	11	11	11.413	11.413	1.307	1.307	10	11	11.946	11.413	1.268	1.307	0,0
93.7 / 6.3	11	11	10.472	10.472	1.185	1.185	10	11	9.946	10.472	1.101	1.185	2,6
96.9 / 3.1	11	11	10.169	10.169	1.187	1.187	10	11	11.532	10.169	1.223	1.187	0,0
98.4 / 1.6	11	11	5.317	5.317	630	630	10	11	6.523	5.317	688	630	0,0
99.2 / 0.8	11	11	6.977	6.977	852	852	10	11	8.468	6.977	962	852	0,0

4 Ergebnisse

Marker: **Penta D**

RSD Code: **RrdD**

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	9	10	8.011	8.649	862	909	11	14	5.872	6.711	604	689	57,0
75 / 25	9	10	5.363	5.053	589	542	11	14	12.860	11.982	1.346	1.222	29,5
87.5 / 12.5	9	10	1.873	1.859	206	188	11	14	11.120	10.115	1.160	1.038	14,9
93.7 / 6.3	9	10	1.053	1.008	108	104	11	14	11.166	11.046	1.159	1.152	8,5
96.9 / 3.1	9	10					11	14	10.509	9.508	1.091	970	0,0
98.4 / 1.6	9	10					11	14	6.778	6.220	721	648	0,0
99.2 / 0.8	9	10					11	14	7.683	7.434	832	771	0,0

Marker: **vWA**

RSD Code: **DSr**

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	18	19	29.208	12.500	3.645	1.577	15	18	16.138	29.208	1.971	3.645	43,6
75 / 25	18	19	24.402	6.658	3.059	824	15	18	22.113	24.402	2.757	3.059	23,1
87.5 / 12.5	18	19	24.479	3.900	3.036	478	15	18	25.046	24.479	3.092	3.036	13,5
93.7 / 6.3	18	19	22.260	2.254	2.753	278	15	18	27.428	22.260	3.448	2.753	7,6
96.9 / 3.1	18	19	26.035	1.805	3.300	216	15	18	30.384	26.035	3.861	3.300	5,6
98.4 / 1.6	18	19	19.258	968	2.446	119	15	18	24.424	19.258	3.096	2.446	3,8
99.2 / 0.8	18	19	18.957	968	2.499	117	15	18	25.914	18.957	3.400	2.499	3,6

4 Ergebnisse

Marker: **D8S1179**

RSD Code: **RrdD**

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	9	13	20.350	18.455	3.108	2.755	14	15	13.224	14.147	1.896	2.073	58,6
75 / 25	9	13	8.035	8.590	1.207	1.274	14	15	16.560	17.872	2.421	2.525	32,6
87.5 / 12.5	9	13	3.752	4.857	567	722	14	15	20.931	20.578	3.051	2.904	17,2
93.7 / 6.3	9	13	1.976	3.806	299	576	14	15	20.281	19.620	3.015	2.796	12,7
96.9 / 3.1	9	13	1.203	3.512	177	546	14	15	26.398	25.692	3.982	3.671	8,3
98.4 / 1.6	9	13		2.368		353	14	15	16.140	17.679	2.385	2.512	6,5
99.2 / 0.8	9	13		2.216		342	14	15	18.837	17.322	2.881	2.624	5,8

Marker: **TPOX**

RSD Code: **SS**

Marker: **FGA**

RSD Code: **SS**

4 Ergebnisse

Tabelle 4.2.1.3: Multiplex-Verdünnungsreihe des Patientenpaars 2298/2393

UPN Patient/Donor: 2298/2393

Injektionszeit: 5 sec

Injektionsspannung: 15 kV

Marker: **D3S1358**

RSD Code: **drR**

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	15	16	8.536	6.940	1.277	931	14	14	14.951	14.951	2.062	2.062	45,6
75 / 25	15	16	5.553	3.355	834	442	14	14	19.800	19.800	2.682	2.682	23,4
87.5 / 12.5	15	16	4.218	2.193	615	267	14	14	22.204	22.204	3.051	3.051	15,3
93.7 / 6.3	15	16	4.168	1.404	556	163	14	14	26.608	26.608	3.665	3.665	8,7
96.9 / 3.1	15	16	4.133	1.064	531	107	14	14	27.915	27.915	3.826	3.826	6,4
98.4 / 1.6	15	16	3.481	773	425	101	14	14	24.670	24.670	3.352	3.352	5,3
99.2 / 0.8	15	16	3.942	1.753	506	137	14	14	28.651	28.651	3.892	3.892	10,2

Marker: **TH01**

RSD Code: **Rrd**

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	7	9	11.217	12.709	1.075	984	9	9	18.357	18.357	1.945	1.945	53,1
75 / 25	7	9	7.496	7.602	583	651	9	9	24.480	24.480	2.698	2.698	37,9
87.5 / 12.5	7	9	5.714	3.663	429	444	9	9	28.130	28.130	3.093	3.093	30,5
93.7 / 6.3	7	9	6.051	2.715	339	288	9	9	35.663	35.663	3.815	3.815	27,2
96.9 / 3.1	7	9	5.485	2.999	306	292	9	9	35.486	35.486	3.914	3.914	24,9
98.4 / 1.6	7	9	2.417	2.504	238	2.444	9	9	30.833	30.833	3.285	3.285	13,5
99.2 / 0.8	7	9	3.815	3.132	267	308	9	9	38.530	38.530	4.054	4.054	16,8

4 Ergebnisse

Marker: **D21S11**

RSD Code: **RSD**

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	28	30	12.301	25.221	1.252	2.633	30	32	25.221	12.175	2.633	1.205	50,3
75 / 25	28	30	8.298	23.432	740	2.505	30	32	23.432	16.211	2.505	1.685	33,9
87.5 / 12.5	28	30	6.059	24.238	470	2.629	30	32	24.238	18.678	2.629	1.941	24,5
93.7 / 6.3	28	30	6.775	28.721	420	3.136	30	32	28.721	23.915	3.136	2.504	22,1
96.9 / 3.1	28	30	6.587	29.432	403	3.024	30	32	29.432	24.151	3.024	2.541	21,4
98.4 / 1.6	28	30	4.833	25.313	280	2.618	30	32	25.313	20.866	2.618	2.192	18,8
99.2 / 0.8	28	30	5.307	29.326	339	3.161	30	32	29.326	26.863	3.161	2.815	16,5

Marker: **D18S51**

RSD Code: **RRDD**

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	14	15	9.108	9.429	898	840	17	20	8.774	9.025	735	678	51,0
75 / 25	14	15	6.016	6.694	496	518	17	20	11.602	11.846	1.105	952	35,2
87.5 / 12.5	14	15	5.279	5.596	375	363	17	20	14.081	14.114	1.345	1.191	27,8
93.7 / 6.3	14	15	4.448	5.831	327	357	17	20	18.447	18.155	1.745	1.526	21,9
96.9 / 3.1	14	15	4.047	5.577	264	319	17	20	21.160	17.916	1.900	1.689	19,8
98.4 / 1.6	14	15	2.067	3.850	199	226	17	20	18.887	15.102	1.401	1.248	14,8
99.2 / 0.8	14	15	3.432	4.002	259	305	17	20	22.288	19.038	1.962	1.557	15,2

4 Ergebnisse

Marker: **Penta E**

RSD Code: **rdD**

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	11	11	10.795	10.795	791	791	12	14	9.379	4.717	1.082	460	62,1
75 / 25	11	11	5.934	5.934	421	421	12	14	8.330	7.110	961	700	33,5
87.5 / 12.5	11	11	6.068	6.068	324	324	12	14	8.993	7.981	1.038	812	30,7
93.7 / 6.3	11	11	6.184	6.184	305	305	12	14	11.294	11.497	1.304	1.069	20,6
96.9 / 3.1	11	11	6.181	6.181	276	276	12	14	10.724	11.688	1.200	1.128	18,2
98.4 / 1.6	11	11	3.485	3.485	198	198	12	14	8.435	8.724	961	857	15,5
99.2 / 0.8	11	11	5.826	5.826	251	251	12	14	9.677	9.120	1.084	912	25,9

Marker: **D5S818**

RSD Code: **RSd**

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	9	11	18.571	35.063	2.236	4.537	11	12	35.063	18.392	4.537	2.019	50,2
75 / 25	9	11	10.072	31.946	1.039	4.357	11	12	31.946	22.599	4.357	2.732	30,8
87.5 / 12.5	9	11	7.842	33.431	696	4.454	11	12	33.431	24.797	4.454	3.232	24,0
93.7 / 6.3	9	11	6.946	36.408	483	4.908	11	12	36.408	30.722	4.908	3.921	18,4
96.9 / 3.1	9	11	2.797	39.507	300	5.162	11	12	39.507	31.808	5.162	3.838	8,1
98.4 / 1.6	9	11	4.219	32.053	228	4.399	11	12	32.053	25.363	4.399	3.244	14,3
99.2 / 0.8	9	11	5.346	40.118	283	5.301	11	12	40.118	31.532	5.301	4.159	14,5

4 Ergebnisse

Marker: **D13S317**

RSD Code: **Rrd**

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	9	11	12.375	13.802	1.594	1.708	12	12	24.916	24.916	2.646	2.646	48,4
75 / 25	9	11	7.809	10.395	901	1.187	12	12	28.748	28.748	3.701	3.701	33,3
87.5 / 12.5	9	11	5.809	8.952	608	921	12	12	35.741	35.741	4.378	4.378	23,0
93.7 / 6.3	9	11	5.491	8.565	515	959	12	12	41.246	41.246	5.357	5.357	19,9
96.9 / 3.1	9	11	3.393	9.286	354	914	12	12	43.176	43.176	5.673	5.673	12,1
98.4 / 1.6	9	11	2.598	6.904	270	688	12	12	35.871	35.871	4.673	4.673	11,5
99.2 / 0.8	9	11	3.133	8.437	328	883	12	12	47.813	47.813	6.109	6.109	10,6

Marker: **D7S820**

RSD Code: **SS**

Marker: **D16S539**

RSD Code: **rSd**

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	11	12	20.078	28.125	2.128	3.141	12	13	28.125	13.940	3.141	1.464	59,0
75 / 25	11	12	11.286	28.734	1.161	3.257	12	13	28.734	19.050	3.257	2.090	37,2
87.5 / 12.5	11	12	8.266	30.060	897	3.413	12	13	30.060	22.294	3.413	2.452	27,0
93.7 / 6.3	11	12	8.199	35.610	681	3.994	12	13	35.610	30.442	3.994	3.346	21,2
96.9 / 3.1	11	12	8.320	35.263	602	3.935	12	13	35.263	31.681	3.935	3.565	20,8
98.4 / 1.6	11	12	5.847	31.062	501	3.585	12	13	31.062	26.559	3.585	2.972	18,0
99.2 / 0.8	11	12	8.103	38.027	544	4.343	12	13	38.027	33.653	4.343	3.826	19,4

4 Ergebnisse

Marker: **CSF1PO**

RSD Code: **rSd**

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	10	11	14.571	22.637	1.468	2.514	11	12	22.637	12.784	2.514	1.266	53,3
75 / 25	10	11	8.205	20.436	791	2.300	11	12	20.436	17.109	2.300	1.781	32,4
87.5 / 12.5	10	11	6.612	21.785	590	2.385	11	12	21.785	18.413	2.385	1.944	26,4
93.7 / 6.3	10	11	5.853	24.664	475	2.841	11	12	24.664	24.639	2.841	2.640	19,2
96.9 / 3.1	10	11	4.993	26.208	382	2.755	11	12	26.208	23.824	2.755	2.504	17,3
98.4 / 1.6	10	11	4.143	19.477	291	2.030	11	12	19.477	16.658	2.030	1.789	19,9
99.2 / 0.8	10	11	4.902	24.429	329	2.497	11	12	24.429	21.715	2.497	2.222	18,4

Marker: **Penta D**

RSD Code: **SS**

Marker: **vWA**

RSD Code: **DSr**

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	17	18	16.587	23.764	2.090	3.046	15	17	18.402	16.587	2.277	2.090	56,4
75 / 25	17	18	20.485	15.746	2.533	2.004	15	17	26.147	20.485	3.229	2.533	37,6
87.5 / 12.5	17	18	24.339	12.543	3.121	1.635	15	17	27.511	24.339	3.501	3.121	31,3
93.7 / 6.3	17	18	29.236	11.663	3.668	1.516	15	17	33.873	29.236	4.259	3.668	25,6
96.9 / 3.1	17	18	30.647	11.635	3.843	1.514	15	17	34.535	30.647	4.275	3.843	25,2
98.4 / 1.6	17	18	27.520	8.837	3.479	1.143	15	17	31.145	27.520	3.956	3.479	22,1
99.2 / 0.8	17	18	30.903	11.440	3.910	1.474	15	17	34.598	30.903	4.394	3.910	24,8

4 Ergebnisse

Marker: **D8S1179**

RSD Code: **drD**

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	13	13	39.639	39.639	5.830	5.830	12	15	20.039	15.239	3.096	2.259	59,3
75 / 25	13	13	22.861	22.861	3.421	3.421	12	15	25.621	22.528	3.930	3.248	36,5
87.5 / 12.5	13	13	16.332	16.332	2.426	2.426	12	15	29.967	25.359	4.606	3.653	29,2
93.7 / 6.3	13	13	14.434	14.434	2.122	2.122	12	15	38.113	32.571	5.773	4.692	23,5
96.9 / 3.1	13	13	12.293	12.293	1.836	1.836	12	15	39.073	33.596	5.966	4.818	20,9
98.4 / 1.6	13	13	7.843	7.843	1.169	1.169	12	15	33.704	30.532	5.086	4.343	15,3
99.2 / 0.8	13	13	9.521	9.521	1.433	1.433	12	15	39.920	35.290	6.122	5.082	16,7

