

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Interdisziplinäre Klinik und Poliklinik für Stammzelltransplantation

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Axel R. Zander

Die Bedeutung des molekularen Chimärismus auf der Basis quantitativer PCR nach allogener Stammzelltransplantation bei akuter myeloischer Leukämie unter besonderer Berücksichtigung verschiedener Konditionierungsstrategien

Dissertation

**Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der medizinischen Fakultät der Universität
Hamburg**

vorgelegt von:

Bettina Maria Wiedemann aus München

Hamburg 2011

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 03.05.2011

Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. U. Bacher

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: PD Dr. I. Müller

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: PD Dr. F.A. Ayuketang

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG.....	5
1.1. Übersicht über die akute myeloische Leukämie.....	5
1.1.1. Pathogenese und Pathophysiologie.....	6
1.1.2. Diagnostik	8
1.1.3. Therapeutische Strategien.....	13
1.2. Allogene Stammzelltransplantation bei Akuten Leukämien	15
1.2.1. Verschiedene Konditionierungsstrategien	16
1.2.2. Komplikationen nach Transplantation.....	18
1.3. Chimärismus – Allgemeine Grundlagen und Definition	19
1.3.1. Andere Methoden zur Detektion einer Resterkrankung nach Transplantation: Genetische Marker	21
1.4. Arbeitshypothese und Zielsetzung der Arbeit	22
2. METHODEN UND MATERIAL	24
2.1. Studienaufbau und Patienten.....	24
2.1.1. Patienten	24
2.1.2. Studiendesign	25
2.2. Konditionierung vor allogener Stammzelltransplantation	28
2.3. Bestimmung des Chimärismus	30
2.3.1. Prinzip der quantitativen „real-time“ PCR (RQ-PCR) mittels Taqman®-Methode	31
2.4. Statistik	35
3. ERGEBNISSE.....	37
3.1. Deskriptive Statistik	37
3.1.1. Kollektiv	37
3.1.2. Standardkonditionierung und dosisreduzierte Konditionierung	42
3.2. Chimärismus	49
3.2.1. Vergleich des Chimärismus bei Standard- versus dosisreduzierter Konditionierung.....	49
3.2.2. Chimärismus-Dynamik und Rezidiv-Wahrscheinlichkeit	52

4. DISKUSSION.....	56
4.1. PCR-Methodik	56
4.2. Standard- und dosisreduzierte Konditionierung	57
4.3. Ursachen und Bedeutung der Chimärismus-Diagnostik	58
4.4. Vergleich der Konditionierungsgruppen	58
4.5. Ergebnisse der Chimärismuskodynamik im Vergleich zwischen den Konditionierungsgruppen. 61	
4.5.1. Vergleich der Chimärismuswerte über den Zeitraum von 24 Monaten.....	61
4.5.2. Etablierung des Spenderchimärismus.....	61
4.6. Aussage des Chimärismus im Hinblick auf Rezidivwahrscheinlichkeit	63
4.7. Therapeutische Interventionen bei abfallendem Spenderchimärismus.....	65
4.8. Fehlerquellen.....	66
4.9. Aktueller Stand der Forschung und Aussicht	67
5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	69
6. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	70
7. TABELLENVERZEICHNIS.....	72
8. LITERATURVERZEICHNIS.....	73
9. DANKSAGUNG	85
10. LEBENSLAUF	86
11. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	87

1. Einleitung

1.1. Übersicht über die akute myeloische Leukämie

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine maligne Neoplasie des hämatopoetischen Systems. Im Jahr 2006 ermittelte das Surveillance Epidemiology and End Results Institute (SEER) eine Inzidenz von 3,8/100.000/Jahr (Horner et al. 2006), wobei diese Zahlen zeigen, dass Männer deutlich häufiger betroffen sind als Frauen. Ferner nimmt die Auftrittswahrscheinlichkeit der AML mit steigendem Alter zu, sodass die Inzidenz bei 60-64-jährigen Menschen 7,3/100.000/Jahr, bei 80-84-jährigen jedoch bereits 23,1/100.000/Jahr beträgt. Bei Diagnosestellung einer AML sind die Patienten durchschnittlich 67 Jahre alt. (Ehninger et al. 2008) Dennoch ist die Diagnose einer AML trotz zunehmender 5-Jahres-Überlebensrate von mittlerweile ca. 21%, (Horner et al. 2006) im Hinblick auf Prognose, Mortalität und Überleben noch immer eine sehr ernst zu nehmende Erkrankung. Hierbei spielt das Alter nicht nur im Bezug auf die Inzidenz, sondern auch im Hinblick auf die Mortalität dieser Erkrankung eine entscheidende Rolle. (Appelbaum et al. 2006) So zeigte sich in zahlreichen Studien übereinstimmend, dass die 5-Jahresüberlebensrate von Patienten unter 24 Jahren nicht über 40% (Gatta et al. 2003) und bei Patienten bis 60 Jahren nicht über 26% liegt. Über 75-jährige Patienten leben nach 5 Jahren sogar nur noch mit einer Wahrscheinlichkeit von 2%. (Horner et al. 2006) Somit ist die Prognose älterer AML-Patienten noch immer sehr ungünstig. (Frohling et al. 2006)

Neben dem Alter sind Leukozytenzahl im peripheren Blut bei Diagnosestellung ($> 100.000/\mu\text{L}$) sowie die Konstitution des Patienten bei Diagnosestellung für die Prognose bei einer AML relevant. Desweiteren spielt insbesondere der Karyotyp eine große Rolle, wie beispielsweise Anomalien der Chromosomen 3 bzw. 3q, 5/5q, 7/7q oder komplex veränderte Karyotypen mit mindestens drei verschiedenen klonalen chromosomalen Veränderungen als prognostische Faktoren zu bewerten. (Ravandi et al. 2007) Auch den molekularen Veränderungen kommt eine große Rolle zu: So sind beispielsweise die *FLT3*-ITD (interne Tandemduplikationen im *FLT3*-Gen) prognostisch ungünstig. (Schnittger et al. 2005) Dagegen sind Nucleophosmin-

Mutationen (*NPM1*) prognostisch eher von Vorteil, sofern sie isoliert auftreten.(Falini et al. 2007)

Das wesentliche Merkmal der AML besteht in einer Vermehrung myeloischer Blasten im Knochenmark, wobei sich oftmals auch eine periphere Ausschwemmung ins Blut nachweisen lässt. In den meisten Fällen einer AML ist kein eindeutiger Krankheitsauslöser festzustellen, jedoch können in seltenen Fällen Noxen wie Benzol eine Rolle spielen. Interessanterweise sind hier besonders Menschen mit Mutationen im Bereich der NAD(P)H-Quinone-Oxidoreduktase 1, welche ein wichtiges Enzym für den Benzolabbau darstellt, gefährdet.(Smith et al. 2001). Ebenfalls ist bei Patienten mit einer früheren Exposition gegenüber Zytostatika oder ionisierender Strahlung im Rahmen der Therapie einer malignen Erkrankung von einem Kausalzusammenhang auszugehen.

Zudem können genetische Faktoren einen Auslöser darstellen. Beispielsweise haben Kinder mit einem Down-Syndrom bzw. einer Trisomie 21 ein deutlich erhöhtes AML-Risiko. Auch eine vorbestehende maligne hämatologische Erkrankung wie z.B. ein myelodysplastisches Syndrom (MDS) ist als wesentlicher Risikofaktor zu betrachten, da ca. 25% der Patienten im Verlauf eine sekundäre AML (s-AML) entwickeln.

1.1.1. Pathogenese und Pathophysiologie

Durch Mutationen vorrangig in Tumorstammzellen können notwendige Funktionen der Zell-Reperatur außer Kraft gesetzt werden und die Empfindlichkeit gegenüber genotoxischen Substanzen oder der Aktivierung proliferationsfördernder Signalwege erhöhen. Beispiele hierfür sind Mutationen in Rezeptortyrosinkinasen (z.B. *FLT3*) oder in Genen, welche in Signalwege involviert sind (z.B. *RAS*). Eine andere Mutationsklasse betrifft die Funktion von Transkriptionsfaktoren; hier sind z.B. die *AML-ETO* oder *PML-RARA*-Genfusion zu nennen. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt geht die Forschung davon aus, dass eine Mutation immer in mindestens zwei verschiedenen Signalwegen auftreten muss, um den Vorgang der Entwicklung einer AML-Zelle in Gang zu setzen. Abbildung 1 zeigt diesen Vorgang schematisch. So führen meist

Mutationen in Tyrosinkinasen wie *FLT3* oder *Ras-Raf* und AML-spezifische Transkriptionsfaktoren wie *AML-ETO* oder *PML-RAR α* zur Bildung einer potentiellen AML-Zelle.(Ehninger et al. 2008) Bei anderen Mutationen wird aber auch ein Ein-Mutations-Modell postuliert, z.B. bei den *NPM1*-Mutationen.(Liso et al. 2008)

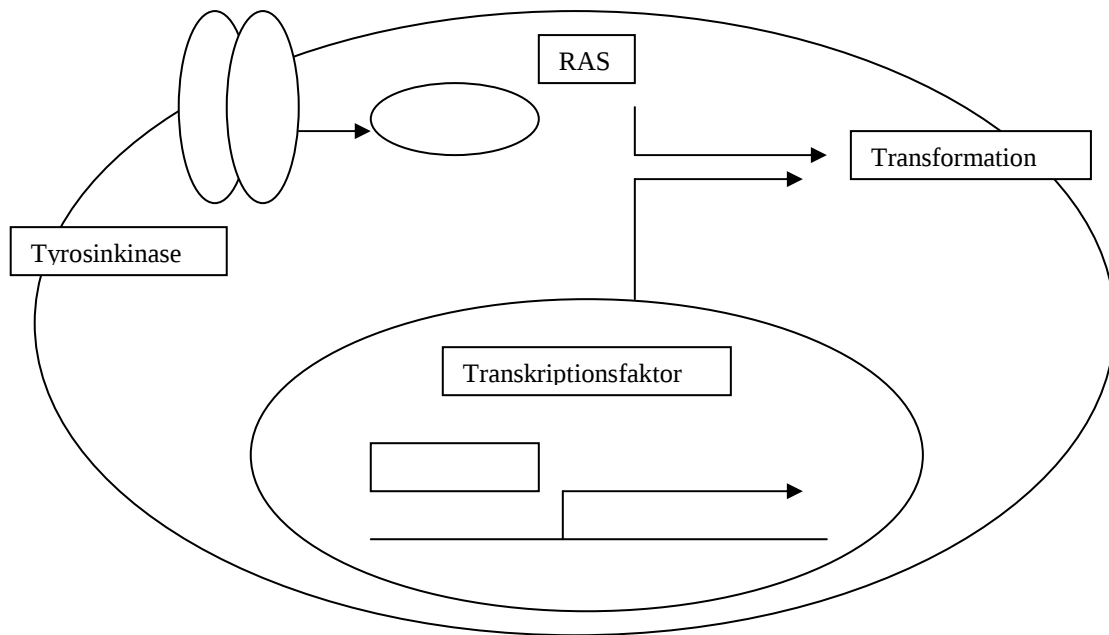


Abb. 1: Modell der Leukämogenese bei AML(Ehninger et al. 2008)

Die auf diesem Weg veränderte Zelle vermehrt sich exponentiell und verdrängt durch das unkontrollierte Wachstum die normale Hämatopoese. Die entstehenden Blasten können allerdings aufgrund eines Differenzierungsblocks nicht normal ausdifferenzieren, weswegen sich in der Folge einer zunehmenden Knochenmarkinsuffizienz Symptome einer Anämie, gesteigerte Blutungsneigung aufgrund von Thrombozytopenie sowie eine erhöhte Anfälligkeit für bakterielle Infekte aufgrund von Granulozytopenie entwickeln. Oft treten zusätzlich Beschwerden im Rahmen einer B-Symptomatik wie Fieber, Abgeschlagenheit, Gewichtsverlust oder Nachtschweiß auf. Mitunter werden zudem Lymphknotenschwellungen oder auch eine Gingivahyperplasie infolge einer Infiltration durch leukämische Blasten beobachtet.

1.1.2. Diagnostik

Die Diagnostik sollte in einem mehrstufigem Prozess durchgeführt werden.

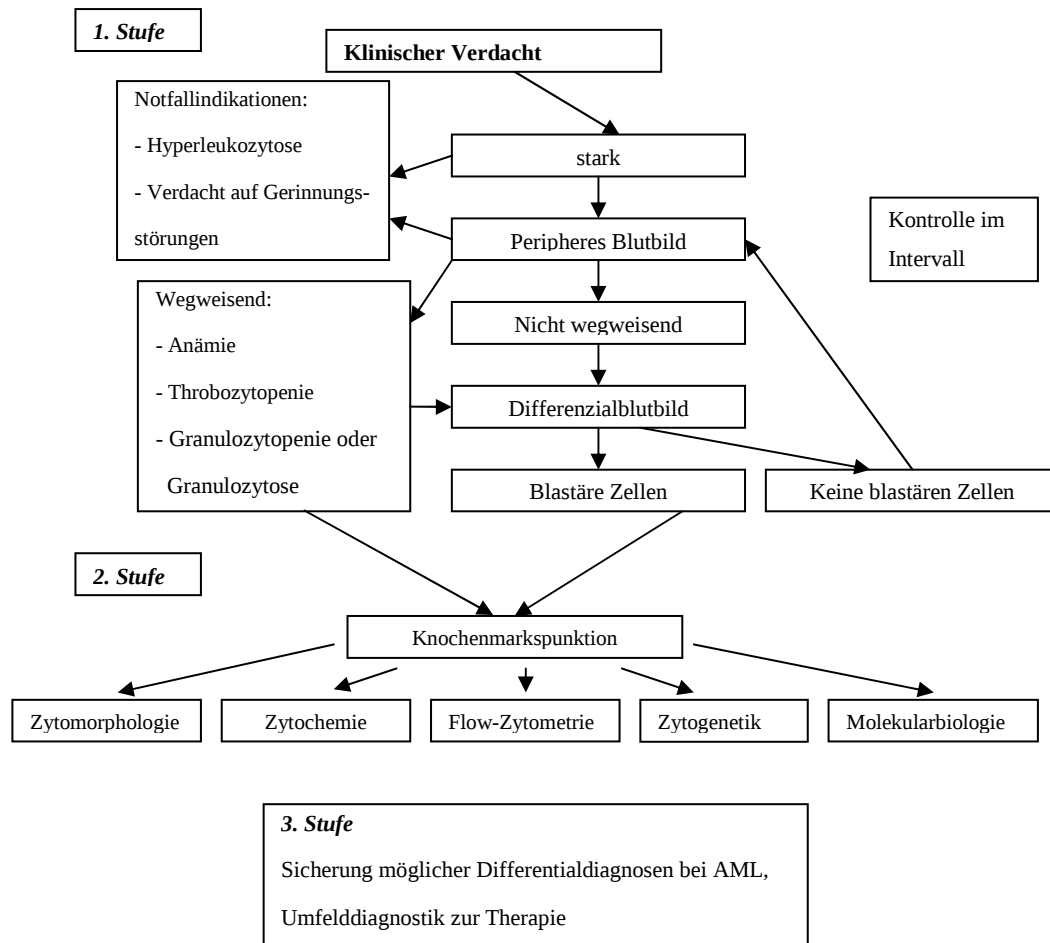


Abb. 2: Stufendiagnostik der AML(Ehninger et al. 2008)

Wie obige Abbildung verdeutlicht, sind zur eindeutigen Stellung und damit Sicherung der Diagnose zahlreiche laborchemische Untersuchungen nötig. Der wichtigste Schritt in der Primärdiagnostik ist die Untersuchung eines Blutausstriches sowie die lichtmikroskopische Betrachtung von Proben eines Knochenmark-Aspirates.(Ehninger et al. 2008;Haferlach et al. 2007)

In jedem Fall muss beachtet werden, dass allein die Zahl der Leukozyten im peripheren Blut keine zuverlässigen Schlüsse auf die Diagnose einer AML erlaubt, da die Leukozytenzahl sehr variabel sein kann. Bei ca. 20% aller Patienten lassen sich zum Zeitpunkt der Erstdiagnose keine Blasten im peripheren Blut nachweisen.

Die Kriterien zur Diagnosestellung einer AML nach der WHO-Klassifikation sind folgende:

1. Anteil pathologischer Myeloblasten an den nukleären Zellen von Knochenmark und/oder peripherem Blut $\geq 20\%$.
2. unabhängig vom Anteil der Knochenmarkblasten, wenn im Rahmen der zyto- bzw. molekulargenetischen Analytik eine definierte Aberration gemäß WHO-Klassifikation nachgewiesen wird.(Swerdlow 2008)

Die folgenden Abbildungen zeigen beispielhaft zytologische bzw. Karyogrammdarstellungen häufiger Subtypen der AML.

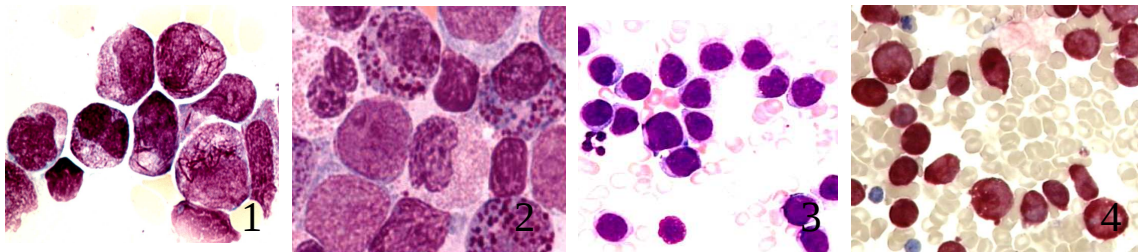


Abb. 3: Akute Promyelozytenleukämie t(15;17) und faggot cells (1), AML M4eo (2), Monozytäre AML (3,4) (Prof. Dr. T. Haferlach)

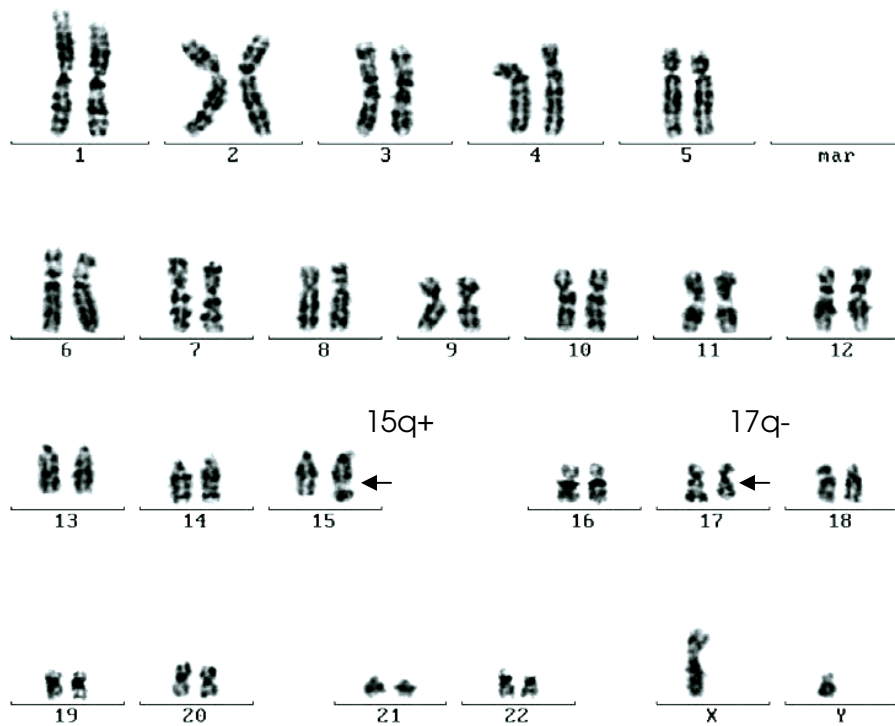


Abb. 4: Karyogramm einer akuten Promyelozytenleukämie t(15;17) (PD Dr. C. Haferlach)

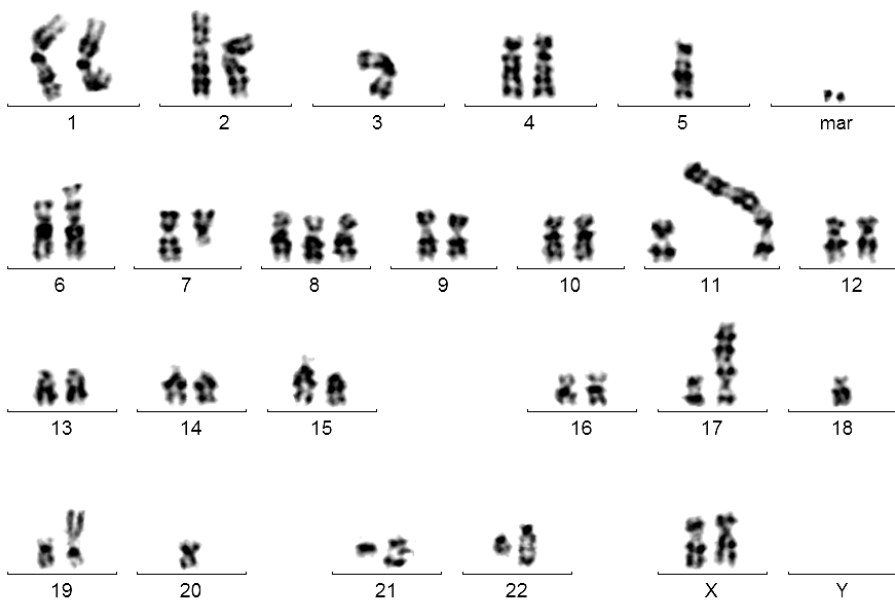


Abb. 5: Karyogramm einer AML mit komplexen Karyotyp (PD Dr. C. Haferlach)

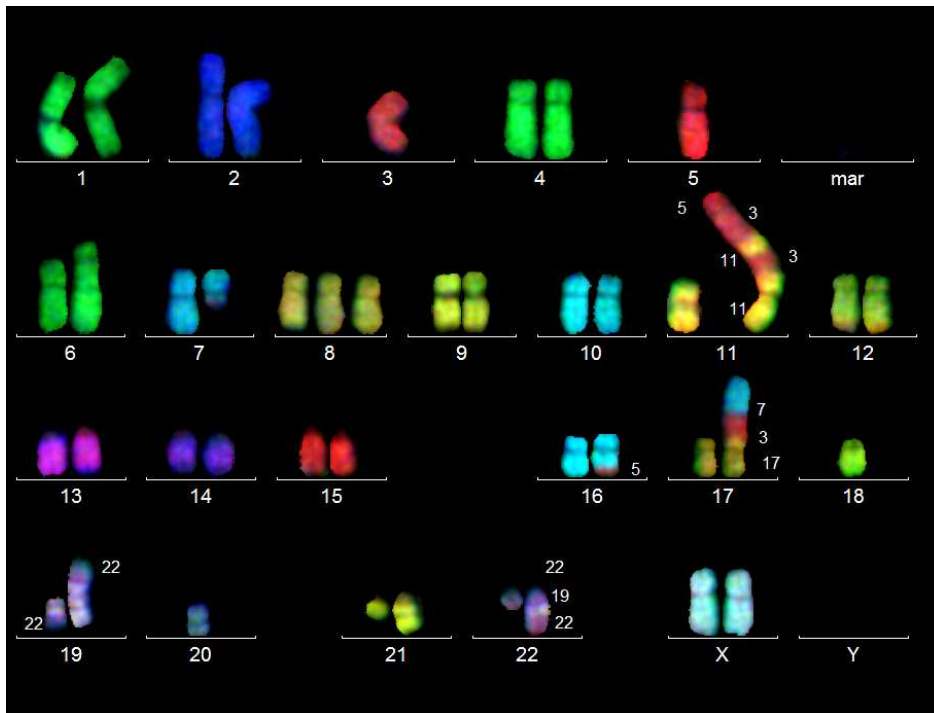
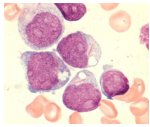
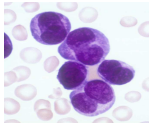
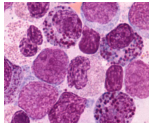
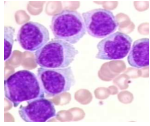


Abb. 6: 24-Farben-FISH einer AML mit komplexem Karyotyp (PD Dr. C. Haferlach)

Zytogenetische Untersuchungen werden nicht nur zur Diagnosesicherung einer AML herangezogen, sondern auch zur Risikostratifizierung dieser Erkrankung. Zu diesem Zweck wird zwischen einer low-, intermediate- und high-risk-Gruppe unterschieden. Die Einteilung hat nicht nur Einfluß auf die Prognose der Krankheit, sondern auch auf die anzuwendende Therapiestrategie. Zur Gruppe mit einem prognostisch günstigen Risiko werden die Translokationen $t(8;21)/RUNX1-RUNX1T1$ und $t(15;17)/PML-RARA$ sowie Inversion $inv(16)/CBFB-MYH11$ gezählt. Tabelle 1 zeigt Korrelationen von Zyto- und Molekulargenetik nach der WHO-Klassifikation.

FAB	Zytogenetik	Molekulargenetik	Zytomorphologie
AML M2(1)	t(8;21)	AML1-ETO	
AML M3(v)	t(15;17)	PML-RARA	
AML M4eo	Inv(16), t(16;16)	CBFB-MYH11	
AML M4/5	11q23	MLL	

Tab. 1: Korrelation mit Zyto- und Molekulargenetik nach der WHO-Klassifikation

Diese Subgruppen haben unter Durchführung einer Standard-Chemotherapie eine realistische Heilungschance. Stellt sich der Karyotyp als normal dar, was bedeutet, dass keine zytogenetischen Anomalien nachweisbar sind, so wird der Patient der prognostisch intermediären Gruppe zugeteilt. Bei der Entität der akuten myeloischen Leukämie weisen etwa 45% der Patienten einen normalen Karyotyp auf. Komplexe Karyotypen sowie unbalancierte Chromosomenanomalien, welche vor allem die Chromosomen 3, 5, oder 7 betreffen, sind prognostisch sehr ungünstig.(Buchner et al. 1999;Byrd et al. 2002;Grimwade et al. 2001;Schlenk et al. 2003;Slovak et al. 2000) Abbildung 7 gibt einen Überblick über die bei der akuten myeloischen Leukämie vorkommenden Karyotypen.

