

**UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG - EPPENDORF**  
**Interdisziplinäre Klinik für Stammzelltransplantation**  
**Direktor: Prof. Dr. med. Nicolaus Kröger**

**Die Bedeutung physiologischer B-Vorläufer-Zellen (Haematogones)  
nach allogener Stammzelltransplantation bei Patienten mit akuter  
myeloischer Leukämie und myelodysplastischen Syndromen**

**Dissertation**

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

**vorgelegt von:**

**Anneke Marie Heiland aus Hamburg**

**Hamburg, 2014**

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 08.03.2016

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität  
Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Ulrike Bacher

Prüfungsausschuss, Gutachter/in: Prof. Dr. Ingo Müller

Prüfer: PD Dr. Francis Ayuketang

# Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Arbeitshypothese und Fragestellung .....</b>   | <b>5</b>  |
| <b>2. Einleitung .....</b>   | <b>6</b>  |
| 2.1. Übersicht über die akute myeloische Leukämie (AML) und Myelodysplastische Syndrome (MDS).....   | 6         |
| 2.1.1. Allgemeine Charakterisierung .....  | 6         |
| 2.1.2. Pathogenese und Pathophysiologie .....  | 7         |
| 2.1.3. Prognostische Faktoren .....  | 8         |
| 2.1.4. Diagnostik .....  | 10        |
| 2.1.5. Therapeutische Strategien .....   | 11        |
| 2.2. Allogene Stammzelltransplantation bei Patienten mit AML und MDS .....                           | 12        |
| 2.2.1. Indikation.....   | 12        |
| 2.2.2. Stammzellquellen und Konditionierung .....  | 13        |
| 2.2.3. Komplikationen nach Transplantation .....   | 15        |
| 2.2.4. Aufbau der Klinik für Stammzelltransplantation im Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf..... | 15        |
| 2.3. Haematogones – Allgemeine Grundlagen und Definition.....  | 16        |
| 2.4. Zielsetzung der Arbeit .....  | 17        |
| <b>3. Methoden und Material.....</b>   | <b>19</b> |
| 3.1. Studienaufbau und Patienten .....   | 19        |
| 3.1.1. Patienten.....  | 19        |
| 3.1.2. Konditionierung vor allogener Stammzelltransplantation .....                                  | 23        |
| 3.1.3. Studiendesign .....   | 24        |
| 3.2. Durchflusszytometrie.....   | 25        |
| 3.3. Statistik.....  | 28        |
| <b>4. Ergebnisse .....</b>   | <b>29</b> |
| 4.1. Klinische Ergebnisse .....  | 29        |
| 4.2. Quantifizierung der Haematogones und Lymphozytensubpopulationen .....                           | 31        |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.2.1. Quantifizierung der Haematogones im Knochenmark.....                   | 31        |
| 4.2.2. Quantifizierung der Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut .... | 31        |
| 4.3. Untersuchung des prognostischen Einflusses der Haematogones .....        | 32        |
| 4.3.1. Tag 30 nach SZT .....  | 33        |
| 4.3.2. Tag 100 nach SZT .....   | 33        |
| 4.4. Uni- und multivariate Analyse prognostischer Faktoren .....              | 37        |
| 4.5. Korrelationen zwischen Haematogones und reifen Lymphozyten.....          | 39        |
| <b>5. Diskussion .....</b>  | <b>41</b> |
| <b>6. Zusammenfassung .....</b>   | <b>44</b> |
| <b>7. Literaturverzeichnis.....</b>   | <b>45</b> |
| <b>8. Abbildungsverzeichnis .....</b>   | <b>51</b> |
| <b>9. Tabellenverzeichnis.....</b>  | <b>53</b> |
| <b>10. Danksagung .....</b>   | <b>54</b> |
| <b>11. Lebenslauf.....</b>  | <b>55</b> |
| <b>12. Eidesstattliche Versicherung .....</b>                                 | <b>56</b> |

## 1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Verschiedene Publikationen haben gezeigt, dass eine erhöhte Anzahl von physiologischen B-Vorläuferzellen (CD10+CD19+/Haematogones) bei Patienten mit bestimmten hämatologischen Neoplasien wie der akuten myeloischen Leukämie (AML), der akuten lymphatischen Leukämie (ALL), den myelodysplastischen Syndromen (MDS) und den Non-Hodgkin-Lymphomen nach Chemotherapie oder nach allogener Stammzelltransplantation zum Zeitpunkt des Donor-Engraftments prognostisch günstig sind (Sayer et al., 2003; Chantepie et al., 2011; Honebrink et al., 2012; Shima et al., 2013).

Diese Arbeit untersucht die prognostische Bedeutung des Anteils von physiologischen B-Vorläuferzellen (CD+10CD19+/Haematogones) im Knochenmark anhand der Immunphänotypisierung an den Tagen 30 und 100 nach allogener Stammzelltransplantation (SZT) bei Patienten mit AML oder MDS.

Im Speziellen soll geklärt werden:

1. Korreliert die Anzahl der Haematogones im Knochenmark oder im peripheren Blut an Tag 30 nach allogener SZT mit dem Gesamtüberleben und ereignisfreien Überleben der Patienten mit AML oder MDS?
2. Korreliert die Anzahl der Haematogones im Knochenmark oder im peripheren Blut an Tag 100 nach allogener SZT mit dem Gesamtüberleben und ereignisfreien Überleben der Patienten mit AML oder MDS?
3. Gibt es Korrelationen zwischen Haematogones im Knochenmark und reifen B-Lymphozyten im peripheren Blut?
4. Stellen die Haematogones im Knochenmark nach den Ergebnissen der Immunphänotypisierung einen vielversprechenden Prognoseparameter im Transplantationssetting dar, welcher die Identifikation von Risikopatienten in der Posttransplantationsphase erleichtern kann?