Marker: **TPOX**

RSD Code: **rd**

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	8	8	27.041	27.041	3.010	3.010	9	9	22.910	22.910	2.549	2.549	54,1
75 / 25	8	8	13.431	13.431	1.493	1.493	9	9	32.349	32.349	3.607	3.607	29,3
87.5 / 12.5	8	8	9.283	9.283	1.026	1.026	9	9	39.110	39.110	4.323	4.323	19,2
93.7 / 6.3	8	8	7.419	7.419	804	804	9	9	47.142	47.142	5.275	5.275	13,6
96.9 / 3.1	8	8	5.614	5.614	630	630	9	9	48.975	48.975	5.442	5.442	10,3
98.4 / 1.6	8	8	3.411	3.411	384	384	9	9	39.717	39.717	4.385	4.385	7,9
99.2 / 0.8	8	8	4.224	4.224	474	474	9	9	43.898	43.898	4.899	4.899	8,8

4 Ergebnisse

Marker: **FGA**

RSD Code: **rSd**

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	23	24	10.450	10.814	1.307	1.337	24	25	10.814	19.264	1.337	2.301	35,2
75 / 25	23	24	5.455	16.055	683	1.933	24	25	16.055	17.891	1.933	2.182	23,4
87.5 / 12.5	23	24	3.308	18.782	421	2.287	24	25	18.782	18.036	2.287	2.207	15,5
93.7 / 6.3	23	24	2.635	22.856	350	2.833	24	25	22.856	22.313	2.833	2.728	10,6
96.9 / 3.1	23	24	2.484	24.588	324	3.012	24	25	24.588	23.614	3.012	2.869	9,5
98.4 / 1.6	23	24	1.628	21.666	215	2.625	24	25	21.666	19.532	2.625	2.350	7,7
99.2 / 0.8	23	24	1.765	24.748	238	3.031	24	25	24.748	23.527	3.031	2.873	7,0

4 Ergebnisse

Tabelle 4.2.1.4: Multiplex-Verdünnungsreihe des Patientenpaars 2311/2492

UPN Patient/Donor: 2311/2492

Injektionszeit: 5 sec

Injektionsspannung: 15 kV

Marker: **D3S1358**

RSD Code: **RdS**

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	15	18	5.792	11.065	912	1.595	17	18	6.966	11.065	1.065	1.595	45,4
75 / 25	15	18	3.398	14.403	532	1.971	17	18	11.142	14.403	1.741	1.971	23,4
87.5 / 12.5	15	18	1.954	13.487	301	1.878	17	18	10.896	13.487	1.703	1.878	15,2
93.7 / 6.3	15	18	1.241	13.007	184	1.910	17	18	12.527	13.007	1.955	1.910	9,0
96.9 / 3.1	15	18	730	12.782	102	1.614	17	18	11.325	12.782	1.721	1.614	6,1
98.4 / 1.6	15	18	1.073	13.767	117	1.914	17	18	12.730	13.767	2.041	1.914	7,8
99.2 / 0.8	15	18	986	11.459	162	1.595	17	18	10.524	11.459	1.650	1.595	8,6

Marker: **TH01**

RSD Code: **Srd**

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	6	8	10.053	5.305	1.229	614	6	9	10.053	8.751	1.229	1.004	37,7
75 / 25	6	8	13.163	3.686	1.586	401	6	9	13.163	10.568	1.586	1.255	25,9
87.5 / 12.5	6	8	13.712	1.638	1.815	237	6	9	13.712	11.005	1.815	1.457	13,0
93.7 / 6.3	6	8	15.171	1.296	1.979	190	6	9	15.171	13.835	1.979	1.803	8,6
96.9 / 3.1	6	8	15.481	2.054	1.867	173	6	9	15.481	13.564	1.867	1.605	13,2
98.4 / 1.6	6	8	12.665		1.640		6	9	12.665	12.282	1.640	1.597	0,0
99.2 / 0.8	6	8	9.899		1.300		6	9	9.899	9.140	1.300	1.177	0,0

4 Ergebnisse

Marker: **D21S11**

RSD Code: **RSd**

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	28	30	13.136	21.390	1.243	2.277	30	31	21.390	12.023	2.277	1.082	52,2
75 / 25	28	30	10.025	23.599	7.711	2.344	30	31	23.599	14.659	2.344	1.593	40,6
87.5 / 12.5	28	30	7.825	23.753	573	2.349	30	31	23.753	20.521	2.349	2.092	27,6
93.7 / 6.3	28	30	7.667	26.606	485	2.631	30	31	26.606	23.273	2.631	2.431	24,8
96.9 / 3.1	28	30	5.478	22.127	334	2.181	30	31	22.127	18.141	2.181	2.084	23,2
98.4 / 1.6	28	30	5.026	24.294	331	2.363	30	31	24.294	19.014	2.363	2.221	20,9
99.2 / 0.8	28	30	2.928	13.528	191	1.284	30	31	13.528	10.701	1.284	1.224	21,5

Marker: **D18S51**

RSD Code: **drDR**

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	14	18	5.916	5.571	554	517	13	16	7.168	6.480	753	593	46,2
75 / 25	14	18	2.412	2.352	240	208	13	16	7.221	6.766	750	662	25,8
87.5 / 12.5	14	18	1.754	1.617	159	145	13	16	9.154	8.391	1.008	813	16,2
93.7 / 6.3	14	18	3.089	2.633	216	173	13	16	16.424	15.902	1.686	1.400	14,2
96.9 / 3.1	14	18	1.919	1.059	130	108	13	16	14.042	14.130	1.386	1.179	7,0
98.4 / 1.6	14	18					13	16	8.614	8.298	935	812	0,0
99.2 / 0.8	14	18					13	16	5.237	4.993	618	581	0,0

4 Ergebnisse

Marker: **Penta E**

RSD Code: **DDRR**

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	13	17	2.487	2.195	260	225	5	10	5.196	4.797	416	374	31,9
75 / 25	13	17	1.299	1.005	135	102	5	10	4.966	3.656	547	417	21,1
87.5 / 12.5	13	17					5	10	6.722	4.396	628	453	0,0
93.7 / 6.3	13	17	903		104		5	10	14.305	8.654	1.114	847	3,8
96.9 / 3.1	13	17					5	10	9.782	7.037	802	612	0,0
98.4 / 1.6	13	17					5	10	7.235	4.650	632	471	0,0
99.2 / 0.8	13	17					5	10	4.074	3.190	447	372	0,0

Marker: **D5S818**

RSD Code: **Rdr**

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	9	12	15.515	16.994	2.034	2.132	11	11	31.213	31.213	4.352	4.352	39,8
75 / 25	9	12	11.748	13.505	1.354	1.264	11	11	54.387	54.387	7.537	7.537	19,5
87.5 / 12.5	9	12	7.999	6.172	820	758	11	11	57.197	57.197	7.676	7.676	13,1
93.7 / 6.3	9	12	6.155	4.589	512	511	11	11	53.094	53.094	6.231	6.231	11,0
96.9 / 3.1	9	12	3.838	2.838	284	345	11	11	53.603	53.603	7.521	7.521	6,9
98.4 / 1.6	9	12	4.607	3.310	302	373	11	11	60.719	60.719	7.675	7.675	7,3
99.2 / 0.8	9	12	3.789	2.916	237	263	11	11	55.707	55.707	7.636	7.636	6,6

Marker: **D13S317**

RSD Code: **SS**

4 Ergebnisse

Marker: **D7S820**

RSD Code: **drS**

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	9	10	10.474	20.220	1.408	2.460	8	10	13.012	20.220	1.479	2.460	44,6
75 / 25	9	10	6.832	22.476	832	2.771	8	10	21.180	22.476	2.517	2.771	24,4
87.5 / 12.5	9	10	4.721	22.487	538	2.611	8	10	22.657	22.487	2.666	2.611	17,2
93.7 / 6.3	9	10	4.068	26.717	426	2.810	8	10	25.871	26.717	3.047	2.810	13,6
96.9 / 3.1	9	10	3.081	21.369	306	2.213	8	10	21.779	21.369	2.521	2.213	12,4
98.4 / 1.6	9	10	3.296	25.000	324	2.745	8	10	25.021	25.000	2.907	2.745	11,6
99.2 / 0.8	9	10	2.538	17.259	237	1.930	8	10	19.223	17.259	2.251	1.930	11,7

Marker: **D16S539**

RSD Code: **drR**

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	12	13	14.010	11.465	1.639	1.299	11	11	28.611	28.611	3.500	3.500	42,4
75 / 25	12	13	8.513	6.771	956	711	11	11	43.235	43.235	5.268	5.268	23,1
87.5 / 12.5	12	13	4.820	4.377	501	427	11	11	50.837	50.837	6.254	6.254	14,6
93.7 / 6.3	12	13	3.810	3.132	344	268	11	11	60.668	60.668	7.372	7.372	9,3
96.9 / 3.1	12	13	2.905	1.991	236	141	11	11	48.374	48.374	5.810	5.810	7,5
98.4 / 1.6	12	13	2.496	2.352	156	105	11	11	59.388	59.388	7.145	7.145	7,3
99.2 / 0.8	12	13					11	11	28.533	28.533	3.662	3.662	0,0

4 Ergebnisse

Marker: **CSF1PO**

RSD Code: **drS**

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	10	12	4.153	9.096	512	1.084	9	12	5.040	9.096	642	1.084	45,2
75 / 25	10	12	2.929	8.772	286	1.091	9	12	7.775	8.772	941	1.091	27,4
87.5 / 12.5	10	12	2.374	7.269	163	916	9	12	8.564	7.269	1.049	916	21,7
93.7 / 6.3	10	12	1.626	10.773	133	1.361	9	12	12.032	10.773	1.422	1.361	11,9
96.9 / 3.1	10	12	1.681	7.434	104	935	9	12	9.298	7.434	1.078	935	15,3
98.4 / 1.6	10	12	1.496	8.925	115	1.038	9	12	9.633	8.925	1.114	1.038	13,4
99.2 / 0.8	10	12		6.253		794	9	12	6.557	6.253	837	794	0,0

Marker: **Penta D**

RSD Code: **drD**

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	10	10	14.873	14.873	1.529	1.529	9	12	9.291	7.511	938	741	52,6
75 / 25	10	10	5.533	5.533	559	559	9	12	10.330	9.829	1.054	977	23,5
87.5 / 12.5	10	10	2.414	2.414	254	254	9	12	12.635	11.210	1.315	1.132	14,6
93.7 / 6.3	10	10	2.195	2.195	245	245	9	12	23.639	20.222	2.445	2.070	12,2
96.9 / 3.1	10	10					9	12	18.440	17.217	1.866	1.711	3,4
98.4 / 1.6	10	10					9	12	13.600	11.946	1.232	1.085	6,5
99.2 / 0.8	10	10					9	12	9.010	7.744	918	781	7,6

4 Ergebnisse

Marker: **vWA**

RSD Code: **DDR**

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	19	19	24.225	24.225	3.228	3.228	16	17	15.285	15.875	1.996	2.058	43,7
75 / 25	19	19	13.994	13.994	1.876	1.876	16	17	27.376	24.522	3.513	3.147	21,2
87.5 / 12.5	19	19	5.833	5.833	802	802	16	17	28.505	26.244	3.687	3.417	9,6
93.7 / 6.3	19	19	3.375	3.375	477	477	16	17	32.209	30.733	4.154	3.969	5,1
96.9 / 3.1	19	19	1.417	1.417	208	208	16	17	29.050	26.334	3.647	3.330	2,5
98.4 / 1.6	19	19	1.355	1.355	192	192	16	17	31.501	32.727	4.084	4.146	2,1
99.2 / 0.8	19	19	826	826	110	110	16	17	29.269	27.539	3.803	3.578	1,4

Marker: **D8S1179**

RSD Code: **DdR**

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	14	14	34.874	34.874	5.027	5.027	12	13	18.102	20.711	2.720	3.003	47,3
75 / 25	14	14	19.024	19.024	2.643	2.643	12	13	35.792	33.917	5.195	4.924	21,4
87.5 / 12.5	14	14	7.595	7.595	1.102	1.102	12	13	38.506	36.166	5.606	5.245	9,2
93.7 / 6.3	14	14	5.121	5.121	735	735	12	13	41.940	40.151	6.003	5.803	5,9
96.9 / 3.1	14	14	1.781	1.781	256	256	12	13	30.832	33.776	4.497	4.867	2,7
98.4 / 1.6	14	14	1.514	1.514	215	215	12	13	42.243	39.881	6.059	5.684	1,8
99.2 / 0.8	14	14	911	911	117	117	12	13	31.586	30.710	4.637	4.483	1,4

4 Ergebnisse

Marker: **TPOX**

RSD Code: **SR**

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	8	11	21.786	5.610	2.412	636	8	8	21.786	21.786	2.412	2.412	41,0
75 / 25	8	11	20.419	2.615	2.254	290	8	8	20.419	20.419	2.254	2.254	22,7
87.5 / 12.5	8	11	24.743	1.316	2.722	140	8	8	24.743	24.743	2.722	2.722	10,1
93.7 / 6.3	8	11	39.114	1.285	4.347	139	8	8	39.114	39.114	4.347	4.347	6,4
96.9 / 3.1	8	11	30.627	1.223	3.358	151	8	8	30.627	30.627	3.358	3.358	7,7
98.4 / 1.6	8	11	22.016		2.413		8	8	22.016	22.016	2.413	2.413	0,0
99.2 / 0.8	8	11	15.090		1.640		8	8	15.090	15.090	1.640	1.640	0,0

