

## 10. MONITORING NACH ALLOGENER STAMMZELLTRANSPLANTATION - CHIMÄRISMUSANALYSE UND BESTIMMUNG DER MINIMALEN RESTERKRANKUNG (MRD)

**Autoren:** Prof. Dr. med. Peter Bader, Frankfurt a. M.; Prof. Dr. med. Martin Bornhäuser, Dresden; Dr. med. Ulrich Grigoleit, Würzburg; Prof. Dr. med. Nicolaus Kröger, Hamburg.

*Version 1, Stand Juni 2016*

### 10.1 Einleitung

Ziel der allogenen Stammzelltransplantation ist es, das blutbildende System des Patienten durch ein funktionsfähiges Immun- und Hämatopoesesystem eines allogenen Stammzellspenders zu ersetzen. Ob dies gelingt, hängt von mehreren Faktoren ab: Hierzu zählen in erster Linie die Intensität des Konditionierungsregimes, die HLA-Identität zwischen Empfänger und Spender, sowie die Tatsache, ob das Transplantat in-vivo oder ex vivo T-Zell depletiert wurde. Ein vollständiges Anwachsen des Transplantates ist Voraussetzung für die Etablierung eines Graft-versus-Leukämie (GvL)-Effektes. So ist vor allem in der Frühphase nach allogener Stammzelltransplantation von großer Bedeutung, ob das Transplantat anwächst oder abgestoßen wird. Im weiteren Verlauf tritt die Frage nach dem Wiederauftreten der Grunderkrankung in den Vordergrund. In den vergangenen Dekaden wurden verschiedene molekularbiologisch basierte Methoden entwickelt, um sowohl den hämatopoietischen Chimärismus zu charakterisieren, als auch submikroskopisch messbare, minimale Resterkrankung (MRD) nachzuweisen.

### 10.2 Definitionen

Die genotypische Untersuchung der Hämatopoese nach Transplantation dient der Klärung der Frage, ob die regenerierte Blutbildung vom Empfänger oder vom Spender stammt und wird Chimärismusanalyse genannt. Der Begriff „Chimäre“ stammt aus der griechischen Mythologie. Von Homer wurde ein feuerspuckendes Monster mit einem Löwenkopf, einem Ziegenkörper und dem Schwanz einer Schlange beschrieben, die Lytia, eine Region Kleinasiens bedrohte und das schließlich vom altertümlichen Helden Bellerophon besiegt wurde. Der Begriff Chimäre wurde 1956 durch Ford et al. in die Transplantationsmedizin eingeführt; heute versteht man unter einer Chimäre einen Organismus der die DNA zweier unterschiedlicher Wesen in sich trägt. Dies ist nach einer allogenen Stammzelltransplantation der Fall, wenn das hämatopoietische System eines Patienten von einem anderen Menschen abstammt.

In Abhängigkeit des Erfolges der Transplantation können sich verschiedene Formen des hämatopoietischen Chimärismus entwickeln:

- vollständiger od. kompletter Chimärismus: die ges. blutbildenden Zellen stammen vom Spender ab
- transienter gemischter Chimärismus: in den ersten Wochen nach Transplantation stammt ein Teil der Blutzellen noch vom Empfänger (ca. 1-5%), bevor im weiteren Verlauf ein kompletter Spenderzellchimärismus eintritt
- stabiler gemischter (stable mixed) Chimärismus: nach der Transplantation findet sich ein gemischtes Profil mit unterschiedlichem Anteil von Spender- und Empfängerhämatopoese, welches jedoch über die Zeit stabil bleibt
- progressiver gemischter Chimärismus: es besteht ein gemischter Anteil von Spender und Empfängerhämatopoese, wobei der Spenderanteil kontinuierlich abnimmt
- Chimärismusverlust (loss of chimerism): es bestand zumindest ein teilweiser Spenderzellchimärismus der jedoch vollständig verloren gegangen ist (auch sekund. graft failure)
- Splitchimärismus: es sind nur Zellen einer Zelllinie vom Spender vorhanden, die übrigen Zellreihen stammen vom Empfänger ab