## **2. Einleitung**

### **2.1. Übersicht über die akute myeloische Leukämie (AML) und Myelodysplastische Syndrome (MDS)**

#### **2.1.1. Allgemeine Charakterisierung**

Die akute myeloische Leukämie (AML) wird als klonale Neoplasie der hämatopoetischen Zellen begriffen. Die AML macht ca. 15-20% der akuten Leukämien im Kindesalter und 80% der akuten Leukämien im Erwachsenenalter aus, wobei Männer im Schnitt etwas häufiger betroffen sind als Frauen.

Die Inzidenz der AML beträgt 2,5:100.000 Einwohner pro Jahr. Die Inzidenz unterliegt jedoch altersspezifischen Unterschieden. Sie nimmt ab der Jugend nur langsam zu und findet ab einem Alter von 45 Jahren einen steileren Anstieg. Ab einem Alter von 45 Jahren beträgt die Inzidenz 3,5:100.000 Einwohner pro Jahr, ab 70 Jahren beläuft sie sich auf 15:100.000. Bei Diagnosestellung einer AML beträgt das Durchschnittsalter der Patienten 67 Jahre (Ehninger et al., 2008).

Das wesentliche Merkmal der AML besteht in der Vermehrung myeloischer Blasten im Knochenmark, in den meisten Fällen assoziiert mit der Ausschwemmung von Blasten ins periphere Blut. In der überwiegenden Zahl der Fälle ist kein Auslöser festzustellen. Allerdings sind eine vorangegangene Chemotherapie oder Strahlentherapie wesentliche Risikofaktoren für die Entwicklung einer therapieassoziierten AML („t-AML“). In seltenen Fällen sind Substanzen wie Benzol oder Lost ursächlich. Auch genetische Faktoren spielen eine Rolle. Beispielsweise haben Kinder mit Trisomie 21 ein erhöhtes Risiko, an einer AML zu erkranken. Ein vorbestehendes myelodysplastisches Syndrom (MDS) ist ebenfalls ein wesentlicher Risikofaktor, da ca. 25% der betroffenen Patienten eine sekundäre AML (s-AML) im Verlauf der Krankheit entwickeln.

Das MDS ist eine heterogene erworbene klonale Stammzellerkrankung mit qualitativen und quantitativen Veränderungen der Hämatopoese, peripheren Zytopenien, einem oftmals zellreichen Knochenmark mit Dysplasien und gegebenenfalls erhöhtem Blastenanteil. Nach morphologischen Kriterien lassen sich verschiedene Subtypen unterscheiden, wobei die Zahl der von Dysplasien betroffenen Zellreihen, der Blastenanteil, sowie die Anwesenheit von

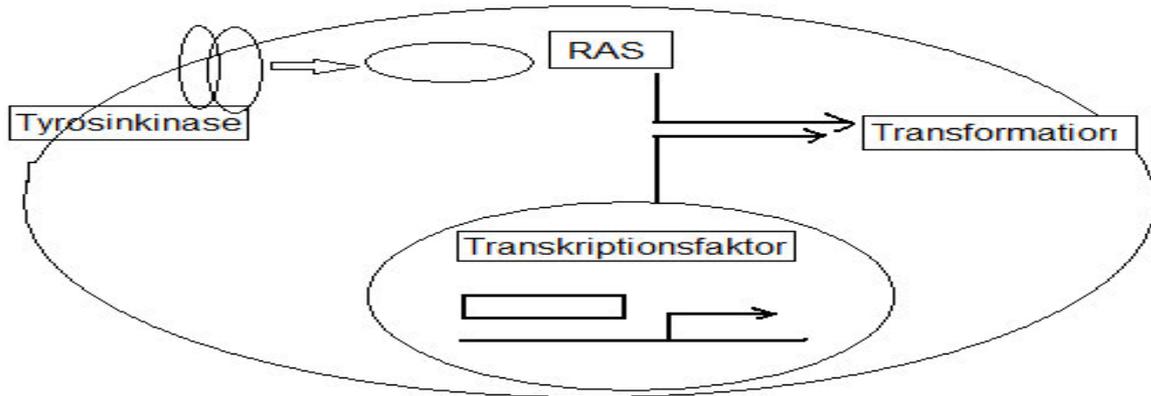
Ringsideroblasten relevant sind. Die Inzidenz der myelodysplastischen Syndrome beläuft sich auf 4-5:100.000 pro Jahr. Ab einem Alter über 70 Jahren steigt die Inzidenz auf 20–50/100.000 Einwohner pro Jahr. Das mediane Erkrankungsalter beträgt ca. 70 Jahre.

Hauptmerkmal der MDS ist die chronisch verlaufende hämatopoetische Insuffizienz. Die Mehrzahl der MDS-Fälle tritt idiopathisch auf. In ca. 10% aller Fälle ist die Erkrankung in Assoziation zu einer vorangegangenen Chemo- bzw. Radiotherapie zu sehen („t-MDS“).

### **2.1.2. Pathogenese und Pathophysiologie**

Durch Mutationen vorrangig in leukämischen Stammzellen können wichtige Funktionen der Zellreparatur aufgehoben werden, wodurch die Sensitivität gegenüber genotoxischen Substanzen oder die Aktivierung proliferationsfördernder Signalwege deutlich erhöht wird. Rekurrent finden sich bei MDS und AML Veränderungen im *RAS*-Proto-Onkogenen. Weitere Beispiele sind Mutationen von Tyrosinkinaserzeptoren (z.B. *FLT3*, *KIT*) oder Transkriptionsfaktoren. Beispiele für letztere sind *RUNX1* (= *AML1*)-, *CEBPA*- und *ATRX*-Mutationen. Außerdem geht man davon aus, dass epigenetische Dysregulationen relevant sind.