Marker: **FGA**

RSD Code: **DdrR**

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Alleles		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	23	25	9.119	8.548	1.117	990	19	22	11.565	11.320	1.408	1.336	43,6
75 / 25	23	25	4.376	4.715	551	556	19	22	20.481	18.965	2.476	2.280	18,7
87.5 / 12.5	23	25	2.578	2.202	327	267	19	22	21.792	20.758	2.660	2.461	10,1
93.7 / 6.3	23	25	1.068	1.347	144	155	19	22	25.940	23.224	3.172	2.754	4,7
96.9 / 3.1	23	25					19	22	21.611	19.744	2.608	2.321	0,0
98.4 / 1.6	23	25					19	22	24.476	23.077	2.945	2.756	0,0
99.2 / 0.8	23	25					19	22	12.154	11.146	1.460	1.308	0,0

4 Ergebnisse

Tabelle 4.2.1.5 Sensitivität der Patientenpaare

UPN-Nr.	2302/ 2320	2364/ 2499	2298/ 2393	2311/ 2492	Alle Multiplex-VD
Mittelwert; Bereich (min./max.) Sensitivität [%]	5,57; 0,4;11,6	9,32; 2,6;16,5	13,22; 5,3;22,1	7,22; 1,4;20,9	8,83; 0,4;22,1
Mittelwert; Bereich (min./max.) Sens. Peaks > 1 repeat unit [%]	3,70; 2,4; 6,3	8,98; 2,6;15,9	15,65; 14,8;16,5	3,87; 1,4;6,4	8,28; 1,4;16,5
Mittelwert, Bereich (min./max.) Sens. Peaks < 1 repeat unit [%]	6,51; 0,4;11,6	9,46; 3,6;16,5	12,78; 5,3;22,1	8,14; 1,4;20,9	9,22; 0,4;22,1
Mittelwert, Bereich (min./max.) Sens. homozygote Allele [%]	4,13; 0,4; 7,7	6,48; 2,6;16,5	11,35; 5,3;15,5	4,42; 1,4;7,3	6,59; 0,4;16,5
Mittelwert, Bereich (min./max.) Sens heterozygote Allele [%]	6,53; 2,4;11,6	10,58; 3,6;16,1	14,83; 7,0;22,1	9,93; 3,8;20,9	10,32; 2,4;22,1

Tabelle 4.2.1.6 Sensitivität der einzelnen Multiplex-Primer

Patient	D3S1358	Th01	D21S11	D18S51	PentaE	D5S818	D13S317
2302/2320	3,5	4,1	7,7	11,2	6,3	2,4	11,6
2364/2499	7,2	7,5	16,5	8,8	15,9	10,2	16,1
2298/2393	5,3	13,5	16,5	14,8	15,5	8,1	10,6
2311/2492	6,1	8,6	20,9	7,0	3,8	6,6	-
Mittelwert Sensitivität	5,53	8,43	15,4	10,45	10,38	6,83	12,77

Patient	D7S820	D16S539	CSF1PO	PentaD	vWA	D8S1179	TPOX	FGA
2302/2320	3,3	3,0	8,2	8,3	4,6	0,4	6,3	2,7
2364/2499	12,8	5,6	2,6	8,5	3,6	5,8	-	-
2298/2393	-	18,0	17,3	-	22,1	15,3	7,9	7,0
2311/2492	11,6	7,3	11,9	3,4	1,4	1,4	6,4	4,7
Mittelwert Sensitivität	9,23	8,48	10,0	6,73	7,93	5,73	6,87	4,8

4 Ergebnisse

Die Sensitivität in den Multiplexanalysen ergab im Mittel für das Patientenpaar 2302/2320 5,57%. Allele, die von einer *stutter peak formation* beeinträchtigt sind, weisen im Durchschnitt eine geringere Sensitivität auf (6,51%), als Allele, bei denen der Abstand der Peaks mehr als eine *repeat unit* beträgt (3,7%). Es lagen sechs homozygote Konstellationen vor; diese haben mit 4,13% eine höhere Sensitivität als heterozygote Allelkonstellationen (6,53%). Von den neun heterozygoten Allelen stammte in fünf Fällen das kürzeste vom Rezipient.

Der Patient mit der UPN-Nr. 2364 hat im Mittelwert eine Sensitivität von 9,32%; informative Primer weisen mit 8,98% eine höhere Sensitivität auf als Primer, deren Abstand der Peaks weniger als eine *repeat unit* beträgt (9,46%). Bei Betrachtung der homozygoten Allele (n=4, davon R_{kurz}=2) findet man im Mittel eine höhere Sensitivität (6,48%), als bei den neun heterozygoten Konstellationen (10,58%), von denen vier Allelkonstellationen das Merkmal R_{kurz} aufweisen.

Die Sensitivität zum Nachweis der Minorpopulation betrug bei dem Patientenpaar 2298/2393 im Mittel 13,22% und ist somit die geringste aller Multiplex-Verdünnungsreihen; in nur zwei Konstellationen fanden sich Allele, bei denen der Abstand der Peaks mehr als eine *repeat unit* beträgt, sie weisen hier eine geringere Sensitivität auf (15,65%), als Allele, die innerhalb der *stutter peak* Formation liegen (12,78%). Werden nur Primer mit homozygoten Allelen betrachtet (n=6, davon R_{kurz}=2), findet sich eine Sensitivität von 11,35%; eine heterozygote Konstellation lag in 7 Fällen vor, davon war bei 3 das kürzeste Allel vom Empfänger; der Mittelwert der Sensitivität beträgt 14,83%.

Das Patientenpaar 2311/2492 hat eine Sensitivität von 7,22%; Allele außerhalb der *stutter peak* Formation haben eine Sensitivität im Mittel von 3,87%, innerhalb der *stutter peak* Region von 8,14%. Die Sensitivität für die 6 homozygoten Allele beträgt 4,42%, davon bot eines das Merkmal R_{kurz}. Die 8 heterozygoten Allelkonstellationen, von denen 2 der Rezipient das kürzeste Allel innehat, haben eine Sensitivität von 9,33%.

Die Gesamtsensitivität für alle PowerPlex[®]16-Primer liegt für diese vier Patientenpaare bei 8,83%. Bei Betrachtung der homozygoten Allelkonstellationen liegt die Gesamtsensitivität bei 6,59%, in heterozygoten

Situationen bei 10,32%. Die Sensitivität von Peaks, die mehr als eine *repeat unit* voneinander entfernt liegen, beträgt 8,28%; Peaks, die weniger als eine *repeat unit* voneinander entfernt liegen, haben eine Sensitivität von 9,22%.

Der Primer FGA hat mit 4,8% im Mittel die maximale Sensitivität unter den Multiplex-Primern, gefolgt von D3S1358 mit 5,53%, D8S1179 mit 5,73%, Penta D mit 6,73% und D5S818 mit 6,83%. Der Marker D21S11 hat mit 15,4% im Mittelwert die minimale Sensitivität in unseren Untersuchungen erreicht.

Nicht informative STR-Marker, die identische Peaks für Donor und Rezipient aufweisen (SS), wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt.

Injektionszeit und Injektionsspannung betragen bei sämtlichen Untersuchungen 5s bzw. 15kV.

4.2.2 Sensitivität der Singleplex-Verdünnungsreihen (Primer D3S1358 und D21S11)

Um eine Überschätzung der erzielbaren Sensitivität zu vermeiden, wurden für die Singleplex-Verdünnungsreihen heterozygote Allelkonstellationen der Rezipienten gewählt.

In den folgenden Tabellen sind die Ergebnisse der Verdünnungsreihen mit den Primern D3S1358 und D21S11 abgebildet. Die Injektionszeit betrug bei den Singleplex-Assays jeweils 3 sec, die Injektionsspannung 15 kV. Diese Injektionsbedingungen waren vorgegeben und wurden nicht optimiert.

Die Kalkulation des Empfängeranteils wurde entsprechend der von Thiede et al. veröffentlichten Literatur berechnet:¹²⁶

$$\text{RSD: Rezipient [\%]} = 100 \times \frac{\text{Fläche R1}}{\text{Fläche R1} + \text{Fläche D2}}$$

4 Ergebnisse

Tabelle 4.2.2.1 Verdünnungsreihen der Primer D3S1358 und D21S11

UPN Patient/Donor: 2320

Injektionszeit: 3 sec

Injektionsspannung: 15 kV

Marker: **D3S1358**

RSD Code: **RSD**

1. Experiment:

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Peak size (bp)		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Peak size (bp)		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	118	126	24.417	40.106	4.019	6.624	126	135	40.106	21.066	6.624	3.414	53,7
75 / 25	118	126	12.982	42.665	2.083	6.465	126	135	42.665	32.161	6.465	5.189	28,8
87.5 / 12.5	118	126	5.574	34.334	911	5.576	126	135	34.334	32.476	5.576	5.302	14,6
93.7 / 6.3	118	126	3.917	47.047	635	7.218	126	135	47.047	44.256	7.218	7.098	8,1
96.9 / 3.1	118	126	2.154	43.832	347	6.119	126	135	43.832	43.570	6.119	6.615	4,7
98.4 / 1.6	118	126	914	36.709	150	5.982	126	135	36.709	32.994	5.982	5.347	2,7
99.2 / 0.8	118	126	924	40.548	146	6.562	126	135	40.548	41.404	6.562	6.710	2,2

2. Experiment:

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Peak size (bp)		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Peak size (bp)		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	118	126	11.176	19.836	1.716	3.039	126	134	10.581	1.593			56,3
75 / 25	118	126	10.062	26.492	1.409	3.990	126	134	20.095	3.100			38,0
87.5 / 12.5	118	126	5.196	18.979	744	2.887	126	134	17.268	2.600			27,4
93.7 / 6.3	118	126	2.348	14.471	305	2.100	126	134	11.827	1.736			16,2
96.9 / 3.1	118	126	3.158	17.087	446	2.613	126	134	15.729	2.423			18,5
98.4 / 1.6	118	126	2.936	17.917	418	2.747	126	134	15.237	2.371			16,4
99.2 / 0.8	118	126		10.051		1.468	126	134	9.765	1.435			0,0

4 Ergebnisse

UPN Patient/Donor: 2364

Injektionszeit: 3 sec

Injektionsspannung: 15 kV

Marker: **D3S1358**

RSD Code: **RDS**

1. Experiment:

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Peak size (bp)		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Peak size (bp)		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	108	136	8.983	14.970	1.401	2.404	123	136	6.465	14.970	1.048	2.404	37,5
75 / 25	108	136	5.918	17.482	910	2.625	123	136	13.996	17.482	2.166	2.625	25,3
87.5 / 12.5	108	136	2.150	14.739	363	2.475	123	136	12.640	14.739	2.179	2.475	12,7
93.7 / 6.3	108	136	1.361	15.495	216	2.556	123	136	14.034	15.495	2.410	2.556	8,1
96.9 / 3.1	108	136	902	20.216	147	3.425	123	136	19.525	20.216	3.289	3.425	4,3
98.4 / 1.6	108	136		19.348		3.298	123	136	17.497	19.348	2.950	3.298	0,0
99.2 / 0.8	108	136		18.714			123	136	17.341	18.714	2.959		0,0

2. Experiment:

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Peak size (bp)		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Peak size (bp)		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	106	135	11.154	18.569	1.517	2.540	122	135	8.171	18.569	1.123	2.540	37,5
75 / 25	106	135	6.605	18.876	897	2.594	122	135	15.606	18.876	2.143	2.594	25,9
87.5 / 12.5	106	135	3.404	23.263	463	3.233	122	135	20.547	23.263	2.809	3.233	12,8
93.7 / 6.3	106	135	1.528	17.474	219	2.464	122	135	16.531	17.474	2.333	2.464	8,0
96.9 / 3.1	106	135		15.458		2.207	122	135	15.506	15.458	2.208	2.207	0,0
98.4 / 1.6	106	135		23.309		3.316	122	135	21.862	23.309	3.112	3.316	0,0
99.2 / 0.8	106	135		21.905		3.113	122	135	21.048	21.905	3.011	3.113	0,0

4 Ergebnisse

UPN Patient/Donor: 2311
 Injektionszeit: 3 sec
 Injektionsspannung: 15 kV
 Marker: **D21S11**
 RSD Code: **RSD**

1. Experiment:

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Peak size (bp)		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Peak size (bp)		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	214	222	4.307	7.520	668	1.139	222	228	7.520	4.269	1.139	644	50,2
75 / 25	214	222	3.209	1.146	492	1.759	222	228	1.146	9.229	1.759	1.341	25,8
87.5 / 12.5	214	222	978	7.377	161	1.090	222	228	7.377	6.313	1.090	910	13,4
93.7 / 6.3	214	222	693	8.806	101	1.301	222	228	8.806	8.270	1.301	1.200	7,7
96.9 / 3.1	214	222		7.294		1.122	222	228	7.294	6.307	1.122	959	0,0
98.4 / 1.6	214	222		5.968		897	222	228	5.968	5.883	897	872	0,0
99.2 / 0.8	214	222		6.007		913	222	228	6.007	6.506	913	964	0,0