## 10.3 Methoden

Den heute zur Verfügung stehenden Methoden zur Chimärismusanalyse liegt das Prinzip zugrunde, phänotypische oder genotypische Unterschiede zwischen Spender- und Empfängerhämatopoese darzustellen. Hierzu stehen verschiedene Methoden zur Verfügung:

1. Zytogenetik oder Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH): X bzw Y-Chromosomen
2. Restriktionslängenfragment-Polymorphismus (RFLP)
3. Blutgruppenmerkmale
4. PCR- Methoden:
  - a. über polymorphe DNS Sequenzen, wie „Short Tandem Repeats“ (STR) oder „variable number of tandem repeats (VNTR)“ mit anschließender kapillarelektrophoretischer Auftrennung
  - b. quantitative real-time PCR über „single nucleotide polymorphisms SNP“ oder Insertionen oder Deletionen von kurzen DNS Abschnitten („Indel-polymorphism“)
  - c. digitale PCR

Während Blutgruppenmerkmale und RFLP heute nur noch wenig zum Einsatz kommen, hat die FISH-Bestimmung zwar einen Stellenwert bei der getrenntgeschlechtlicher Transplantation, weist jedoch nur eine Sensitivität von ca. 1% auf. Gegenwärtig stellt die PCR basierte Amplifikation der STR-Polymorphismen den Goldstandard für die Chimärismusanalyse dar. Die STR-Analyse findet auch in der forensischen Medizin oder in der Vaterschaftsanalytik Anwendung. Für eine sensitive Chimärismusanalyse aber müssen die gewählten Primerpaare optimiert werden, um eine ausreichende Sensitivität zu erreichen. Dies ist in der Regel mit kommerziell erhältlichen Multilokus-Amplifikationskits nicht möglich. Optimierte Testverfahren erlauben den Nachweis einer Minorzellpopulation von regelmäßig 0,1%; dies ist für den quantitativen Nachweis erforderlich.

Eine Steigerung der Sensitivität lässt sich bei allen Methoden durch eine vorherige Anreicherung von Zellsubpopulationen (Zelllinien) erreichen. Für die Analysen des linienspezifischen Chimärismus eignen sich die jeweiligen zellspezifischen Marker für T-, B-, NK- Zellen, für Granulozyten, erythropoetische Vorstufen, Plasmazellen oder aber auch die myeloischen Marker CD33 und CD34. Erfolgt eine Anreicherung bestimmter Zellsubpopulationen vor der Chimärismusanalyse so erhöht sich die Sensitivität zum Nachweis einer Minorpopulation von  $1 \times 10^{-2}$  bis auf  $1 \times 10^{-4}$ .

Eine ähnliche Sensitivität ( $10^{-4}$ ) kann auch mit Realtime-PCR basierten Verfahren erreicht werden. Die hohe Sensitivität der qPCR ist methodenbedingt auch mit einer begrenzten Genauigkeit im Bereich des gemischten Chimärismus (zwischen 90 und 10%) verbunden. Die Limitation konnte durch die Einführung der digitalen PCR in die Chimärismusdiagnostik überwunden werden.