Man nimmt an, dass oftmals mindestens zwei genetische Ereignisse in verschiedenen Signalwegen notwendig sind, um die Transformation einer Zelle zu einer AML-Zelle zu bewirken (Abb. 1). Beim MDS geht man von einer Mehrschritt-Leukämogenese aus.



**Abbildung 1:** Modell der Leukämogenese bei AML. Es wird angenommen, dass die mutierte Rezeptortyrosinkinase die Zellproliferation steigert und eine weitere Mutation die Zelldifferenzierung blockiert (Ehninger et al., 2008).

Die auf diesem Weg veränderte Zelle vervielfältigt sich nun exponentiell und hemmt so die normale Hämatopoese im Knochenmark. Diese Verdrängung der normalen Hämatopoese führt zu einer Knochenmarksinsuffizienz. Diese äußert sich z.B. durch Symptome einer Anämie (Müdigkeit, verminderte Leistungsfähigkeit, Dyspnoe, Tachykardie, Blässe), Granulozytopenie (erhöhte Anfälligkeit für bakterielle Infekte, v.a. der Atemwege) oder einer Thrombozytopenie mit einer erhöhten Blutungsneigung im Sinne von Petechien, Epistaxis und Menorrhagie. Oftmals entwickelt sich auch eine B-Symptomatik mit Müdigkeit, Fieber, Gewichtsabnahme und Nachtschweiß. Außerdem kann man in selteneren Fällen eine Lymphknotenschwellung oder Gingivahyperplasie infolge einer Infiltration mit leukämischen Blasten beobachten.

### 2.1.3. Prognostische Faktoren

Das Alter spielt nicht nur im Hinblick auf die Inzidenz eine entscheidende Rolle, sondern ist auch prognostisch relevant (Appelbaum et al., 2006). So wurde eine 5-Jahresüberlebensrate von 39% bei Patienten mit AML zwischen 15 und 24 Jahren beschrieben, wohingegen diese bei Patienten bis zu 60 Jahren nur bei 26% lag (Gatta et al., 2003). AML-Patienten ab einem Alter von 75 Jahren zeigten ein 5-Jahresüberleben von nur 2% (Horner et al., 2006). Bei Patienten mit MDS wurden in einer Arbeit 5-Jahresüberlebensraten von 29% beschrieben (Visser et al., 2012).

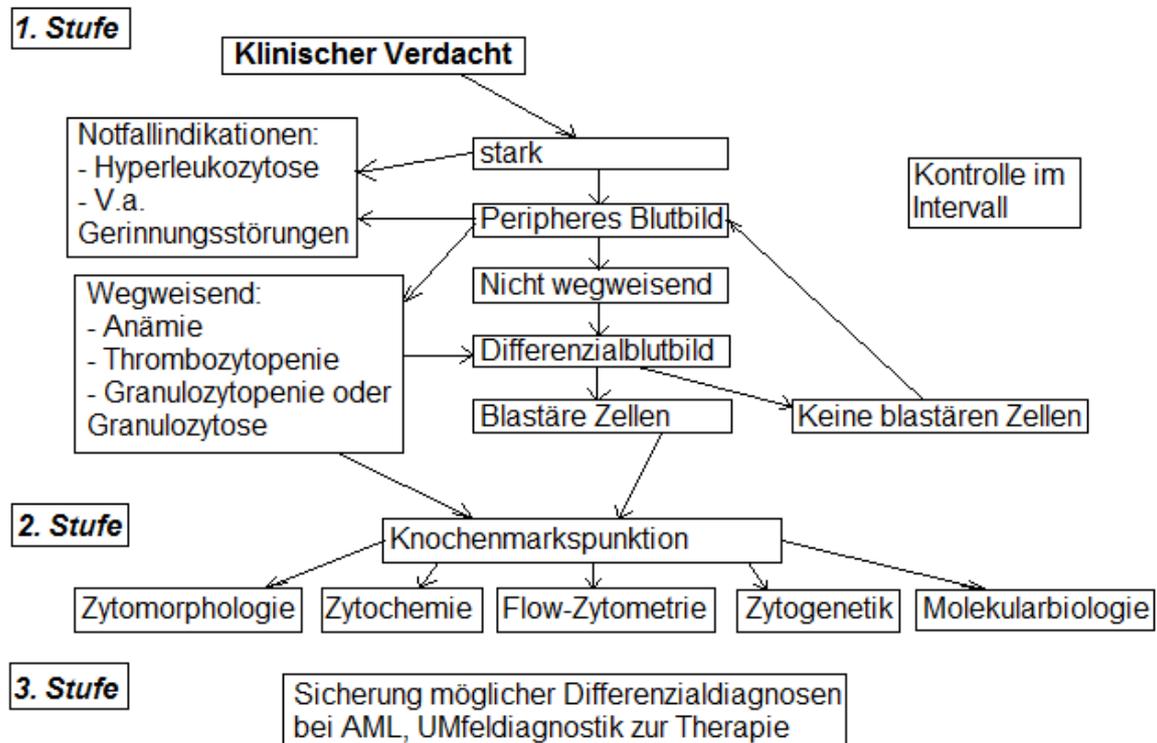
MDS-Patienten im Alter von  $\geq 60$  Jahren wiesen ein medianes Überleben von 35 Monaten und eine 4-Jahres-Überlebensrate von nur 41% auf (Falantes et al., 2012).