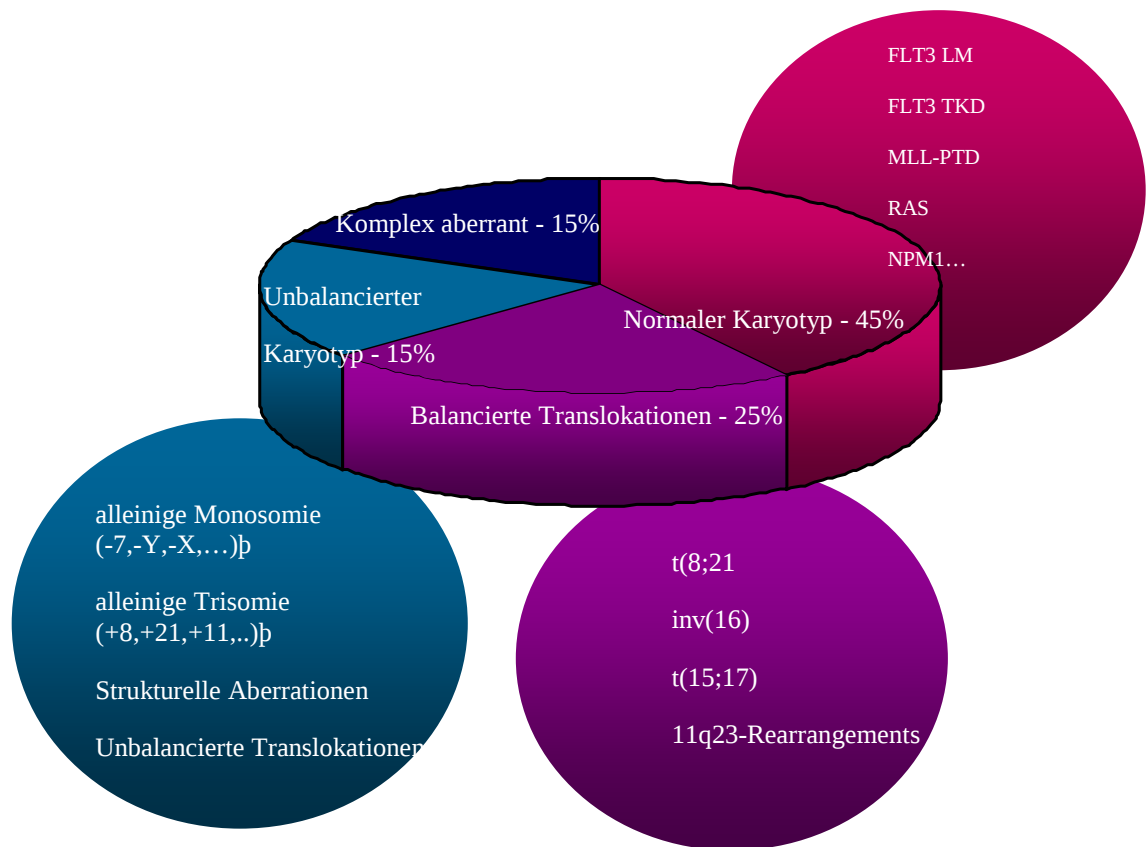


Abb. 7: Typische genetische Veränderungen bei der akuten myeloischen Leukämie

1.1.3. Therapeutische Strategien

Die intensive Forschungstätigkeit seit den 1970er Jahren hat dazu beigetragen, therapeutische Strategien bei der Behandlung der AML zu verbessern. Auch kann die Indikation zur allogenen Stammzelltransplantation mittlerweile differenzierter gestellt werden.

Bei der Therapie der AML wird zwischen einer „First-line-Chemotherapie“ und einer „Second-line-Chemotherapie“ unterschieden. Erstere bezieht sich auf die Behandlung der Erkrankung bei Diagnosestellung bevor andere therapeutische Maßnahmen ergriffen wurden; letztere, die „Second-line-Chemotherapie“ erhalten Patienten bei Versagen der ersten Therapie, beispielsweise im Falle eines ungenügenden Ansprechens oder einer Therapierefraktärität.

Zu Beginn der Behandlung wird entweder ein kuratives oder ein palliatives Ziel festgelegt. Während bei einer kurativen Intention eine komplette Remission angestrebt wird, ist bei einer Palliativbehandlung eine Heilung aufgrund der Prognose, anderen Begleiterkrankungen oder dem Alter des Patienten voraussichtlich nicht mehr möglich.

Um den Therapieerfolg beurteilen zu können, wird das Ansprechen in verschiedene Kategorien unterteilt. Von einer kompletten Remission (CR) spricht man, wenn der Anteil der Blasten im Knochenmark weniger als 5% beträgt. Zudem dürfen keine Blasten mehr im peripheren Blut oder an anderer extraleukämischer Lokalisation nachweisbar sein. Voraussetzung ist ferner eine Regeneration des peripheren Blutbilds (Thrombozyten $> 100.000/\mu\text{L}$; Neutrophile $> 1000/\mu\text{L}$). (Cheson et al. 2003) Während bei einer partiellen Remission der Anteil an Blasten im Knochenmark über 5% liegt, spricht man bei einem Blastenanteil von über 25% von Therapierefraktarität.

Das Therapieregime der AML gliedert sich in zwei Phasen. Sie beginnt zunächst mit zwei Blöcken einer Induktionstherapie, im Anschluss daran folgt eine Konsolidierungstherapie. Die als ersten Schritt erfolgende Induktionstherapie hat eine Reduktion des Tumormaterials zum Ziel. Es geht darum, möglichst viele Blasten aus dem Knochenmark zu eliminieren und dadurch eine komplette Remission zu erreichen, wobei dieses Ziel meist anhand von zwei Zyklen einer intensiven Kombinationschemotherapie, in der Regel Cytarabin (ARA-C) in Kombination mit einem Anthrazyklinderivat angestrebt wird. Hingegen geht es in der Konsolidierungstherapie darum, die komplette Remission dauerhaft zu erhalten und ein Rezidiv zu vermeiden.

Als Beispiel kann die sogenannte „7+3 Induktionstherapie“ angeführt werden. Diese beinhaltet zwei Zyklen ARA-C in Kombination mit einem Anthrazyklin. Dabei bekommt der Patient über sieben Tage eine Dauerinfusion mit ARA-C ($100\text{mg}/\text{m}^2\text{KOF}/\text{Tag}$), und zusätzlich über drei Tage ein Anthrazyklin (meist Daunorubicin in einer Dosierung von $60\text{mg}/\text{m}^2\text{KOF}/\text{Tag}$). (Ehninger et al. 2008) Anhand dieses Schemas wird bei ca. 75% der behandelten Patienten eine komplette Remission erreicht. (Mayer et al. 1994) Neuere Studien belegen, dass es zwischen den

verschiedenen Anthrazyklinen wie Idarubicin, Daunorubicin oder Mitoxantron keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich des Therapieergebnisses gibt.(Berman et al. 1991;Vogler et al. 1992;Wiernik et al. 1992)

Über eine Standard-Konsolidierungstherapie gibt es bislang keine Übereinkunft, (Ehninger et al. 2008) jedoch scheint die Applikation von drei Zyklen ARA-C in einer Gesamtdosis von $18\text{g/m}^2\text{KOF}$ pro Zyklus sehr vorteilhaft zu sein.(Ehninger et al. 2008) Im Gegensatz zur Induktionstherapie haben sich in Studien keine Verbesserungen der Ergebnisse gezeigt, wenn die Therapie zusätzlich mit einem Anthrazyklin kombiniert(Moore et al. 2005) oder ARA-C in einer Hochdosisform verabreicht wurde.(Bradstock et al. 2005)

Eine Erhaltungstherapie („Maintenance Therapy“) wird in der AML-Therapie gewöhnlich nicht durchgeführt.(Ravandi et al. 2007) Untersuchungen mit Patienten, die eine Erhaltungstherapie über 36 Monate erhielten, konnten keine besseren Ergebnisse nachweisen als bei solchen Patienten, die die Therapie nur über acht Monate erhielten.(Preisler et al. 1987) In einigen Studien zeigte sich, dass eine Erhaltungstherapie das krankheitsfreie Überleben, jedoch aber nicht das Gesamtüberleben verlängert.(Hewlett et al. 1995)

1.2. Allogene Stammzelltransplantation bei Akuten Leukämien

Seit nun mehr als 40 Jahren werden weltweit allogene Stammzelltransplantation durchgeführt, wobei die AML hierfür eine sehr häufige Indikation darstellt. Mit zunehmender Erfahrung auf diesem Gebiet, wurde es auch möglich neben Knochenmark zunehmend periphere Blutstammzellen zu transplantieren, von welchen man nach früheren Ergebnissen annahm, dass sie sich positiv auf das Risiko eines Rezidivs auswirken könnten.(Bensinger et al. 2001). Diese Annahme konnte zwar in späteren Studien nicht bestätigt werden, jedoch kommt es nach Transplantation von peripheren Stammzellen zu einer schnelleren Erholung des Knochenmarks.(Couban et al. 2002)

Der Nutzen einer allogenen Transplantation liegt im Besonderen im Auftreten des immunologisch vermittelten Graft-versus-Leukämie (GvL)-Effekts. Die Indikation wird in der Regel bei Patienten mit ungünstigem Risikoprofil z.B. nach Hinweisen aufgrund zytogenetischer Untersuchungen, bereits in erster Remission durchgeführt. Nach Möglichkeit wird hierfür ein HLA-identischer Spender – entweder verwandt oder unverwandt – gesucht. Ein Rezidiv stellt ebenfalls eine Indikation zur Transplantation dar.(Buchner et al. 2002) Zwar ist die allogene Stammzelltransplantation die Therapieform mit dem größten antileukämischen Effekt bzw. der stärksten Reduktion des Rezidivrisikos, jedoch bringt sie auch das nicht zu unterschätzende Risiko einer therapieassoziierten Mortalität mit sich.

In der Klinik für Stammzelltransplantation des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf werden jährlich ca. 140 Patienten allogene transplantiert, davon ca. 50 mit der Diagnose einer AML.

1.2.1. Verschiedene Konditionierungsstrategien

Vor einer allogenen Stammzelltransplantation müssen sich Patienten einer Konditionierungstherapie unterziehen, welche eine hochdosierte Chemo- bzw. Radiochemotherapie beinhaltet. Das Ziel liegt in einer Unterdrückung des Immunsystems, einer Myeloablation und einer weiteren Reduktion der Leukämiezelllast.(Kröger & Zander 2008)

Bei der Behandlung unterscheidet man zwischen einer Standardkonditionierung und einer dosisreduzierten Konditionierung („reduced-intensity conditioning“, RIC). Die Standardkonditionierung soll eine Myeloablation erreichen, was die Elimination eines Großteils der hämatopoetischen Zellen des Empfängers bedeutet. Tabelle 2 zeigt bei AML angewandte Konditionierungsregime.(Kröger & Zander 2008)

Ganzkörperbestrahlung (total body irradiation, TBI) plus Chemotherapie:
TBI mit 8-12Gy + Cyclophosphamid (120-200mg/kgKG)
Chemotherapie allein:
Busulfan (14-16mg/kgKG) + Cyclophosphamid (120-200mg/kgKG)
Andere Chemotherapieregime:
Melphalan (140-200mg/m ²)
Thiotepa (500-800mg/kgKG)
Etoposid (30-60mg/kgKG)

Tab. 2: Beispiele für myeloablative Konditionierungsregime bei AML

Allerdings stellt die myeloablative Konditionierung bei relevanter Komorbidität oder bei höherem Alter unter Umständen ein zu hohes Risiko dar, weswegen dosisreduzierte Konditionierungsregime (RIC) eingeführt wurden, um auch diesen Patienten eine Transplantation zu ermöglichen.(Andersson et al. 2003;Giralt et al. 1997;Slavin et al. 1998;Wong et al. 2003) Neben den Vorteilen einer geringeren therapie-assoziierten Mortalität („transplant related mortality“, TRM) und einer kürzeren Phase der Neutropenie, ist bekannt, dass dosisreduzierte Konditionierungen ein ebenso suffizientes Engraftment erreichen können wie Standardkonditionierungen.(Hegenbart et al. 2006;Stelljes et al. 2005)

Auch in Bezug auf akute Graft-versus-Host-Erkrankungen (Spender-gegen-Wirt-Reaktion, GvHD) und schwere Infektionen, waren die Ergebnisse vergleichbar.(Massenkeil et al. 2005) Einen weiteren Vorteil bietet RIC im stärkeren Ausnutzen des Graft-vs.-Leukemia-Effektes. Tabelle 3 zeigt eine Auswahl dosisreduzierter Konditionierungsregime.(Kröger & Zander 2008)

Ganzkörperbestrahlung (TBI) mit 2Gy
Busulfan (8mg/kgKG) + Fludarabin (180mg/m ² KO)
Melphalan (140-180mg/m ² KO) + Fludarabin (125mg/m ² KO) oder Cladribin (60mg/m ² KO)

Tab. 3: Beispiele für dosisreduzierte Konditionierungsregime bei AML

Obwohl seit Einführung von RIC mehr Patienten eine allogene Transplantation ermöglicht werden kann und das Gesamtüberleben (overall survival, OS) insgesamt höher ist, zeigen neuere Untersuchungen aber auch, dass dosisreduzierte Konditionierungen mit einem geringeren rezidivfreien Überleben (disease-free survival, DFS) einhergehen.(Massenkeil et al. 2005)

1.2.2. Komplikationen nach Transplantation

In der Zeit nach Transplantation ist die Immunität des Patienten sehr stark eingeschränkt. Insbesondere innerhalb der ersten Wochen bis zum vollständigen Engraftment kann es daher zu zahlreichen Komplikationen kommen.

Eine große Bedrohung stellen insbesondere Infektionen dar. Sowohl neu erworbene bakterielle, virale oder mykotische Infektionen, als auch die Reaktivierung von bestimmten Infektionen, wie beispielsweise eines Herpes Zoster oder einer Virus-Hepatitis, stellen eine Gefahr für den Patienten dar. Eine weitere gefürchtete Komplikation ist das sogenannte „graft failure“. Darunter versteht man, dass das Transplantat nicht richtig anwächst, das Engraftment ausbleibt und das Knochenmark somit seine Funktion nicht aufnehmen kann. Man unterscheidet zwischen primärem und sekundärem „Graft failure“ (Markversagen).

In der Regel wird ein primäres graft failure folgendermaßen definiert: Die Anzahl an Neutrophilen erreicht auch an Tag 21-42 bei gleichzeitig hypozellulären Mark nicht $0.2-0.5 \times 10^9/l$. Bei sekundärer Transplantatabstoßung kommt es an mindestens drei aufeinander folgenden Tagen nach erfolgten Engraftment zu einem Abfall der Neutrophilen auf unter $0.5 \times 10^9/l$.(Kröger & Zander 2008) Besonders anfällig für dieses Problem sind Patienten, die im Vollbild der Erkrankung aufgrund einer Therapierefraktärität transplantiert wurden, deren Immunsuppression nicht ausreichend, oder deren Spender nicht HLA-kompatibel war.(Kröger & Zander 2008)

Ein gewisser Teil an Patienten ist in der Zeit nach Transplantation von einer graft-versus-host-disease betroffen. Man unterscheidet eine akute (weniger als 100 Tage nach

der Transplantation) von einer chronischen Form (später als 100 Tage nach Transplantation). Das Transplantat erkennt die Empfängergewebe als fremd und initiiert eine Immunreaktion dagegen. Probleme bereitet dies insbesondere im Bereich der Haut, der Leber und des Verdauungstraktes. Um eine schwere GvHD zu vermeiden, wird daher eine prophylaktische immunsuppressive Medikation verabreicht, wobei am häufigsten Methotrexat und Ciclosporin gegeben werden. Als zusätzliche Medikation stehen Antikörper wie ATG oder Thymozytenglobulin zur Verfügung.

Die Entwicklung einer chronischen GvHD ist jedoch im Hinblick auf Rezidivwahrscheinlichkeit und krankheitsfreies Überleben als ein prognostisch guter Faktor zu bewerten.(Valcarcel et al. 2008)

1.3. Chimärismus – Allgemeine Grundlagen und Definition

Während der Transplantation erhält der AML-Patient Stammzellen des Spenders. Das Verhältnis von Spender- und Wirtszellen kann nach der Transplantation bestimmt werden. So kann man einerseits nach einer Transplantation deren Erfolg überprüfen, andererseits den Zeitpunkt für nötige therapeutische Interventionen früh erkennen.(Bai et al. 2006) Die Koexistenz dieser verschiedenen Gewebe wird als Chimärismus bezeichnet (Chimäre = lykisches Fabelwesen, welches den Kopf eines Löwen, den Rumpf einer Ziege und den Schwanz einer Schlange besitzt).(Kröger & Zander 2008) Es wird darunter insbesondere das Verhältnis von Spenderzellen zur Gesamt-Zellzahl gesehen. Dieser Parameter muss nach Transplantation in regelmäßigen Abständen kontrolliert werden, wozu in der Regel während der Nachsorgeuntersuchungen Proben aus peripherem Blut gewonnen werden. Eine größere Verlässlichkeit bietet im Vergleich dazu die Bestimmung des Chimärismus aus dem Knochenmark. Allerdings sind auch Studien durchgeführt worden, welche eine gute Vergleichbarkeit der Methodik bei der Untersuchung von Blut und Knochenmark zeigten.(Maurillo et al. 2007) Die Ergebnisse dieser Analysen können sich im Laufe der Zeit verändern. Man unterscheidet daher verschiedene Arten des Chimärismus.(Barrios et al. 2003;McCann et al. 2005)

Donorchimärismus (DC)	Vollständiger Spenderchimärismus
Gemischter Chimärismus (MC)	Es werden sowohl Spender- als auch Empfängerzellen nachgewiesen
Transienter gemischter Chimärismus (TCM)	Zunächst noch Zellen des Empfängers nachweisbar, jedoch Entwicklung Richtung DC
Stabiler gemischter Chimärismus (SMC)	Spender- und Empfängerzellen existieren in einem konstanten Verhältnis nebeneinander
Ansteigender gemischter Chimärismus (inMC) („decreasing donor alleles“)	Der Anteil an Empfängerzellen nimmt zu bzw. jede Entwicklung vom DC zum MC
Abfallender gemischter Chimärismus (deMC) („increasing donor alleles“)	Der Anteil an Empfängerzellen nimmt ab bzw. jede Entwicklung vom MC zum DC
Verlust des Chimärismus (Loss of chimerism)	Das Transplantat wird abgestoßen

Tab. 4: Definition des Chimärismus nach McCann *et al.* (McCann *et al.* 2005) und Barrios *et al.* (Barrios *et al.* 2003)

Die Untersuchung des Chimärismus hat sich zur Kontrolle des Erfolges und Verlaufs nach der Transplantation als hilfreich erwiesen. Die Ergebnisse müssen allerdings immer im Kontext von Grunderkrankung, Art der Konditionierung oder auch dem zeitlichen Intervall seit Transplantation gesehen werden. (Kröger & Zander 2008) Denn Erfahrungen zeigen, dass sich beispielsweise ein vollständiger Donorchimärismus bei dosisreduzierter Konditionierung erst nach einigen Monaten einstellt, während dies bei Standardkonditionierung rascher geschieht.

Für die Chimärismus-Bestimmung gibt es verschiedene Möglichkeiten. Während früher vor allem eine Restriktionslängenfragment-Polymorphismus-Analyse (RFLP) durchgeführt wurde, wird dieses Verfahren heutzutage kaum noch angewendet und so basieren die heute gängigen Untersuchungen überwiegend auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Um die Zellen von Spender und Empfänger unterscheiden zu können, müssen minimale genetische Unterschiede zwischen den beiden gefunden werden, welches zum Beispiel short-tandem-repeats (STR) sind. Anhand dieser Sequenzen kann der Chimärismus bestimmt werden.

Eine erweiterte Form stellt die quantitative „real-time“ PCR (RQ-PCR) dar. Auf Basis der Bestimmung bestimmter Einzel-Nukleotid-Polymorphismen mit Austausch

einzelner Basenpaare („single nucleotide polymorphism“ SNP) können die Allele von Spender und Empfänger im Verhältnis quantifiziert werden, falls diese differente Sequenzen zeigen. Anhand einer Verwendung fluoreszenzmarkierter Gensonden bzw. einer lasergestützten Auswertung der Signale gelingt im Anschluss die Quantifizierung der Spender- bzw. Empfängerzellen.

Bei geschlechtsdifferenter Transplantation kann die Chimärismusbestimmung auch mittels Interphase-Fluoreszenz-*in-Situ*-Hybridisierung (FISH) erfolgen. Dazu werden bestimmte Abschnitte auf den Geschlechtschromosomen mit Fluoreszenzsonden durch Hybridisierung (=Paarung komplementärer Basenpaare) markiert. Im Anschluss kann das quantitative Verhältnis im Blut oder Knochenmark mittels Signalauswertung im Fluoreszenzmikroskop ermittelt werden. Anhand der genannten Methoden kann der Chimärismus mit einer Sensitivität bis zu 10^{-4} ermittelt werden und so als Verlaufsparemeter für das Anwachsen des Transplantates dienen.

Eine ausführlichere Erklärung der Chimärismus-Bestimmungsmethoden, welche im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf verwendet werden und die Grundlage der Ergebnisse dieser Arbeit darstellen, wird im Methodikteil gegeben.

1.3.1. Andere Methoden zur Detektion einer Resterkrankung nach Transplantation: Genetische Marker

In zahlreichen Studien wird darauf hingewiesen, wie wichtig eine regelmäßige Kontrolle der „minimal residual disease“ (minimale Resterkrankung, MRD) in Hinblick auf therapeutische Interventionen ist. Dazu stehen neben der Chimärismus-Bestimmung weitere Methoden wie Immunphänotypisierung sowie molekulare und zytogenetische Analysen zur Verfügung. Bei der Überwachung mittels genetischer Marker stellt sich allerdings das Problem, dass diese Marker nie bei allen Patienten vorhanden sind.(Barragan et al. 2008). Gut eignen sich beispielsweise die reziproken Genfusionen (t(8;21)/*RUNX1-RUNX1T1* (=AML1-ETO) und die inv(16)/*CBF-MYH11* oder auch *MLL*-Rearrangements, welche den Chromosomenabschnitt 11q23 einbeziehen.(Raanani & Ben Bassat 2004) Bei anderen Markern wie den *FLT3*-Mutationen kann allerdings

die Instabilität problematisch sein, d.h. der Marker ist im Rezidiv nicht mehr nachweisbar. Jedoch hat sich herausgestellt, dass auch die Expression von Genen relevant sein kann. So wurde gezeigt, dass bei Patienten mit AML in den meisten Fällen eine erhöhte Expression nachweisbar ist (*WT1*). (Raanani & Ben Bassat 2004) Mehrere Autoren haben beschrieben, dass die *WT1*-Expression in engem Zusammenhang mit dem Krankheitsstatus stehen (Candoni et al. 2009) und sich dieser Marker daher gut zur Überwachung der minimalen Resterkrankung eignet. (Brieger et al. 1994; Cilloni et al. 2002; Miyagi et al. 1993) Allerdings scheint das Monitoring von rekurrenten Mutationen im Vergleich dem Monitoring der *WT1*-Expression überlegen zu sein. Barragan *et al.* zeigten dies für die Nucleophosmin-Mutationen (*NPM1*). (Barragan et al. 2008)

1.4. Arbeitshypothese und Zielsetzung der Arbeit

Chimärismusanalysen geben Auskunft über den Erfolg einer Stammzelltransplantation, was die Annahme nahe legt, dass ein Abfallen des Chimärismus in engem Zusammenhang mit einem Rezidiv stehen kann. (Bader et al. 1997; Bader et al. 1998; Barrios et al. 2003) Insofern stellt sich die Frage, ob die Analyse des Chimärismus ausreichend ist, um den Verlauf nach Transplantation zu überwachen, insbesondere, da zumindest bei einem Teil der Patienten auch Möglichkeiten der MRD-Diagnostik zur Verfügung stehen. (Maurillo et al. 2007) So kann auch ein Wiederanstieg bzw. eine Persistenz genetischer Marker auf ein drohendes Rezidiv hinweisen. (Elmaagacli 2007)

Diese Untersuchung fokussiert auf die Bedeutung des molekularen Chimärismus nach allogener Stammzell-Transplantation bei AML unter besonderer Berücksichtigung verschiedener Konditionierungsstrategien. Dazu soll zunächst untersucht werden, welche Unterschiede es bezüglich des Chimärismus und dessen Kinetik zwischen den Gruppen „Standard-Konditionierung“ und „dosisreduzierte Konditionierung“ gibt. Besonderes Interesse gilt daher der Dauer der Etablierung eines Donorchimärismus. Im Anschluss daran soll der Frage nachgegangen werden, inwiefern der Chimärismus bei Patienten mit Rezidiv eine Voraussage auf dieses Ereignis liefern kann.

Zu diesem Zweck wurde im Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf eine retrospektive Analyse an insgesamt 75 Patienten durchgeführt, welche in den Jahren 2003 bis 2007 durch Material von Fremd- oder Familienspendern transplantiert wurden. Von diesen 75 Patienten wurden 36 Patienten vor Transplantation mit einer Standard-Konditionierung behandelt, 39 Patienten erhielten eine Konditionierung mit reduzierter Dosis.