## 10.4 Einsatz in der klinischen Nachsorge

### 10.4.1 Dokumentation des Engraftments

Mit Hilfe PCR basierter Detektionsverfahren ist es möglich, sehr geringe Zellzahlen zu analysieren. Dies ermöglicht es deshalb, das Anwachsen des Transplantates zu verfolgen und zu dokumentieren. Dies ist vor allem bei Patienten mit einem hohen Abstoßungsrisiko indiziert. Dazu gehören Patienten mit einer schweren aplastischen Anämie, Patienten die ein T-Zell depletiertes Transplantat erhalten und alle Patienten, die von einem nicht-passenden Spender transplantiert werden. Es konnte durch zahlreiche Untersuchungen belegt werden, dass durch wöchentliche Untersuchungen (diese können bereits ab der zweiten Woche beginnen) drohende Abstoßungen erkannt werden können. Bei diesen Hochrisikopatienten ist die Chimärismusanalyse in Zellsubpopulationen anzuraten. Dies gilt im Besonderen für die CD3+-T-Zellen sowie für CD3-/CD56+-NK-Zellen. Es wird empfohlen, im Rahmen haploidentischer, T-Zell depletierter Transplantationen den hämatopoetischen Chimärismus auch in der CD-3 Fraktion während des Zeitraumes des Engraftments bis zum Tag +28 zweimal wöchentlich zu untersuchen, um so frühe Abstoßungen zu erkennen.

Insgesamt gilt, dass spätestens zum Tag +28 durch eine Chimärismusanalyse die erfolgreiche Transplantation dokumentiert werden sollte, um bei einem fehlenden „Engraftment“ zeitnah weitere therapeutische Schritte einleiten zu können.

### 10.4.2 Rezidivfrüherkennung nach allogener Stammzelltransplantation

Für die Rezidivfrüherkennung nach allogener Stammzelltransplantation sind prinzipiell zwei verschiedene Methoden einsetzbar: 1. Charakterisierung des hämatopoetischen Chimärismus und 2. Analyse der minimalen Resterkrankung. Mittels MRD-Untersuchungen wird der maligne Zellklon direkt nachgewiesen; die Chimärismusanalyse weist hingegen in der Regel nicht-maligne Zellen der Hämatopoese nach. Es stehen für beide

Verfahren verschiedene PCR-basierte Methoden sowie die Immunphänotypisierung zur Verfügung.

#### 10.4.2.1 Bedeutung des hämatopoietischen Chimärismus für das Wiederauftreten der Grunderkrankung

Der molekulare Nachweis persistierender oder wiederauftretender autologer Zellen, kann sowohl überlebende Hämatopoese, Leukämieblasten und in seltenen Fällen auch beides darstellen. Chimärismusanalysen sind nur bedingt als MRD-Untersuchungen geeignet. Es konnte durch prospektive Untersuchungen bereits in den frühen 1990-iger Jahren nachgewiesen werden, dass ein gemischter Chimärismus häufig in hämatopoietischen Zellen entsteht, so zu einer Abschwächung des GvL-Effektes führt, und das Wiederauftreten der Grunderkrankung erleichtert. Es ist klar geworden, dass die Entwicklung des hämatopoietischen Chimärismus ein dynamischer Prozess ist. Aus diesem Grunde sollten Untersuchungen in kurzen Zeitintervallen vorgenommen werden, wenn mit diesen Aufschluss über das Rezidivrisiko gewonnen werden soll.

Durch serielle Chimärismusuntersuchungen konnten viele, zunächst vor allem pädiatrische, dann auch interistische Studien zweifelsfrei zeigen, dass Patienten mit einem gemischten Chimärismus ein deutlich gesteigertes Rezidivrisiko tragen. Auch konnte von diesen und weiteren Studien klar gezeigt werden, dass durch eine immuntherapeutische Intervention ein gemischter Chimärismus bei vielen Patienten zu einem vollständigen Spenderchimärismus konvertiert und so ein offenes Rezidiv verhindert werden konnte.

Sollten Chimärismusuntersuchungen im peripheren Blut zur Vorhersage eines Rezidivs durchgeführt werden, so sollten diese in den ersten 6 Monaten krankheitsadaptiert wöchentlich bis zweiwöchentlich, mindestens jedoch einmal pro Monat erfolgen.

Wie erwähnt, geben Chimärismusanalysen Aufschluss über Alloreaktivität und/oder Toleranzinduktion des Transplantates. Aufgrund der relativ geringen Sensitivität von etwa 1% zum Nachweis einer Minorfraktion, eignen sich Chimärismusuntersuchungen im gesamten peripheren Blut nicht als MRD-Marker. Zu diesem Zweck sollten, wenn möglich, andere Verfahren eingesetzt werden.