Hinzu kommt eine Vielzahl weiterer prognostisch wichtiger Faktoren: Bei der AML ist beispielsweise eine hohe Leukozytenzahl ( $>100.000/\mu\text{L}$ ) aufgrund gehäufte zerebraler Blutungen (Wald et al., 1982) zum Zeitpunkt der Diagnosestellung von prognostischer Relevanz. Eine hohe LDH ist ein weiterer ungünstiger Prognosefaktor (Ferrara et al., 1996). Eine große Rolle spielt außerdem der Karyotyp. Bei der AML sind u.a. Aberrationen der Chromosomen 3 bzw. 3q, 5/5q, 7/7q oder komplexe Veränderungen prognostisch ungünstig (Ravandi et al., 2007). Auch Veränderungen auf molekularer Ebene sind bei der AML relevant: von Nachteil sind interne Tandemduplikationen im *FLT3*-Gen (*FLT3-ITD*) (Schnittger et al., 2005), während isolierte Nucleophosmin-Mutationen (*NPM1*) eher günstig eingestuft werden (Falini et al., 2007). Auch das Ansprechen auf die Therapie ist von prognostischer Bedeutung: Das Erreichen einer kompletten Remission bereits nach der ersten Induktionstherapie wurde bei AML-Patienten als prognostisch günstig eingestuft (Estey et al., 2000).

Bei Patienten mit MDS spielt insbesondere das Stadium eine wesentliche Rolle. Ein höherer Blastenanteil ist prognostisch ungünstig. Außerdem wurde gezeigt, dass Transfusionsbedürftigkeit (Malcovati, 2009) und eine ausgeprägte Thrombozytopenie ( $<100.000/\mu\text{L}$ ) (Schmitt-Graeff et al., 2002) einen ungünstigen Einfluss auf die Prognose haben. Chromosomale Veränderungen sind ebenfalls prognostisch relevant, so sind etwa Aberrationen der Chromosomen 7 oder 17p ungünstig. Weiterhin wirken sich Mutationen im *NRAS*-Gen prognostisch ungünstig aus (Padua et al., 1998). Das Spektrum bekannter molekularer Mutationen hat sich beim MDS in den letzten Jahren rasch erweitert. Hier sind u.a. die prognostisch ungünstigen Mutationen im *ASXL1*-Gen zu nennen (Gelsi-Boyer et al., 2012). Darüber hinaus ist für jeden Patienten mit einer hämatologischen Neoplasie auch der Gesamtzustand prognostisch mitentscheidend. Komorbiditäten wie etwa kardiologische oder pulmonale chronische Erkrankungen sind in jedem Fall ebenfalls von Bedeutung.

## 2.1.4. Diagnostik

Die Diagnostik der AML sollte in einem mehrstufigen Prozess durchgeführt werden (Abb. 2).



**Abbildung 2:** Stufendiagnostik bei Patienten mit AML (Ehninger et al., 2008). Die erste diagnostische Stufe beruht auf dem klinischen Verdacht anhand von Anamnese, klinischer Untersuchung und dem Blutbild. Die Diagnosesicherung erfolgt auf Stufe 2 mithilfe einer Knochenmarkspunktion. Stufe 3 beinhaltet mögliche Differenzialdiagnosen sowie die Umfelddiagnostik zur Therapie.

Der wichtigste Schritt in der Primärdiagnostik ist die lichtmikroskopische Untersuchung eines Blutausstrichs sowie des Knochenmarkspirats (Haferlach et al., 2007; Ehninger et al., 2008). Bei 20% der Patienten lassen sich zum Zeitpunkt der Diagnose keine Blasten im peripheren Blut nachweisen, so dass die Diagnose der AML erst im Knochenmark gelingt. Nach aktuellen WHO-Kriterien (Swerdlow, 2008) muss der Blastenanteil zur Diagnose einer AML mindestens 20% betragen. Ausnahmen stellen reziproke Translokationen wie die  $t(8; 21)/RUNX1-RUNX1T1$  dar, bei deren Nachweis der Blastenanteil unerheblich ist. Neben der Zytogenetik muss

auch das molekulare Mutationsprofil berücksichtigt werden. So sind beispielsweise die *FLT3*-ITD (interne Tandemmutationen im *FLT3*-Gen) prognostisch ungünstig (Schnittger et al., 2005). Anhand der multiparametrischen Durchflusszytometrie wird die Linienzugehörigkeit der AML gesichert.

Die Diagnose eines MDS ist bei fehlender Blastenvermehrung in vielen Fällen schwierig, da Dysplasien auch andere Ursachen (etwa Medikamenten-vermittelte Toxizität) haben können. Oftmals kann erst eine Verlaufsbeobachtung die Diagnose eines MDS bestätigen. Für die Diagnosestellung des MDS ist ferner die zytogenetische Untersuchung des Knochenmarks wichtig, da der Nachweis einer MDS-typischen Veränderung im Knochenmark als beweisend für die Diagnose gilt.

### **2.1.5. Therapeutische Strategien**

Bei Patienten mit einer AML wird zunächst eine intensive Chemotherapie verabreicht. Das Ziel ist eine komplette Remission (CR), d.h. eine Normalisierung von Blutbild und Knochenmark. Eine komplette Remission bedeutet weniger als 5% Blasten im Knochenmark. Bei einem Blastenanteil zwischen 6% und 24% spricht man von einer partiellen Remission, beträgt der Blastenanteil nach der Therapie über 25% im Knochenmark, handelt es sich um Therapierefraktärität (Cheson et al., 2003). Im peripheren Blut sollten nach Erreichen einer CR keine Blasten mehr zu finden sein.

Die Chemotherapie bei Patienten mit AML gliedert sich in zwei Phasen. Sie beginnt mit der Induktionstherapie, im Anschluss darauf folgt die Konsolidierungstherapie. Bei der Induktionstherapie soll die Zahl maligner Zellen um mindestens drei Zehnerpotenzen vermindert werden. Das Ziel der Induktionstherapie ist die komplette Remission, während das Ziel der Konsolidierungstherapie die Erhaltung der Remission ist. Ein Beispiel für die Induktionstherapie ist das sogenannte „7+3-Schema“. Dieses beinhaltet eine dreitägige Gabe eines Anthrazyklins (Tag 3-5), meist Daunorubicin, sowie der Verabreichung von Cytarabin (ARA-C) über sieben Tage (Mayer et al., 1994). Bei der Konsolidierungstherapie hat sich hingegen kein Vorteil einer Kombination aus ARA-C mit einem Anthrazyklin im Vergleich zur Monotherapie mit ARA-C erwiesen (Moore et al., 2005).