Der Chimärismus wurde auf der Basis der quantitativen „real-time“ PCR im Labor der Klinik für Stammzelltransplantation im dreimonatigen Abstand unter Berücksichtigung der Tage +30, +90, +180, +270, +360, +450, +540, +630 und +720 nach Transplantation bestimmt. Das Patientenkollektiv umfasst sowohl erwachsene, als auch pädiatrische Patienten.

2. Methoden und Material

2.1. Studienaufbau und Patienten

2.1.1. Patienten

Im Rahmen dieser retrospektiven Studie wurde ein Kollektiv von insgesamt 75 Patienten untersucht, welche aufgrund einer *de novo* (n=52) oder sekundären AML nach MDS oder einer myeloproliferativen Erkrankung (s-AML) (n=23) im Zeitraum Februar 2003 bis Juli 2007 in der Klinik für Stammzelltransplantation des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf allogene transplantiert wurden.

Die Patienten wurden retrospektiv über einen Zeitraum von zwei Jahren hinweg nach ihrer Transplantation beobachtet. Abschluss der Studie war der 28.02.2009. Tabelle 5 gibt einen Überblick über die Patientendaten.

Gesamtzahl: 75	
Geschlecht	
Männlich:	38 (50.7%)
Weiblich:	37 (49.3%)
Patientenalter	
Medianes Alter bei Transplantation:	52.0 Jahre (range 3-67)
Donorart	
Verwandte Spender (matched related donor):	2 (2.7%)
Unverwandte Spender (unrelated donor) :	73 (97.3%)
Stammzellquelle	
KMT:	9 (12.0%)
PBSCT:	66 (88.0%)
Entität	
<i>De novo</i> AML:	52 (69.3%)
s-AML:	23 (30.7%)
Konditionierung:	
Standard-Konditionierung:	36 (48.0%)
Dosisreduzierte Konditionierung:	39 (52.0%)
HLA-match:	
Match:	53 (70.7%)
Mismatch:	22 (29.3%)

Tab. 5: Überblick über die Patientendaten

2.1.2. Studiendesign

Die retrospektive Datenerhebung erfolgte im Zeitraum April 2008 bis Februar 2009 anhand von Patientenakten des Ambulanz- und Stationsarchivs der Klinik für Stammzelltransplantation. Dabei wurden insbesondere Arztbriefe, Verlaufsbögen des stationären Aufenthalts, sowie der ambulanten Betreuung in der Ambulanz, Transplantationsdokumentationen und Befunde aus Knochenmarkszytologien ausgewertet. Zusätzlich wurden Chimärismusdaten aus dem Labor der Klinik für Stammzelltransplantation einbezogen. Das Vorhandensein von Chimärismusdaten war

neben der Hauptdiagnose ausschlaggebend für die Einbeziehung in die konsekutiv erfolgte Analyse.

Zunächst wurde eine „Excel“-Tabelle entworfen, die die im Hinblick auf die Fragestellung der Studie wichtigen Items enthielt. Die Datentabelle umfasste neben allgemeinen Patientendaten (Geschlecht, Geburtsdatum, Alter bei Transplantation), patientenspezifische medizinische Daten. Daher wurden die Patientenakten nach Datum der Erstdiagnose und Datum der Transplantation, Ereignis (ja; nein) und Datum eines Rezidivs, Tod (ja; nein) und Todesdatum durchsucht. Zusätzlich wurde dokumentiert in welchem Krankheitsstadium (Erstdiagnose (ED), Anzahl des Rezidivs (1. Rezidiv, 2. Rezidiv, ...)) und –Status (komplette Remission (CR: $\leq$ 5% Blasten in der letzten Knochenmarkspunktion vor Transplantation), partielle Remission (PR: 6-25% Blasten), refraktär (refraktär/Rezidiv: $>$ 25% Blasten)) der Patient sich vor Transplantation befand. Ebenso wurde die Zytogenetik und die sich daraus ergebende Risikoeinschätzung (Standardrisiko; Hochrisiko), Alter und Geschlecht des Spenders sowie HLA-Merkmale von Empfänger und Spender und deren Übereinstimmung (match, mismatch) festgehalten. Tabelle 6 gibt einen Überblick über die Einteilung der Patienten in Risikogruppen nach Zytogenetik. Patienten mit Niedrig- und Standardrisiko im Hinblick auf den Karyotyp wurden in eine Gruppe zusammengefasst.

Niedrig-/ Standardrisiko	Hochrisiko:
t(8;21)/AML1-ETO	Komplexer Karyotyp (≥ 3 chrom. Alterationen)
t(15;17)/PML-RAR α	t(9;11)/ MLL-AF9
Inv16 /CBF-MYH11	andere MLL-Rearrangements
Normaler Karyotyp	t(6;9)/DEK-CAN
Trisomie 8	Monosomie 7
	Trisomien: +4, +11, +13

Tab. 6: Einteilung der Risikogruppen nach Karyotyp

Im Hinblick auf die Therapie wurde die Intensität der Konditionierung (myeloablativ/dosisreduziert) sowie die Zahl der transplantierten CD34+ -Zellen, die GvHD-Prophylaxe und die Gabe von ATG bzw. Thymoglobulin in der Tabelle erfasst.

Zur Protokollierung des Therapieerfolges wurde die maximale Therapieantwort (komplette Remission (CR), partielle Remission (PR), refraktär (refraktär/rezidiv)) sowie Datum von Leukozyten- und Thrombozyten-Engraftment (Leukozyten $> 1 \times 10^9/L$, Thrombozyten $> 10 \times 10^9/L$) und auch eventuelles Auftreten von akuter (Grad I-IV) und chronischer GvHD festgehalten. Die Einteilung des Schweregrades der akuten GvHD erfolgte anhand klinischer, laborchemischer und histologischer Parameter nach dem Grading von Glucksberg *et al.* (Glucksberg et al. 1974)

Hinsichtlich der Chimärismus-Auswertung wurde der erste Chimärismus-Wert nach Transplantation sowie der maximale und minimale Wert dokumentiert. Ferner wurden die Chimärismus-Werte einen Monat, drei Monate, sowie dann in 3-monatigen Intervallen bis zwei Jahre nach der Transplantation dokumentiert. Tabelle 7 zeigt die Erhebungskriterien für den Chimärismus.

Chimärismus	Erhebungszeitpunkt
1. Chimärismus	1. Chimärismus-Wert nach Transplantation (max. +2 Monate)
Chimärismus am Tag +30, +90, +180, im dreimonatigen Abstand bis Tag +720	Chimärismus-Werte im Abstand zur Transplantation (max. ± 1 Monat)
Chimärismus _{max}	Maximaler Chimärismus (1. Wert)
Chimärismus _{min}	Minimaler Chimärismus (1. Wert)

Tab. 7: Überblick über Chimärismuskriterien

Zur Bearbeitung der Fragestellung wurden die Chimärismus-Daten nach Erhebung in Kategorien unterteilt. Von einem kompletten Donorchimärismus spricht man, wenn der Chimärismus einen Wert $\geq 99.0\%$ erreicht. Chimärismuswerten aus der Labordokumentation von $>99.9\%$ wurde der Wert 100% zugeordnet.

Unter einem „gemischten Chimärismus“ wurden Werte $<99.0\%$ verstanden. Um die Kinetik eines partiellen Chimärismus nach Transplantation einschätzen zu können, wurde der gemischte Chimärismus in „increasing donor alleles“ und „decreasing donor alleles“ eingeteilt.

„Increasing donor alleles“ bedeutet, dass kein Donorchimärismus vorlag und sich das Verhältnis der Zellen zugunsten des Anteils an Spenderzellen verschob oder dass ein Wechsel vom gemischten- zum Donorchimärismus stattfand. Der Anteil residueller Zellen nahm also ab. Dagegen zeigt „decreasing donor alleles“ an, dass kein vollständiger Spender-Chimärismus erreicht war, und dass der Prozentsatz an Empfängerzellen zunahm oder, dass ein Wechsel vom Donorchimärismus zum „mixed chimerism“ stattgefunden hat.

2.2. Konditionierung vor allogener Stammzelltransplantation

Es wurden 36 Patienten mit myeloablativer, 39 Patienten mit non-myeloablativer bzw. reduzierter Konditionierung vorbehandelt.

Als dosisreduzierte Konditionierung wurde eine Konditionierung definiert, bei welcher die Dosis einer Ganzkörperbestrahlung (total body irradiation, TBI) unter 12Gy lag. Ferner war die kumulative Busulfan-Dosis <14 mg/kg Körpergewicht bei oraler Gabe bzw. <11.2 mg/kg Körpergewicht bei intravenöser Gabe. Alle Dosen die darüber hinausgingen, wurden zu den Standardkonditionierungen gezählt.

Tabelle 8 gibt Beispiele für im Universitätsklinikum Eppendorf gebräuchliche Standard- und RIC-Konditionierungen.

Intensität des Konditionierungsregimes	Medikament	Dosierung (mg/kg KG)	Tag
Standardkonditionierung <i>TBI 12Gy + Cyclophosphamid</i>	Total Body Irradiation (TBI)	2x2	d-6 bis d-4
	ATG	5	d-4
	Cyclophosphamid	60	d-3
	ATG	15	d-3
	Cyclophosphamid	60	d-2
	ATG	20	d-2 bis d-1
Dosisreduzierte Konditionierung <i>FLAMSA + Busulfan</i>	Fludarabin	30mg/m ² KOF	d-11 bis d-8
	Amsacrin	100mg/m ² KOF	d-11 bis d-8
	Cytarabin	2000mg/m ² KOF	d-11 bis d-8
	Pause		d-7 bis d-5
	i.v. Busulfan	4x0.8	d-4 bis d-3
	Fludarabin	30mg/m ² KOF	d-4 bis d-3
	ATG	5	d-4
	ATG	15	d-3
	i.v. Busulfan	2x0.8	d-2
	ATG	20	d-2 bis d-1

Tab. 8: Beispiele für Konditionierungsprotokolle der Klinik für Stammzelltransplantation bei Patienten mit AML.

Die Entscheidung über das angewendete Konditionierungsregime wurde in jedem Einzelfall unter Berücksichtigung von Krankheitsstatus, Alter und Komorbiditäten getroffen.

Als GvHD-Prophylaxe wurde vor Transplantation standardmäßig Methotrexat in Kombination mit Cyclosporin A oder Mycophenolat-Mofetil (MMF) verabreicht. Tabelle 9 zeigt beispielhaft verwendet Dosierungen.

Cyclosporin A	3mg/kgKG von Tag 1-100, Zielserumlevel: 200-300ng/ml Ausschleichen ab Tag 100 Bei fehlenden GvHD-Anzeichen Beendigung zwischen Tag 120 und 140
Methotrexat	10mg/m ² an Tag +1, +3 und +6
ATG	Mediane Dosis 30mg/kgKG
Oder	
Thymoglobulin	Mediane Dosis 7.5mg/kgKG

Tab. 9: Immunsuppression vor allogener Stammzelltransplantation(Kröger et al. 2006)

2.3. Bestimmung des Chimärismus

Die Chimärismus-Analyse wurde auf Basis der quantitativen „real-time“ PCR (RQ-PCR) nach der TaqMan®-Technologie durchgeführt. Vor Transplantation wurde zunächst peripheres Blut von Spender und Empfänger untersucht. Bei Nachweis von Differenzen hinsichtlich bestimmter Polymorphismen können mit dieser Methode empfänger- bzw. patienten-spezifische DNA-Abschnitte nachgewiesen und quantifiziert werden.

Nach allogener Transplantation wurden bei den Patienten die Kontrollen sowohl aus peripherem Blut als auch aus Knochenmark durchgeführt. Proben aus diesen beiden unterschiedlichen Materialien (Blut und Knochenmark) wurden in dieser Analyse gleichwertig behandelt. Die Literatur weist teilweise darauf hin, dass diese Vorgehensweise zu fehlerhaften Ergebnissen führen kann. Allerdings ist es Patienten im Rahmen der Nachsorge nicht zumutbar, in einmonatigen Abständen Knochenmarkbiopsien durchzuführen. Zudem postulieren andere Autoren, wie beispielsweise Maurillo *et al.*, dass eine gleichwertige Behandlung des Untersuchungsmaterials durchaus möglich ist.(Maurillo et al. 2007) Die im Rahmen

dieser Studie ermittelten Chimärismuswerte basieren daher zum größten Teil auf Untersuchungen aus Proben peripheren Blutes.

2.3.1. Prinzip der quantitativen „real-time“ PCR (RQ-PCR) mittels Taqman®-Methode

Die Taqman®-Methode ist eine 5'Nuclease-Technologie und arbeitet mittels einer TaqMan®-Sonde („probe“). Diese ist eine Messsonde und besteht aus einem Oligonukleotid, welches an einem 5'-Ende mit einem „reporter dye“ (Signalfarbe) („FAM“) und am 3'-Ende mit einem „quencher dye“ (Löschfarbe), „FAMRA“ markiert ist. In der Hybridisierungsphase lagern sich Primer, TaqMan®-Polymerase und auch TaqMan®-Sonde an den zu untersuchenden DNA-Abschnitt an. Solange die beiden Farbstoffe an das Oligonukleotid angelagert sind, wird kein Fluoreszenzsignal abgegeben. Nimmt die Polymerase allerdings ihre Arbeit auf und trifft auf die fluoreszenzmarkierte Sonde, greift sie diese mittels ihrer 5'Exonucleaseaktivität an. Dadurch werden die beiden Farbstoffe „reporter dye“ und „quencher dye“ voneinander abgelöst, letzterer verliert seine abschwächende Wirkung und der erste Farbstoff setzt ein Fluoreszenzsignal frei. Dieses wird durch ein Spektrophotometer (ABI 7700 Sequenzier Detector bzw. ABI 7500 Applied Biosystems) gemessen. Die Intensität dieses Signals ist direkt proportional zur Zahl der in der Synthesephase gebildeten neuen DNA.

Der erste Schritt stellt die Gewinnung von DNA aus EDTA-Vollblut oder EDTA-Knochenmark dar. In der Regel benötigt man dafür 200 µL Probenmaterial, welches sofort oder nach bis zu fünf Tage dauernder Kühlung weiterverarbeitet wird. Die Isolierung der DNA erfolgt mittels einer standardisierten Methode mit Hilfe eines Kits der Firma Quiagen (Hilden, Deutschland).

Im Anschluss kann der Chimärismus anhand von quantitativer „real-time“ PCR auf der Grundlage von Y-spezifischen Gensequenzen (bei geschlechtsdifferenter Transplantation) oder von Empfänger-/Spender-spezifischen Polymorphismen untersucht werden. In der folgenden Tabelle werden die bei den Patienten des

Kollektivs angewendeten Primer und ihre entsprechenden Sequenzen dargestellt, welche analog zu Alizadeh *et al.* ausgewählt wurden.(Alizadeh et al. 2002)

Genlocus	Genlokus	Forward Primer	Reverse Primer	Taqman® Sonde
S01b:	17q	GTA CCG GGT CTC CAC CAG G	GGG AAA GTC ACT CAC CCA AGG	5'FAM CTG GGC CAG AAT CTT GGT CCT CAC A TAMRA3'
S03:	6q	CTT TTG CTT TCT GTT TCT TAA GGG C	TCA ATC TTT GGG CAG GTT GAA	5'FAM CAT ACG TGC ACA GGG TCC CCG AGT TAMRA3'
S04a:	9	CTG GTG CCC ACA GTT ACG CT	AAG GAT GCG TGA CTG CTA TGG	5'FAM TCC TGG CAG TGT GGT CCC TTC AGA A TAMRA3'
S04b:	9	CTG GTG CCC ACA GTT ACG CT	AGG ATG CGT GAC TGC TCC TC	5'FAM TCC TGG CAG TGT GGT CCC TTC AGA A TAMRA3'
S05b:	20	AGT TAA AGT AGA CAC GGC CTC CC	CAT CCC CAC ATA CGG AAA AGA	5'FAM CCC TGG ACA CTG AAA ACA GGC AAT CCT TAMRA3'
S06:	1p	CAG TCA CCC CGT GAA GTC CT	TTT CCC CCA TCT GCC TAT TG	5'FAM CCC ATC CAT CTT CCC TAC CAG ACC AGG TAMRA3'
S07a:	X	TGG TAT TGG CTT TAA AAT ACT GGG	TGT ACC CAA AAC TCA GCT GCA	5'FAM TCC TCA CTT CTC CAC CCC TAG TTA AAC A TAMRA3'
S07b:	X	GGT ATT GGC TTT AAA ATA CTC AAC C	CAG CTG CAA CAG TTA TCA ACG TT	5'FAM TCC TCA CTT CTC CAC CCC TAG TTA AAC A TAMRA3'
S08a:	1q	CTG GAT GCC TCA CTG ATC CA	TGG GAA GGA TGC ATA TGA TCT G	5'FAM CTC CCA ACC CCC ATT TCT GCC TG
S08b:	1q	GCT GGA TGC CTC ACT GAT GTT	TGG GAA GGA TGC ATA TGA TCT G	5'FAM CTC CCA ACC CCC ATT TCT GCC TG TAMRA3'

S09b:	17q	GGG CAC CCG TGT GAG TTT T	CAG CTT GTC TGC TTT CTG CTG	5'FAM CTC CCA ACC CCC ATT TCT GCC TG TAMRA3'
S10b:	18	TTA GAG CCA CAA GAG ACA ACC AG	TGG CTT CCT TGA GGT GGA AT	5'FAM CAG TGT TCC CCA CTC AAG TAC TCC TTT GGA TAMRA3'
S11a:	11	P TAG GAT TCA ACC CTG GAA GC	CCA GCA TGC ACC TGA CTA ACA	5'FAM CAA GGC TTC CTC AAT TCT CCA CCC TTC C TAMRA3'
Y:				5'FAM CAG CCA CCA GAA TTA TCT CCA AGC TCT CTG A TAMRA3'
HCK:		TAT TAG CAC CAT CCA TAG GAG GCT T	GTT AGG GAA AGT GGA GCG GAA G	5'VIC TAA CGC GTC CAC CAA GGA TGC GAA TAMRA3'

Tab. 10: Übersicht über die verwendeten Primer und Taqman®-Sonden zur Evaluation der Polymorphismen (FP: forward primer; RP: reverse primer; P: Taqman®-Sonde).

Bei männlichen Patienten, welche eine weibliche Spenderin hatten, wurde die quantitative „real-time“ PCR anhand von Y-Chromosom spezifischen Sequenzen durchgeführt.(Fehse et al. 2001) Bei allen anderen Konstellationen wurde die RQ-PCR anhand von SNP angewendet. Die Durchführung erfolgte anhand einer Duplex-PCR, die es ermöglicht zwei Zielsequenzen gleichzeitig zu amplifizieren. Dabei wird als Kontrollsequenz das Hematopoetic Cell Kinase-Gen (*HCK*) eingesetzt. Die *HCK*-spezifische PCR wird in der „real-time“ PCR erfahrungsgemäß bei ca. 19-20 Syntheszyklen positiv („threshold cycle“).

Das getestete Material gilt für einen untersuchten Polymorphismus als negativ, wenn die c_t -Werte („threshold cycle“) für die benutzte spezifische PCR und die Kontroll- (*HCK*) PCR ($=\Delta c_t$) um mindestens 10 Zyklen differieren, d.h. wenn sich der untersuchte Polymorphismus bei einer signifikant höheren Zykluszahl nachweisen lässt. Das

Material gilt für den untersuchten Polymorphismus als positiv, wenn die c_t -Werte für die benutzte spezifische PCR und die Kontroll-PCR etwa gleich groß sind ($\Delta c_t=0$).

Zur Durchführung der PCR an einem real-time PCR-Gerät (ABI 7700 Sequenzier Detector bzw. ABI 7500 Applied Biosystems) wurden folgende Reagenzien eingesetzt:

- 12.5 μ L 2x Mastermix für Taqman® PCR
- 10 μ L Proben DNA
- Je 0.25 μ L HCK (Hematopoetic Cell Kinase Gen)-Forward Primer und –Reverse Primer sowie 0.25 μ L HCK-Sonde
- Je 0.25 μ L (für die Y-PCR: 0.5 μ L) des spezifischen Forward Primer und Reverse Primer sowie 0.25 μ L der entsprechenden Sonde

Parallel wurde jeweils eine Negativkontrolle mit Wasser amplifiziert. Zusätzlich wurde eine Standard-Verdünnungsreihe (10%, 3%, 1%, 0.3%, 0.1%) analysiert. Die Verdünnungsreihe wurde aus mononukleären Zellen von merkmals-positiven und merkmals-negativen Proben mittels eines „Buffy-coat“ gewonnen. Der „Buffy-coat“ stellt die dünne Grenzschicht zwischen Erythrozyten und Blutplasma nach Zentrifugation von Vollblut dar und besteht aus Leukozyten und Thrombozyten.

Die Ergebnisse, c_t , wurden in eine vorgefertigte Matrix eingegeben und die entsprechenden Δc_t -Werte anhand von Excel-Tabellen berechnet. Die Werte der Verdünnungsreihe wurden zur Berechnung einer Standardkurve verwendet. Die entsprechende Funktion wurde zur Bestimmung des prozentualen Anteils an Empfängerzellen im Blut umgestellt und in die Tabelle übertragen. Im Anschluss daran wurden die Werte in den Donorchimärismus (% Spenderzellen) umgerechnet und in einem EDV-Befundblatt gespeichert.

2.4. Statistik

Die gesammelten Daten wurden im Anschluss an die Datensammlung in eine SPSS-Tabelle übertragen und anschließend mittels SPSS Statistics 17.0 (SPSS GmbH

Software, München, Deutschland) ausgewertet. Dabei wurden deskriptive Statistiken aufgestellt sowie Chi-Quadrat-Tests, t-tests zweier unabhängiger Stichproben, Univariate Analysen und nicht parametrische Tests unabhängiger Stichproben durchgeführt. Für Letztere wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Als Signifikanzniveau wurde $p \leq 0.05$ gewählt. Als Gesamtüberleben („Overall survival“, OS) wurde der Zeitraum von Transplantation bis Todesdatum, als rezidivfreies Überleben („Disease-free survival“, DFS) die Zeit zwischen Transplantation und Progression der Grundkrankheit gewertet.

3. Ergebnisse

3.1. Deskriptive Statistik

3.1.1. Kollektiv

Im Kollektiv der Studie befanden sich 75 Patienten - 38 Männer und 37 Frauen. Von diesen Patienten waren 52 an einer *de novo* AML, 23 an einer s-AML erkrankt. Das mediane Alter betrug 52.0 Jahre, wobei der jüngste Patient 3, der älteste 67 Jahre alt war. 36 Patienten erhielten eine volle Konditionierung, 39 wiederum wurden dosisreduziert konditioniert.

72 Patienten (96.0%) wurden dabei das erste Mal, 3 Patienten (4.0%) zum zweiten Mal transplantiert. Bei 40 Patienten handelte es sich Zeitpunkt der Transplantation um die Erstdiagnose, 28 befanden sich ersten Rezidiv, 6 im 2. Rezidiv und 1 Patient erlebte bereits das 4. Rezidiv (53.3%, 37.3%, 8.0% und 1.3%). Abbildung 8 verdeutlicht diesen Sachverhalt.

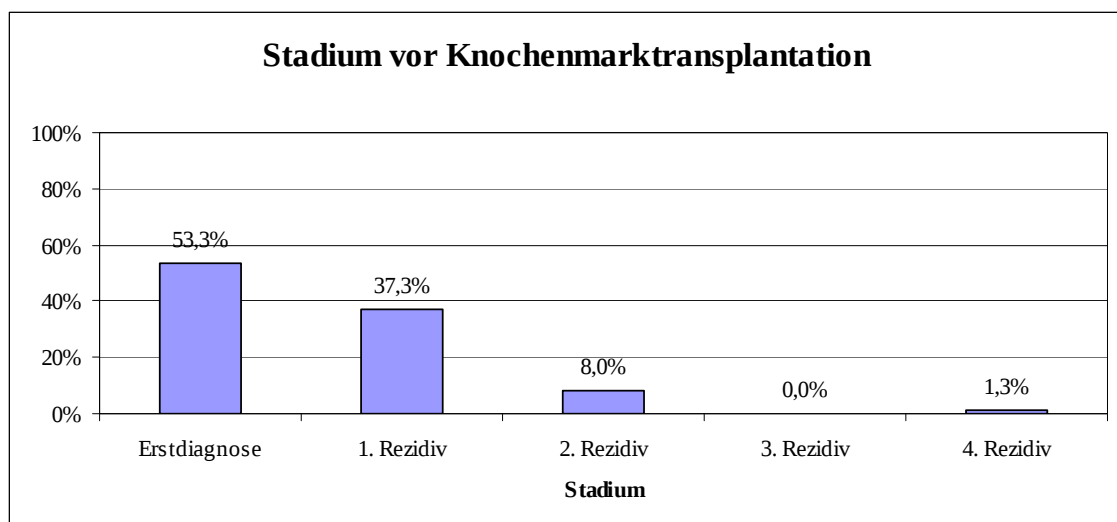


Abb. 8: Stadium vor Knochenmarktransplantation

Vor der Stammzell-Transplantation befanden sich 42 Patienten in kompletter Remission (56.0%), 15 in partieller Remission (20.0%), 16 (21.3%) Patienten sprachen nicht auf

die Therapie an und 2 Patienten befanden sich im Rezidiv (2.7%). Die folgende Abbildung verdeutlicht Stadium und Status der Patienten vor Transplantation.