Die Interpretation des Chimärismus sollte jedoch immer im Kontext der Grundkrankheit und des Therapiezieles stehen. Bei nicht-malignen Erkrankungen, wie z.B. Aplastische Anämie, ist ein stabiler gemischter Chimärismus für den Transplantationserfolg ausreichend, während bei Patienten mit malignen hämatologischen Erkrankungen ein nicht kompletter Spenderzell-Chimärismus, wie oben beschrieben, mit der Entwicklung eines klinischen Rezidivs assoziiert ist.

#### 10.4.2.2 MRD-Bestimmung

Im Gegensatz zu den Chimärismusanalysen lassen sich bei der Untersuchung der minimalen Resterkrankung maligne Zellen direkt nachweisen. Dazu sollen MRD-Untersuchungen mit Methoden durchgeführt werden, die es erlauben, krankheitsspezifische Veränderungen der Zellen zu erfassen. Hierzu gehören:

1. PCR-basierte Methoden wie z.B. die Analyse der TCR- oder Immunglobulinschwerketten-(IG-) Rearrangements für Patienten mit ALL, Nachweis des BCR/ABL Fusionsproteins für Patienten mit CML und ALL, NPM1, FLT-3, RUNX1, MLL für einen Teil der Patienten mit AML, JAKV617F, MPL oder Calreticulin für MPN u.va.
2. Immunphänotypisierung mittels der Multiparameter-Immunphänotypisierung zum Nachweis verschiedenster leukämieassoziiertes Phänotypen.
3. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH): zum Nachweis bestehender chromo-somaler Abberationen, z.B. 5q, -7, +8 u.v. (NGS),
4. Sequenzierung über Sanger oder Next Generation Sequencing.

Mehrere prospektive Untersuchungen im Erwachsenen- und Kindesalter haben zweifelsfrei die Wichtigkeit dieser Untersuchungen nachgewiesen. Es ist unzweifelhaft, dass die Höhe der MRD zum Zeitpunkt der Transplantation vor allem bei ALL einen wesentlichen Einfluss auf das Überleben der Patienten hat. In den vergangenen Jahren konnten zudem mehrere Studie belegen, dass durch systematische Untersuchungen der MRD im Knochenmark nach allogener Stammzelltransplantation, das Rezidiv vorausgesagt werden kann. So können MRD-Untersuchungen nach Transplantation nunmehr klare Indikatoren für eine präemptive Therapie zur Verhinderung eines zytologisch manifesten Rezidivs sein. Durch die neuen Sequenziermethoden ist es heute bei der überwiegenden Anzahl der Patienten mit hämatologischen Erkrankungen möglich, einen spezifischen Krankheitsmarker zu detektieren.

Welche Untersuchungen durchgeführt werden sollen, hängt von der zugrunde liegenden Erkrankung ab. Ähnlich wie bei der Chimärismusbestimmung ist die Sensitivität der verschiedenen Untersuchungsmethoden unterschiedlich, aber für die Beurteilung des Befundes relevant.

Welche Methode auch immer eingesetzt wird, unabdingbare Voraussetzung für das Monitoring nach Transplantation sowohl mit Chimärismus- als auch MRD-Methoden ist deren Standardisierung und Qualitätssicherung. Bei entsprechender Durchführung erlauben Chimärismus und MRD-Untersuchungen nicht nur die Dokumentation des Engraftments und die Erfassung einer Transplantatabstoßung sondern auch die Rezidivfrüherkennung und ermöglichen so die Steuerung einer präemptiven bzw. früh interventionellen Rezidivtherapie.

---

### Literatur

Alizadeh M, Bernard M, Danic B, et al. Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Blood*. 2002;99:4618-4625.