Eine weitere Option stellt die allogene Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen aus peripherem Blut (PBSC, „peripheral blood stem cells“), dem Knochenmark oder aus Nabelschnurblut („cord blood“) von einem verwandten oder unverwandten Spender dar.

Die Therapie der Patienten mit MDS hängt vom Risikoprofil des Patienten sowie vom Allgemeinzustand und Alter ab. Somit kann die Therapie zwischen einer rein supportiv ausgerichteten Therapie und intensiven Therapiemaßnahmen variieren.

Neben den Möglichkeiten der supportiven Therapie stehen für Patienten mit MDS andere Therapiekonzepte wie hämatopoetische Wachstumsfaktoren (z.B. Erythropoetin) zur Verfügung. In Einzelfällen kann eine immunsuppressive Therapie mit Antithymozytenglobulin (ATG) und/oder Cyclosporin A wirksam sein. Eine Therapie mit der immunmodulatorisch wirksamen Substanz Lenalidomid eignet sich für MDS-Fälle mit isolierter 5q-Deletion (List et al., 2006). Seit einigen Jahren wird bei Patienten mit MDS erfolgreich 5-Azacytidin verabreicht. Dadurch kann in zahlreichen Fällen eine passagere Blutbildstabilisierung erreicht werden, ferner eine Reduktion des Blastenanteils.

Patienten mit Hochrisiko-MDS haben eine deutlich ungünstigere Prognose mit einem hohen Risiko der Transformation in eine s-AML. Bei diesen Patienten sollte die Möglichkeit einer allogenen Stammzelltransplantation (SZT) geprüft werden.

## **2.2. Allogene Stammzelltransplantation bei Patienten mit AML und MDS**

### **2.2.1. Indikation**

Die allogene Stammzelltransplantation (SZT) ist für eine Vielzahl von hämatopoetischen Erkrankungen eine Behandlungsoption mit kurativen Potential. Sie wird vor allem bei den unterschiedlichen Formen akuter und chronischer Leukämien angewandt. Beispiele für Indikationen zur allogenen SZT sind AML und akute lymphoblastische Leukämie (ALL) mit Hochrisikoprofil, MDS, Myelofibrose und in seltenen Fällen auch Lymphome. Ferner kommt die allogene SZT bei der schweren aplastischen Anämie (SAA) zum Einsatz. Ihre Bedeutung beruht bei malignen Erkrankungen vor allem auf dem immunologisch vermittelten Graft-versus-

Leukämie-Effekt. Optimale Voraussetzungen eröffnen sich bei Verfügbarkeit eines gewebekompatiblen Spenders (HLA-Übereinstimmung).

Bei der AML wird zunehmend versucht, die Indikation zur SZT mit dem individuellen Rezidivrisiko der Patienten abzustimmen. Hierbei spielen das zytogenetische und molekulare Mutationsprofil, ein bereits manifestes oder auf Basis der Verlaufsdagnostik drohendes Rezidiv, das Ansprechen auf die Induktionstherapie, weitere Faktoren wie Alter und Komorbidität sowie die Verfügbarkeit eines HLA-kompatiblen Spenders eine Rolle. Aufgrund der ungünstigen Prognose etwa bei Aberrationen am Chromosom 7 oder bei komplexen zytogenetischen Veränderungen besteht eine Indikation zur allogenen SZT bereits in der ersten Remission. Hingegen werden Patienten, die reziproke Rearrangements wie die  $t(15;17)/PML-RARA$ ,  $t(8;21)RUNX1-RUNX1T1$  oder eine Inversion  $inv(16)/CBFB-MYH11$  aufweisen, als prognostisch günstig eingestuft. Bei diesen bevorzugt man eine konventionelle Chemotherapie in erster Remission. Patienten mit AML mit einem normalen Karyotyp oder einer isolierten Trisomie 8 haben eine intermediäre Prognose. In dieser Subgruppe ist die Therapieentscheidung am schwierigsten.

Kommt es zu einem Rezidiv, nachdem die AML primär auf die Induktions- und Konsolidierungstherapie angesprochen hat, ist eine allogene SZT indiziert. Diese ermöglicht dann immer noch eine Heilungschance von etwa 40% (Schmid et al., 2006).

Die allogene SZT stellt die Therapie mit dem größten antileukämischen Potential dar, birgt allerdings auch ein höheres Risiko einer therapieassoziierten Morbidität oder Mortalität (TRM) im Vergleich zur konventionellen Therapie. MDS-Patienten mit einem Hochrisikoprofil können von einer allogenen SZT profitieren. Diese Therapie stellt die einzige kurative Option für Patienten mit einem MDS dar. Im Einzelfall können auch Patienten mit einem niedrigeren Risiko einer Transformation des MDS in eine s-AML Kandidaten für eine allogene SZT sein, z.B. jüngere Patienten.

### **2.2.2. Stammzellquellen und Konditionierung**

Hämatopoetische Stammzellen, welche das Antigen CD34 exprimieren, haben das Potential, sich selbst zu regenerieren. Sie können ins periphere Blut mobilisiert

werden, was die Voraussetzung für die Gewinnung der „PBSC“ für eine allogene SZT darstellt. Dies erfordert allerdings eine Stimulation durch Wachstumsfaktoren („GCSF“, Granulocyte colony stimulating factor“). Alternativen sind die Gewinnung der Stammzellen aus dem Knochenmark oder Nabelschnurblut („cord blood“). Vor einer allogenen SZT müssen sich die Patienten einer Konditionierungstherapie unterziehen. Darunter versteht man eine intensive Chemotherapie ggf. auch in Kombination mit einer Ganzkörperbestrahlung. Das Ziel ist eine Suppression des Immunsystems sowie eine weitere Reduktion der Leukämiezellen (Kröger & Zander, 2008).