2. Experiment:

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Peak size (bp)		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Peak size (bp)		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	214	222	10.994	21.517	1.661	3.170	222	228	21.517	10.815	3.170	1.618	50,4
75 / 25	214	222	3.994	15.652	610	2.328	222	228	15.652	12.026	2.328	1.790	24,9
87.5 / 12.5	214	222	2.693	17.763	425	2.679	222	228	17.763	15.934	2.679	2.403	14,5
93.7 / 6.3	214	222	630	8.185	106	1.240	222	228	8.185	8.027	1.240	1.216	7,3
96.9 / 3.1	214	222		6.879		1.032	222	228	6.879	6.374	1.032	967	0,0
98.4 / 1.6	214	222		7.744		1.173	222	228	7.744	7.738	1.173	1.155	0,0
99.2 / 0.8	214	222		15.669		2.376	222	228	15.669	16.461	2.376	2.478	0,0

4 Ergebnisse

UPN Patient/Donor: 2393

Injektionszeit: 3 sec

Injektionsspannung: 15 kV

Marker: **D21S11**

RSD Code: **RSD**

1. Experiment:

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Peak size (bp)		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Peak size (bp)		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	214	224	15.825	30.684	2.291	4.316	224	232	30.684	16.191	4.316	2.273	49,4
75 / 25	214	224	7.303	33.108	1.113	4.850	224	232	33.108	24.315	4.850	3.501	23,1
87.5 / 12.5	214	224	4.055	36.754	613	5.272	224	232	36.754	28.975	5.272	4.142	12,3
93.7 / 6.3	214	224	1.508	32.439	218	4.689	224	232	32.439	31.282	4.689	4.438	4,6
96.9 / 3.1	214	224	795	34.573	112	4.931	224	232	34.573	30.952	4.931	4.386	2,5
98.4 / 1.6	214	224		32.139		4.702	224	232	32.139	30.837	4.702	4.433	0,0
99.2 / 0.8	214	224		33.387		4.848	224	232	33.387	32.823	4.848	4.627	0,0

2. Experiment:

DNA Dilution	Recipient						Donor						calculated R/D ratio
	Peak size (bp)		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		Peak size (bp)		Peak Areas (Aver.)		Peak Heights (Aver.)		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
50 / 50	214	225	24.488	44.048	2.169	3.730	225	233	44.048	19.576	3.730	1.628	55,6
75 / 25	214	225	11.554	47.595	1.830	7.099	225	233	47.595	33.953	7.099	5.119	25,4
87.5 / 12.5	214	225	6.619	47.526	1.071	6.878	225	233	47.526	39.214	6.878	5.889	14,4
93.7 / 6.3	214	225	3.062	39.581	486	6.033	225	233	39.581	35.294	6.033	5.293	8,0
96.9 / 3.1	214	225	2.142	47.080	344	6.680	225	233	47.080	46.489	6.680	6.502	4,4
98.4 / 1.6	214	225	1.220	38.498	200	5.983	225	233	38.498	34.633	5.983	5.289	3,4
99.2 / 0.8	214	225	665	27.815	103	4.295	225	233	27.815	25.790	4.295	3.925	2,5

Tabelle 4.2.2.2 Übersicht der Singleplex-Verdünnungsreihen

Primer	UPN-Nr.	Allelkongstellation	Sensitivität	Peakamplitude Rezipient	Injektionszeit, -spannung
D3S1358	2320	RSD	2,2%; 16,4%	146rfu; 418rfu	3s; 15kV
D3S1358	2364	DRS	4,3%; 8,0%	147rfu; 219rfu	3s; 15k
D21S11	2311	RSD	7,7%; 7,3%	101rfu; 106rfu	3s; 15kV
D21S11	2393	RSD	2,5%; 2,5%	112rfu; 103rfu	3s; 15kV

In den Singleplexanalysen lag die Sensitivität im Mittel bei 6,4%; der Primer D3S1358 erzielte im Mittel eine Sensitivität von 7,7%, der Marker D21S11 zeigte ein mittleres Detektionslimit von 5% für die autologe Minorkomponente. Die Peakamplitude der Rezipienten betrug zwischen 101 und 418rfu, das entspricht einem Durchschnitt von 169rfu und liegt über der vom Hersteller angegebenen Grenze von 50rfu, die die Software als Peaks erkennt.

4.3 Quantitative Analyse von Proben mit gemischtem Chimärismus durch das PowerPlex® 16 System

Mit dem PowerPlex® 16 System können engmaschig Verlaufskontrollen durchgeführt werden, die möglichst früh die Entwicklung eines gemischten Chimärismus bzw. eines damit verbundenen Rezidivs aufdecken oder den Status des *Engraftments* oder einer residuellen Erkrankung anzeigen; dadurch können zeitnah die entsprechenden therapeutischen Konsequenzen eingeleitet werden.

Die Berechnung des Grades eines gemischten Chimärismus basiert auf der Annahme, dass die Fläche eines Peaks mit der in der Probe vorhandenen DNA-Menge korreliert und dass die Allele von Donor und Rezipient entsprechend amplifiziert werden.

Die Dynamik eines gemischten Chimärismus wird durch die quantitative Bestimmung der Rezipientenanteile in den Nachproben nach KMT erfasst. Dazu werden Donor, Rezipient und aktuelle Nachprobe mit Hilfe der Genotyper Software so untereinandergesetzt, dass die Fläche unter der Kurve des

4 Ergebnisse

informativen Allels des Rezipienten mit der Fläche der entsprechenden Nachprobe verglichen werden kann.

Je nach Allelkonstellation, homozygoter oder heterozygoter Situation werden verschiedene Formeln zur Berechnung des quantitativen Chimärismus zugrunde gelegt:

$$\text{RD: } \% \text{ Recipient} = 100 \times \frac{\text{Fläche R1}}{\text{Fläche R1} + \text{Fläche D1}}$$

$$\text{RRDD: } \% \text{ Recipient} = 100 \times \frac{\text{Fläche R1} + \text{Fläche R2}}{\text{Fläche R1} + \text{Fläche R2} + \text{Fläche D1} + \text{Fläche D2}}$$

$$\text{RSD: } \% \text{ Recipient} = 100 \times \frac{\text{Fläche R1}}{\text{Fläche R1} + \text{Fläche D2}}$$

$$\text{SR: } \% \text{ Recipient} = 100 \times \frac{\text{Fläche R2}}{(\text{Fläche S} - \text{Fläche R2}) / 2 + \text{Fläche R2}}$$

$$\text{DDR: } \% \text{ Recipient} = 100 \times \frac{\text{Fläche R1}}{\text{Fläche R1} + \text{Fläche D1} + \text{Fläche D2}}$$

$$\text{rDd: } \% \text{ Recipient} = 100 - \frac{100 \times 2 \times \text{Fläche D}}{\text{Fläche r} + \text{Fläche D} + \text{Fläche d}}$$

$$\text{Rdr: } \% \text{ Recipient} = 100 \times \frac{2 \times \text{Fläche R}}{\text{Fläche R} + \text{Fläche d} + \text{Fläche r}}$$

5 Diskussion

5.1 Bedeutung der Chimärismusanalyse nach SZT

Bei diversen malignen und nichtmalignen Erkrankungen stellt die Stammzelltransplantation die einzige Therapiemöglichkeit dar, diese kurativ zu behandeln. Die Eradikation der Grunderkrankung erfolgt einerseits durch die myeloablative Chemotherapie, andererseits führt der sogenannte Graft-versus-Tumor-Effekt des neuen Knochenmarks zu einer Immunreaktion der Spenderzellen gegen residuelle maligne Zellen.^{127,128}

Die häufigste Ursache eines Therapieversagens in der Pädiatrie ist das Rezidiv der Grunderkrankung.¹²⁹

Die Entstehung eines Rezidivs wird durch die Persistenz maligner Zellen und durch eine Resistenz gegenüber der Chemotherapie bedingt.¹³⁰ Chimärismusanalysen zeigen den genetischen Ursprung der Hämatopoese an; nach SZT dienen sie der Engraftmentüberwachung und sind ein Indikator für das Wiederauftreten der Erkrankung.¹³¹

Die Bedeutung eines gemischten Chimärismus bezüglich des Wiederauftretens der Grunderkrankung war zunächst kontrovers diskutiert worden; verschiedene Arbeitsgruppen konnten belegen, dass ein zunehmender gemischter Chimärismus zu einer Abnahme des GVL-Effektes führt und somit ein Rezidiv begünstigt.^{69,116,132-134}

Die durch einen zunehmenden gemischten Chimärismus mögliche Vorhersage eines Rezidivs und die damit verbundene frühzeitige Diagnose desselben ist mit einer günstigeren Prognose verbunden, da unmittelbar mit einer immuntherapeutischen Intervention, z.B. der Gabe von Donor-Lymphozyten, begonnen werden kann.^{84,135,136}

Für die Chimärismusuntersuchung stehen verschiedene Methoden zur Verfügung; die Amplifikation von *short tandem repeats* (STR) mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion und anschließender Kapillarelektrophorese ist der

Goldstandard, um den Chimärismusstatus nach hämatologischer SZT zu untersuchen.

5.2 Die Methode: Chimärismusanalyse mittels Powerplex® 16

Das Powerplex® 16 System wurde für forensische Zwecke optimiert und kann zur DNA-Typisierung im Rahmen von Vaterschaftstests, zur Identitätsbestimmung von Individuen und zur Identifizierung von Zellen, wie dies in der Chimärismusanalyse der Fall ist, verwendet werden.

Durch die im Powerplex® 16 System verwendete PCR-basierte Analyse von Mikrosatelliten (*short tandem repeats*) besteht die Möglichkeit, geringste DNA-Mengen in sehr kurzer Zeit zu vervielfältigen. Da parallel 15 STR-Primer amplifiziert werden, handelt es sich um einen sogenannten Multiplex-Ansatz.

Die STR-Typisierung ist bezüglich Verwendung degenerierter DNA toleranter als andere Methoden, da die amplifizierten Produkte weniger als 500bp lang und somit kleiner als bei Verwendung von AMP-FLP- (*amplified fragment length polymorphism*) oder VNTR-Analysen (*variable number of tandem repeats*) sind. In Studien konnte gezeigt werden, dass *short tandem repeats* sensitiver (<5%) als *variable number of tandem repeats* (<10%) sind, da die autologe Minor-DNA-Komponente bei geringen Konzentrationen genauer quantifiziert werden kann.¹³⁷

Allele der STR-Loci unterscheiden sich durch die Anzahl der Kopien der Wiederholungssequenzen; da diese Sequenzen in der Regel interindividuelle Unterschiede aufweisen, eignen sie sich ausgezeichnet für die Chimärismusanalyse.¹²¹

Im Gegensatz zu zytogenetischen Untersuchungen, Chimärismusuntersuchungen mit X- und Y-Chromosom-spezifischen Markern, oder mit Hilfe des Amelogenin-Systems sowie auf Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung (FISH)-basierten Chimärismusanalysen ist die Bestimmung des genetischen Ursprungs

der Zellen mittels *short tandem repeats* nicht an das Vorliegen einer verschiedengeschlechtlichen Donor-Rezipienten-Kombination geknüpft.⁹³

Ein weiterer Vorteil der PCR auf Basis von STR-Markern ist, dass kein HLA-mismatch wie bei der Durchflusszytometrie mit Hilfe von anti-HLA-Antikörpern oder eine Blutgruppendifferenz gemäß der Erythrozyten-Phänotypisierung durch Blutgruppenantigene vorliegen muss.¹³⁸

Die Differenzierung von eineiigen Zwillingen ist mittels *short tandem repeats* jedoch nicht möglich.^{139,140}

Da STR-Sequenzen mittels ihrer Länge differenziert werden und kurze Allele effektiver amplifiziert werden als lange Allele, kommt es zu methodischen Ungenauigkeiten, wenn die Länge der Allele deutlich unterschiedlich ist.¹⁴¹

Chimärismusanalysen mit dem PowerPlex 16 System können unabhängig von der der Stammzelltransplantation zugrunde liegenden Erkrankung eingesetzt werden.

5.3 Anwendbarkeit und Durchführbarkeit der Methode

Chimärismusanalysen mit dem PowerPlex[®] 16 System sind bei nahezu allen Patienten möglich; die im Rahmen der Dissertation durchgeführten Tests konnten nur für ein Patienten-Spender-Paar (UPN-Nr. 2206) keinen informativen Primer ermitteln, dies entspricht 1,3% des untersuchten Patientenkollektivs.

Für die Verlaufskontrolle von Rezidiven sind regelmäßige und in kürzester Zeit durchführbare Chimärismusuntersuchungen von Vorteil.

Das Multiplex-Kit ermöglicht die Amplifikation der in drei verschiedenen Farben markierten sechzehn Loci (fünfzehn STR-Loci und Amelogenin); dadurch können alle sechzehn Primer in einem Tube gleichzeitig vervielfältigt und in einer Gel- oder Kapillarelektrophorese innerhalb nur eines Tages analysiert werden, eine aufwändige Primersuche entfällt.

Das PowerPlex[®] 16 System enthält zwei *low-stutter* Penta D und Penta E; das sind polymorphe, aus Pentanucleotiden bestehende Wiederholungs-Loci. Diese zusätzlichen Loci bieten die Möglichkeit, eine Vaterschaft definitiv

auszuschließen. Zusätzlich sind die *low-stutter* Penta D und Penta E ideale Loci für die Evaluierung von DNA-Gemischen, wie dies zum Beispiel in der Gerichtsmedizin der Fall ist. Das Amelogenin ermöglicht eine Differenzierung des Geschlechts.