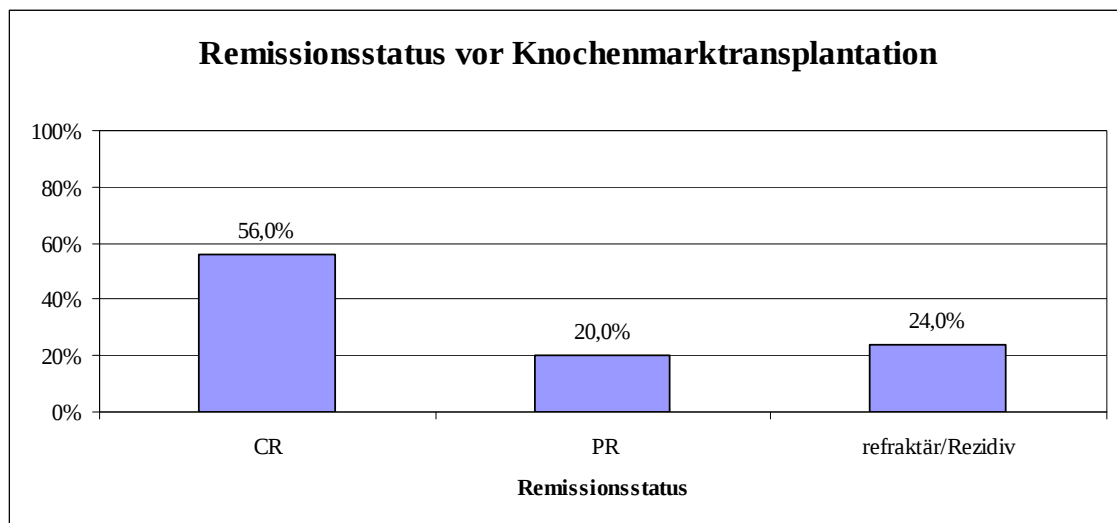


Abb. 9: Remissionsstatus vor Knochenmarktransplantation

Die mediane Anzahl von Blasten in der Zytomorphologie des Knochenmarksaspirates vor Stammzelltransfusion war 4.0% (range 0-90).

Die Quelle der Stammzellen war bei neun Patienten Knochenmark, bei 66 Patienten periphere Blutstammzellen (12.0% und 88.0%). Zwei Patienten hatten Familienspender, alle anderen Patienten einen unverwandten Spender. 53 (70.7%) Patienten wurden in Bezug auf die HLA-Merkmale identisch transplantiert, 22 (29.3%) als Mismatch. 29 Patienten (38.7%) waren mit ihren Spendern im Bezug auf das ABO-System identisch, 46 waren nicht identisch (61.3%). Von den 75 Patienten wurden des weiteren 50 (66.7%) hinsichtlich des Geschlechts übereinstimmend, 25 nicht übereinstimmend transplantiert (33.3%).

Zur Vorbeugung von GvHD erhielten 38 Patienten ATG, 32 Thymoglobulin, fünf Patienten erhielten kein Antithymozytenglobulin. Bei allen Patienten wurde ein Engraftment beobachtet, es kam bei keinem Patienten zu einem „Graft failure“.

Im Laufe der ersten 100 Tage nach Transplantation litten 49 Patienten an einer akuten GvHD, 26 (34.6%) wiesen keine derartigen Symptome auf. Von den betroffenen Personen zeigten 17 Anzeichen einer aGvHD Grad I (22.7%), 19 Grad II (25.3%), 11 Grad III (14.7%) und 2 Grad IV (2.7%). Dies bedeutet, dass 13 Patienten (17.3%) unter schweren Symptomen (Grad 3 und 4) litten. Eine chronische GvHD trat bei 44 Patienten auf (58.7%). Abbildung 10 verdeutlicht oben genannte Ergebnisse.

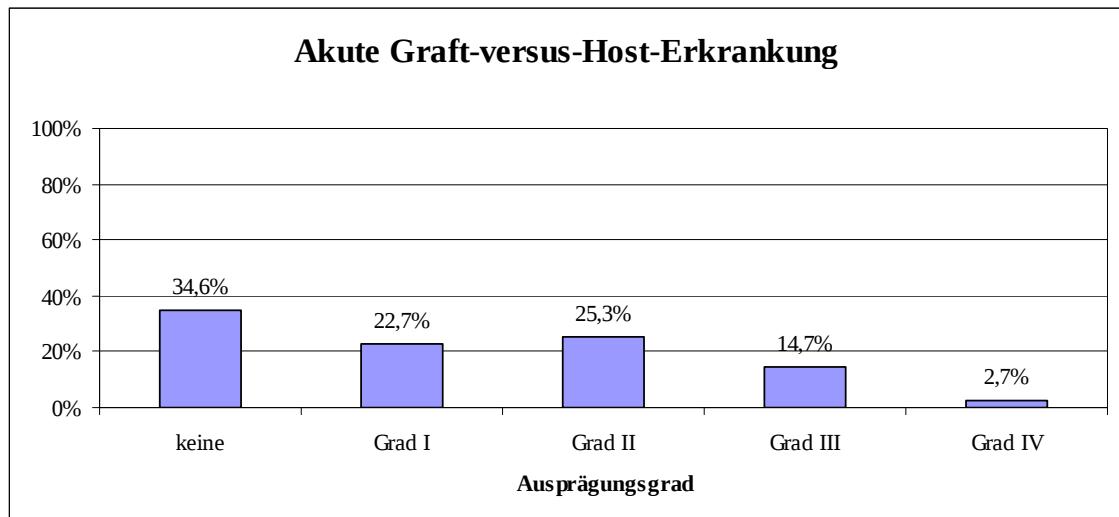


Abb. 10: Akute Graft-versus-Host-Erkrankung

Das mediane Leukozytenengraftment war am Tag 14 (range 8-44) erreicht. Bei den Thrombozyten war dies im Median der 15. Tag (range: 5-78). Als maximale Therapieantwort nach allogener Transplantation zeigten 72 Patienten eine komplette Remission (96.0%), ein Patient eine partielle Remission, zwei weitere Patienten sprachen nicht auf die Therapie an und blieben refraktär.

Im Laufe des Untersuchungszeitraums entwickelten 29 Patienten ein Rezidiv der Grundkrankheit, dies entspricht 38.7%. Abbildung 11 veranschaulicht dieses Verhältnis. Die Letalität bei einem Rezidiv der Grunderkrankung lag bei 89.7%, dies entspricht 26 von 29 Patienten.

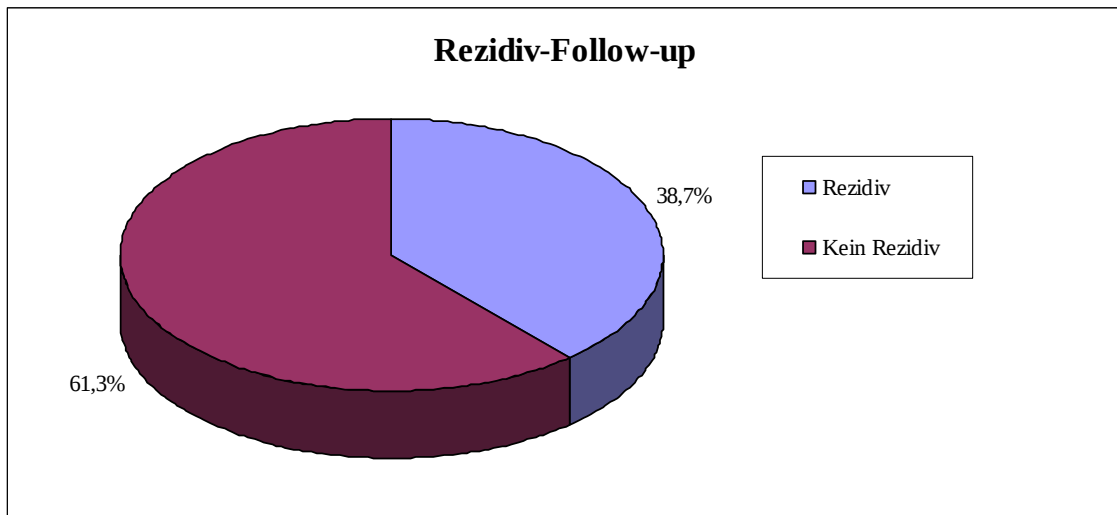


Abb. 11: Rezidiv-Follow-up

Das Gesamtüberleben für alle 75 Patienten lag bei 55% (95%-iges Konfidenzintervall, CI: 44%-67%) sowie das rezidiv-freie Überleben bei 50% (95%-iges Konfidenzintervall, CI: 39%-62%). Während der Follow-up Periode von zwei Jahren waren insgesamt 34 Patienten verstorben (45%).

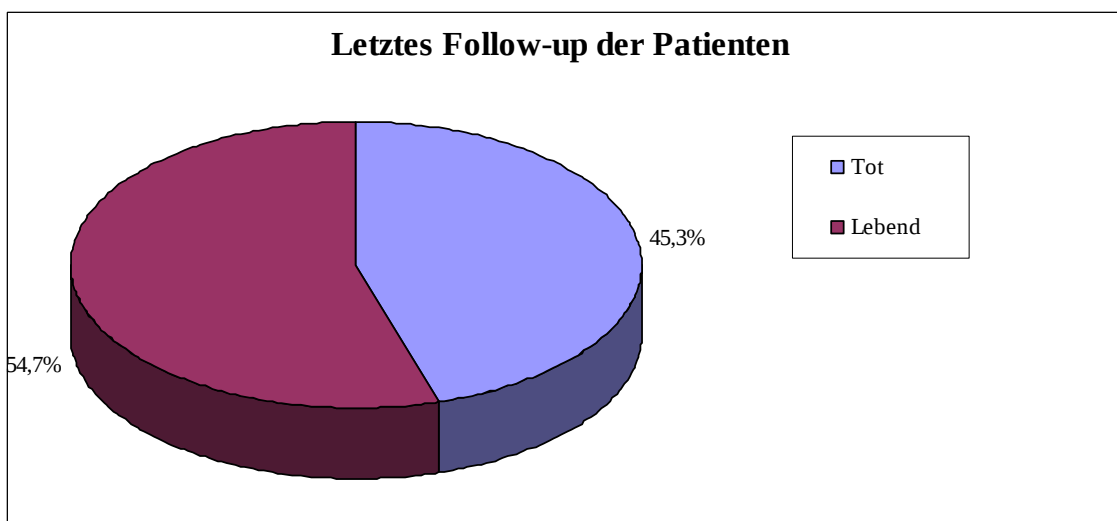


Abb. 12: Letzes Follow-up der Patienten

Die folgenden Abbildungen zeigen Gesamtüberleben und krankheitsfreies Überleben.

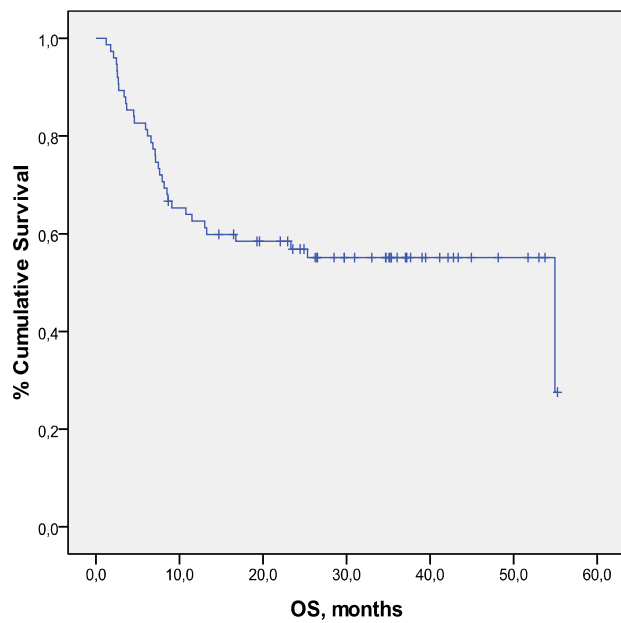


Abb. 13: Overall survival

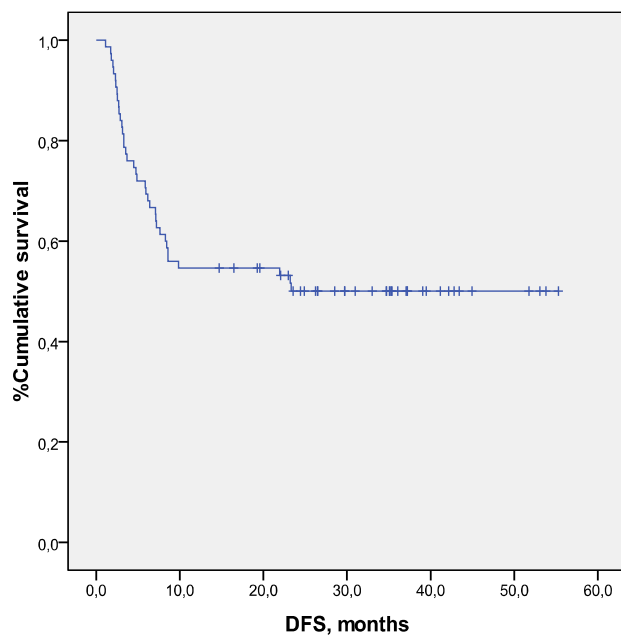


Abb. 14: Disease-free survival

Führende Todesursache war das Rezidiv (76.5%), gefolgt von Infekten ohne (8.8%) bzw. in Zusammenhang mit aGvHD (5.9%) oder cGvHD (5.9) und prärenalem

Nierenversagen (2.9%). Einen Überblick über die Verteilung der Todesursachen gibt Abbildung 15.

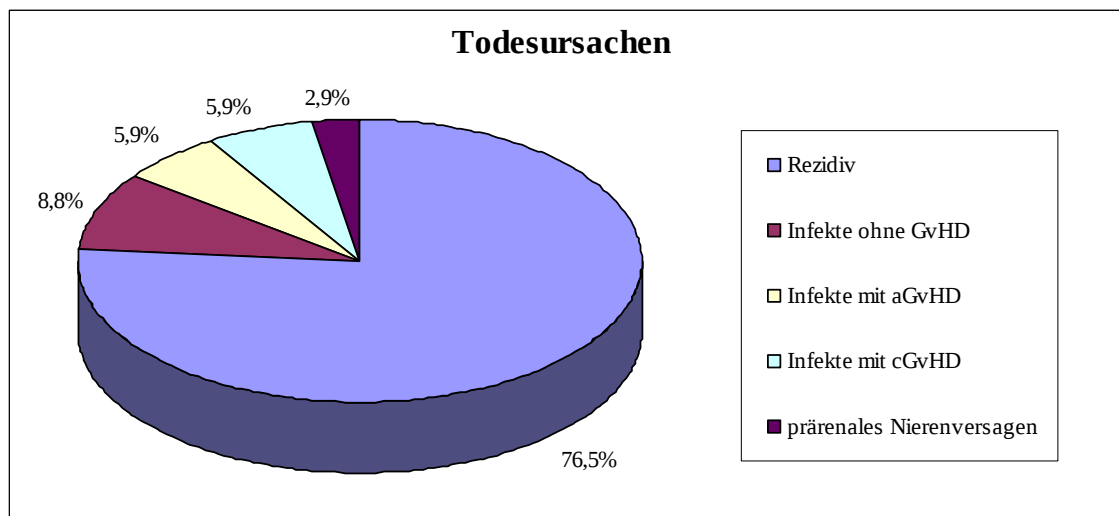


Abb. 15: Todesursachen

Sieben Patienten wurden bei Rezidiv mit Donorlymphozyteninfusionen (DLI) (24.1%) behandelt.

3.1.2. Standardkonditionierung und dosisreduzierte Konditionierung

Im Folgenden werden einige der oben für das Kollektiv genannten Items noch einmal im Vergleich der beiden Gruppen „Standardkonditionierung“ versus „dosisreduzierte Konditionierung“ (RIC) dargestellt. Zusätzlich wurde untersucht, ob sich die beiden Gruppen hinsichtlich bestimmter Variablen signifikant unterscheiden.

36 Patienten wurden mit einem Regime in Standarddosierung behandelt. Davon hatten 30 Patienten die Diagnose *de novo* AML und 6 Patienten die einer s-AML erhalten. 39 Patienten wurden mit reduzierter Intensität konditioniert. In dieser Gruppe waren 22 Menschen an einer *de novo* AML und 17 an einer s-AML erkrankt. Die Patienten, die eine myeloablative Konditionierung erhielten, waren im Median 41.5 Jahre alt (range, 3-65), die Patienten der Gruppe mit RIC 62.0 Jahre (range, 8-67). Dieser Unterschied ist signifikant ($p=0.000$). 35 (97.2%) Patienten der Gruppe mit myeloablativer

Konditionierung wurden zum ersten Mal transplantiert, ein Patient zum zweiten Mal. Dagegen wurden 37 (94.9%) Patienten der anderen Gruppe zum ersten, zwei zum zweiten Mal transplantiert.

Im Vergleich des Stadiums vor Transplantation ergab sich Folgendes: So hatten 17 Patienten (47.2%) der voll konditionierten Patienten zum ersten Mal die Diagnose einer AML erhalten, gegenüber 23 Patienten (59.0%) der reduziert konditionierten Patienten. 15 Patienten (41.7%) der ersten Gruppe befanden sich im ersten und drei im zweiten Rezidiv. Ähnlich sah es bei den Patienten aus, die dosisreduziert transplantiert wurden, von denen sich 13 (33.3%) im ersten bzw. 3 (7.7%) im 2. Rezidiv befanden. Lediglich ein Patient der ersten Gruppe befand sich bereits im 4. Rezidiv.

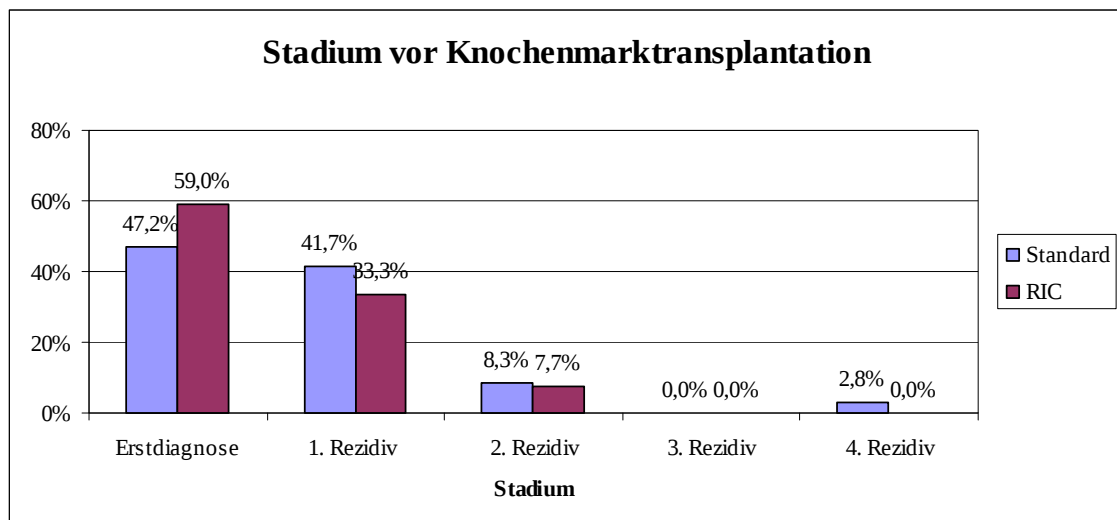


Abb. 16: Stadium vor Transplantation im Vergleich zwischen den Konditionierungsgruppen

Auch in Bezug auf den Remissionsstatus vor Transplantation waren sich die beiden Gruppen ähnlich. Aus der Standard-Gruppe befanden sich 22 Patienten (61.1%) in CR, 9 (25.0%) in partieller Remission und 5 Patienten (13.9%) hatten nicht auf die Therapie angesprochen. Bei 20 (51.3%) der Patienten der RIC-Gruppe hatte sich das Knochenmark vollständig erholt, bei 6 (15.4%) nur teilweise. 13 Patienten (33.3%) blieben therapierefraktär. Somit erreichten insgesamt 33 Patienten aus beiden Gruppen vor der Transplantation keine komplette Remission. Die Unterschiede hinsichtlich des Remissionsstatus im Gruppenvergleich verfehlen das Signifikanzniveau $p=0.298$.

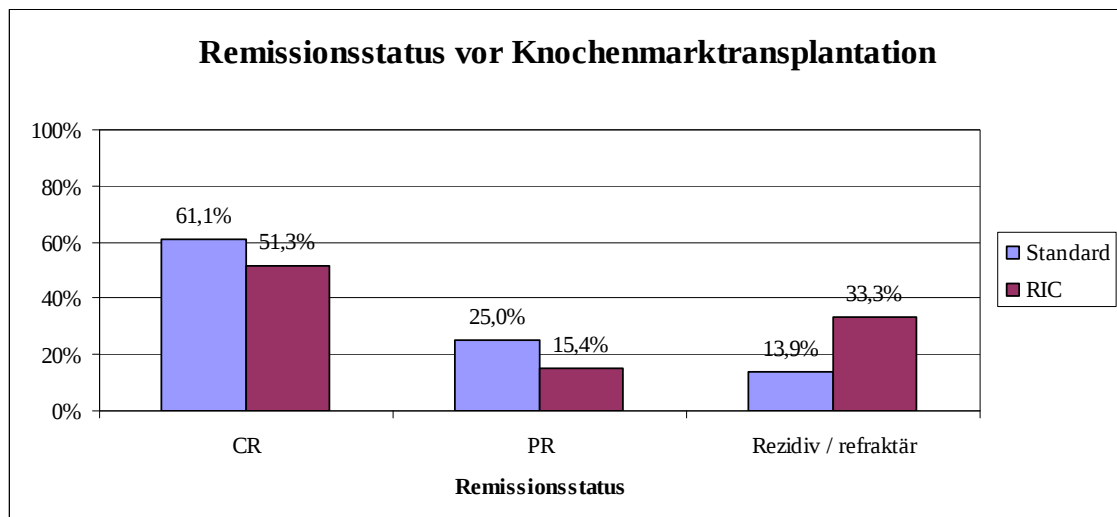


Abb. 17: Remissionsstatus vor Transplantation im Vergleich zwischen den Konditionierungsgruppen

Patienten die vor Transplantation eine myeloablative Konditionierung erhalten hatten, wiesen in der letzten Knochenmarks-Untersuchung vor Transfusion im Median eine deutlich niedrigere Anzahl an Blasten auf, als die Teilnehmer der anderen Studiengruppe (2.5%, range 0-50 vs. 4.5%, range 0-90). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen erreicht jedoch das Signifikanzniveau nicht ($p=0.120$), was bedeutet, dass beide Patientengruppe vor Transplantation in etwa gleich hohe Zahlen an verbliebenen Blasten aufwiesen.

7 Patienten (19.4%) die eine Standardkonditionierung erhielten, wurden mit Knochenmark versorgt, 29 (80.6%) dagegen mit peripheren Blutstammzellen. In der anderen Gruppe verhielt es sich 5.1% ($n=2$) zu 94.9% ($n=37$). 21 Patienten (58.3%) der Standardkonditionierungs-Gruppe erhielten ein HLA-identisches Transplantat, während 32 Patienten (82.1%) der anderen Gruppe auf diese Weise versorgt wurden. Bei 14 Patienten (38.9%) der Standardgruppe waren Spender und Empfänger ABO- identisch, in der anderen Gruppe sogar 15 (38.5%).

Zur Prophylaxe der Spender-gegen-Wirt-Krankheit (GvHD) erhielten 17 Patienten (47.2%) aus der Standardgruppe, beziehungsweise 21 Patienten aus der RIC-Gruppe (53.8%) ATG und 14 (38.9%, Standardkonditionierung), beziehungsweise 18 Patienten (46.2%, RIC) Thymozytenglobulin. Die restlichen 5 (13.9 %) der Standardgruppe bekamen keine Globuline. Trotzdem waren in der ersten Gruppe 24, in der zweiten

Gruppe 25 Patienten von einer aGvHD betroffen. Im Rahmen der reduzierten Konditionierung entwickelten 9 Patienten (23.1%) eine akute GvHD Grad I, 9 (23.1%) II. Grades und 7 (17.9%) III. Grades. Die Daten für die Standardkonditionierung ergaben bei 8 Patienten (22.2%) eine aGvHD Grad I, bei 10 (27.8%) Grad II, bei 4 Patienten (11.1%) Grad III und bei 2 (5.6%) Patienten ein Grad IV. In der Zeit bis Tag 100 nach Transplantation litten in der Standardgruppe 23 Patienten (63.9%) an einer chronischen GvHD, gegenüber 21 Patienten (53.8%) der anderen Gruppe. Abbildung 18 zeigt die Ausprägungsgrade der aGvHD im Gruppenvergleich.

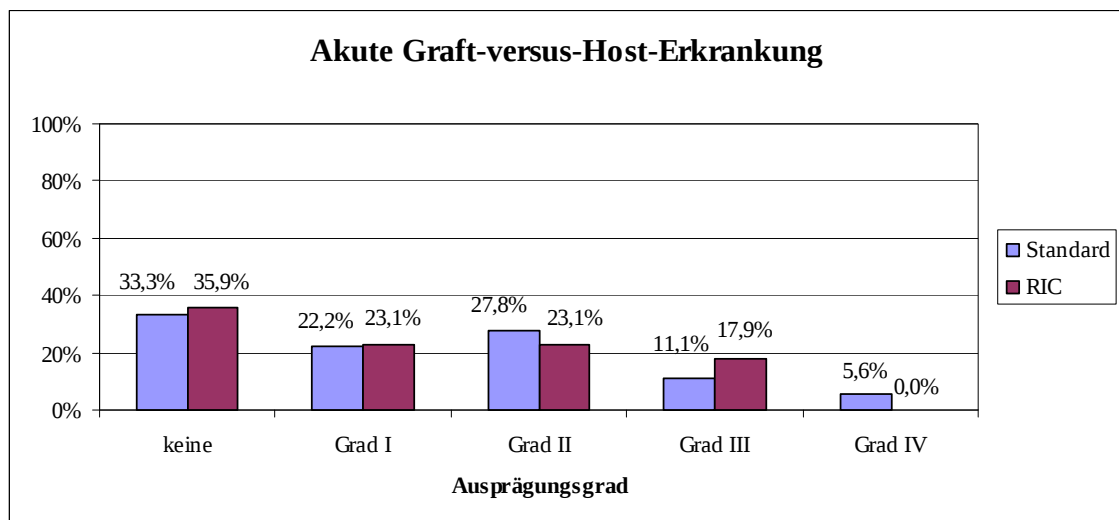


Abb. 18: Akute Graft-versus-Host-Erkrankung im Vergleich zwischen den Konditionierungsgruppen

Das Engraftment der Leukozyten benötigte eine mediane Dauer von 15.0 Tagen in der standard-konditionierten Gruppe (range 8-30), beziehungsweise 13.0 in der RIC-Gruppe. (range 9-44). Der Unterschied war signifikant ($p=0.012$). Auch in Bezug auf das Engraftment der Thrombozyten gab es auffällige Unterschiede. Während die Thrombozytenregeneration in der Standardgruppe im Median 20.0 Tage (range 11-62) einnahm, erreichten die Patienten der RIC-Gruppe die Zielwerte bereits nach 13.0 Tagen (range 5-78). Dieser Unterschied war ebenfalls signifikant ($p=0.004$).