Man unterscheidet zwischen einer Standardkonditionierung und einer dosisreduzierten Konditionierung („reduced-intensity conditioning“, RIC). Die Standardkonditionierung hat eine Myeloablation als Zielsetzung. Beispiele für eine myeloablative Konditionierung sind Busulfan (14-16mg/kg KG) in Kombination mit Cyclophosphamid (120-200 mg/kg KG) oder eine Ganzkörperbestrahlung („total body irradiation“, TBI, 8-12 Gy) mit Cyclophosphamid (120-200 mg/kg KG) (Kröger & Zander, 2008).

Bei höherem Alter oder relevanter Komorbidität stellen derartig intensive Protokolle allerdings ein zu hohes Risiko für die Patienten dar. Daher wurden dosisreduzierte Konditionierungsregime („reduced intensity conditioning“, RIC) eingeführt. Diese basieren stärker auf dem Graft-versus-Leukämie-Immuneffekt bei deutlich niedrigerer Toxizität. Ein Beispiel hierfür ist das FLAMSA-Regime (Fludarabin, Amsacrin, Cytarabin) in Verbindung mit Busulfan in nicht-myeloablativer Dosierung (Schmid et al., 2005). Weitere Beispiele für dosisreduzierte Konditionierungen bei der AML sind eine Ganzkörperbestrahlung (TBI) mit 2Gy oder die Kombination aus Busulfan (8 mg/kg KG) und Fludarabin (180 mg/m<sup>2</sup> KOF) (Kröger & Zander, 2008).

Die dosisreduzierte Konditionierung ist ein großer Vorteil, da sie auch älteren Patienten oder Patienten, die für eine Standardkonditionierung nicht in Frage kommen, eine allogene SZT ermöglicht. Allerdings ist das Rezidivrisiko bei diesen Protokollen höher (Massenkeil et al., 2005).

### **2.2.3. Komplikationen nach Transplantation**

Die allogene SZT bleibt trotz der signifikant verbesserten Überlebensdauer bei akuten Leukämien mit einer relevanten therapieassoziierten Mortalität behaftet (Frassoni et al., 1996). Häufige Komplikationen sind Infektionen, Organschäden oder eine „Graft versus Host Disease“ (GvHD). Nach vorangegangener Konditionierung und allogener SZT kommt es nach etwa zwei Wochen zum sogenannten „Engraftment“, welches durch eine Neutrophilenzahl  $\geq 500/\mu\text{L}$  im peripheren Blut definiert ist (Kröger & Zander, 2011). Im klinischen Alltag wird das Engraftment oftmals durch eine Gesamtleukozytenzahl von  $\geq 1.000/\mu\text{L}$  im peripheren Blut definiert. Ein primäres oder sekundäres Transplantatversagen („graft failure“) sind seltene Komplikationen.

Bei der GvHD bzw. „Spender-gegen-Wirt-Krankheit“ richten sich die Spenderlymphozyten gegen Organstrukturen des Empfängers. Diese Reaktion ist eine der häufigsten Komplikationen nach allogener SZT. Man unterscheidet die akute und chronische GvHD. Die akute GvHD manifestiert sich in der Regel bis zum Tag 100 nach allogener SZT. Meist sind hierbei die Haut, die Leber oder der Gastrointestinaltrakt betroffen. Die Einteilung der akuten GvHD richtet sich nach Ausmaß und Anzahl der betroffenen Organe.

Bei der cGvHD finden sich oft Hautveränderungen, ferner Trockenheit der Mundschleimhäute und Bindehäute. Darüber hinaus sind Manifestationen auch an anderen Organen wie Lunge, Muskeln, oder dem Gastrointestinaltrakt möglich.

Zur Prophylaxe und Therapie der GvHD werden Immunsuppressiva eingesetzt. Beispielhaft für die GvHD-Prophylaxe ist Cyclosporin A oftmals in Kombination mit Methotrexat zu nennen. Die Therapie erfolgt meist primär mit Steroiden.

### **2.2.4. Aufbau der Klinik für Stammzelltransplantation im Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf**

Das Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf ist eines der größten Zentren für Stammzelltransplantation in Europa. Es wurde von Prof. Dr. med. Dr. h.c. Axel Rolf Zander begründet und von Prof. Dr. med. Nicolaus Kröger weitergeführt. Seit 1990 werden überwiegend allogene, seltener auch autologe Stammzelltransplantationen

durchgeführt. Die Klinik behandelt sowohl pädiatrische als auch erwachsene Patienten. Derzeit beträgt die Zahl der allogenen stammzelltransplantierten Patienten über 180 pro Jahr. Seit 1990 wurden über 2.000 Patienten allogenen transplantiert.