Das Gießen von Ethidiumbromidgelen nach VNTR-PCR war gesundheitsschädlich und eine langwierige Prozedur; es mussten besondere Schutzmaßnahmen wie das Arbeiten unter einem Abzug für die Mitarbeiter getroffen werden; mit der Einführung der Kapillarelektrophorese steht ein gesundheitlich unbedenkliches Verfahren zur Verfügung.

Visuelle oder instrumentengestützte Vergleiche zwischen allelischen Leitern und den amplifizierten Proben desselben Locus ermöglichen eine schnelle und präzise Zuweisung der Allele.

Daten, die man durch das PowerPlex® 16 System erhält, können in einer digitalisierten Form aufgenommen werden; daraus kann man den direkten Vergleich zur gespeicherten Datenbank ziehen.

5.4 Informativität der Methode

Wie unter 5.2 bereits dargestellt, konnte für einen von 76 Patienten-Spender-Paaren kein informativer Primer gefunden werden der in der Lage ist, zwischen Donor und Rezipient zu unterscheiden; damit sind 98,7% des Patientenkollektivs mit den im Powerplex® 16 System enthaltenen STRs zu diskriminieren. Bei dem Patientenpaar mit der UPN-Nr 2206 sind alle Marker an den untersuchten Loci identisch, so dass von eineiigen Zwillingen ausgegangen werden kann. Für die 75 getesteten Donor-Rezipienten-Proben waren je mindestens zwei und maximal 13 Primer informativ. Die Diskriminationsfähigkeit mehrerer Primer für ein Patientenpaar kann zur Verifizierung eines Primertests verwendet werden.

Verschiedene Studien zeigen bezüglich der Diskriminationsfähigkeit ähnliche Daten: 1999 untersuchten Thiede et al neun der 15 PowerPlex®-Primer (TH01, D3S1358, FGA, TPOX, vWA, CSF1PO, D7S820, D13S317 und D5S818); für

alle Donor-Rezipienten-Kombinationen konnten mindestens ein und höchstens neun informative Primer gefunden werden.¹⁴²

Talwar et al. beschreiben ein Set bestehend aus sieben Markern u.a. den im Powerplex® 16 System enthaltenen Primer D3S1358, dessen Informativitätsgehalt in 98,7% der Fälle differenziert.¹²⁰

In der Praxis wird bei neuen Patientenproben mit Singleplex-Primern zunächst ein sogenannter Primertest zur Ermittlung des informativsten Primers vorgenommen. Die Diskriminationsfähigkeit ist auch von der Wahl der einzelnen Marker für einen Test abhängig und nicht nur von der Anzahl derselben. Mit dem Multiplex-Kit entfällt diese zeitaufwändige Arbeit, da das System eine Übersicht über alle 15 STRs bietet.

Im analysierten Patientengut war mit den informativsten Primern D13S317 und D8S1179 in 73,7% eine Diskrimination zwischen Donor und Rezipient möglich. Nimmt man die in unseren Tests ungleich schlechter diskriminierenden Primer D18S51, Penta E und vWA hinzu, kann in 94,7% der Fälle ein informativer Marker detektiert werden. Penta E wurde in einer Studie von Thiede et al. als informativster Primer von 27 Markern bei 203 Spender-Patienten-Paaren getestet.¹⁴³

Der Primer TPOX hat in unseren Tests den geringsten Informativitätsgehalt gezeigt; auch die Primer D5S818, D21S11 sowie D16S539 sind wenig informativ.

Die hohe Wahrscheinlichkeit, ein Empfänger-Spender-Paar mittels *short tandem repeats* diskriminieren zu können, ist durch deren ausgeprägten Polymorphismus bedingt.¹⁴⁴

Der Polymorphismus der STR-Marker variiert innerhalb und zwischen verschiedenen Völkern.¹²⁰

Die analysierten Primer zeigen eine Länge zwischen 106bp, das dem Amelogenin entspricht und 474bp für Penta E (Tabelle 3.3.2 Short tandem repeat Loci und allelische Leiter).

Für die beiden längsten STR-Loci Penta E (379-474bp) mit der chromosomalen Lokation 15q konnte in drei von 76 Fällen (UPN-Nr. 2295, 2311 und 2324) und für Penta D mit der chromosomalen Lokation 21q (376-449bp) konnte ein

Ergebnis (UPN-Nr. 2324) nicht ermittelt werden. Für diese Patienten zeigten sich andere STRs informativ. Da kürzere PCR-Produkte bevorzugt vervielfältigt werden, ist eine Ursache der Störanfälligkeit mit einer nicht ausreichenden Menge amplifizierter DNA zu begründen. Nachlassende Qualität der verwendeten Primer durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen und ein nicht auf alle im Multiplex-Kit enthaltenen Primer optimal eingestelltes PCR-Programm sind weitere zu diskutierende Ursachen, die in dieser Arbeit nicht weiter untersucht worden sind, jedoch Gegenstand zukünftiger Analysen sein könnten. Als Fehlerquelle müssen weiter Verunreinigungen im Rahmen der PCR sowie Störfaktoren, die mit der Gerätewartung des ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzers zusammenhängen, ausgeschlossen werden. Nach 350 Injektionen ist ein Nachfüllen von Polymer in die Untersuchungskapillare Voraussetzung für eine saubere Auftrennung in der Elektrophorese.

Die Informativität ist außerdem abhängig vom gewählten Probenkollektiv; gemäß den Mendelschen Regeln können für Fremdspender mehr informative Primer gefunden werden als für Familienspender.^{140,145} Unser Patientengut beinhaltet 29 Donor-Rezipientenpaare eines HLA-MRD (*matched related donor*), 41 eines HLA-MUD (*matched unrelated donor*), drei eines HLA-MMRD (*mismatched related donor*) und drei eines HLA-MMUD (*mismatched unrelated donor*), so dass das Verhältnis zu Gunsten der unverwandten Proben liegt (56,6%).

Die Diskrimination eines Primersystems ist weiter abhängig von der Anzahl der im Kit enthaltenen Marker. Thiede et al haben in einer Studie das Profiler SGM plus dem PowerPlex® 16 System gegenübergestellt; das Profiler SGM plus beinhaltet nur 10 Marker und ist bezüglich der Informativität dem PowerPlex® 16 Kit, das 15 STR-Primer enthält, unterlegen. Thiede et al postulieren, dass die Informativität eines Markers weniger von der Anzahl der Allele abhängt, als vielmehr mit dem Grad der Heterozygotie korreliert.¹⁴³

5.5 Sensitivität der Methode

5.5.1 Sensitivität der Multiplex-Verdünnungsreihen

Im Rahmen der Untersuchungen wurden von vier Patientenpaaren Verdünnungsreihen erstellt, um das Sensitivitätslimit der Multiplex-Primer zu detektieren.

Die mittlere Sensitivität für alle PowerPlex[®]-Primer liegt für diese vier Patientenpaare bei 8,74% und variiert zwischen 5,57 und 13,22%. Arbeitsgruppen um Beck et al. und Thiede et al. ermittelten für das Amp FISTR Profiler Plus und das Amp FISTR Cofiler PCR Amplification Kit, die das Amelogenin und je neun bzw. sechs der PowerPlex[®]-Marker enthalten, eine Sensitivität von 1-5%.^{95,142,143} Kreyenberg et al veröffentlichten 2003 eine Studie, in der neun laboreigene STR-Primer eine durchschnittliche Sensitivität von 3% erzielten, die Nachweisgrenze für die autologe Minorkomponente lag zwischen 0,8 und 6,2%.¹¹³ Die Gruppe um Fundia et al publizierte 2004 eine Sensitivität von 0,8-1,6% für sechs STR-Marker.¹⁵⁰

Die maximale Sensitivität erreichte der Primer D8S1179 mit 0,4%; der Marker vWA erzielte mit 22,1% das Sensitivitätsminimum in unseren Untersuchungen. Beigel erzielte in unserem Labor in ihren Untersuchungen für sieben STR-Primer ein Detektionslimit für residuale Empfängerzellen zwischen 0,39 und 50%; die Auftrennung der Proben erfolgte jedoch mit einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese und die Färbung wurde mittels Ethidiumbromid durchgeführt.¹⁵¹

In den hier beschriebenen Experimenten erzielte der Marker FGA das durchschnittliche Sensitivitätsmaximum (4,8%) gefolgt von D3S1358 (5,53%), D8S1179 (5,73%), Penta D (6,73%) und D5S818 (6,83%). Der Marker D21S11 hat mit 15,4% die minimale durchschnittliche Sensitivität in unseren Untersuchungen erreicht.

Primer, die eine *stutter peak* Formation aufweisen, erzielten in unseren Untersuchungen eine geringere mittlere Sensitivität (9,22%), als Marker, bei denen der Abstand der Peaks mehr als vier Basenpaare beträgt (8,28%).

Primer, die von *stutter peaks* beeinträchtigt sind, sollten durch andere Marker ersetzt werden.

Homozygote Allelkonstellationen zeigten in unseren Analysen eine durchschnittlich höhere Sensitivität (6,59%), als heterozygote (10,32%), so dass Primer, die eine homozygote Situation im Analyseausdruck aufzeigen, bevorzugt zur Identifikation des Chimärismusstatus verwendet werden sollten.

2004 publizierte Thiede et al eine Studie, die eine Korrelation zwischen Heterozygotenrate und Informativitätsgehalt der Marker postuliert, bezüglich der Sensitivität wurde keine Aussage getroffen.¹⁴³

Zusammenfassend ist mittels der hier durchgeführten Experimente ein Nachweis der Empfänger-DNA bis zu einem Anteil von 0,4% möglich; mit einer durchschnittlichen Sensitivität von 8,74% liegen die in unseren Analysen ermittelten Daten insgesamt etwas höher als die in der Literatur beschriebenen Grenzen zur Detektion der Minorkomponente (0,8-6,2%).

5.5.2 Sensitivität der Singleplex-Verdünnungsreihen mit den Primern D3S1358 und D21S11

Die Sensitivität der Singleplex-Primer wurde mit Verdünnungsreihen ermittelt. Der Nachweis der Minorpopulation betrug zwischen 2 und 16%, der Mittelwert liegt bei 6,4% für die Primer D3S1358 und D21S11; dies stimmt mit den berichteten Voruntersuchungen des Eurochimärismus-Konsortiums, bei denen die Sensitivität in einem Bereich zwischen 0,5 und 10% lag, überein. Die Sensitivität ist auch von der untersuchten Allelkonstellation und der verwendeten Methode (radioaktive versus fluoreszenzmarkierte Primer) abhängig.¹⁴⁶ Durch Eurochimärismus wurden uns zwei Primer zugeteilt.; bei den Primern D21S11 und D3S1358 handelt es sich um in unseren Untersuchungen bestätigten am wenigsten informativen Markern. In der Literatur wird von einer großen Varianz bezüglich der Sensitivität verschiedener Marker berichtet.^{139,147,148} Da die relative Ungenauigkeit bei geringen Chimärismuswerten steigt, wird von verschiedenen Autoren eine Detektionsgrenze von 5% vorgeschlagen.^{142,148,149}

Eine weitere Ursache einer geringen Sensitivität mag in einer nicht optimal für diese Primer und die verwendeten Geräte eingestellten Injektionszeit oder Injektionsspannung liegen.

Da der ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer individuelle Empfindlichkeiten in der Photosensorik aufweist, und alle Testungen unter strikter Vorgabe der Injektionsbedingungen durch das Eurochimärismus-Konsortium durchgeführt wurden, war eine Modifikation der Einstellungen nach Erhalt von schlechten Ergebnissen bezüglich der Nachweisgrenze in den weiteren Experimenten nicht möglich.

Die Reproduzierbarkeit der Verdünnungsreihen wurde durch je ein Wiederholungsexperiment demonstriert. Die Injektionszeit betrug bei den Singleplex-Analysen 3s, die Injektionsspannung 15kV; der Einfluss von Injektionszeit und -spannung auf die Sensitivität müssten in Folgeversuchen geklärt werden.

5.6 Ausblick

Die im Rahmen der Untersuchungen detektierten sensitivsten (FGA, D3S1358, D8S1179, Penta D und D5S818) und informativsten Marker (D13S317, D8S1179, D18S51, Penta E und vWA) könnten zur Entwicklung eines spezifischen Kits für die Chimärismusanalyse dienen.

Die Interferenz durch *stutter peaks* wirkt sich nachteilig auf die Sensitivität aus; sie ist bei pentameren Markern (Penta E und Penta D) und je nach Locus und Allel am geringsten, so dass diese Primer bevorzugt in Kits für Chimärismusuntersuchungen integriert werden sollten.

Die genetische Heterogenität ist abhängig von soziokulturellen und geographischen Unterschieden; diese führen zu einem mannigfaltigen Genpool; da sich der Polymorphismus der STR-Marker zwischen den Völkern unterscheidet, können auf bestimmte ethnische Gruppen zugeschnittene Kits entwickelt werden, wie bereits für forensische Kits geschehen.

6 Zusammenfassung

Die allogene Stammzelltransplantation ist ein Verfahren zur Therapie verschiedener maligner und nicht-maligner hämatologischer Erkrankungen. Da es sich um eine sehr aufwendige Therapie handelt, sind Methoden, die den Behandlungsverlauf dokumentieren, wie minimale Resterkrankung und Chimärismusanalyse, essentiell.

Eine nach Stammzelltransplantation vollständig vom Spender abgeleitete Hämatopoese ist Voraussetzung für das *Engraftment* und die Prophylaxe eines Rezidivs der zugrundeliegenden Erkrankung. Die qualitative und quantitative Untersuchung der donor- und rezipientenspezifischen Zellen wird als Chimärismusanalyse bezeichnet. Chimärismusuntersuchungen sind deshalb zur Identifizierung und Prognose einer erfolgreichen Stammzelltransplantation von großer Bedeutung.