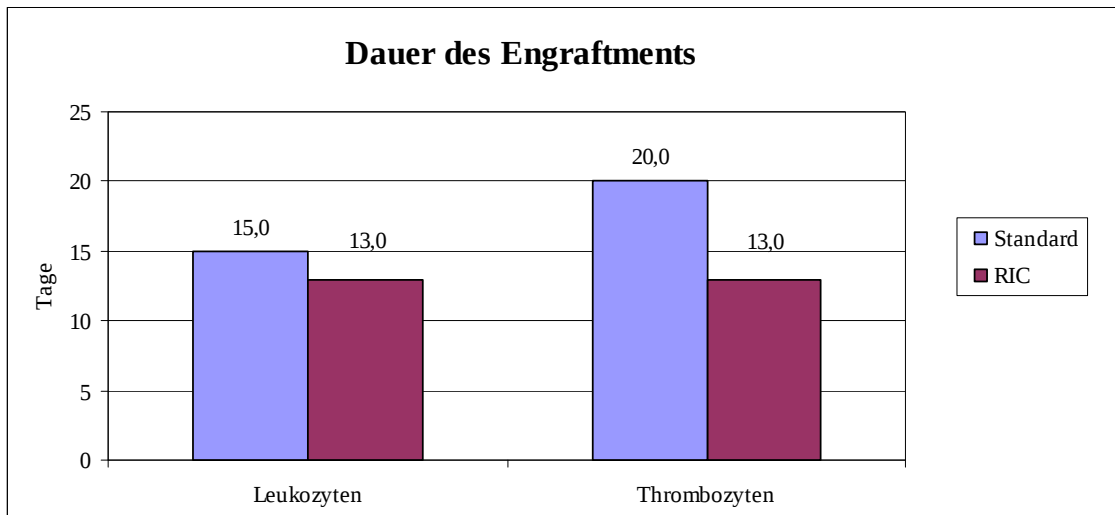


Abb. 19: Dauer des Engraftments von Leukozyten und Thrombozyten im Vergleich zwischen den Konditionierungsgruppen

Im Verlauf der anschließenden Therapie erhielten 3 von 33 (8.3%) der standardisiert konditionierten Patienten, beziehungsweise 8 von 39 (20.5%) Patienten der anderen Gruppe eine Donorlymphozyteninfusion.

Im Bezug auf das Ansprechen der Therapie zeigten alle 36 Patienten der ersten Gruppe eine komplette hämatologische Remission (CR). Bei den Patienten der dosisreduzierten Konditionierung waren zwei Patienten refraktär, ein Patient hatte nur eine partielle Remission. 36 von 39 dieser Patienten (92.0%) wiesen eine komplette Erholung des Knochenmarks auf. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen ist nicht signifikant ($p=0.092$).

Im Laufe von 2 Jahren nach Transplantation entwickelten 11 Patienten, die myeloablativ konditioniert wurden, ein Rezidiv, dies entsprach 30.5%. Demgegenüber erlitten 18 von 39 RIC-Patienten einen Rückfall (46.2%). Im Vergleich ergibt sich jedoch mit $p=0.169$ kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Rezidivwahrscheinlichkeit.

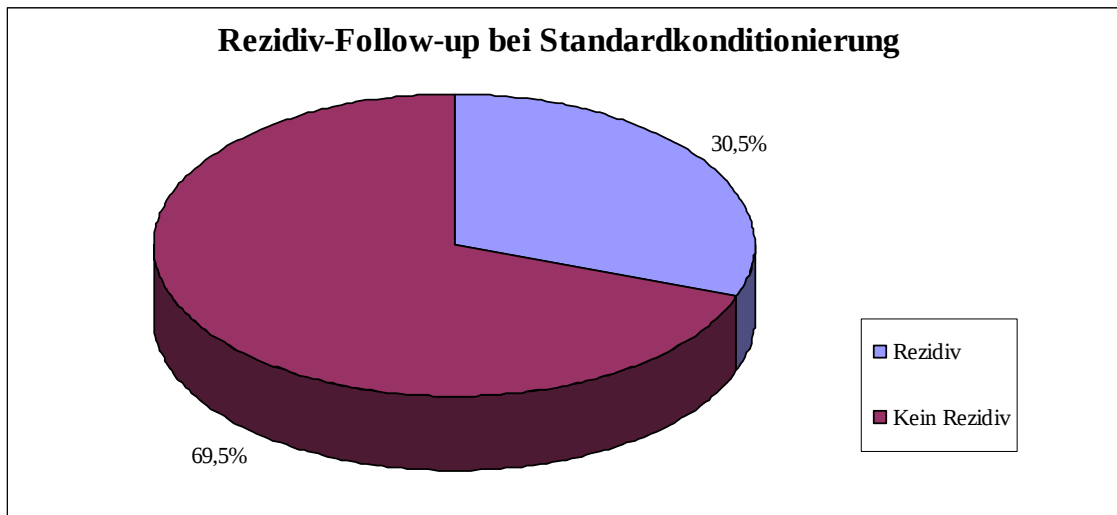


Abb. 20: Rezidiv-Follow-up bei Standardkonditionierung

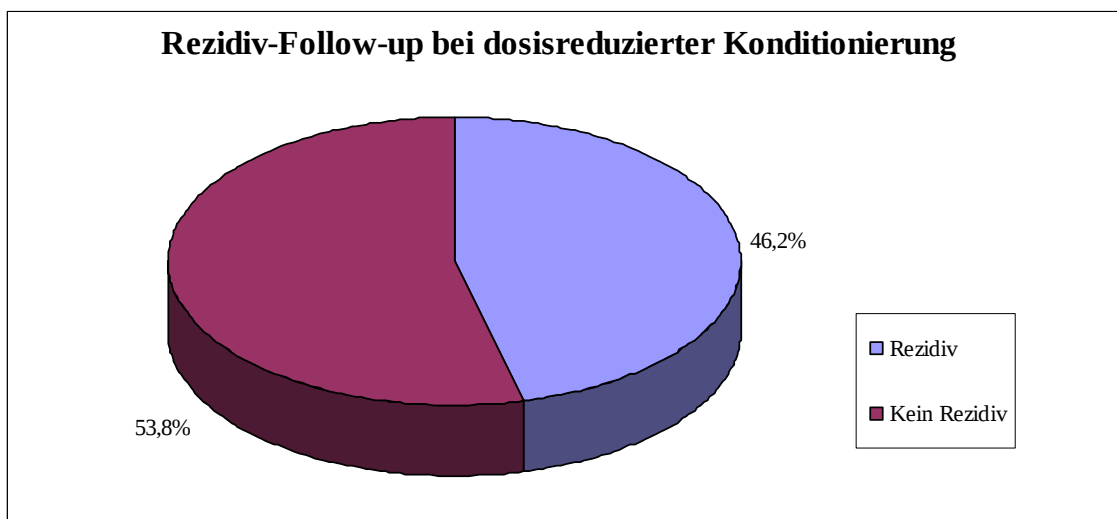


Abb. 21: Rezidiv-Follow-up bei dosisreduzierter Konditionierung

Zum Zeitpunkt des letzten Follow-up waren in der ersten Gruppe noch 25 (69.0%) der Patienten am Leben, während bereits 23 (59.0%) Patienten der dosisreduziert transplantierten Patienten verstorben waren. Diese Differenz ist signifikant ($p=0.01$). Die folgende Abbildung veranschaulicht dies.

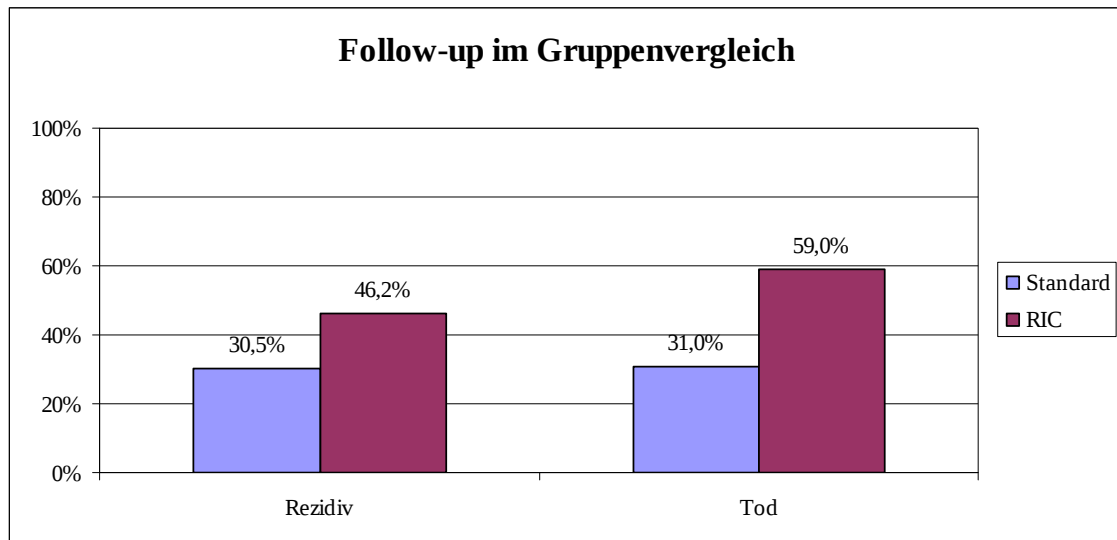


Abb. 22: Follow-up von Rezidiv und Tod im Vergleich zwischen den Konditionierungsgruppen

Das mediane Gesamtüberleben betrug in der Standard-Gruppe 2 Jahre (range 0.1-5) und in der RIC-Gruppe 1.5 Jahre (range 0.1-5.6). Dieser Unterschied war signifikant ($p=0.047$). Hingegen ergab sich bezüglich des medianen DFS kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen. So betrug das mediane rezidiv-freie Überleben in der Standardgruppe 1.5 Monate (range 0.1-5), während dies bei der RIC-Gruppe lediglich 1.3 Monate betrug (range 0.1-5).

Um eine Aussage über Faktoren zu machen, welche das Überleben der Patienten beeinflussen, wurde eine univariate Analyse durchgeführt. So sprach ein Blastenanteil höher als 5% zum Zeitpunkt der Transplantation für ein verringertes 2-Jahres- (39% vs. 67%, $p=0.007$) und rezidiv-freies Überleben (64% vs. 37%, $p=0.04$). Zudem war die Standardkonditionierung im Vergleich zur intensitäts-reduzierten Konditionierung mit einem erhöhten Gesamtüberleben (68% vs. 43%, $p=0.02$) und rezidiv-freien Überleben (64% vs. 37%, $p=0.04$) assoziiert. Auch hatten diese Patienten, welche in kompletter Remission transplantiert wurden ein höheres rezidiv-freies Überleben (61%) als solche, welche nur in partieller Remission (40%) bzw. therapie-refraktär (31%) gewesen waren ($p=0.011$). Schließlich waren ein fortgeschrittenes Stadium der Erkrankung (Rezidiv vs. Erstdiagnose, $p=0.03$) und eine erhöhte Blastenzahl ($>5\%$, $p=0.005$) zum Zeitpunkt der Transplantation mit einem signifikant erhöhtem Risiko behaftet ein Rezidiv zu erleiden.

3.2. Chimärismus

3.2.1. Vergleich des Chimärismus bei Standard- versus dosisreduzierter Konditionierung

Es wurde zunächst untersucht, wie sich der Chimärismus im Beobachtungszeitraum von zwei Jahren bei beiden Konditionierungsgruppen entwickelte (Abbildung 23).

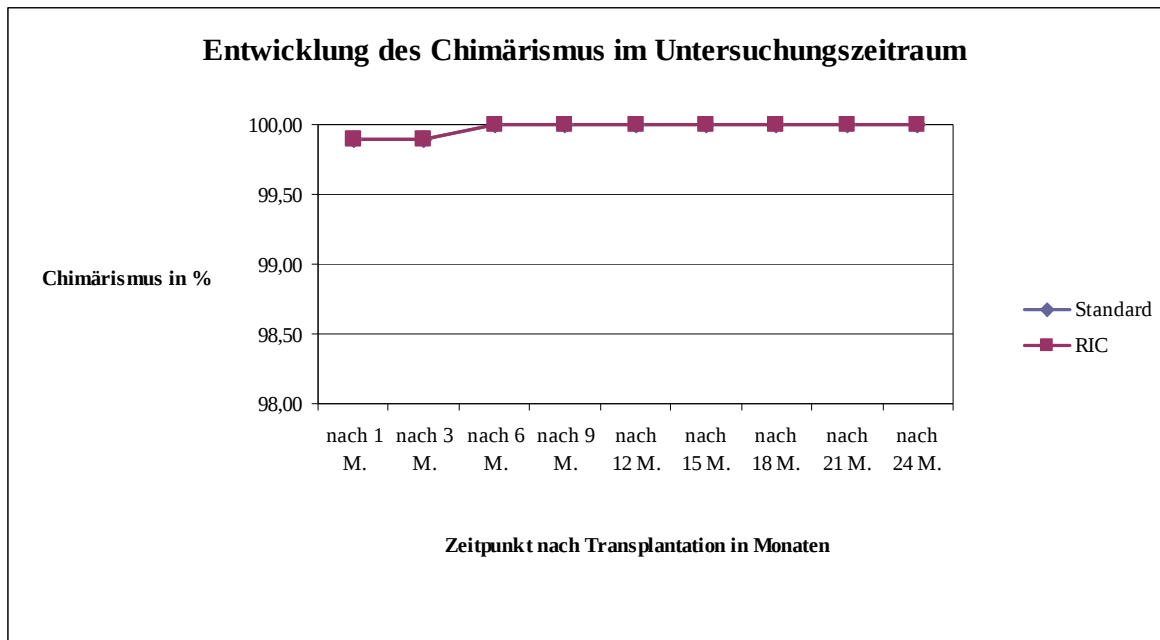


Abb. 23: Entwicklung des medianen Chimärismus innerhalb des Untersuchungszeitraums im Vergleich zwischen den Konditionierungsgruppen

Tabelle 11 zeigt die der obigen Abbildung zugrunde liegenden medianen Chimärismuswerte, sowie die dazugehörigen Spannbreiten.

	Standardkonditionierung (Range)			Dosisreduzierte Konditionierung (Range)		
	Minimal (%)	Maximal (%)	Median (%)	Minimal (%)	Maximal (%)	Median (%)
1. Chimärismus	77.8	100.0	99.9	19.6	100.0	99.1
Nach 1 Monat	77.8	100.0	99.9	45.0	100.0	99.9
Nach 3 Monaten	58.7	100.0	99.9	0.0	100.0	99.9
Nach 6 Monaten	99.7	100.0	100.0	64.6	100.0	100.0
Nach 9 Monaten	28.9	100.0	100.0	99.2	100.0	100.0
Nach 12 Monaten	99.6	100.0	100.0	98.8	100.0	100.0
Nach 15 Monaten	99.7	100.0	100.0	99.8	100.0	100.0
Nach 18 Monaten	99.8	100.0	100.0	99.9	100.0	100.0
Nach 21 Monaten	100.0	100.0	100.0	99.2	100.0	100.0
Nach 24 Monaten	99.9	100.0	100.0	99.3	100.0	100.0
Chimärismus_{Max}	98.9	100.0	100.0	39.7	100.0	100.0
Chimärismus_{Min}	28.9	100.0	99.3	0.0	100.0	95.1

Tab. 11: Mediane Chimärismuswerte und zugehöriges Ranges

Zum Zeitpunkt der ersten Kontrolluntersuchung nach Transplantation, die median nach 24 Tagen statt fand (range 12-30), zeigten 54 der 75 (72%) evaluierten Patienten einen kompletten Spenderchimärismus. Der mediane Chimärismus bei der ersten Untersuchung betrug 99.8% (range 19.6%-100.0%). Der mediane Chimärismus über den gesamten Untersuchungszeitraum hingegen betrug 99.9% (range 99.8-100.0%).

Die Patienten der myeloablativen Therapiegruppe zeigten median konstant Werte über, beziehungsweise gleich 99.9%. Ähnliche Ergebnisse präsentierten die Patienten der RIC-Gruppe, deren Werte konstant über beziehungsweise gleich 99.1% waren. Einen Vergleich der Chimärismus-Werte der beiden Gruppen im Zeitraum der Beobachtung sowie die zugehörigen Ranges gibt Tabelle 12.

Chimärismus	Standard (%)	RIC (%)	p
1. Chimärismus	99.9	99.1	0.000
Nach 1 Mon.	99.9	99.9	0.401
Nach 3 Mon.	99.9	99.9	0.905
Nach 6 Mon.	100.0	100.0	0.298
Nach 9 Mon.	100.0	100.0	0.346
Nach 12 Mon.	100.0	100.0	0.010
Nach 15 Mon.	100.0	100.0	0.897
Nach 18 Mon.	100.0	100.0	0.907
Nach 21 Mon.	100.0	100.0	0.296
Nach 24 Mon.	100.0	100.0	0.162
Chim _{max}	100.0	100.0	0.042
Chim _{min}	99.3	95.1	0.022

Tab. 12: Chimärismus im Vergleich

Bei Betrachtung der Mittelwerte der jeweiligen Chimärismus-Daten fällt auf, dass es zwischen den beiden Gruppen mit Ausnahme von vier Werten keine signifikanten Unterschiede gab. Eine dieser Ausnahmen war der erste ermittelte Chimärismus, welcher in der Standardgruppe höher ausfällt. Der 1. Chimärismus betrug bei Patienten der Standardkonditionierung im Median 99.9%, bei der anderen Gruppe lediglich 99.1%. Diese Differenz war signifikant ($p=0.000$). Ebenso war der Unterschied hinsichtlich des Chimärismus nach 12 Monaten signifikant ($p=0.010$). Auch in Bezug auf den medianen maximalen und minimalen Chimärismus unterschieden sich die beiden Gruppen deutlich (maximaler Chimärismus: $p=0.042$, minimaler Chimärismus: $p=0.022$). Insgesamt gesehen, waren die medianen Chimerismuswerte in der Standardgruppe signifikant höher als in der RIC-Gruppe ($p=0.037$).

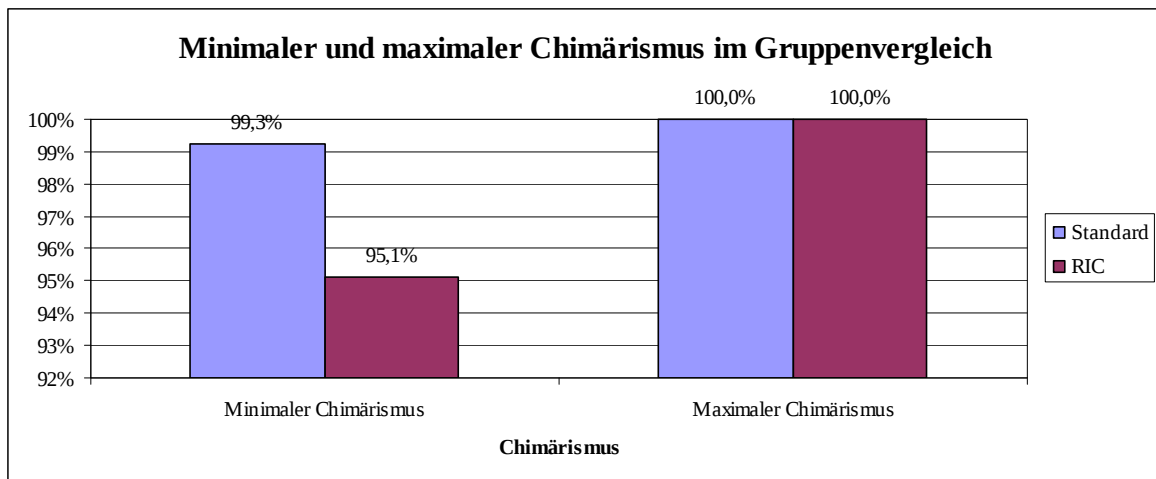


Abb. 24: Minimaler und maximaler Chimärismus im Vergleich zwischen den Konditionierungsgruppen

3.2.2. Chimärismus-Dynamik und Rezidiv-Wahrscheinlichkeit

Im Folgenden wurde untersucht, inwiefern sich der Chimärismus über den Beobachtungszeitraum veränderte.

Insgesamt erreichten 71/75 Patienten (95%) einen kompletten Spenderchimärismus. Zunächst soll die Zeitspanne betrachtet werden, die benötigt wurde, bis sich ein kompletter Spenderchimärismus von $\geq 99.0\%$ Spenderzellen entwickelt hat.

Zum Zeitpunkt der ersten Chimärismusuntersuchung nach Transplantation hatten bereits 54/75 Patienten (72%) einen kompletten Donorchimärismus erreicht. Übertragen auf die Konditionierungsgruppen bedeutet dies, dass 33 von 36 Patienten, die einer Standardkonditionierung unterzogen wurden, bereits früh einen Chimärismuswert $\geq 99.0\%$ erreicht hatten. Dies entspricht 92% aller Patienten dieser Gruppe. Hingegen waren es in der RIC-Gruppe lediglich 21 von 39 Patienten (54%). Dies bedeutet einen signifikanten Unterschied ($p < 0.001$). 40 dieser Patienten konnten diesen Wert über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg halten.

Das Erreichen eines kompletten Spenderchimärismus dauerte median 29 Tage (range 12-163). Die Patienten der RIC Gruppe benötigten etwas weniger Zeit, nämlich 26.5 Tage (range 12-163). Bei der anderen Gruppe war ein Donorchimärismus jedoch erst im Median

nach 31 Tagen erreicht (range 14-70). Dieser Unterschied verfehlte die Signifikanz ($p=0.369$). Vier der 75 Patienten hatten im Laufe der zwei Jahre nie einen vollen Chimärismus erreicht. Drei der Patienten waren vor Transplantation mit dosisreduzierter Konditionierung behandelt worden, ein Patient war einer Standardkonditionierung unterzogen worden.

Über die Studiendauer von 2 Jahren hatten 40/75 (bzw. 40/71 Patienten, die zuvor einen kompletten Spenderchimärismus erreicht hatten) Patienten durchgängig einen vollen Spenderchimärismus („stable donor chimerism“). Dies entspricht 53.0% der gesamten Kohorte. Davon waren 23 Patienten standardmäßig konditioniert, 17 dosisreduziert. Der Unterschied war nicht signifikant. Trotz durchgängigem Donorchimärismus erlebten 9/40 Patienten ein Rezidiv (23%). Dieses Ereignis trat nach einer medianen Zeit von 9 Monaten auf (range 2-24). Die 2-Jahres-Überlebensrate betrug in dieser Kategorie 77% (95%, CI: 64%-90%), das rezidivfreie Überleben 76% (95%, CI: 52%-82%).

Hingegen hatten 31 Teilnehmer (31/75, 41%) zumindest einmal einen gemischten Chimärismus. Davon stammten 19 Patienten aus der RIC-Gruppe und 12 aus der Standardgruppe. In diesem Zusammenhang kann man zwischen zwei Kategorien unterscheiden. 13 (42%, Standard: $n=4$, RIC: $n=9$) dieser Patienten zeigten einen Anstieg der Donor Allele („increasing donor alleles“), 18 (58%, Standard: $n=8$, RIC: $n=10$) erlebten hingegen einen Abfall der Donor Allele („decreasing donor alleles“). Diese Ergebnisse legen die Annahme nahe, dass die Art der Konditionierung keinen Einfluss darauf hat, ob sich ein zu- oder abnehmender gemischter Chimärismus entwickelt. Die statistische Untersuchung stützt diese Aussage ($p=0.558$).

Von den 31 Teilnehmern, die im Laufe der 2 Jahre einen gemischten Chimärismus aufwiesen, entwickelten 17 Patienten ein Rezidiv, 14 hingegen nicht. Betrachtet man die Patienten, die während der gesamten Zeit komplette Spender-Chimärismus-Werte zeigten, fällt auf, dass 31 Patienten nicht ins Rezidiv zurückfielen, jedoch 9 Patienten trotz des Erreichen eines kompletten Donorchimärismus ein Rezidiv entwickelten. Bereits hier lässt sich ein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Outcomes nach komplettem bzw. gemischtem Chimärismus nachweisen ($p=0.007$). Demnach rezidivieren diese Patienten,

welche einen durchgängigen kompletten Spenderchimärismus präsentieren nachweislich seltener. Jedoch wies ein gemischter Chimärismus in 14/31 Fällen unberechtigtweise auf ein kommendes Rezidiv hin, da die Patienten in Remission blieben. Die Rezidivwahrscheinlichkeit bei gemischtem Chimärismus betrug nach obigem Schema demnach 54.8% (vs. 45.2%). Dies bedeutet zwar, dass in der Mehrheit der Fälle tatsächlich mit einem Rezidiv gerechnet werden muss, allerdings ist die Zahl der falsch positiven Ergebnisse beträchtlich.