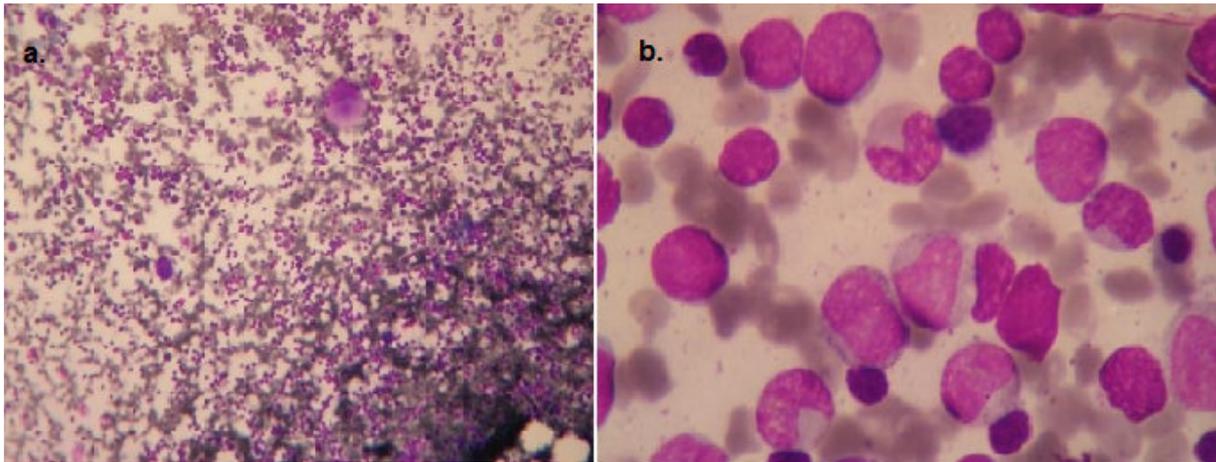
Die Klinik besteht aus einer Akut- und einer Nachsorgestation. In der KMT-Ambulanz werden die Patienten zur SZT vorbereitet, anschließend wird hier die Nachsorge nach SZT durchgeführt. Insbesondere in den ersten Monaten nach SZT ist diese sehr intensiv. Ein multidisziplinäres Team aus Hämatologen, Kinderonkologen, Pflegefachkräften, Angehörigen psychosozialer Berufe und Pharmazeuten betreut die Patienten.

Eine intensive Forschungstätigkeit rundet das Profil der Klinik für Stammzelltransplantation ab, etwa in der Weiterentwicklung der allogenen SZT für Patienten mit Myelofibrose oder Multiplem Myelom.

### **2.3. Haematogones – Allgemeine Grundlagen und Definition**

Haematogones (HG) sind physiologische Vorläuferzellen der B-Lymphozyten, die im gesunden Knochenmark des Menschen vorkommen (Muehleck et al., 1983). Physiologisch ist die Zahl der Haematogones im Knochenmark bei Kindern höher und nimmt im Alter kontinuierlich ab (Lucio et al., 1999). Des Weiteren konnte man feststellen, dass die Zahl der Haematogones bei Patienten nach Stammzelltransplantation, bei Lymphomen oder bei Patienten nach einer Chemotherapie ebenfalls erhöht ist (McKenna et al., 2001). Haematogones können aufgrund ihrer Morphologie und immunphänotypischen Ähnlichkeit mit neoplastischen Lymphozyten verwechselt werden.

Morphologisch zeigen sie ein kondensiertes und homogenes Chromatin mit wenig bis gar keinem Zytoplasma. Wenn Zytoplasma vorhanden ist, ist dieses sehr basophil, frei von Vakuolen, Granulationen oder Einschnürungen. Der Durchmesser variiert zwischen 10 und 20  $\mu\text{m}$ . Aufgrund ihrer Vielfältigkeit in Größe und Erscheinung sind sie teilweise nicht von Lymphoblasten zu unterscheiden.



**Abbildung 3:** (a) Knochenmark mit normalen Megakaryozyten (400x-fache Vergrößerung) (b) Kleinere und große Haematogones (1.000x-fache Vergrößerung) (Agarwal et al., 2010).

Immunphänotypisch charakteristisch für die Haematogones ist die Expression von CD38, CD10, D19, sowie eine schwache Expression von CD45. Der Fc-Rezeptor, Oberflächenimmunglobuline und CD20 sind negativ.

#### 2.4. Zielsetzung der Arbeit

Die Prognose von Patienten mit myeloischen Erkrankungen ist nach einer allogenen SZT durch eine Rezidiv-Rate von 20-50% bei AML- und von 30-50% bei MDS-Patienten limitiert (Kröger et al., 2010). Es wird daher nach Parametern gesucht, welche im Posttransplantationsverlauf zur Identifikation von Risikopatienten beitragen können. Eine erhöhte Zahl von Blasten im Knochenmark ist nicht nur vor, sondern auch nach einer allogenen SZT mit einer erhöhten Rezidivwahrscheinlichkeit assoziiert (Sayer et al., 2003). Ein positiver prognostischer Einfluss wurde dem vermehrten Nachweis von physiologischen B-Vorläuferzellen im Knochenmark bei Patienten mit einer AML in der Remission nach konventioneller Chemotherapie zugeschrieben (Chantepie et al., 2011). Bei Patienten, welche eine Nabelschnurbluttransplantation erhalten hatten, wurde eine erhöhte Zahl von Haematogones im Knochenmark mit einer niedrigeren Rate von GvHD, einer niedrigeren TRM und einem verbesserten Überleben in Verbindung gebracht (Honebrink et al., 2012). Bei Patienten mit MDS, ALL, AML und Non-Hodgkin-

Lymphomen war ebenfalls ein erhöhter Anteil von Haematogones zum Zeitpunkt des Engraftments nach allogener SZT prognostisch günstig (Shima et al., 2013).

Diese Arbeit untersucht die prognostische Bedeutung von physiologischen B-Vorläuferzellen (CD+10CD19+/Haematogones) nach allogener SZT bei Patienten mit AML oder MDS. Zu diesem Zweck führten wir im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf eine retrospektive Analyse an 76 erwachsenen Patienten mit AML oder MDS durch, welche in den Jahren von 2008 bis 2011 von Fremd- oder Familienspendern allogent transplantiert wurden. Der Anteil der Haematogones im Knochenmark wurde anhand der Immunphänotypisierung bzw. der multiparametrischen Durchflusszytometrie analysiert. Wir untersuchten die Zeitpunkte Tag 30 und Tag 100 nach Transplantation.