Bader P, Kreyenberg H, Hoelle W, et al. Increasing mixed chimerism is an important prognostic factor for unfavorable outcome in children with acute lymphoblastic leukemia after allogeneic stem-cell transplantation: possible role for pre-emptive immunotherapy? *J Clin Oncol*. 2004;22:1696-1706.

Bader P, Niethammer D, Willasch A, Kreyenberg H, Klingebiel T. How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation? *Bone Marrow Transplant*. 2005;35:107-119.

Bader P, Kreyenberg H, Henze GHR, Eckert C, Reising M, Willasch A et al. Prognostic Value of Minimal Residual Disease Quantification Before Allogeneic Stem-Cell Transplantation in Relapsed Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: The ALL-REZ BFM Study Group. *Journal of Clinical Oncology*. 2009;27: 377-384.

Bader P, Kreyenberg H, von Stackelberg A, et al. Monitoring of minimal residual disease after allogeneic stem-cell transplantation in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia allows for the identification of impending relapse: results of the ALL-BFM-SCT 2003 trial. *J Clin Oncol*. 2015;33:1275-1284.

Bornhauser M, Oelschlaegel U, Platzbecker U, et al. Monitoring of donor chimerism in sorted CD34+ peripheral blood cells allows the sensitive detection of imminent relapse after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2009;94:1613-1617.

van Dongen JJ, van der Velden VH, Bruggemann M, Orfao A. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies. *Blood*. 2015;125: 3996-4009.

Fehse B, Chukhlovina A, Kuhlcke K, et al. Real-time quantitative Y chromosome-specific PCR (QYCS-PCR) for monitoring hematopoietic chimerism after sex-mismatched allogeneic stem cell transplantation. *J Hematother Stem Cell Res*. 2001;10:419-425.

Fu Y, Schroeder T, Zabelina T, et al. Postallogeneic monitoring with molecular markers detected by pretransplant next-generation or Sanger sequencing predicts clinical relapse in patients with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Eur J Haematol*. 2014;92:189-194.

Kröger N, Badbaran A, Holler E, et al. Monitoring of the JAK2-V617F mutation by highly sensitive quantitative real-time PCR after allogeneic stem cell transplantation in patients with myelofibrosis. *Blood*. 2007;109:1316-1321.

Kröger N, Bacher U, Bader P, et al. NCI First International Workshop on the Biology, Prevention, and Treatment of Relapse after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: report from the Committee on Disease-Specific Methods and Strategies for Monitoring Relapse following Allogeneic Stem Cell Transplantation. Part I: Methods, acute leukemias, and myelodysplastic syndromes. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010;16:1187-1211.

Lange T, Hubmann M, Burkhardt R, et al. Monitoring of WT1 expression in PB and CD34(+) donor chimerism of BM predicts early relapse in AML and MDS patients after hematopoietic cell transplantation with reduced-intensity conditioning. *Leukemia*. 2011;25:498-505.

Platzbecker U, Wermke M, Radke J, et al. Azacitidine for treatment of imminent relapse in MDS or AML patients after allogeneic HSCT: results of the RELAZA trial. *Leukemia*. 2012;26:381-389.

Stahl T, Bohme MU, Kroger N, Fehse B. Digital PCR to assess hematopoietic chimerism after allogeneic stem cell transplantation. *Exp Hematol*. 2015;43:462-468.

Thiede C, Bornhauser M, Oelschlaegel U, 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*. 2001;15:293-302.

Thiede C, Meyer RG, Bader B. Chimärismusanalysen. In: Herr W, Theobald M, Ehninger G, Einsele H, Meyer RG (eds). Hämatopoietische Stammzellen - Grundlagen und klinische Einsatzgebiete. *Deutscher Ärzte Verlag. Köln, 2015, pp 157-161.*

Walter RB, Buckley SA, Pagel JM, et al. Significance of minimal residual disease before myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation for AML in first and second complete remission. *Blood*. 2013;122:1813-1821.