Wird jedoch zusätzlich noch die Kinetik des gemischten Chimärismus hinzugezogen, der gemischte Chimärismus also in „increasing-“ und „decreasing donor alleles“ eingeteilt, ergibt sich folgendes Bild: Von 13 Patienten, bei denen der Anteil der Empfängerzellen im Laufe der Zeit wieder abnahm, erhielt kein Patient innerhalb von zwei Jahren die Diagnose eines Rezidivs. Alle Patienten blieben in Remission. Jedoch rezidierten 17/18 (94.4%) Patienten der Gruppe deren Empfängerzellanteil wieder zu nahm. 9/40 (22.5%) Patienten der Gruppe mit „stable donor chimerism“ fielen ins Rezidiv. Der Chi-Quadrat-Test nach Pearson ergibt signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ($p=0.000$). Dies bedeutet, dass Patienten mit komplettem Spenderchimärismus oder „increasing donor alleles“ deutlich öfter in Remission blieben, als solche, deren Anteil an residuellen Empfängerzellen zunahm. Die Wahrscheinlichkeit nach Auftreten eines „decreasing donor alleles“ auch tatsächlich ein Rezidiv zu erleiden, lag nach den vorliegenden Daten bei 94.4%. Die Wahrscheinlichkeit trotz dieses Untersuchungsergebnisses in Remission zu bleiben, lag lediglich bei 5.6%.

Die Patienten, welche den Status des vollen Donorchimärismus nicht durchgängig halten konnten, jedoch eine Zunahme der Spenderallele zeigten hatten somit ein günstiges Outcome. So lag das 2-Jahres OS bei 85% (95%, CI: 65%-96%) und das DFS bei 85% (95%, CI: 65%-96%). Gegenteiliges ist jedoch bei der Gruppe der Patienten der Fall, welche einen „decrease of donoralleles“ präsentierten. In dieser Kategorie rezidierten nicht nur signifikant mehr Patienten, sondern taten dies im Vergleich zu den anderen Gruppen auch deutlich früher ($p=0.04$). Vergleicht man das rezidiv-freie Überleben in den genannten drei Gruppen, so unterscheidet sich dieses wie folgt. „Stable donor chimerism“: 67% (95%, CI: 52-82%), „Increase of donor alleles“: 85% (95%, CI: 65%-96%), „decrease of donor alleles“: 0% ($p<0.001$).

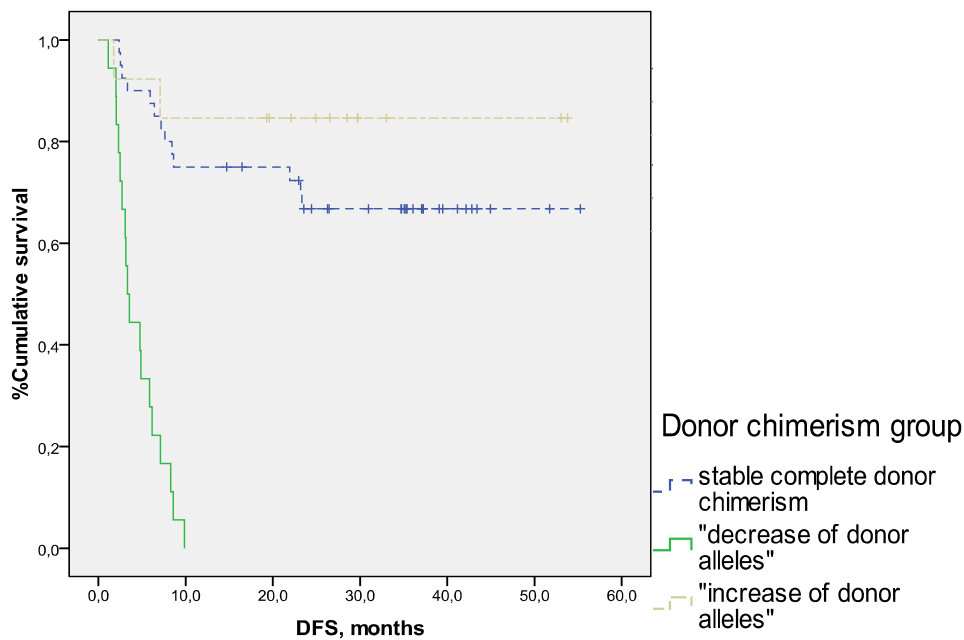


Abb. 25: Chimärismusverteilung nach Standardkonditionierung

Untersuchte man die Abhängigkeit der Chimärismodynamik von der Art der Konditionierung, so ergab sich, dass diese unabhängig von der Konditionierungsdosis war ($p=0.220$).

Aus den vorliegenden Daten konnte ein durchschnittlicher Zeitraum ermittelt werden, der zwischen Abfall des Chimärismus und Auftreten eines Rezidivs lag. Die 17 Patienten, welche im Verlauf nach gemischten Chimärismus-Werten einen Rückfall erlitten, zeigten dies im Median 21 Tage (range 0-133) vor der klinischen Manifestation anhand einer Veränderung des Untersuchungsergebnisses im Sinne eines gemischten Chimärismus.

4. Diskussion

4.1. PCR-Methodik

Aufbauend auf die Untersuchungen von Alizadeh *et al.* (Alizadeh et al. 2002) wird im Labor der Klinik für Stammzelltransplantation des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf die Chimärismus-Diagnostik nach Stammzelltransplantationen mittels quantitativer „real-time“ PCR (RQ-PCR) durchgeführt und bildet die Grundlage der dieser Arbeit zugrundeliegenden Ergebnisse.

Die Analysen wurden anhand von 11 verschiedenen Markern durchgeführt, welche mit Hilfe von SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) bei 90% der Patienten angewendet werden können und eine Sensitivität von 0.1% bis 0.01% erreichen. Im Vergleich zu anderen etablierten Methoden wie short tandem repeats (STR), unter anderem in Untersuchungen von Bader *et al.*, (Bader & Kreyenberg 2004) liegt der Vorteil der RQ-PCR darin, dass die Ergebnisse weitaus sensitiver und linearer sind. Dies liegt an der Art der PCR-Bestimmung, welche zu Beginn der exponentiellen Phase misst und deren Ergebnis damit direkt proportional zur Anfangsmenge der Ziel-DNA ist.

Im Vergleich dazu bestimmt die Short-Tandem-Repeat-PCR (STR-PCR) die Anzahl der PCR-Produkte am Punkt der Plateau-Phase, was die Problematik des PCR-Competition-Bias mit sich bringt. (Alizadeh et al. 2002). Neben dem Vorteil eines sehr hohen Informationsgehalt- und Genauigkeitsgrad, verfügt die STR-PCR jedoch zudem nur über eine geringe Sensitivität. Hier ist die RQ-PCR der STR-PCR deutlich überlegen, da es diese Methode ermöglicht, auch sehr kleine Mengen an DNA zu detektieren. Auch Koldehoff *et al.* konnten in einem Vergleich von STR-PCR mit RQ-PCR mittels SNPs nachweisen, dass letztere eine deutlich höhere Sensitivität besitzt, da gemischte Chimärismuswerte im Hinblick auf drohende Rezidive signifikant früher erkannt werden können (120 Tage versus 30 Tage, $p < 0.007$). (Koldehoff et al. 2006) Jedoch sprechen andere Studien auch von einer niedrigen quantitativen Reproduzierbarkeit, welche sich vor allem bei der Messung großer Anteile autologer Zellen (d.h. Zellen des Patienten) niederschlägt und nur zu tolerieren sei, wenn der Anteil autologer Zellen 5% nicht

überschreitet.(Alizadeh et al. 2002;Maas et al. 2003) Alizadeh *et al.* geben allerdings an, dass das Präzisionslevel für den klinischen Alltag durchaus ausreichend sei.

Somit haben offensichtlich verschiedene Methoden der molekularen Chimärismus-Bestimmung unterschiedliche Vorzüge und Nachteile. Bislang ist die Methodik noch nicht standardisiert, jedoch verfolgen multizentrische Studien das Ziel, Methodik und Interpretation der Chimärismus-Diagnostik der verschiedenen Zentren besser aufeinander abzustimmen. Eine wesentliche Verbesserung könnte auch in der Kombination verschiedener Chimärismus-Techniken liegen. Ein Beispiel hierfür ist die Kombination mit der Interphase-FISH-Methode bei geschlechtsdifferenter Transplantation. Im KMT-Labor der Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf wurde diese Methode in den letzten Monaten zur Verbesserung der Sicherheit etabliert.

4.2. Standard- und dosisreduzierte Konditionierung

Vor dem Hintergrund, dass in den letzten Jahren immer mehr älteren Patienten oder auch Patienten mit Komorbiditäten die Möglichkeit einer allogenen Stammzelltransplantation gegeben werden soll, hat es sich bewährt, Transplantationen durchzuführen, vor denen die Patienten mit einer dosisreduzierten Konditionierung behandelt werden. Stammzelltransplantationen mit vorhergehendem dosisreduzierten Regime stellen mittlerweile mindestens ein Viertel aller durchgeführten Transplantationen dar,(Gratwohl et al. 2002) je nach Krankheitsentität kann dieser Anteil auch höher sein. Wenngleich ein deutlicher Vorteil dieser Konditionierungsstrategie in der geringeren transplantations-assoziierten Mortalität (TRM) liegt, wird eine erhöhte Rezidivwahrscheinlichkeit im Vergleich zu myeloablativen Konditionierungsstrategien diskutiert.(de Lima et al. 2004)

Ganz entscheidend für den weiteren Verlauf ist allerdings, welchen Einfluss die Konditionierungsintensität auf die Regeneration der Hämatopoese sowie auf die Entwicklung eines kompletten Spenderchimärismus hat. Es stellt sich also die Frage, inwiefern die Chimärismus-Diagnostik bzw. die Interpretation der Ergebnisse die Konditionierungsintensität berücksichtigen muss. Dies soll im Folgenden weiter diskutiert werden.

4.3. Ursachen und Bedeutung der Chimärismus-Diagnostik

Mit den Fortschritten auf dem Gebiet der molekularen Untersuchungstechniken ist es in den letzten Jahren möglich geworden, den hämatopoetischen Chimärismus mit hoher Sensitivität zu bestimmen und die Ergebnisse zur Kontrolle des Transplantationserfolges sowie zur Rezidivüberwachung zu nutzen.(Bader et al. 2005;Hancock et al. 1997;Koldehoff et al. 2006) Es herrscht jedoch Uneinigkeit darüber, inwiefern die Ergebnisse für den klinischen Alltag zur Rezidivdiagnostik brauchbar sein können: Ein Grund hierfür ist die Tatsache, dass gemischte Chimärismus-Werte neben Hinweisen auf ein Rezidiv auch zahlreiche anderen Ursachen haben können. So kann ein gemischter Chimärismus auch Ausdruck einer dosisreduzierten Konditionierung sein.(van Leeuwen et al. 1994) Ferner zeigen Untersuchungen mit T-Zell-depletierten Transplantaten eine höhere Frequenz von gemischtem Chimärismus als bei nicht depletierten Transplantaten.(Schaap et al. 2000;Schaap et al. 2002) Auch kann eine Reduktion des Spenderchimärismus Hinweise auf eine Transplantatabstoßung („graft rejection“) geben.(Dubovsky et al. 1999;Mattsson et al. 2001) Um bezüglich dieser Problematik Klarheit zu schaffen, sind weitere Untersuchungen nötig.

Einen sehr wichtigen Aspekt stellt hierbei die Beobachtung der Dynamik des Chimärismus dar, welche es eher zulässt, verlässliche Aussagen zum Rezidiv und zur Rezidivwahrscheinlichkeit zu machen.(Barrios et al. 2003)

4.4. Vergleich der Konditionierungsgruppen

Im Kollektiv der Studie befanden sich 75 Patienten von denen 52 an einer *de novo* AML, 23 an einer s-AML erkrankt waren. 36 Patienten waren mit einem Standard-Konditionierungsregime vorbehandelt, 39 dagegen mit reduzierter Intensität. Das mediane Alter lag bei 52.0 Jahren. Dies entspricht in etwa dem medianen Alter vergleichbarer Studien.(Martin et al. 2009;Valcarcel et al. 2008) Das mediane Alter der Patienten mit einer dosisreduzierten Konditionierung war signifikant höher (62.0 versus 41.5 Jahre, $p<0.000$). Dies ist insofern schlüssig, als dass häufig ältere Patienten oder Patienten mit Komorbidität für eine dosisreduzierte Konditionierung ausgewählt werden.(Andersson et

al. 2003;Giralt et al. 1997;Slavin et al. 1998;Wong et al. 2003) Auffallend war, dass nur 56.0% aller Patienten vor allogener Stammzelltransplantation eine komplette Remission erreicht hatten. Hierzu muss betont werden, dass nach neueren Therapierichtlinien ausschließlich AML-Patienten mit einem genetisch ungünstigen Risikoprofil oder mit insuffizientem Ansprechen auf die Induktionstherapie für eine allogene Transplantation ausgewählt werden. Ferner finden sich in großen Transplantationszentren darüber hinaus schwerpunktmässig komplexe Fälle, welche von anderen hämatologischen Zentren dorthin überwiesen werden. Dies gilt auch für die Klinik für Stammzelltransplantation des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.

Der hohe Anteil an Patienten der Studie, welche periphere Blutstammzellen (PBSC) erhalten hatten (88.0%), entspricht heute gängigen Transplantationsstrategien.(Bensinger et al. 2001) Wenngleich bei Verwendung von peripheren Blutstammzellen eine höhere Inzidenz von akuter und chronischer GvHD diskutiert wird,(Schmitz et al. 2002) postulieren manche Autoren bei peripheren Blutstammzellen eine geringere Rezidivwahrscheinlichkeit.(Bensinger et al. 2001) Insgesamt nimmt generell die Zahl der mit peripheren Stammzellen transplantierten Patienten in den letzten Jahren kontinuierlich zu.

Das mediane Leukozytenengraftment um den 14. Tag in dieser Analyse entspricht den Ergebnissen der Literatur, nach welcher es zwischen dem 12. und 16. Tag zu stabilen peripheren Leukozytenwerten ($> 1 \times 10^9/L$) gekommen sein sollte. Ein suffizientes Thrombozytenengraftment von mehr als $10 \times 10^9/L$ war im Median nach 15 Tagen erreicht, was ebenfalls mit der Literatur vergleichbar ist.(Ostronoff et al. 2009)

Die Konditionierungsgruppen unterscheiden sich in ihren Einzelwerten allerdings signifikant. Sowohl das Engraftment der Leukozyten ($p=0.012$) als auch der Thrombozyten ($p=0.004$) erfolgte in der Gruppe mit dosisreduzierter Konditionierung schneller als in der Gruppe mit myeloablativer Vorbehandlung. Im Median betrug der Unterschied zwei bzw. sieben Tage. Dies bestätigt frühere Arbeiten, welche zeigten, dass das Engraftment nach intensitätsreduzierter Konditionierung suffizient verläuft und dass eine dosisreduzierte

Konditionierung mit einer kürzeren Aplasiephase assoziiert ist.(Hegenbart et al. 2006;Stelljes et al. 2005)

Hinsichtlich des unmittelbaren maximalen Therapieansprechens auf die Transplantation gibt es zwischen den beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede ($p=0.092$). Während die Patienten der vollen Konditionierung zu 100% eine komplette Remission erreichten, waren dies in der anderen Gruppe 92%. 8% der Patienten erreichten eine partielle Remission oder waren refraktär.

Wenngleich frühere Studien von einem geringeren rezidivfreien Überleben nach dosisreduzierter Konditionierung berichten,(Massenkeil et al. 2005) sahen wir hier mit 46.2% nach dosisreduzierter Konditionierung und 30.5% nach myeloablativer Konditionierung ähnliche Rezidivraten ($p=0.169$). Auch hinsichtlich der Dauer des rezidivfreien Überlebens gibt es keine signifikanten Unterschiede (Standardkonditionierung: 1.5 Monate; RIC: 1.3 Monate) (n.s.).

Am Ende des 2-jährigen Untersuchungszeitraums sind noch 41 von 75 Patienten am Leben. Dies entspricht 54.7%. Beim Vergleich der beiden Konditionierungsgruppen fällt auf, dass in der Standard-Kohorte noch 25 von 36 Patienten leben (69.4%), hingegen nur 16/39 Patienten (41.0%) der Gruppe mit dosisreduzierter Konditionierung. Hinsichtlich der Ergebnisse der Standardkonditionierung deckt sich dieses Ergebnis mit früheren Studien, welche von einem Langzeitüberleben zwischen 60 und 70% berichten.(Cornelissen et al. 2007;Vicente et al. 2007) Dieser Unterschied war signifikant ($p=0.01$). Auch im Bezug auf das mediane Gesamtüberleben unterschieden sich die beiden Gruppen signifikant voneinander (Standardkonidtionierung: 2 Jahre vs. RIC: 1.5 Jahre, $p=0.047$).

Dieses Ergebnis steht allerdings nicht in Einklang mit der Mehrzahl anderer Studien. So berichten *Massenkeil et al.* nicht von einem signifikant verschiedenen OS bei RIC- und standardkonditionierten AML-Patienten (13 versus 21 Monaten, n.s.).(Massenkeil et al. 2005) Auch wenn auf eine teilweise unzureichende Datenlage hingewiesen wird, stützen andere Untersuchungen wie beispielsweise eine Studie von Parker *et al.*(Parker et al. 2002) diese Aussage. Jedoch betonen die Autoren auch, dass die Datenlage hinsichtlich des

langfristigen Erfolges von dosisreduzierter Konditionierung noch nicht ausreichend erforscht sei und weiterführende Untersuchungen abgewartet werden müssten.

4.5. Ergebnisse der Chimärismodynamik im Vergleich zwischen den Konditionierungsgruppen

4.5.1. Vergleich der Chimärismuswerte über den Zeitraum von 24 Monaten

Die Ergebnisse der beiden Gruppen (Standard- versus dosisreduzierte Konditionierung) fallen hinsichtlich der Chimärismuswerte zu den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten im Intervall zwischen 1 - 24 Monaten sehr ähnlich aus und unterscheiden sich lediglich zu zwei Zeitpunkten signifikant. Dies sind der erste bestimmte Chimärismuswert ($p=0.000$) im Rahmen der ersten Kontrolle nach SCT (maximal 2 Monate nach Transplantation), sowie der Wert nach 12 Monaten mit einem Signifikanzniveau von $p=0.010$. Zu beiden Untersuchungszeitpunkten ist das mediane Ergebnis der Standardkonditionierung höher als das der dosisreduzierten Gruppe. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen bestehen auch hinsichtlich des minimalen ($p=0.022$) und maximalen ($p=0.042$) Chimerismus, der jeweils unter Standardkonditionierung höher ausfällt. Diese Unterschiede lassen sich sicherlich auch damit erklären, dass sich ein kompletter Donorchimärismus in der Standard-Gruppe bei der Mehrheit der Patienten schon zum ersten Zeitpunkt der Chimärismusuntersuchung etabliert hatte (72% vs. 54%, $p<0.001$).

4.5.2. Etablierung des Spenderchimärismus

Die Etablierung eines vollen Spenderchimärismus dauert im Median 29 Tage, wobei sich beide Gruppen nicht signifikant unterscheiden (Standardgruppe: 31 Tage, RIC-Gruppe: 26.5 Tage; $p=0.369$). Generell entspricht die Dauer der Etablierung eines vollen Chimärismus dem Resultat anderer Studien wie etwa von Lübbert *et al.*, dessen Patienten nach dem Fludarabin, BCNU und Melphalan-Protokoll (FBM) mit reduzierter Intensität konditioniert wurden und nach 30 Tagen zu 80% einen kompletten Spenderchimärismus aufwiesen.(Lübbert et al. 2009) Auch die Verteilung der Ergebnisse in der RIC-Gruppe,

bei welcher die Spannbreite bis zum Erreichen eines vollständigen Chimärismus zwischen 12 und 163 Tagen lag, entspricht der vorausgegangener Untersuchungen, wie beispielsweise der von Child *et al.* durchgeführten Untersuchung, in welcher der Autor 15 Patienten nach einer allogenen Transplantation und dosisreduzierter Konditionierung hinsichtlich ihrer Chimärismusentwicklung beobachtete.(Childs et al. 1999)

Ein interessantes Ergebnis dieser Arbeit war, dass die Zeit bis zur Entwicklung eines kompletten Donorchimärismus in beiden Gruppen nicht wesentlich unterschiedlich war, jedoch die Mehrzahl der Patienten, welche bereits nach maximal 2 Monaten einen vollen Donorchimärismus erreicht hatte, myeloablativ konditioniert worden war. Dieses Ergebnis wird von mehreren Arbeiten gestützt, die postulieren, dass Patienten, welche einer reduzierten Konditionierung unterzogen wurden in der Regel erst einige Zeit einen gemischten Chimärismus entwickeln und im Vergleich zu voll konditionierten Patienten manchmal sogar erst Monate später eine komplette Spender-Hämatopoese aufwiesen.(Baron et al. 2004;Carvallo et al. 2004;Childs et al. 1999;Dey et al. 2003;Slavin et al. 1998) Hier könnten mehrere Faktoren relevant sein: Baron *et al.* verweisen auf verschiedene Studien, nach denen die Wahl des Medikamentes einer dosisreduzierten Konditionierung deutlichen Einfluss auf die Etablierung des Chimärismus hat.(Baron & Sandmaier 2006) So konnten Ueno *et al.* zeigen, dass Patienten die mit Melphalan und Fludarabin konditioniert wurden (kumulative Dosis: Melphalan 140mg/m^2 , Fludarabin $125\text{-}150\text{mg/m}^2$) nach einem Follow-Up von 28 Tagen bereits einen medianen Chimärismus von 100% aufwiesen,(Ueno et al. 2003) wogegen Patienten, die mit Cyclophosphamid anstelle von Melphalan behandelt wurden (kumulative Dosis: Fludarabin 125mg/m^2 , Cyclophosphamid 120mg/kg) zum gleichen Zeitpunkt nur einen Chimärismus von 38% zeigten.(Carvallo et al. 2004)

Neben der Art der dosisreduzierten Konditionierungsregime könnte auch die Entität der Erkrankung relevant sein. Viele der oben zitierten Arbeiten schlossen Patienten verschiedener hämatologischer Entitäten in die Analysen ein, während in der hier vorliegenden Studie nur AML-Patienten untersucht wurden. So scheint zum Beispiel nach eigenen Erfahrungen bei Patienten mit einer Myelofibrose, welche ebenfalls dosisreduziert konditioniert werden, in viel mehr Fällen und über längere Zeiträume nach Transplantation

ein gemischter Chimärismus zu bestehen. All diese Aspekte bedürfen einer weiteren Analyse und der Bestätigung mittels größerer Fallzahlen.

Über den Follow-up-Zeitraum von 24 Monaten konnten 40 von 54 Patienten, welche bereits bei der ersten Kontrolluntersuchung einen vollen Donorchimärismus erreicht hatten, diesen auch halten. Von den genannten 40 Patienten, welche über den gesamten Zeitraum den kompletten Donorchimärismus zeigten, waren 23 vollständig konditioniert worden, 17 dosisreduziert (n.s.), was wiederum zeigt, dass auch nach dosisreduzierter Konditionierung ein konstanter kompletter Donorchimärismus möglich ist.

4.6. Aussage des Chimärismus im Hinblick auf Rezidivwahrscheinlichkeit

Ein Ziel der vorliegenden Studie war, zu untersuchen, ob die regelmäßige Kontrolle des Chimärismus nach allogener Stammzelltransplantation sinnvoll für eine rechtzeitige Rezidivdiagnostik eingesetzt werden kann. Zu diesem Zweck war es interessant zu prüfen, ob Patienten mit einem gemischten Chimärismus signifikant öfter ein Rezidiv erleiden und wie es sich bei Patienten verhält, die während des gesamten Untersuchungszeitpunktes einen vollen Spenderchimärismus aufwiesen.

Wie in Kapitel 4.5.2. bereits erwähnt, zeigten 40 Patienten durchgängig einen vollen Donorchimärismus. Jedoch bewahrte diese Tatsache nicht alle betroffenen Patienten vor einem Rezidiv, da in 9 Fällen ein Rückfall auftrat. Von den 31 Patienten, die während der Untersuchung zumindest einmal einen gemischten Chimärismuswert aufgewiesen hatten, entwickelten 17 Patienten ein Rezidiv, 14 Probanden blieben in Remission. Dies bedeutet, dass Patienten mit gemischtem Chimärismus eine Rezidivwahrscheinlichkeit von 54.8% hatten, Patienten mit vollem Chimärismus eine Wahrscheinlichkeit von 22.5%. Respektive konnten 45.2% der Patienten mit gemischten Chimärismus davon ausgehen, in Remission zu bleiben, und 77.5% der Patienten, die immer einen vollen Donorchimärismus zeigten. Dieser Unterschied war signifikant ($p=0.007$).

Aufgrund dieser Datenlage scheint schon das einmalige Ergebnis eines gemischten Chimärismus vor einem möglichen Rezidiv zu warnen. Es ist jedoch unter

Berücksichtigung der erheblichen Anzahl von falsch positiven Ergebnissen (n=14, 45.2%) fraglich, ob auf Basis dieser Ergebnisse bereits Entscheidungen über Indikation zu einer weiteren Therapie wie beispielsweise einer adaptiven Immuntherapie etwa mit Donor-Lymphozyteninfusionen getroffen werden können. Daher konzentrieren sich verschiedene Autoren darauf, die Dynamik des Chimärismus im Verlauf zu beobachten und bedienen sich der Einteilung des Chimärismus in „increasing“ versus „decreasing mixed chimerism“. Dieser Einteilung liegt die Arbeit von Barrios *et al.* (Barrios *et al.* 2003) zugrunde, welche in der Beurteilung des Chimärismus dynamische Faktoren und die Entwicklung über die Zeit berücksichtigen. In dieser Arbeit wird eine ähnliche Einteilung verwendet: „increasing donor alleles“ und „decreasing donor alleles“. Die Erläuterung dieses Prinzips findet sich im Methodikteil der vorliegenden Arbeit (Kapitel 2.1.2.).