Die Identifizierung oder Diskriminierung der Spender- und Empfängerzellen anhand ihres genetischen Aufbaus ist das zugrundeliegende Prinzip der Chimärismusanalyse.

In den letzten Jahren wurden verschiedene Methoden wie Erythrozytenphänotypisierung, RFLP (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus) und FISH (Fluoreszenz in situ Hybridisation) sowie die quantitative real-time PCR zur Chimärismusanalyse etabliert. Die Bestimmung des Genotyps mittels der STR-PCR mit fluoreszenzmarkierten Sonden und anschließender Auftrennung durch Kapillarelektrophorese wird als erfolgreichste und stabilste Methode zur Detektion des Chimärismus angesehen.

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde ein aus der forensischen Medizin zur Identifizierung des genetischen Fingerabdrucks bekanntes STR-Primersystem bestehend aus 15 Markern und das zur Geschlechtsdifferenzierung verwendete Amelogenin für die quantitative und qualitative Chimärismusdiagnostik nach allogener Stammzelltransplantation etabliert. Die Informativität wurde mittels eines durch das Eurochimärismus-Konsortium festgelegten „RSD-Codes“ ermittelt. Die 15 hier getesteten hochpolymorphen Marker konnten in 98,3% des Patientengutes präzise zwischen Donor und

Rezipient diskriminieren. Mit der STR-PCR ist unabhängig von Geschlecht, Blutgruppe und Grad der Übereinstimmung im HLA-System für annähernd jedes Patientenpaar eine Chimärismusanalyse nach Stammzelltransplantation möglich.

Die durchschnittliche Sensitivität der Multiplex-Marker wurde in Standardverdünnungsreihen ermittelt und variiert für jedes Patientenpaar zwischen 5,57 und 13,22% bei einem mittleren Detektionslimit von 8,74%.

Es zeigte sich, dass die Nachweisgrenze vom verwendeten Primer und dem zugehörigen Patientenpaar abhängt; die Bandbreite der einzelnen Primer bezüglich der Sensitivität reicht von 0,4% bis maximal 22,1%.

Für die uns durch das Eurochimärismus-Konsortium gesondert zugewiesenen Primer D3S1358 und D21S11 wurde in Standardverdünnungsreihen eine Sensitivität von 2,2 bis 16,4% ermittelt, bei einem durchschnittlichen Detektionslimit von 6,4%.

In unseren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Marker, die von einer *stutter peak* Formation betroffen sind sowie heterozygote Allelkonstellationen eine geringere durchschnittliche Sensitivität erzielen.

Bei der Auswertung der Ergebnisse muss daher durch einen erfahrenen Untersucher der passende Primer für das jeweilige Donor-/Rezipientenpaar gewählt werden.

Das aus der Forensik stammende Powerplex[®] 16 System ist eine informative und sensitive Methode für die Chimärismusdiagnostik, die auf nahezu alle Patienten angewendet werden kann. Es bietet einen schnellen Überblick über 15 STR-Marker, so dass eine aufwendige Primersuche mit diesem System entfällt.

7 Literaturverzeichnis

Reference List

1. Osgood,E.E., Riddle,M.C. & Mathews,T.J. Aplastic anemia treated with daily transfusions and intravenous marrow; case report. *Ann. Intern. Med.* **13**: 357-367, 357-3677 (1939).
2. FORD,C.E., HAMERTON,J.L., BARNES,D.W. & LOUITIT,J.F. Cytological identification of radiation-chimaeras. *Nature.* **177**, 452-454 (1956).
3. JACOBSON,L.O., MARKS,E.K., Robson,M.J., Gaston,E.O. & Zirkle,R.E. Effect of spleen protection on mortality following x-irradiation. *J. Clin. Med.* 34-1543 (1949).
4. LORENZ,E., UPHOFF,D., REID,T.R. & SHELTON,E. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J. Natl. Cancer Inst.* **12**, 197-201 (1951).
5. JACOBSON,L.O., SIMMONS,E.L., MARKS,E.K. & ELDREDGE,J.H. Recovery from radiation injury. *Science.* **113**, 510-511 (1951).
6. Murray,J.E., Merrill,J.P. & Harrison,J.H. Renal homotransplantation in identical twins. 1955. *J. Am. Soc. Nephrol.* **12**, 201-204 (2001).
7. THOMAS,E.D., LOCHTE,H.L., Jr., LU,W.C. & FERREBEE,J.W. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N. Engl. J. Med.* **257**, 491-496 (1957).
8. THOMAS,E.D., LOCHTE,H.L., Jr., CANNON,J.H., SAHLER,O.D. & FERREBEE,J.W. Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *J. Clin. Invest* **38**, 1709-1716 (1959).
9. Jansen,J. The first successful allogeneic bone-marrow transplant: Georges Mathe. *Transfus. Med. Rev.* **19**, 246-248 (2005).
10. DAUSSET,J. [Iso-leuko-antibodies.]. *Acta Haematol.* **20**, 156-166 (1958).
11. Janeway CA. Immunologie. 5.Auflage. Spektrum akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford, (2002).
12. Gadner. Pädiatrische Hämatologie und Onkologie. Springer Medizin Verlag, Heidelberg, (2006).
13. Van den Tweel JG. Immunologie: Das menschliche Abwehrsystem. Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH, Heidelberg, (1991).

14. Handgretinger, R. *et al.* Megadose transplantation of purified peripheral blood CD34(+) progenitor cells from HLA-mismatched parental donors in children. *Bone Marrow Transplant.* **27**, 777-783 (2001).
15. VAN, R.O.O.D. & VAN, L.E.E.U. LEUKOCYTE GROUPING. A METHOD AND ITS APPLICATION. *J. Clin. Invest* **42**, 1382-1390 (1963).
16. Gatti, R.A., Meuwissen, H.J., Allen, H.D., Hong, R. & Good, R.A. Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. *Lancet* **2**, 1366-1369 (1968).
17. THOMAS, E.D. *et al.* Allogeneic marrow grafting using HL-A matched donor-recipient sibling pairs. *Trans. Assoc. Am. Physicians* **84**, 248-261 (1971).
18. Appelbaum, F.R. *et al.* Successful engraftment of cryopreserved autologous bone marrow in patients with malignant lymphoma. *Blood* **52**, 85-95 (1978).
19. Good, R.A. & Verjee, T. Historical and current perspectives on bone marrow transplantation for prevention and treatment of immunodeficiencies and autoimmunities. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **7**, 123-135 (2001).
20. Almici, C., Carlo-Stella, C., Wagner, J.E. & Rizzoli, V. Umbilical cord blood as a source of hematopoietic stem cells: from research to clinical application. *Haematologica* **80**, 473-479 (1995).
21. Broxmeyer, H.E. *et al.* Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **86**, 3828-3832 (1989).
22. Barker, J.N. *et al.* Survival after transplantation of unrelated donor umbilical cord blood is comparable to that of human leukocyte antigen-matched unrelated donor bone marrow: results of a matched-pair analysis. *Blood* **97**, 2957-2961 (2001).
23. Wagner, J.E. *et al.* Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. *Blood* **100**, 1611-1618 (2002).
24. Storb, R., Graham, T.C., Epstein, R.B., Sale, G.E. & THOMAS, E.D. Demonstration of hemopoietic stem cells in the peripheral blood of baboons by cross circulation. *Blood* **50**, 537-542 (1977).
25. Gianni, A.M. *et al.* Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to harvest circulating haemopoietic stem cells for autotransplantation. *Lancet* **2**, 580-585 (1989).

26. Malachowski,M.E., Comenzo,R.L., Hillyer,C.D., Tiegerman,K.O. & Berkman,E.M. Large-volume leukapheresis for peripheral blood stem cell collection in patients with hematologic malignancies. *Transfusion* **32**, 732-735 (1992).
27. Bensinger,W. *et al.* Autologous transplantation with peripheral blood mononuclear cells collected after administration of recombinant granulocyte stimulating factor. *Blood* **81**, 3158-3163 (1993).
28. Schmitz,N. *et al.* Primary transplantation of allogeneic peripheral blood progenitor cells mobilized by filgrastim (granulocyte colony-stimulating factor). *Blood* **85**, 1666-1672 (1995).
29. Storek,J. *et al.* Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation may be associated with a high risk of chronic graft-versus-host disease. *Blood* **90**, 4705-4709 (1997).
30. Bornhauser,M. *et al.* Allogeneic transplantation of G-CSF mobilized peripheral blood stem cells from unrelated donors: a retrospective analysis. *Haematologica* **85**, 839-847 (2000).
31. Marmont,A.M. *et al.* T-cell depletion of HLA-identical transplants in leukemia. *Blood* **78**, 2120-2130 (1991).
32. Platzbecker,U., Ehninger,G. & Bornhauser,M. Allogeneic transplantation of CD34+ selected hematopoietic cells--clinical problems and current challenges. *Leuk. Lymphoma* **45**, 447-453 (2004).
33. Hildebrandt,M., Serke,S., Meyer,O., Ebell,W. & Salama,A. Immunomagnetic selection of CD34+ cells: factors influencing component purity and yield. *Transfusion* **40**, 507-512 (2000).
34. Weisdorf,D.J. *et al.* Autologous versus unrelated donor allogeneic marrow transplantation for acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **90**, 2962-2968 (1997).
35. Gorin,N.C. *et al.* Retrospective evaluation of autologous bone marrow transplantation vs allogeneic bone marrow transplantation from an HLA identical related donor in acute myelocytic leukemia. A study of the European Cooperative Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Bone Marrow Transplant.* **18**, 111-117 (1996).
36. Soiffer,R.J. *et al.* Monoclonal antibody-purged autologous bone marrow transplantation in adults with acute lymphoblastic leukemia at high risk of relapse. *Bone Marrow Transplant.* **12**, 243-251 (1993).
37. THOMAS,E.D. Bone marrow transplantation: a review. *Semin. Hematol.* **36**, 95-103 (1999).

38. Hayes-Lattin,B., Leis,J.F. & Maziarz,R.T. Isolation in the allogeneic transplant environment: how protective is it? *Bone Marrow Transplant.* **36**, 373-381 (2005).
39. Ottinger,H.D., Beelen,D.W., Scheulen,B., Schaefer,U.W. & Grosse-Wilde,H. Improved immune reconstitution after allotransplantation of peripheral blood stem cells instead of bone marrow. *Blood* **88**, 2775-2779 (1996).
40. Bleakley,M. & Riddell,S.R. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 371-380 (2004).
41. Horowitz,M.M. *et al.* Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* **75**, 555-562 (1990).
42. Passweg,J.R. *et al.* Graft-versus-leukemia effects in T lineage and B lineage acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant.* **21**, 153-158 (1998).
43. Locatelli,F. *et al.* Graft versus host disease prophylaxis with low-dose cyclosporine-A reduces the risk of relapse in children with acute leukemia given HLA-identical sibling bone marrow transplantation: results of a randomized trial. *Blood* **95**, 1572-1579 (2000).
44. Ljungman,P. *et al.* Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: definitions and current practice in Europe. *Bone Marrow Transplant.* **37**, 439-449 (2006).
45. Storb,R., Rudolph,R.H. & THOMAS,E.D. Marrow grafts between canine siblings matched by serotyping and mixed leukocyte culture. *J. Clin. Invest* **50**, 1272-1275 (1971).
46. Willasch,A. *et al.* Outcome of allogeneic stem cell transplantation in children with non-malignant diseases. *Haematologica* **91**, 788-794 (2006).
47. Niethammer,D. [Bone marrow transplantation in children and adolescents]. *Monatsschr. Kinderheilkd.* **136**, 297-304 (1988).
48. Reddy,P. Pathophysiology of acute graft-versus-host disease. *Hematol. Oncol.* **21**, 149-161 (2003).
49. Wingard,J.R. Infections in allogeneic bone marrow transplant recipients. *Semin. Oncol.* **20**, 80-87 (1993).
50. Lehrnbecher,T. [Intravenous immunoglobulins in the prevention of infection in children with hematologic-oncologic diseases]. *Klin. Padiatr.* **213 Suppl 1**, A103-A105 (2001).

51. Feuchtinger,T., Lang,P. & Handgretinger,R. Adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Leuk. Lymphoma* **48**, 244-255 (2007).
52. Angarone,M. & Ison,M.G. Prevention and early treatment of opportunistic viral infections in patients with leukemia and allogeneic stem cell transplantation recipients. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* **6**, 191-201 (2008).
53. Feuchtinger,T. *et al.* Clinical grade generation of hexon-specific T cells for adoptive T-cell transfer as a treatment of adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *J. Immunother.* **31**, 199-206 (2008).
54. Zupanic-Krmek,D. & Nemet,D. [Systemic fungal infections in immunocompromised patients]. *Acta Med. Croatica* **58**, 251-261 (2004).
55. Ades,L., Guardiola,P. & Socie,G. Second malignancies after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: new insight and current problems. *Blood Rev.* **16**, 135-146 (2002).
56. Deeg,H.J. & Socie,G. Malignancies after hematopoietic stem cell transplantation: many questions, some answers. *Blood* **91**, 1833-1844 (1998).
57. Lowe,T., Bhatia,S. & Somlo,G. Second malignancies after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **13**, 1121-1134 (2007).
58. Ranke,M.B. *et al.* Late effects after stem cell transplantation (SCT) in children--growth and hormones. *Bone Marrow Transplant.* **35 Suppl 1**, S77-S81 (2005).
59. Socie,G. *et al.* Nonmalignant late effects after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* **101**, 3373-3385 (2003).
60. Fraser,C.J. & Scott,B.K. The management and outcome of chronic graft-versus-host disease. *Br. J. Haematol.* **138**, 131-145 (2007).
61. Joseph,R.W., Couriel,D.R. & Komanduri,K.V. Chronic graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation: challenges in prevention, science, and supportive care. *J. Support. Oncol.* **6**, 361-372 (2008).
62. Beck,J.F. *et al.* [Relapse of childhood ALL, AML and MDS after allogeneic stem cell transplantation can be prevented by donor lymphocyte infusion in a critical stage of increasing mixed chimerism]. *Klin. Padiatr.* **214**, 201-205 (2002).
63. Giralt,S.A. & Champlin,R.E. Leukemia relapse after allogeneic bone marrow transplantation: a review. *Blood* **84**, 3603-3612 (1994).