In unserer Untersuchung zeigte sich, dass Patienten, die einen gemischten Chimärismus aufwiesen, welcher sich in Richtung eines kompletten Spenderchimärismus entwickelte, zu 100% eine stabile Remission erreichten und kein Rezidiv entwickelten. Barrios *et al.* kommen zu ähnlichen Resultaten, wobei immerhin 11.1% der angesprochenen Patienten in dieser Studie ein Rezidiv entwickelten. (Barrios *et al.* 2003)

Im Kollektiv einer Studie von Bader *et al.* an 55 Patienten mit akuten Leukämien (AML und ALL), erlitten im Vergleich 7 von 36 Patienten mit vorhergehendem kompletten Chimärismus (19.4%) ein Rezidiv. (Bader *et al.* 1998) Von den Patienten, die eine gegenläufige Entwicklung durchmachten, sich der gemischte Chimärismus also zugunsten der Empfängerzellen verschob („increasing mixed chimerism“), erlitten 9/10 Patienten einen Rückfall. Dies entspricht einer Rezidivwahrscheinlichkeit von 90%. Dieser Unterschied hinsichtlich Rezidivwahrscheinlichkeit war mit $p < 0.0001$ signifikant. Auch die Patienten von Barrios *et al.*, welche der eben genannten Gruppe entsprechen, haben eine sehr hohe Rezidivwahrscheinlichkeit. Diese liegt bei 93.1%. (Barrios *et al.* 2003) Zu ähnlichen Ergebnissen gelangen auch Bader *et al.* (Bader *et al.* 1998), welche in ihrem Kollektiv unter den genannten Bedingungen eine Rückfall-Wahrscheinlichkeit von 90% ermittelten (9/10).

Somit scheint die Dynamik des Chimärismus im Gegensatz zu einem Einzelwert in einem höheren Maße dazu berechtigt, die Indikation zu einer therapeutischen Intervention zu stellen. In unserer Arbeit hatten Patienten, welche einen abfallenden Spenderchimärismus („decreasing donor alleles“) aufweisen, eine Rezidivwahrscheinlichkeit von 94.4%.

Auch eine weitere Studie, welche prospektiv von Bader *et al.* an 32 Leukämie-Patienten (ALL: n=11; AML: n=9; Sonstige: n=12) nach allogener Stammzelltransplantation durchgeführt wurde, stützt diese Erkenntnis, denn auch hier lag die Rezidivwahrscheinlichkeit mit 100% (8 von 8 Patienten) signifikant höher als bei Patienten mit komplettem oder „decreasing mixed Chimärismus“. (Bader *et al.* 1997) Unsere Ergebnisse unterstützen damit die Interpretation von Barrios *et al.* und deuten darauf hin, dass diese Einteilung besser geeignet ist, Aussagen zu einem drohenden Rezidiv machen, da längere Zeiträume zur Urteilsfindung berücksichtigt werden. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Molloy *et al.* sowie Ramirez *et al.* bei Kindern, welche aufgrund einer akuten lymphatischen Leukämie (ALL) eine allogene Transplantation erhielten. (Molloy *et al.* 1996; Ramirez *et al.* 1996)

4.7. Therapeutische Interventionen bei abfallendem Spenderchimärismus

Hinsichtlich der Interventionsmöglichkeiten ergibt sich das Problem des Zeitfensters. Wie bereits erläutert, wird der Chimärismus nach Barrios *et al.* über mehrere Untersuchungszeitpunkte hin beobachtet, um Aussagen über die Dynamik des Chimärismus machen zu können. Aus den von uns ermittelten Daten ergibt sich jedoch eine mediane Zeitspanne von 21 Tagen (range 2-133) zwischen erstem Auftreten eines gemischten Chimärismus und tatsächlichem klinischen Rezidiv. Barrios *et al.* hingegen gehen anhand ihrer Ergebnisse von einem medianen Zeitfenster von 74 Tagen aus. (Barrios *et al.* 2003) Demnach ergibt sich hier die Frage, ob nicht bei Patienten mit akuten Leukämien eine Chimärismus-Diagnostik in kürzeren Intervallen – z.B. alle 1-2 Wochen – angezeigt wäre, um dem kurzen Zeitfenster zwischen dem Abfall des Chimärismus und der Rezidiventwicklung gerecht zu werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bis zum heutigen Zeitpunkt die Aussagekraft von Chimärismusbestimmungen nach allogener Stammzelltransplantation kontrovers diskutiert wird. Mehrere Studien konnten keinen Zusammenhang zwischen gemischtem Chimärismus und Rezidivaufreten finden. (Roy et al. 1990; Schattenberg et al. 1989; van Leeuwen et al. 1993) Andere Autoren sehen dagegen deutliche Korrelationen. (Bader et al. 1997; Lawler et al. 1991; Molloy et al. 1996; Ramirez et al. 1996)

Sowohl letztere Studien als auch die vorliegenden Daten stützen allerdings die These, dass die serielle und quantitative Analyse des hämatopoetischen Chimärismus bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation die Möglichkeit bietet, solche Patienten aus einem Kollektiv zu identifizieren, welche mit einem besonders hohen Risiko behaftet sind, ein Rezidiv zu erleiden. Werden die angesprochenen Untersuchungen in kurzen zeitlichen Abständen durchgeführt, können diese das frühe Erkennen von Rückfällen erleichtern und damit als Screening-Methode verwendet werden. Besonders im Hinblick darauf, dass bei vielen Patienten keine Möglichkeit besteht, den Transplantationserfolg auf anderem Wege zu überprüfen (z.B. bei Absenz von MRD-Markern), ist dies erfolgversprechend. Dennoch sollten zukünftige Studien abgewartet werden, welche diese Aussagen stützen. Dazu würde es sich anbieten, sowohl deutschlandweit wie auch international multizentrische Studien anzustreben, durch welche sich die Möglichkeit bietet, hohe Patienten-Fallzahlen nach verschiedenen Leukämie-Entitäten getrennt zu beobachten.

4.8. Fehlerquellen

Obwohl viele Ergebnisse dieser Arbeit konform mit denen früherer Arbeiten sind, ergeben sich auch Fakten, welche im Unterschied zu den früheren Studien stehen. Nicht zuletzt aufgrund dieser Tatsachen, muss zum Abschluss dieser Studie auf mögliche Fehlerquellen eingegangen werden.

Eine Schwierigkeit stellt sicherlich das behandelte Kollektiv dar. Da das Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf das größte norddeutsche Zentrum für Stammzelltransplantation ist, finden sich hier zu einem größeren Anteil Patienten mit einem ungünstigen Risikoprofil.

Zudem ergibt sich das Problem der limitierten Fallzahl (75 Patienten). Um allgemeingültige Aussagen hinsichtlich der Verlässlichkeit des gemischten Chimärismus im Bezug auf Rezidivwahrscheinlichkeit treffen zu können, müssen allerdings in Zukunft sicherlich weitere Studien durchgeführt werden.

Als weiterer beeinflussenden Faktor muss die Materialquelle zur Untersuchung der Chimärismuswerte betrachtet werden. Die hier vorliegenden Chimärismus-Daten basieren überwiegend auf Untersuchungen peripheren Bluts, da Knochenmarkuntersuchungen in so kurzen Intervallen nicht möglich sind. Unter Beachtung dieser Tatsache gilt es zu bedenken, dass die Interpretation von verschiedenen Materialien (Knochenmark versus peripheres Blut) relevant sein könnte.

4.9. Aktueller Stand der Forschung und Aussicht

Sowohl unsere Ergebnisse als auch die Studien anderer Autoren weisen auf den Nutzen einer engmaschigen Kontrolle des hämatopoetischen Chimärismus zur Rezidivdiagnostik hin. Es bietet sich jedoch auch an, verschiedene Methoden zur Verlaufskontrolle zu kombinieren und MRD- zusammen mit Chimärismus-Diagnostik zu betreiben. Dafür wurden in jüngster Vergangenheit bei der AML beispielsweise *NPM1*-Mutationen hinsichtlich ihres Stellenwerts für eine MRD-Diagnostik nach Transplantation untersucht.(Bacher et al. 2009)

Eine weitere Aufgabe für zukünftige Forschungsbemühungen sollte die Standardisierung der verschiedenen Chimärismus-Techniken sein. So werden bisher in den verschiedenen Zentren beziehungsweise Laboren zum Teil sehr unterschiedliche Verfahren angewendet. Es würde sich daher anbieten, auch für dieses Gebiet Leitlinien zu entwerfen.

Wie bereits angesprochen, werden in der Zukunft multizentrische Studien mit höheren Fallzahlen notwendig sein, um den Sinn und Nutzen von Chimärismus-Bestimmungen eindeutig beurteilen zu können. Hinsichtlich dieser Problemstellung wäre es sicherlich ebenso von Interesse die Etablierung des Spenderchimärismus bei verschiedenen verwandten hämato-onkologischen Entitäten zu vergleichen. Als Beispiel sei ein Vergleich

von Myelodysplastischem Syndrom (MDS) und AML genannt. Anhand derartiger Studien könnte insbesondere der Einfluss von verschiedenen Entitäten untersucht werden. Der Vergleich des Chimärismus unter dem Einfluss verschiedener Konditionierungsstrategien auch bei anderen Entitäten – z.B. bei der ALL – wäre darüber hinaus interessant.

Eine weitere diagnostische Möglichkeit bietet der linienspezifische Chimärismus. Thiede *et al.* untersuchten beispielsweise zirkulierende CD34-Zellen und konnten einen Vergleich zu Ergebnissen des Gesamtchimärismus herstellen. In ihrer Studie konnten Rezidive mittels des CD34-spezifischen Linienchimärismus mit hoher Sensitivität und Verlässlichkeit nachgewiesen werden. Die Autoren empfehlen diese Art der Chimärismusbestimmung daher vor allem für Hochrisikopatienten, bei denen keine andere Monitoring-Möglichkeit zur Verfügung steht. (Thiede *et al.* 2002) Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass auch der linienspezifische Chimärismus noch nicht ausreichend etabliert ist und weiterer Forschungsbemühungen bedarf, diese Methode allerdings für die Zukunft eine aussichtsreiche Möglichkeit darstellt.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Diese Arbeit macht deutlich, wie schwierig eine korrekte Interpretation der Ergebnisse des Chimärismus bei Patienten mit AML nach allogener Stammzelltransplantation ist. Zunächst stellte sich das Problem, dass ein einzelner Befund, welcher einen gemischten Chimärismus darstellt, *per se* keine ausreichende Aussagekraft hinsichtlich eines drohenden Rezidives besitzt. Jedoch kann durch Betrachtung der Dynamik des gemischten Chimärismus die Aussagekraft bezüglich einem drohenden Rezidiv wesentlich verbessert werden: bei „decreasing donor alleles“ – also einem Anstieg des Anteils von Empfängerzellen – betrug die Rezidivwahrscheinlichkeit über 94%. Allerdings muss das kurze Zeitintervall zwischen dem Abfall des Chimärismus und der Manifestation des Rezidivs berücksichtigt werden, welches in dieser Analyse im Median nur 21 Tage betrug. Dies macht deutlich, dass Chimärismusuntersuchungen in kurzen Intervallen indiziert sind, um noch rechtzeitig vor der klinischen Manifestation des Rezidivs eine Intervention planen zu können – z.B. durch die Reduktion oder gar das Absetzen der Immunsuppression oder die Gabe von Donorlymphozyten.

Letztlich bleibt festzuhalten, dass eine Standardisierung der Chimärismus-Techniken, der Interpretation sowie der Untersuchungsintervalle eine große Herausforderung für die Transplantationsmedizin darstellen. Auch sollte der Stellenwert verschiedener MRD-Parameter in der Post-Transplantationsphase bei Patienten mit AML weiter geprüft werden. All diese Bemühungen müssen eine verbesserte Indikationsstellung und Einsatz therapeutischer Interventionen bei drohendem Rezidiv in der Post-Transplantationsphase zum Ziel haben.

6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Modell der Leukämogenese bei AML	7
Abb. 2: Stufendiagnostik der AML	8
Abb. 3: Akute Promyelozytenleukämie t(15;17) und faggot cells (1), AML M4eo (2), Monozytäre AML (3,4)	9
Abb. 4: Karyogramm einer akuten Promyelozytenleukämie t(15;17)	10
Abb. 5: Karyogramm einer AML mit komplexen Karyotyp	10
Abb. 6: 24-Farben-FISH einer AML mit komplexem Karyotyp	11
Abb. 7: Typische genetische Veränderungen bei der akuten myeloischen Leukämie	13
Abb. 8: Stadium vor Knochenmarktransplantation	37
Abb. 9: Remissionsstatus vor Knochenmarktransplantation	38
Abb. 10: Akute Graft-versus-Host-Erkrankung	39
Abb. 11: Rezidiv-Follow-up.....	40
Abb. 12: Letzes Follow-up der Patienten	40
Abb. 13: Overall survival	41
Abb. 14: Disease-free survival	42
Abb. 15: Todesursachen	43
Abb. 16: Stadium vor Transplantation im Vergleich zwischen den Konditionierungsgruppen	44
Abb. 17: Remissionsstatus vor Transplantation im Vergleich zwischen Konditionierungsgruppen.....	45
Abb. 18: Akute Graft-versus-Host-Erkrankung im Vergleich zwischen den Konditionierungsgruppen.....	46
Abb. 19: Dauer des Engraftments von Leukozyten und Thrombozyten im Vergleich zwischen den Konditionierungsgruppen.....	47
Abb. 20: Rezidiv-Follow-up bei Standardkonditionierung	47
Abb. 21: Rezidiv Follow-up bei dosisreduzierter Konditionierung	48

Abb. 22: Follow-up von Rezidiv und Tod im Vergleich zwischen den Konditionierungsgruppen	48
Abb. 23: Entwicklung des medianen Chimärismus innerhalb des Untersuchungszeitraums im Vergleich zwischen den Konditionierungsgruppen	49
Abb. 24: Minimaler und maximaler Chimärismus im Vergleich zwischen den Konditionierungsgruppen.....	52
Abb. 25: Chimärismusverteilung nach Standardkonditionierung.....	55

7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Korrelation mit Zyto- und Molekulargenetik nach der WHO-Klassifikation.....	12
Tab. 2: Beispiele für myeloablative Konditionierungsregime bei AML.....	17
Tab. 3: Beispiele für dosisreduzierte Konditionierungsregime bei AML	17
Tab. 4: Definition des Chimärismus nach McCann <i>et al.</i> und Barrios <i>et al.</i>	20
Tab. 5: Überblick über die Patientendaten	25
Tab. 6: Einteilung der Risikogruppen nach Karyotyp.....	26
Tab. 7: Überblick über Chimärismuskriterien.....	27
Tab. 8: Beispiele für Konditionierungsprotokolle der Klinik für Stammzelltransplantation bei Patienten mit AML.....	29
Tab. 9: Immunsuppression vor allogener Stammzelltransplantation ⁴⁷	30
Tab. 10: Übersicht über die verwendeten Primer und Taqman®-Sonden zur Evaluation der Polymorphismen.	34
Tab. 11: Mediane Chimärismuswerte und zugehöriges Ranges.....	50
Tab. 12: Chimärismus im Vergleich	51

8. Literaturverzeichnis

1. Alizadeh, M., Bernard, M., Danic, B., Dauriac, C., Birebent, B., Lapart, C., Lamy, T., Le Prise, P. Y., Beauplet, A., Bories, D., Semana, G., & Quélvennec, E. 2002, "Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction", *Blood*, vol. 99, no. 12, pp. 4618-4625.
2. Andersson, B. S., Kashyap, A., Couriel, D., Madden, T., de Lima, M., Thall, P. F., Fernandez, H., Vaughan, W. P., Jones, R., Wingard, J. R., Blume, K. G., & Champlin, R. E. 2003, "Intravenous busulfan in pretransplant chemotherapy: bioavailability and patient benefit", *Biol.Blood Marrow Transplant.*, vol. 9, no. 11, pp. 722-724.
3. Appelbaum, F. R., Gundacker, H., Head, D. R., Slovak, M. L., Willman, C. L., Godwin, J. E., Anderson, J. E., & Petersdorf, S. H. 2006, "Age and acute myeloid leukemia", *Blood*, vol. 107, no. 9, pp. 3481-3485.
4. Bacher, U., Badbaran, A., Fehse, B., Zabelina, T., Zander, A. R., & Kröger, N. 2009, "Quantitative monitoring of NPM1 mutations provides a valid minimal residual disease parameter following allogeneic stem cell transplantation", *Exp.Hematol.*, vol. 37, no. 1, pp. 135-142.
5. Bader, P., Beck, J., Frey, A., Schlegel, P. G., Hebarth, H., Handgretinger, R., Einsele, H., Niemeyer, C., Benda, N., Faul, C., Kanz, L., Niethammer, D., & Klingebiel, T. 1998, "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.*, vol. 21, no. 5, pp. 487-495.
6. Bader, P., Holle, W., Klingebiel, T., Handgretinger, R., Benda, N., Schlegel, P. G., Niethammer, D., & Beck, J. 1997, "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.*, vol. 19, no. 7, pp. 697-702.
7. Bader, P. & Kreyenberg, H. 2004, "Analysis of chimerism after stem cell transplantation", *Methods Mol.Med.*, vol. 91, pp. 247-264.
8. Bader, P., Niethammer, D., Willasch, A., Kreyenberg, H., & Klingebiel, T. 2005, "How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation?", *Bone Marrow Transplant.*, vol. 35, no. 2, pp. 107-119.

9. Bai, L., Deng, Y. M., Dodds, A. J., Milliken, S., Moore, J., & Ma, D. D. 2006, "A SYBR green-based real-time PCR method for detection of haemopoietic chimerism in allogeneic haemopoietic stem cell transplant recipients", *Eur.J.Haematol.*, vol. 77, no. 5, pp. 425-431.
10. Baron, F., Baker, J. E., Storb, R., Gooley, T. A., Sandmaier, B. M., Maris, M. B., Maloney, D. G., Heimfeld, S., Oparin, D., Zellmer, E., Radich, J. P., Grumet, F. C., Blume, K. G., Chauncey, T. R., & Little, M. T. 2004, "Kinetics of engraftment in patients with hematologic malignancies given allogeneic hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning", *Blood*, vol. 104, no. 8, pp. 2254-2262.
11. Baron, F. & Sandmaier, B. M. 2006, "Chimerism and outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation following nonmyeloablative conditioning", *Leukemia*, vol. 20, no. 10, pp. 1690-1700.
12. Barragan, E., Pajuelo, J. C., Ballester, S., Fuster, O., Cervera, J., Moscardo, F., Senent, L., Such, E., Sanz, M. A., & Bolufer, P. 2008, "Minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia by mutant nucleophosmin (NPM1): comparison with WT1 gene expression", *Clin.Chim.Acta*, vol. 395, no. 1-2, pp. 120-123.
13. Barrios, M., Jimenez-Velasco, A., Roman-Gomez, J., Madrigal, M. E., Castillejo, J. A., Torres, A., & Heiniger, A. 2003, "Chimerism status is a useful predictor of relapse after allogeneic stem cell transplantation for acute leukemia", *Haematologica*, vol. 88, no. 7, pp. 801-810.
14. Bensinger, W. I., Martin, P. J., Storer, B., Clift, R., Forman, S. J., Negrin, R., Kashyap, A., Flowers, M. E., Lilleby, K., Chauncey, T. R., Storb, R., & Appelbaum, F. R. 2001, "Transplantation of bone marrow as compared with peripheral-blood cells from HLA-identical relatives in patients with hematologic cancers", *N.Engl.J.Med.*, vol. 344, no. 3, pp. 175-181.
15. Berman, E., Heller, G., Santorsa, J., McKenzie, S., Gee, T., Kempin, S., Gulati, S., Andreeff, M., Kolitz, J., Gabrilove, J., & . 1991, "Results of a randomized trial comparing idarubicin and cytosine arabinoside with daunorubicin and cytosine arabinoside in adult patients with newly diagnosed acute myelogenous leukemia", *Blood*, vol. 77, no. 8, pp. 1666-1674.
16. Bradstock, K. F., Matthews, J. P., Lowenthal, R. M., Baxter, H., Catalano, J., Brighton, T., Gill, D., Eliadis, P., Joshua, D., Cannell, P., Schwarzer, A. P., Durrant, S., Gillett, A., Koutts, J., Taylor, K., Bashford, J., Arthur, C., Enno, A., Dunlop, L., Szer, J., Leahy, M., Juneja, S., & Young, G. A. 2005, "A randomized trial of high-versus conventional-dose cytarabine in consolidation chemotherapy for adult de

novo acute myeloid leukemia in first remission after induction therapy containing high-dose cytarabine", *Blood*, vol. 105, no. 2, pp. 481-488.

17. Brieger, J., Weidmann, E., Fenchel, K., Mitrou, P. S., Hoelzer, D., & Bergmann, L. 1994, "The expression of the Wilms' tumor gene in acute myelocytic leukemias as a possible marker for leukemic blast cells", *Leukemia*, vol. 8, no. 12, pp. 2138-2143.
18. Buchner, T., Dohner, H., Ehninger, G., Ganser, A., & Hasford, J. 2002, "Up-front randomization and common standard arm: a proposal for comparing AML treatment strategies between different studies", *Leuk.Res.*, vol. 26, no. 12, pp. 1073-1075.
19. Buchner, T., Hiddemann, W., Wormann, B., Loffler, H., Gassmann, W., Haferlach, T., Fonatsch, C., Haase, D., Schoch, C., Hossfeld, D., Lengfelder, E., Aul, C., Heyll, A., Maschmeyer, G., Ludwig, W. D., Sauerland, M. C., & Heinecke, A. 1999, "Double induction strategy for acute myeloid leukemia: the effect of high-dose cytarabine with mitoxantrone instead of standard-dose cytarabine with daunorubicin and 6-thioguanine: a randomized trial by the German AML Cooperative Group", *Blood*, vol. 93, no. 12, pp. 4116-4124.
20. Byrd, J. C., Mrozek, K., Dodge, R. K., Carroll, A. J., Edwards, C. G., Arthur, D. C., Pettenati, M. J., Patil, S. R., Rao, K. W., Watson, M. S., Koduru, P. R., Moore, J. O., Stone, R. M., Mayer, R. J., Feldman, E. J., Davey, F. R., Schiffer, C. A., Larson, R. A., & Bloomfield, C. D. 2002, "Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461)", *Blood*, vol. 100, no. 13, pp. 4325-4336.
21. Candoni, A., Tiribelli, M., Toffoletti, E., Cilloni, D., Chiarvesio, A., Michelutti, A., Simeone, E., Pipan, C., Saglio, G., & Fanin, R. 2009, "Quantitative assessment of WT1 gene expression after allogeneic stem cell transplantation is a useful tool for monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukemia", *Eur.J.Haematol.*, vol. 82, no. 1, pp. 61-68.
22. Carvallo, C., Geller, N., Kurlander, R., Srinivasan, R., Mena, O., Igarashi, T., Griffith, L. M., Linehan, W. M., & Childs, R. W. 2004, "Prior chemotherapy and allograft CD34+ dose impact donor engraftment following nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation in patients with solid tumors", *Blood*, vol. 103, no. 4, pp. 1560-1563.
23. Cheson, B. D., Bennett, J. M., Kopecky, K. J., Buchner, T., Willman, C. L., Estey, E. H., Schiffer, C. A., Doehner, H., Tallman, M. S., Lister, T. A., Lo-Coco, F., Willemze, R., Biondi, A., Hiddemann, W., Larson, R. A., Lowenberg, B., Sanz, M. A., Head, D. R., Ohno, R., & Bloomfield, C. D. 2003, "Revised recommendations

of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia", *J.Clin.Oncol.*, vol. 21, no. 24, pp. 4642-4649.

24. Childs, R., Clave, E., Contentin, N., Jayasekera, D., Hensel, N., Leitman, S., Read, E. J., Carter, C., Bahceci, E., Young, N. S., & Barrett, A. J. 1999, "Engraftment kinetics after nonmyeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: full donor T-cell chimerism precedes alloimmune responses", *Blood*, vol. 94, no. 9, pp. 3234-3241.

25. Cilloni, D., Gottardi, E., De Micheli, D., Serra, A., Volpe, G., Messa, F., Rege-Cambrin, G., Guerrasio, A., Divona, M., Lo, C. F., & Saglio, G. 2002, "Quantitative assessment of WT1 expression by real time quantitative PCR may be a useful tool for monitoring minimal residual disease in acute leukemia patients", *Leukemia*, vol. 16, no. 10, pp. 2115-2121.

26. Cornelissen, J. J., van Putten, W. L., Verdonck, L. F., Theobald, M., Jacky, E., Daenen, S. M., van Marwijk, K. M., Wijermans, P., Schouten, H., Huijgens, P. C., van der, L. H., Fey, M., Ferrant, A., Maertens, J., Gratwohl, A., & Lowenberg, B. 2007, "Results of a HOVON/SAKK donor versus no-donor analysis of myeloablative HLA-identical sibling stem cell transplantation in first remission acute myeloid leukemia in young and middle-aged adults: benefits for whom?", *Blood*, vol. 109, no. 9, pp. 3658-3666.

27. Couban, S., Simpson, D. R., Barnett, M. J., Bredeson, C., Hubesch, L., Howson-Jan, K., Shore, T. B., Walker, I. R., Browett, P., Messner, H. A., Panzarella, T., & Lipton, J. H. 2002, "A randomized multicenter comparison of bone marrow and peripheral blood in recipients of matched sibling allogeneic transplants for myeloid malignancies", *Blood*, vol. 100, no. 5, pp. 1525-1531.

28. de Lima, M., Anagnostopoulos, A., Munsell, M., Shahjahan, M., Ueno, N., Ippoliti, C., Andersson, B. S., Gajewski, J., Couriel, D., Cortes, J., Donato, M., Neumann, J., Champlin, R., & Giralt, S. 2004, "Nonablative versus reduced-intensity conditioning regimens in the treatment of acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome: dose is relevant for long-term disease control after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation", *Blood*, vol. 104, no. 3, pp. 865-872.

29. Dey, B. R., McAfee, S., Colby, C., Sackstein, R., Saidman, S., Tarbell, N., Sachs, D. H., Sykes, M., & Spitzer, T. R. 2003, "Impact of prophylactic donor leukocyte infusions on mixed chimerism, graft-versus-host disease, and antitumor response in patients with advanced hematologic malignancies treated with nonmyeloablative conditioning and allogeneic bone marrow transplantation", *Biol.Blood Marrow Transplant.*, vol. 9, no. 5, pp. 320-329.

30. Dubovsky, J., Daxberger, H., Fritsch, G., Printz, D., Peters, C., Matthes, S., Gadner, H., Lion, T., & Muller-Berat, N. 1999, "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*, vol. 13, no. 12, pp. 2059, 2060-2059, 2069.
31. Ehninger, G., Link, H., & Berdel, W. E. 2008 *Akute myeloische Leukämie*. Köln. Deutscher Ärzteverlag, pp. 7-100.
32. Elmaagacli, A. H. 2007, "Molecular methods used for detection of minimal residual disease following hematopoietic stem cell transplantation in myeloid disorders", *Methods Mol.Med.*, vol. 134, pp. 161-178.
33. Falini, B., Nicoletti, I., Bolli, N., Martelli, M. P., Liso, A., Gorello, P., Mandelli, F., Mecucci, C., & Martelli, M. F. 2007, "Translocations and mutations involving the nucleophosmin (NPM1) gene in lymphomas and leukemias", *Haematologica*, vol. 92, no. 4, pp. 519-532.
34. Fehse, B., Chukhlovin, A., Kuhlcke, K., Marinetz, O., Vorwig, O., Renges, H., Kruger, W., Zabelina, T., Dudina, O., Finckenstein, F. G., Kröger, N., Kabisch, H., Hochhaus, A., & Zander, A. R. 2001, "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.*, vol. 10, no. 3, pp. 419-425.
35. Frohling, S., Schlenk, R. F., Kayser, S., Morhardt, M., Benner, A., Dohner, K., & Dohner, H. 2006, "Cytogenetics and age are major determinants of outcome in intensively treated acute myeloid leukemia patients older than 60 years: results from AMLSG trial AML HD98-B", *Blood*, vol. 108, no. 10, pp. 3280-3288.
36. Gatta, G., Capocaccia, R., De Angelis, R., Stiller, C., & Coebergh, J. W. 2003, "Cancer survival in European adolescents and young adults", *Eur.J.Cancer*, vol. 39, no. 18, pp. 2600-2610.
37. Giralt, S., Estey, E., Albitar, M., van Besien, K., Rondon, G., Anderlini, P., O'Brien, S., Khouri, I., Gajewski, J., Mehra, R., Claxton, D., Andersson, B., Beran, M., Przepiorka, D., Koller, C., Kornblau, S., Korbling, M., Keating, M., Kantarjian, H., & Champlin, R. 1997, "Engraftment of allogeneic hematopoietic progenitor cells with purine analog-containing chemotherapy: harnessing graft-versus-leukemia without myeloablative therapy", *Blood*, vol. 89, no. 12, pp. 4531-4536.
38. Glucksberg, H., Storb, R., Fefer, A., Buckner, C. D., Neiman, P. E., Clift, R. A., Lerner, K. G., & Thomas, E. D. 1974, "Clinical manifestations of graft-versus-host

disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors", *Transplantation*, vol. 18, no. 4, pp. 295-304.

39. Gratwohl, A., Baldomero, H., Passweg, J., & Urbano-Ispizua, A. 2002, "Increasing use of reduced intensity conditioning transplants: report of the 2001 EBMT activity survey", *Bone Marrow Transplant.*, vol. 30, no. 12, pp. 813-831.
40. Grimwade, D., Walker, H., Harrison, G., Oliver, F., Chatters, S., Harrison, C. J., Wheatley, K., Burnett, A. K., & Goldstone, A. H. 2001, "The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial", *Blood*, vol. 98, no. 5, pp. 1312-1320.
41. Haferlach, T., Bacher, U., Kern, W., Schnittger, S., & Haferlach, C. 2007, "Diagnostic pathways in acute leukemias: a proposal for a multimodal approach", *Ann.Hematol.*, vol. 86, no. 5, pp. 311-327.
42. Hancock, J. P., Burgess, M. F., Goulden, N. J., Steward, C. G., Knechtli, C. J., Pamphilon, D. H., Potter, M. N., & Oakhill, A. 1997, "Same-day determination of chimaeric status in the immediate period following allogeneic bone marrow transplantation", *Br.J.Haematol.*, vol. 99, no. 2, pp. 403-409.
43. Hegenbart, U., Niederwieser, D., Sandmaier, B. M., Maris, M. B., Shizuru, J. A., Greinix, H., Cordonnier, C., Rio, B., Gratwohl, A., Lange, T., Al Ali, H., Storer, B., Maloney, D., McSweeney, P., Chauncey, T., Agura, E., Bruno, B., Maziarz, R. T., Petersen, F., & Storb, R. 2006, "Treatment for acute myelogenous leukemia by low-dose, total-body, irradiation-based conditioning and hematopoietic cell transplantation from related and unrelated donors", *J.Clin.Oncol.*, vol. 24, no. 3, pp. 444-453.
44. Hewlett, J., Kopecky, K. J., Head, D., Eyre, H. J., Elias, L., Kingsbury, L., Balcerzak, S. P., Dabich, L., Hynes, H., Bickers, J. N., & . 1995, "A prospective evaluation of the roles of allogeneic marrow transplantation and low-dose monthly maintenance chemotherapy in the treatment of adult acute myelogenous leukemia (AML): a Southwest Oncology Group study", *Leukemia*, vol. 9, no. 4, pp. 562-569.
45. Horner MJ., Ries LAG., Krapcho M., Neyman N., Aminou R., Howlader N., Altekruse SF., Feuer EJ., Huang J., Mariotto A., Miller BA., Lewis DR., Eisner MP., Stinchcomb DG., & Edwards BK. 2006, SEER Cancer Statistics Review 1975-2006, National Cancer Institute Bethesda.
46. Koldehoff, M., Steckel, N. K., Hlinka, M., Beelen, D. W., & Elmaagacli, A. H. 2006, "Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation

by real-time polymerase chain reaction with single nucleotide polymorphisms, standard tandem repeats, and Y-chromosome-specific sequences", *Am.J.Hematol.*, vol. 81, no. 10, pp. 735-746.

47. Kröger, N., Shimoni, A., Zabelina, T., Schieder, H., Panse, J., Ayuk, F., Wolschke, C., Renges, H., Dahlke, J., Atanackovic, D., Nagler, A., & Zander, A. 2006, "Reduced-toxicity conditioning with treosulfan, fludarabine and ATG as preparative regimen for allogeneic stem cell transplantation (alloSCT) in elderly patients with secondary acute myeloid leukemia (sAML) or myelodysplastic syndrome (MDS)", *Bone Marrow Transplant.*, vol. 37, no. 4, pp. 339-344.
48. Kröger, N. & Zander, A. 2008 *Allogene Stammzelltherapie - Grundlagen, Indikationen und Perspektiven.* pp 76-114.
49. Lawler, M., Humphries, P., & McCann, S. R. 1991, "Evaluation of mixed chimerism by in vitro amplification of dinucleotide repeat sequences using the polymerase chain reaction", *Blood*, vol. 77, no. 11, pp. 2504-2514.
50. Liso, A., Castiglione, F., Cappuccio, A., Stracci, F., Schlenk, R. F., Amadori, S., Thiede, C., Schnittger, S., Valk, P. J., Dohner, K., Martelli, M. F., Schaich, M., Krauter, J., Ganser, A., Martelli, M. P., Bolli, N., Lowenberg, B., Haferlach, T., Ehninger, G., Mandelli, F., Dohner, H., Michor, F., & Falini, B. 2008, "A one-mutation mathematical model can explain the age incidence of acute myeloid leukemia with mutated nucleophosmin (NPM1)", *Haematologica*, vol. 93, no. 8, pp. 1219-1226.
51. Lübbert, M., Bertz, H., Ruter, B., Marks, R., Claus, R., Wasch, R., & Finke, J. 2009, "Non-intensive treatment with low-dose 5-aza-2'-deoxycytidine (DAC) prior to allogeneic blood SCT of older MDS/AML patients", *Bone Marrow Transplant.*
52. Maas, F., Schaap, N., Kolen, S., Zoetbrood, A., Buno, I., Dolstra, H., de Witte, T., Schattenberg, A., & van de Wiel-van Kemenade 2003, "Quantification of donor and recipient hemopoietic cells by real-time PCR of single nucleotide polymorphisms", *Leukemia*, vol. 17, no. 3, pp. 630-633.
53. Martin, M. G., Uy, G. L., Procknow, E., Stockerl-Goldstein, K., Cashen, A., Westervelt, P., Abboud, C. N., Augustin, K., Luo, J., Dippersio, J. F., & Vij, R. 2009, "Allo-SCT conditioning for myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia with clofarabine, cytarabine and ATG", *Bone Marrow Transplant.*
54. Massenkeil, G., Nagy, M., Neuburger, S., Tamm, I., Lutz, C., le Coutre, P., Rosen, O., Wernecke, K. D., Dorken, B., & Arnold, R. 2005, "Survival after reduced-intensity conditioning is not inferior to standard high-dose conditioning before

allogeneic haematopoietic cell transplantation in acute leukaemias", *Bone Marrow Transplant.*, vol. 36, no. 8, pp. 683-689.

55. Mattsson, J., Uzunel, M., Remberger, M., & Ringden, O. 2001, "T cell mixed chimerism is significantly correlated to a decreased risk of acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation", *Transplantation*, vol. 71, no. 3, pp. 433-439.
56. Maurillo, L., Buccisano, F., Spagnoli, A., Del Poeta, G., Panetta, P., Neri, B., Principe, M. I., Mazzone, C., Consalvo, M. I., Tamburini, A., Ottaviani, L., Fraboni, D., Sarlo, C., De Fabritiis, P., Amadori, S., & Venditti, A. 2007, "Monitoring of minimal residual disease in adult acute myeloid leukemia using peripheral blood as an alternative source to bone marrow", *Haematologica-the Hematology Journal*, vol. 92, no. 5, pp. 605-611.
57. Mayer, R. J., Davis, R. B., Schiffer, C. A., Berg, D. T., Powell, B. L., Schulman, P., Omura, G. A., Moore, J. O., McIntyre, O. R., & Frei, E., III 1994, "Intensive postremission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia. Cancer and Leukemia Group B", *N.Engl.J.Med.*, vol. 331, no. 14, pp. 896-903.
58. McCann, S. R., Crampe, M., Molloy, K., & Lawler, M. 2005, "Hemopoietic chimerism following stem cell transplantation", *Transfus.Apher.Sci.*, vol. 32, no. 1, pp. 55-61.
59. Miyagi, T., Ahuja, H., Kubota, T., Kubonishi, I., Koeffler, H. P., & Miyoshi, I. 1993, "Expression of the candidate Wilm's tumor gene, WT1, in human leukemia cells", *Leukemia*, vol. 7, no. 7, pp. 970-977.
60. Molloy, K., Goulden, N., Lawler, M., Cornish, J., Oakhill, A., Pamphilon, D., Potter, M., Steward, C., Langlands, K., Humphries, P., & McCann, S. R. 1996, "Patterns of hematopoietic chimerism following bone marrow transplantation for childhood acute lymphoblastic leukemia from volunteer unrelated donors", *Blood*, vol. 87, no. 7, pp. 3027-3031.
61. Moore, J. O., George, S. L., Dodge, R. K., Amrein, P. C., Powell, B. L., Kolitz, J. E., Baer, M. R., Davey, F. R., Bloomfield, C. D., Larson, R. A., & Schiffer, C. A. 2005, "Sequential multiagent chemotherapy is not superior to high-dose cytarabine alone as postremission intensification therapy for acute myeloid leukemia in adults under 60 years of age: Cancer and Leukemia Group B Study 9222", *Blood*, vol. 105, no. 9, pp. 3420-3427.
62. Ostronoff, F., Ostronoff, M., Souto-Maior, A. P., Domingues, M., Sucupira, A., Manso, D. A., de Lima, A. K., Monteiro, P. G., Florencio, R., & Calixto, R. 2009,

"Prospective trial of mycophenolate mofetil-cyclosporine A prophylaxis for acute GVHD after G-CSF stimulated allogeneic bone marrow transplantation with HLA-identical sibling donors in patients with severe aplastic anemia and hematological malignancies", *Clin.Transplant.*, vol. 23, no. 1, pp. 33-38.

63. Parker, J. E., Shafi, T., Pagliuca, A., Mijovic, A., Devereux, S., Potter, M., Prentice, H. G., Garg, M., Yin, J. A., Byrne, J., Russell, N. H., & Mufti, G. J. 2002, "Allogeneic stem cell transplantation in the myelodysplastic syndromes: interim results of outcome following reduced-intensity conditioning compared with standard preparative regimens", *Br.J.Haematol.*, vol. 119, no. 1, pp. 144-154.
64. Preisler, H., Davis, R. B., Kirshner, J., Dupre, E., Richards, F., III, Hoagland, H. C., Kopel, S., Levy, R. N., Carey, R., Schulman, P., & . 1987, "Comparison of three remission induction regimens and two postinduction strategies for the treatment of acute nonlymphocytic leukemia: a cancer and leukemia group B study", *Blood*, vol. 69, no. 5, pp. 1441-1449.
65. Raanani, P. & Ben Bassat, I. 2004, "Detection of minimal residual disease in acute myelogenous leukemia", *Acta Haematol.*, vol. 112, no. 1-2, pp. 40-54.
66. Ramirez, M., Diaz, M. A., Garcia-Sanchez, F., Velasco, M., Casado, F., Villa, M., Vicario, J. L., & Madero, L. 1996, "Chimerism after allogeneic hematopoietic cell transplantation in childhood acute lymphoblastic leukemia", *Bone Marrow Transplant.*, vol. 18, no. 6, pp. 1161-1165.
67. Ravandi, F., Burnett, A. K., Agura, E. D., & Kantarjian, H. M. 2007, "Progress in the treatment of acute myeloid leukemia", *Cancer*, vol. 110, no. 9, pp. 1900-1910.
68. Roy, D. C., Tantravahi, R., Murray, C., Dear, K., Gorgone, B., Anderson, K. C., Freedman, A. S., Nadler, L. M., & Ritz, J. 1990, "Natural history of mixed chimerism after bone marrow transplantation with CD6-depleted allogeneic marrow: a stable equilibrium", *Blood*, vol. 75, no. 1, pp. 296-304.
69. Schaap, N., Schattenberg, A., Bar, B., Mensink, E., de Man, A., Geurts, v. K., & de Witte, T. 2000, "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.*, vol. 108, no. 1, pp. 116-125.
70. Schaap, N., Schattenberg, A., Mensink, E., Preijers, F., Hillegers, M., Knops, R., Pennings, A., Boezeman, J., Geurts, v. K., de Pauw, B., & de Witte, T. 2002, "Long-term follow-up of persisting mixed chimerism after partially T cell-depleted allogeneic stem cell transplantation", *Leukemia*, vol. 16, no. 1, pp. 13-21.

71. Schattenberg, A., de Witte, T., Salden, M., Vet, J., Van Dijk, B., Smeets, D., Hoogenhout, J., & Haanen, C. 1989, "Mixed hematopoietic chimerism after allogeneic transplantation with lymphocyte-depleted bone marrow is not associated with a higher incidence of relapse", *Blood*, vol. 73, no. 5, pp. 1367-1372.
72. Schlenk, R. F., Benner, A., Hartmann, F., del Valle, F., Weber, C., Pralle, H., Fischer, J. T., Gunzer, U., Pezzutto, A., Weber, W., Grimminger, W., Preiss, J., Hensel, M., Frohling, S., Dohner, K., Haas, R., & Dohner, H. 2003, "Risk-adapted postremission therapy in acute myeloid leukemia: results of the German multicenter AML HD93 treatment trial", *Leukemia*, vol. 17, no. 8, pp. 1521-1528.
73. Schmitz, N., Beksac, M., Hasenclever, D., Bacigalupo, A., Ruutu, T., Nagler, A., Gluckman, E., Russell, N., Apperley, J. F., Gorin, N. C., Szer, J., Bradstock, K., Buzyn, A., Clark, P., Borkett, K., & Gratwohl, A. 2002, "Transplantation of mobilized peripheral blood cells to HLA-identical siblings with standard-risk leukemia", *Blood*, vol. 100, no. 3, pp. 761-767.
74. Schnittger, S., Schoch, C., Kern, W., Mecucci, C., Tschulik, C., Martelli, M. F., Haferlach, T., Hiddemann, W., & Falini, B. 2005, "Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype", *Blood*, vol. 106, no. 12, pp. 3733-3739.
75. Slavin, S., Nagler, A., Naparstek, E., Kapelushnik, Y., Aker, M., Cividalli, G., Varadi, G., Kirschbaum, M., Ackerstein, A., Samuel, S., Amar, A., Brautbar, C., Ben Tal, O., Eldor, A., & Or, R. 1998, "Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases", *Blood*, vol. 91, no. 3, pp. 756-763.
76. Slovak, M. L., Kopecky, K. J., Cassileth, P. A., Harrington, D. H., Theil, K. S., Mohamed, A., Paietta, E., Willman, C. L., Head, D. R., Rowe, J. M., Forman, S. J., & Appelbaum, F. R. 2000, "Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study", *Blood*, vol. 96, no. 13, pp. 4075-4083.
77. Smith, M. T., Wang, Y., Kane, E., Rollinson, S., Wiemels, J. L., Roman, E., Roddam, P., Cartwright, R., & Morgan, G. 2001, "Low NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 activity is associated with increased risk of acute leukemia in adults", *Blood*, vol. 97, no. 5, pp. 1422-1426.
78. Stelljes, M., Bornhauser, M., Kröger, M., Beyer, J., Sauerland, M. C., Heinecke, A., Berning, B., Scheffold, C., Silling, G., Buchner, T., Neubauer, A., Fauser, A. A., Ehninger, G., Berdel, W. E., & Kienast, J. 2005, "Conditioning with 8-Gy total

body irradiation and fludarabine for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in acute myeloid leukemia", *Blood*, vol. 106, no. 9, pp. 3314-3321.

79. Swerdlow, S. H. 2008 Who Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue (World Health Organization Classification of Tumours). Campo, E. Harris N. L. Jaffe E. S. Pileri S. A. Stein H. Thiele J. Vardiman J. W..
80. Thiede, C., Lutterbeck, K., Oelschlagel, U., Kiehl, M., Steudel, C., Platzbecker, U., Brendel, C., Fauser, A. A., Neubauer, A., Ehninger, G., & Bornhauser, M. 2002, "Detection of relapse by sequential monitoring of chimerism in circulating CD34+ cells", *Ann.Hematol.*, vol. 81 Suppl 2, p. S27-S28.
81. Ueno, N. T., Cheng, Y. C., Rondon, G., Tannir, N. M., Gajewski, J. L., Couriel, D. R., Hosing, C., de Lima, M. J., Anderlini, P., Khouiri, I. F., Booser, D. J., Hortobagyi, G. N., Pagliaro, L. C., Jonasch, E., Giral, S. A., & Champlin, R. E. 2003, "Rapid induction of complete donor chimerism by the use of a reduced-intensity conditioning regimen composed of fludarabine and melphalan in allogeneic stem cell transplantation for metastatic solid tumors", *Blood*, vol. 102, no. 10, pp. 3829-3836.
82. Valcarcel, D., Martino, R., Caballero, D., Martin, J., Ferra, C., Nieto, J. B., Sampol, A., Bernal, M. T., Pinana, J. L., Vazquez, L., Ribera, J. M., Besalduch, J., Moraleda, J. M., Carrera, D., Brunet, M. S., Perez-Simon, J. A., & Sierra, J. 2008, "Sustained remissions of high-risk acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome after reduced-intensity conditioning allogeneic hematopoietic transplantation: chronic graft-versus-host disease is the strongest factor improving survival", *J.Clin.Oncol.*, vol. 26, no. 4, pp. 577-584.
83. van Leeuwen, J. E., van Tol, M. J., Joosten, A. M., Wijnen, J. T., Khan, P. M., & Vossen, J. M. 1993, "Mixed T-lymphoid chimerism after allogeneic bone marrow transplantation for hematologic malignancies of children is not correlated with relapse", *Blood*, vol. 82, no. 6, pp. 1921-1928.
84. van Leeuwen, J. E., van Tol, M. J., Joosten, A. M., Wijnen, J. T., Verweij, P. J., Khan, P. M., & Vossen, J. M. 1994, "Persistence of host-type hematopoiesis after allogeneic bone marrow transplantation for leukemia is significantly related to the recipient's age and/or the conditioning regimen, but it is not associated with an increased risk of relapse", *Blood*, vol. 83, no. 10, pp. 3059-3067.
85. Vicente, D., Lamparelli, T., Gualandi, F., Occhini, D., Raiola, A. M., Ibatucci, A., Van Lint, M. T., Gobbi, M., Miglino, M., Clavio, M., Risso, M., Frasson, F., & Bacigalupo, A. 2007, "Improved outcome in young adults with de novo acute myeloid leukemia in first remission, undergoing an allogeneic bone marrow transplant", *Bone Marrow Transplant.*, vol. 40, no. 4, pp. 349-354.

86. Vogler, W. R., Velez-Garcia, E., Weiner, R. S., Flaum, M. A., Bartolucci, A. A., Omura, G. A., Gerber, M. C., & Banks, P. L. 1992, "A phase III trial comparing idarubicin and daunorubicin in combination with cytarabine in acute myelogenous leukemia: a Southeastern Cancer Study Group Study", *J.Clin.Oncol.*, vol. 10, no. 7, pp. 1103-1111.
87. Wiernik, P. H., Banks, P. L., Case, D. C., Jr., Arlin, Z. A., Periman, P. O., Todd, M. B., Ritch, P. S., Enck, R. E., & Weitberg, A. B. 1992, "Cytarabine plus idarubicin or daunorubicin as induction and consolidation therapy for previously untreated adult patients with acute myeloid leukemia", *Blood*, vol. 79, no. 2, pp. 313-319.
88. Wong, R., Giralt, S. A., Martin, T., Couriel, D. R., Anagnostopoulos, A., Hosing, C., Andersson, B. S., Cano, P., Shahjahan, M., Ippoliti, C., Estey, E. H., McMannis, J., Gajewski, J. L., Champlin, R. E., & de Lima, M. 2003, "Reduced-intensity conditioning for unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation as treatment for myeloid malignancies in patients older than 55 years", *Blood*, vol. 102, no. 8, pp. 3052-3059.

9. Danksagung

Zum Abschluß möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich dabei unterstützt haben, diese Arbeit zu beenden.

Mein größter Dank gilt Frau PD Dr. Ulrike Bacher, der Betreuerin meiner Promotionsarbeit, für die tolle Zusammenarbeit. Sie hat nicht nur dabei geholfen, ein für mich passendes Theman zu finden, Frau Bacher hat mich während der ganzen Zeit sehr umfassend und kompetent betreut, hatte stets ein offenes Ohr für mich und war immer in kürzester Zeit mit Rat und Tat zur Stelle. Ich weiss dies zu schätzen und bin sehr froh, dass ich mich damals dazu entschlossen habe, meine Doktorarbeit zusammen mit ihr zu beginnen.

Ein großes Dankeschön möchte ich auch an Frau Dr. Zabelina richten, die mich bei statistischen Fragestellungen beraten, sowie Frau Badbaran und Frau Zeschke, die mir bei labortechnischen Problemen unter die Arme gegriffen haben. Auch Herrn Prof. Zander sowie Herrn Prof. Kröger gilt mein großer Dank.

Herzlich Danken möchte ich auch meiner Familie und meinem Freund, die mich immer ermuntert haben, beim Schreiben am Ball zu bleiben, die mir wertvolle Tipps gegeben, mich zwischendurch abgelenkt haben und nicht zuletzt die ersten Leser meiner Doktorarbeit waren. Euch viere vielen Dank.

10. Lebenslauf

Bettina Maria Wiedemann, geboren am 25.03.1983 in München

Hochschulausbildung

11/2010	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
10/2006-11/2010	Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
06/2006	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
09/2004-09/2006	Studium der Humanmedizin an der Semmelweis-Universität Budapest
07/2004	Vordiplom der Psychologie
10/2002-09/2004	Studium der Psychologie an der Universität München

Schulbildung

06/2002	Allgemeine Hochschulreife am Schyren-Gymnasium Pfaffenhofen an der Ilm
---------	--

Praktisches Jahr

03/2010-07/2010	Dr. Maaßen, Gynäkologie und Geburtshilfe, Asklepios Klinik Harburg
02/2010-03/2010	Prof. Dr. Müller, Allgemeinchirurgie, Marienkrankenhaus Hamburg
12/2009-01/2010	Prof. Dr. Ebner, Thorax- und Gefäßchirurgie, Krankenhaus Bozen
08/2009-12/2010	Prof. Dr. Park, Prof. Dr. Christl, PD Dr. Wiest, Dr. Linzer, Innere Medizin, Asklepios Klinik Harburg

11. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift:

Bettina Wiedemann