64. Woolfrey,A.E. *et al.* Factors associated with outcome after unrelated marrow transplantation for treatment of acute lymphoblastic leukemia in children. *Blood* **99**, 2002-2008 (2002).
65. Muller,M.R., Thomale,J., Rajewsky,M.F. & Seeber,S. Drug resistance and DNA repair in leukaemia. *Cytotechnology* **27**, 175-185 (1998).
66. Stankovic,T. & Marston,E. Molecular mechanisms involved in chemoresistance in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Srp. Arh. Celok. Lek.* **136**, 187-192 (2008).
67. Bertino,J.R., Goker,E., Gorlick,R., Li,W.W. & Banerjee,D. Resistance Mechanisms to Methotrexate in Tumors. *Oncologist.* **1**, 223-226 (1996).
68. Rhee,M.S., Wang,Y., Nair,M.G. & Galivan,J. Acquisition of resistance to antifolates caused by enhanced gamma-glutamyl hydrolase activity. *Cancer Res.* **53**, 2227-2230 (1993).
69. Bader,P. *et al.* Serial and quantitative analysis of mixed hematopoietic chimerism by PCR in patients with acute leukemias allows the prediction of relapse after allogeneic BMT. *Bone Marrow Transplant.* **21**, 487-495 (1998).
70. Bader,P. *et al.* Characterization of lineage-specific chimaerism in patients with acute leukaemia and myelodysplastic syndrome after allogeneic stem cell transplantation before and after relapse. *Br. J. Haematol.* **108**, 761-768 (2000).
71. Bader,P. *et al.* Minimal residual disease (MRD) status prior to allogeneic stem cell transplantation is a powerful predictor for post-transplant outcome in children with ALL. *Leukemia* **16**, 1668-1672 (2002).
72. McCann,S.R., Crampe,M., Molloy,K. & Lawler,M. Hemopoietic chimerism following stem cell transplantation. *Transfus. Apher. Sci.* **32**, 55-61 (2005).
73. Doney,K. *et al.* Treatment of adult acute lymphoblastic leukemia with allogeneic bone marrow transplantation. Multivariate analysis of factors affecting acute graft-versus-host disease, relapse, and relapse-free survival. *Bone Marrow Transplant.* **7**, 453-459 (1991).
74. Goulden,N. *et al.* Minimal residual disease prior to stem cell transplant for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br. J. Haematol.* **122**, 24-29 (2003).
75. Blau,I.W. *et al.* Second allogeneic hematopoietic stem cell transplantation as treatment for leukemia relapsing following a first transplant. *Bone Marrow Transplant.* **25**, 41-45 (2000).

76. Mortimer, J. *et al.* Relapse of acute leukemia after marrow transplantation: natural history and results of subsequent therapy. *J. Clin. Oncol.* **7**, 50-57 (1989).
77. Rivera, G.K. *et al.* Effectiveness of intensified rotational combination chemotherapy for late hematologic relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **88**, 831-837 (1996).
78. Uderzo, C. *et al.* Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia after the first relapse: curative strategies. *Haematologica* **86**, 1-7 (2001).
79. Shaw, B.E. *et al.* Outcome of second allogeneic transplants using reduced-intensity conditioning following relapse of haematological malignancy after an initial allogeneic transplant. *Bone Marrow Transplant.* **42**, 783-789 (2008).
80. Grulich, C., Bertz, H., Spyridonidis, A., Muller, C.I. & Finke, J. A fludarabine, thiotepa reduced toxicity conditioning regimen designed specifically for allogeneic second haematopoietic cell transplantation after failure of previous autologous or allogeneic transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **41**, 845-850 (2008).
81. Kolb, H.J. & Holler, E. Adoptive immunotherapy with donor lymphocyte transfusions. *Curr. Opin. Oncol.* **9**, 139-145 (1997).
82. Loren, A.W. & Porter, D.L. Donor leukocyte infusions for the treatment of relapsed acute leukemia after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **41**, 483-493 (2008).
83. Alyea, E.P. Modulating graft-versus-host disease to enhance the graft-versus-leukemia effect. *Best. Pract. Res. Clin. Haematol.* **21**, 239-250 (2008).
84. Bader, P. *et al.* Prevention of relapse in pediatric patients with acute leukemias and MDS after allogeneic SCT by early immunotherapy initiated on the basis of increasing mixed chimerism: a single center experience of 12 children. *Leukemia* **13**, 2079-2086 (1999).
85. Stachel, D.K. *et al.* Simultaneous control of third-degree graft-versus-host disease and prevention of recurrence of juvenile myelomonocytic leukemia (JMML) with 6-mercaptopurine following fulminant JMML relapse early after KIR-mismatched bone marrow transplantation. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **27**, 672-674 (2005).
86. Mutis, T. *et al.* Feasibility of immunotherapy of relapsed leukemia with ex vivo-generated cytotoxic T lymphocytes specific for hematopoietic system-restricted minor histocompatibility antigens. *Blood* **93**, 2336-2341 (1999).

87. Pui,C.H. & Campana,D. New definition of remission in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **14**, 783-785 (2000).
88. Szczepanski,T., Orfao,A., Van,D.V., V, San Miguel,J.F. & van Dongen,J.J. Minimal residual disease in leukaemia patients. *Lancet Oncol.* **2**, 409-417 (2001).
89. Dworzak,M.N. *et al.* Detection of residual disease in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia by comparative phenotype mapping: a study of five cases controlled by genetic methods. *Exp. Hematol.* **27**, 673-681 (1999).
90. Kerst,G. *et al.* Concurrent detection of minimal residual disease (MRD) in childhood acute lymphoblastic leukaemia by flow cytometry and real-time PCR. *Br. J. Haematol.* **128**, 774-782 (2005).
91. de,H., V *et al.* The TEL-AML1 real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) might replace the antigen receptor-based genomic PCR in clinical minimal residual disease studies in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Br. J. Haematol.* **116**, 87-93 (2002).
92. Oehler,V.G. & Radich,J.P. Monitoring bcr-abl by polymerase chain reaction in the treatment of chronic myeloid leukemia. *Curr. Oncol. Rep.* **5**, 426-435 (2003).
93. 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.* **35**, 107-119 (2005).
94. Bader,P., Willasch,A. & Klingebiel,T. Monitoring of post-transplant remission of childhood malignancies: is there a standard? *Bone Marrow Transplant.* **42 Suppl 2**, S31-S34 (2008).
95. Beck,O. *et al.* Quantification of chimerism within peripheral blood, bone marrow and purified leukocyte subsets: comparison of singleplex and multiplex PCR amplification of short tandem repeat (STR) loci. *Eur. J. Haematol.* **76**, 237-244 (2006).
96. Jolkowska,J. *et al.* Hematopoietic chimerism after allogeneic stem cell transplantation: a comparison of quantitative analysis by automated DNA sizing and fluorescent in situ hybridization. *BMC. Blood Disord.* **5**, 1 (2005).
97. Schopfer,P. Pflanzenphysiologie. Elsevier, München, (2006).
98. Liesveld,J.L. & Rothberg,P.G. Mixed chimerism in SCT: conflict or peaceful coexistence? *Bone Marrow Transplant.* **42**, 297-310 (2008).
99. Lion,T. Detection of impending graft rejection and relapse by lineage-specific chimerism analysis. *Methods Mol. Med.* **134**, 197-216 (2007).

100. Khan,F., Agarwal,A. & Agrawal,S. Significance of chimerism in hematopoietic stem cell transplantation: new variations on an old theme. *Bone Marrow Transplant.* **34**, 1-12 (2004).
101. Yam,P.Y. *et al.* Use of DNA restriction fragment length polymorphisms to document marrow engraftment and mixed hematopoietic chimerism following bone marrow transplantation. *Transplantation* **43**, 399-407 (1987).
102. Schaap,N. *et al.* Red blood cell phenotyping is a sensitive technique for monitoring chronic myeloid leukaemia patients after T-cell-depleted bone marrow transplantation and after donor leucocyte infusion. *Br. J. Haematol.* **108**, 116-125 (2000).
103. Seong,C.M. *et al.* Early detection of relapse by hypermetaphase fluorescence in situ hybridization after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* **18**, 1831-1836 (2000).
104. Hibi,S. *et al.* Chimerism analysis on mononuclear cells in the CSF after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **20**, 503-506 (1997).
105. Bertheas,M.F. *et al.* Partial chimerism after T-cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation in leukemic HLA-matched patients: a cytogenetic documentation. *Blood* **72**, 89-93 (1988).
106. Elmaagacli,A.H. *et al.* Detection of minimal residual disease and persistence of host-type hematopoiesis: a study in 28 patients after sex-mismatched, non-T cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation for Philadelphia-chromosome positive chronic myelogenous leukemia. *Bone Marrow Transplant.* **16**, 823-829 (1995).
107. Choi,S.J. *et al.* Prognostic value of hematopoietic chimerism in patients with acute leukemia after allogeneic bone marrow transplantation: a prospective study. *Bone Marrow Transplant.* **26**, 327-332 (2000).
108. Alizadeh,M. *et al.* Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Blood* **99**, 4618-4625 (2002).
109. Schumm,M. *et al.* Flow cytometry with anti HLA-antibodies: a simple but highly sensitive method for monitoring chimerism and minimal residual disease after HLA-mismatched stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **39**, 767-773 (2007).
110. Watanabe,N. *et al.* Recipient-derived cells after cord blood transplantation: dynamics elucidated by multicolor FACS, reflecting graft failure and relapse. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **14**, 693-701 (2008).

111. Chalandon,Y., Vischer,S., Helg,C., Chapuis,B. & Roosnek,E. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by PCR amplification of microsatellite markers and capillary electrophoresis with fluorescence detection: the Geneva experience. *Leukemia* **17**, 228-231 (2003).
112. Jolkowska,J., Wachowiak,J., Lange,A., Kwissa,M. & Witt,M. Molecular assessment of post-BMT chimerism using various biologic specimens and automated DNA sizing technology. *J. Hematother. Stem Cell Res.* **9**, 263-268 (2000).
113. Kreyenberg,H., Holle,W., Mohrle,S., Niethammer,D. & Bader,P. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by PCR amplification of microsatellite markers and capillary electrophoresis with fluorescence detection: the Tuebingen experience. *Leukemia* **17**, 237-240 (2003).
114. Mackinnon,S., Barnett,L., Heller,G. & O'Reilly,R.J. Minimal residual disease is more common in patients who have mixed T-cell chimerism after bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Blood* **83**, 3409-3416 (1994).
115. van Leeuwen,J.E. *et al.* Mixed T-lymphoid chimerism after allogeneic bone marrow transplantation for hematologic malignancies of children is not correlated with relapse. *Blood* **82**, 1921-1928 (1993).
116. Bader,P. *et al.* Mixed hematopoietic chimerism after allogeneic bone marrow transplantation: the impact of quantitative PCR analysis for prediction of relapse and graft rejection in children. *Bone Marrow Transplant.* **19**, 697-702 (1997).
117. Mattsson,J., Uzunel,M., Tammik,L., Aschan,J. & Ringden,O. Leukemia lineage-specific chimerism analysis is a sensitive predictor of relapse in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia* **15**, 1976-1985 (2001).
118. Ramirez,M. *et al.* Chimerism after allogeneic hematopoietic cell transplantation in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant.* **18**, 1161-1165 (1996).
119. Alford,R.L., Hammond,H.A., Coto,I. & Caskey,C.T. Rapid and efficient resolution of parentage by amplification of short tandem repeats. *Am. J. Hum. Genet.* **55**, 190-195 (1994).
120. Talwar,S., Khan,F., Nityanand,S. & Agrawal,S. Chimerism monitoring following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **39**, 529-535 (2007).

121. Tilanus,M.G. Short tandem repeat markers in diagnostics: what's in a repeat? *Leukemia* **20**, 1353-1355 (2006).
122. Beutler,E., Gelbart,T. & Kuhl,W. Interference of heparin with the polymerase chain reaction. *Biotechniques* **9**, 166 (1990).
123. Löffler,G. Biochemie und Pathobiochemie. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, (1998).
124. Landers,J.P. Capillary electrophoresis: pioneering new approaches for biomolecular analysis. *Trends Biochem. Sci.* **18**, 409-414 (1993).
125. Watzinger,F., Lion,T. & Steward,C. The RSD code: proposal for a nomenclature of allelic configurations in STR-PCR-based chimerism testing after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia* **20**, 1448-1452 (2006).
126. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation using multiplex PCR amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection. *Leukemia* **15**, 303-306 (2001).
127. Kolb,H.J. Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood* **112**, 4371-4383 (2008).
128. Storb,R. Mixed allogeneic chimerism and graft-versus-leukemia effects in acute myeloid leukemia. *Leukemia* **16**, 753-754 (2002).
129. Pulsipher,M.A., Bader,P., Klingebiel,T. & Cooper,L.J. Allogeneic transplantation for pediatric acute lymphoblastic leukemia: the emerging role of peritransplantation minimal residual disease/chimerism monitoring and novel chemotherapeutic, molecular, and immune approaches aimed at preventing relapse. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **15**, 62-71 (2009).
130. Konrad,M. *et al.* Late relapses evolve from slow-responding subclones in t(12;21)-positive acute lymphoblastic leukemia: evidence for the persistence of a preleukemic clone. *Blood* **101**, 3635-3640 (2003).
131. Bader,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.* **22**, 1696-1705 (2004).
132. Bader,P. *et al.* Quantitative assessment of mixed hematopoietic chimerism by polymerase chain reaction after allogeneic BMT. *Anticancer Res.* **16**, 1759-1763 (1996).
133. Dubovsky,J. *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* **13**, 2059, 2060-2059, 2069 (1999).

134. Lawler, M. *et al.* Serial chimerism analyses indicate that mixed haemopoietic chimerism influences the probability of graft rejection and disease recurrence following allogeneic stem cell transplantation (SCT) for severe aplastic anaemia (SAA): indication for routine assessment of chimerism post SCT for SAA. *Br. J. Haematol.* **144**, 933-945 (2009).
135. Bader, P. *et al.* Additional immunotherapy on the basis of increasing mixed hematopoietic chimerism after allogeneic BMT in children with acute leukemia: is there an option to prevent relapse? *Bone Marrow Transplant.* **20**, 79-81 (1997).
136. Bader, P. *et al.* Monitoring of donor cell chimerism for the detection of relapse and early immunotherapeutic intervention in acute lymphoblastic leukemias. *Ann. Hematol.* **81 Suppl 2**, S25-S27 (2002).
137. Millson, A.S., Spangler, F.L., Wittwer, C.T. & Lyon, E. Comparison of automated short tandem repeat and manual variable number of tandem repeat analysis of chimerism in bone marrow transplant patients. *Diagn. Mol. Pathol.* **9**, 91-97 (2000).
138. Dahmen, U.M., Boettcher, M., Krawczyk, M. & Broelsch, C.E. Flow cytometric "rare event analysis": a standardized approach to the analysis of donor cell chimerism. *J. Immunol. Methods* **262**, 53-69 (2002).
139. Scharf, S.J., Smith, A.G., Hansen, J.A., McFarland, C. & Erlich, H.A. Quantitative determination of bone marrow transplant engraftment using fluorescent polymerase chain reaction primers for human identity markers. *Blood* **85**, 1954-1963 (1995).
140. Thiede, C. *et al.* Sequential monitoring of chimerism and detection of minimal residual disease after allogeneic blood stem cell transplantation (BSCT) using multiplex PCR amplification of short tandem repeat-markers. *Leukemia* **15**, 293-302 (2001).
141. Walsh, P.S., Erlich, H.A. & Higuchi, R. Preferential PCR amplification of alleles: mechanisms and solutions. *PCR Methods Appl.* **1**, 241-250 (1992).
142. Thiede, C. *et al.* Rapid quantification of mixed chimerism using multiplex amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection. *Bone Marrow Transplant.* **23**, 1055-1060 (1999).
143. Thiede, C., Bornhauser, M. & Ehninger, G. Evaluation of STR informativity for chimerism testing--comparative analysis of 27 STR systems in 203 matched related donor recipient pairs. *Leukemia* **18**, 248-254 (2004).
144. Schichman, S.A., Suess, P., Vertino, A.M. & Gray, P.S. Comparison of short tandem repeat and variable number tandem repeat genetic

- markers for quantitative determination of allogeneic bone marrow transplant engraftment. *Bone Marrow Transplant.* **29**, 243-248 (2002).
145. Bryant E & Martin PJ. Documentation of engraftment and characterization of chimerism following hematopoietic cell transplantation. In: Thomas ED, Blume KG, Forman SJ (eds). Hematopoietic Cell Transplantation. Blackwell Science: Boston, (1999).
146. Antin, J.H. *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. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **7**, 473-485 (2001).
147. Frankel, W. *et al.* Detection of chimerism and early engraftment after allogeneic peripheral blood stem cell or bone marrow transplantation by short tandem repeats. *Am. J. Hematol.* **52**, 281-287 (1996).
148. Nuckols, J.D., Rasheed, B.K., McGlennen, R.C., Bigner, S.H. & Stenzel, T.T. Evaluation of an automated technique for assessment of marrow engraftment after allogeneic bone marrow transplantation using a commercially available kit. *Am. J. Clin. Pathol.* **113**, 135-140 (2000).
149. Nollet, F., Billiet, J., Selleslag, D. & Criel, A. Standardisation of multiplex fluorescent short tandem repeat analysis for chimerism testing. *Bone Marrow Transplant.* **28**, 511-518 (2001).
150. Fundia, A.F., De Brasi, C. & Larripa, I. Feasibility of a cost-effective approach to evaluate short tandem repeat markers suitable for chimerism follow-up. *Mol. Diagn.* **8**, 87-91 (2004).
151. Beigel A. Vergleichende Untersuchungen zweier Primersysteme zur PCR-gestützten Analyse des hämatopoetischen Chimärismus nach allogener Stammzelltransplantation. (2004).

8 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Peter Bader danke ich sehr herzlich für die Bereitstellung des Themas, die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die kompetente fachliche Betreuung und Geduld, die diese Arbeit ermöglichten.

Meinem Betreuer Dr. rer. nat. Herrmann Kreyenberg danke ich für die Vermittlung der Labortechniken, die humorvollen Ratschläge und die Möglichkeit, mich mit meiner Vielfalt an Fragen jederzeit an ihn wenden zu können.

Den MTA Bettina Baden, Lena Daiker, Regina Kusyschyn †, Irene Metzdorf, Maria Pechan und Claudia Zürcher danke ich für die hervorragende Unterstützung bei der Durchführung der Experimente, die gute Organisation sowie die freundliche Arbeitsatmosphäre im Chimärismuslabor.

Dres. med. Walter Hölle, Martin R. Müller, Matthias Pfeiffer und Andre Willasch danke ich für die vielen Ratschläge, Tipps und aufmunternden Worte.

Meinen Eltern Kornelia und Christoph danke ich von ganzem Herzen, dass sie mir dieses Studium ermöglicht haben. Ihr vermittelte mir stets, was wichtig im Leben ist. Für Eure unendliche Liebe, Fürsorge, Motivation und Geduld.

Meinem langjährigen Lebensgefährten Wolfgang danke ich herzlich für die wunderschönen 16 Jahre, die wir zusammen verbracht haben, für unsere unvergesslichen Bussleurlaube! Dafür, dass Du immer für mich da bist, sowie für die unermüdliche Unterstützung und Toleranz, die Du mir während Studium und Dissertation entgegengebracht hast. Und natürlich für unsere umwerfenden Söhne Lasse und Max!

Meinen Söhnen Lasse und Max für ihr bezauberndes Lachen und ihre Fröhlichkeit, die mein Herz höher schlagen lassen!

8 Danksagung

Meinen Geschwistern Sarah, Lisa, Ruben und Manuel danke ich für unsere gemeinsamen, abwechslungsreichen und lustigen Zeiten zu Hause und dass sie mich auch in anstrengenderen Phasen meines Studiums tapfer ertragen haben.

Meinem verstorbenen Großvater Hans, der meinen Wunsch, Medizinerin zu werden, gefestigt hat. Wie sehr würde ich mir wünschen, er könnte heute daran Anteil nehmen.

Meiner Großmutter Franziska danke ich von Herzen für Ihr Interesse an meiner Arbeit, fürs Korrekturlesen bezüglich Rechtschreibung/Grammatik und ihre intellektuelle Anteilnahme an meinem Leben.

Meinen Großeltern Brunhilde und Josef danke ich für ihre liebevolle Begleitung seit meinen ersten Lebenstagen sowie ihre Unterstützung in geistiger und materieller Weise und durch ihr Gebet.

Ralf Holz danke ich für das - in vielfältiger Weise - zugewandte Interesse in den vergangenen Jahren.

Meinen Schwiegereltern Elfriede und Richard: für die herzliche Aufnahme in Ihre Familie und die fürsorgliche Unterstützung während meines Studiums. Dafür, dass sie mir die abschließende Arbeit an meiner Dissertation durch ihre liebevolle Betreuung meiner Söhne ermöglichten.

Ina Majer danke ich für unsere wunderschöne Freundschaft, die gemeinsamen Urlaube und dafür, dass Du immer für mich da bist.

Meinen Freundinnen Regine Arnold, Sina Herzog, Anita Patel, Susanne Schmidt und Birgit Weiß für eine unvergessliche, fröhliche Studienzeit, das Lernen im Theologicum, die Superfitness-Besuche und unsere gemeinsamen, schönen Ferientage im Schnee und in der Sonne.

8 Danksagung

Martin Lämmle danke ich für eine unvergessliche, gemeinsame Studienzeit in Tübingen.

Anne Karlin danke ich für unsere seit Babytagen bestehende Freundschaft! Fürs Zuhören, die vielseitigen Internet-Recherchen und die perfekte Verköstigung.

Hana Isijanov für ihre Ratschläge, Motivation, unsere Freundschaft und für die schönen gemeinsamen Stunden, in der Hoffnung, bald wieder mehr Zeit miteinander verbringen zu können.

Ana-Sofia Mateus danke ich für unsere seit vielen Jahren bestehende herzliche, interkulturelle Freundschaft.

Meiner Tante Nika Winkels danke ich herzlich fürs schnelle Korrekturlesen sowie die Tipps hinsichtlich der formalen Gestaltung der Arbeit.

Christian Braun, Marc Grohne und Bernd Möck danke ich für die Lösung der Formatierungsprobleme.

Meiner Freundin und Kollegin Regina Braun danke ich für unsere schöne, gemeinsame Zeit auf verschiedenen Stationen.

Pascal Seitz für die Korrektur des Abstracts und die Einführung in den Zürcher Ausgang.

Tamara Brenner für ihre netten Besuche und fürs Babysitten; Du wärst sicher auch eine sehr gute Kinderkrankenschwester geworden!

Elsemiek van der Kaaden und Christoph Tuor für die wunderschöne und lehrreiche Unterassistentzeit in Zürich.

8 Danksagung

Meiner Wohngemeinschaft während des Studiums: Christine Allmendinger, Gabriele Frick, Anja Mutschler und Michael Scheible für die schöne WG-Zeit, unsere Feste und gemeinsamen Stunden auf der Terasse.

Meiner Jugendgruppe Marion Diehl, Eas und Nicole Pflüger, Andreas Buchmann, Katrin Apelt, Martin und Ursula Pflüger, Petra Herrle, Jürgen und Gabi Thienwiebel für unsere abwechslungsreichen, netten Hüttendienste, Pfingstcamps und Skiurlaube.

Abschließend bedanke ich mich von Herzen bei allen, die mir bei dieser Arbeit Unterstützung schenkten und die natürlich nicht vergessen sind.

9 Curriculum vitae

Persönliche Daten

Stefanie Joachim, geboren am 26.09.1976 in Karlsruhe

Schulbildung

1983 - 1987	Matthäus-Beger-Schule (Grundschule) in Reutlingen
1987 - 1996	Isolde-Kurz-Gymnasium in Reutlingen, Abschluss der allgemeinen Hochschulreife
09-12/1997	Auslandsaufenthalt in Südamerika
01-03/1997	Pflegepraktikum an der Universitätsfrauenklinik Tübingen
04-06/1997	Praktikum im Bauingenieurbüro „Nebgen und Partner“ in Reutlingen
07-09/1997	Beschäftigung bei der Firma Bosch, Reutlingen
10/1997 - 06/1997	Praktikum bei „Riehle+Partner Architekten“ in Reutlingen

Hochschulbildung

10/1998 - 05/2005	Studium der Medizin an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen
08/2000	Physikum
08/2001	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2004	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
12/05/2005	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr

04/2004 - 08/2004	Pädiatrie an der Universitätskinderklinik Tübingen
08/2004 - 11/2004	Innere Medizin am Universitätsspital Zürich
12/2004 - 03/2005	Chirurgie am Universitätsspital Zürich

Ärztliche Tätigkeit

Seit 10/2005	Ärztin an der Universitätskinderklinik Tübingen (Abteilung I, Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie, Onkologie)
07/2006 - 12/2006	Abteilung IV (Neonatologie)
01/2007- 06/2007	Grundlagenforschung: Antigen-spezifische T-Zellen gegen tumorassoziierte Antigene beim Neuroblastom; Labor für Immuntherapie, Leitung: Dr. med. T. Feuchtinger;

9 Curriculum vitae

Publikation: Feuchtinger T, Richard C, Joachim S, Scheible MH, Schumm M, Hamprecht K, Martin D, Jahn G, Handgretinger R, Lang P. Clinical grade generation of hexon-specific T cells for adoptive T-cell transfer as a treatment of adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. J Immunother. 2008 Feb-Mar;31(2):199-206

07/2007 - 02/2008 Abteilung III (Neuropädiatrie)
03/2008 - 09/2008 Abteilung V (Kinderchirurgie)
10/2008 - 03/2009 Abteilung II (Kinderkardiologie, päd. Intensivmedizin)
04/2009 - 07/2009 durch Schwangerschaft bedingtes Beschäftigungsverbot
seit 08/2009 Geburt meiner Söhne Lasse Finn und Max Carlo;
Mutterschutz und Elternzeit