### 3. Methoden und Material

#### 3.1. Studienaufbau und Patienten

##### 3.1.1. Patienten

Die Basis der Analyse bildeten 76 erwachsene Patienten mit AML oder MDS, welche im Zeitraum 2008-2011 eine allogene Stammzelltransplantation erhielten. Von den 76 Patienten waren 41 (54%) Männer und 35 Frauen (46%). Das mediane Alter betrug 54 Jahre (Verteilung: 18-71 Jahre). 62 Patienten hatten eine AML (*de novo* AML: n=51; s-AML nach MDS/therapieassoziierte AML: n=11) und 13 Patienten ein MDS (RARS: n=1, RAEB-1: n=2, RAEB-2: n=10). 70 (92%) Patienten erhielten eine erste allogene Stammzelltransplantation, 6 (8%) wurden zum zweiten Mal allogent transplantiert. 53 Patienten (70%) wurden nach erster Krankheitsmanifestation, 21 (28%) nach dem ersten Rezidiv und ein Patient (1%) nach dem zweiten Rezidiv transplantiert. Bei einem Patienten lagen Daten zum Krankheitsstatus nicht vor. Ein Patient (1%) gehörte der günstigen zytogenetischen Risikogruppe an, 50 (66%) waren der intermediären Risikogruppe, und 24 (32%) der ungünstigen Gruppe zuzuordnen. Die Mehrheit der Patienten (n=51, 67%) erhielt eine reduzierte Konditionierung, überwiegend basierend auf FLAMSA (Fludarabin, Amsacrin, Cytarabin; n=41) (Schmid et al., 2005; Schmid et al., 2006), kombiniert mit Busulfan (Kumulativedosis 6.4-8 mg/kg KG). Die restlichen Patienten (n=25; 33%) erhielten eine myeloablative bzw. Standardkonditionierung. Die GvHD-Prophylaxe basierte überwiegend auf Cyclosporin A, bei 59 Patienten (78%) wurde sie mit Mycophenolat-Mofetil (MMF) kombiniert, bei 13 Patienten (17%) mit Methotrexat (MTX). Drei Patienten (4%) erhielten eine andere GvHD-Prophylaxe. In einem Fall fehlten die Daten. Antithymozytenglobulin (ATG Fresenius, 3x20 - 3x30 mg/kg KG oder Thymoglobulin Merieux, kumulative Dosis 6-8 mg/kg KG) wurde 58 (76%) Patienten appliziert.

Die Charakteristika der Patienten, der Transplantationen und der Spender sind in Tabelle 1 und 2 aufgeführt.

**Tabelle 1:** Patienten- und Transplantationscharakteristika

| <b>Patientencharakteristika</b>   | <b>Anzahl</b> |
|---|---------------|
| Männlich/weiblich (Verhältnis)  | 41/35 (1:1,2) |
| Medianes Alter in Jahren (Bereich)  | 54 (18-71)    |
| Medianes Intervall von Diagnose bis zur SZT in Monaten (Bereich)                      | 4 (1-72)      |
| <b>Entität</b>  |               |
| <i>De novo</i> AML  | 52 (68%)      |
| s-/t-AML  | 11 (14%)      |
| MDS   | 13 (17%)      |
| - RARS  | 1             |
| - RAEB-1  | 2             |
| - RAEB-2  | 10            |
| <b>Zytogenetik</b>  |               |
| Normaler Karyotyp   | 37 (49%)      |
| inv(16)/ <i>CBFB-MYH11</i>  | 1 (1%)        |
| Trisomie 8  | 2 (3%)        |
| 20q-Deletion  | 1 (1%)        |
| Chromosom 5-Veränderung   | 0 (0%)        |
| Chromosom 7-Veränderung   | 4 (5%)        |
| t(9;11)(p21-22;q23)   | 2 (3%)        |
| 17p-Deletion  | 2 (3%)        |
| Komplexer Karyotyp (≥3 klonale Veränderungen)   | 15 (20%)      |
| Andere chromosomale Veränderungen   | 8 (11%)       |
| Karyotyp nicht vorliegend   | 1 (1%)        |
| <b>Zytogenetische Risikogruppe (Medical Research Council) (Grimwade et al., 2010)</b> |               |
| Günstig   | 1 (1%)        |
| Intermediär   | 50 (66%)      |
| Ungünstig   | 24 (32%)      |
| Karyotyp nicht vorliegend   | 1 (1%)        |
| <b>Krankheitsstatus zum Zeitpunkt der SZT</b>   |               |
| Erstmanifestation   | 53 (70%)      |

|   |          |
|---|----------|
| 1. Rezidiv                                    | 21 (28%) |
| 2. Rezidiv                                    | 1 (1%)   |
| Unbekannt                                     | 1 (1%)   |
| <b>Remissionsstatus zum Zeitpunkt der SZT</b> |          |
| Komplette Remission                           | 36 (47%) |
| “Active disease”                              | 30 (39%) |
| Keine Therapie vor SZT                        | 9 (12%)  |
| Unbekannt                                     | 1 (1%)   |

**Tabelle 2:** Patienten- und Spendercharakteristika

| <b>Spendercharakteristika</b>                         |                 |
|---|-----------------|
| Männlich/weiblich (Ratio)                             | 60/15 (4,0)     |
| Medianes Alter des Spenders in Jahren (Bereich)       | 36 (14-58)      |
| Unverwandt/verwandt                                   | 63/12 (84%/16%) |
| HLA-ident/nicht-ident                                 | 46/30 (61%/39%) |
| Unbekannt   | 1 (1%)          |
| <b>Spender/Patient CMV-Serostatus</b>                 |                 |
| IgG negativ/IgG negativ                               | 29 (38%)        |
| IgG positiv/IgG positiv                               | 25 (33%)        |
| IgG positiv/IgG negativ                               | 11 (14%)        |
| IgG negativ/IgG positiv                               | 11 (14%)        |
| <b>Spender/Patient ABO-Blutgruppenübereinstimmung</b> |                 |
| Ident   | 26 (34%)        |
| Nicht-ident   | 44 (58%)        |
| Unbekannt   | 4 (5%)          |
| <b>Stammzellquelle</b>                                |                 |
| Periphere Blutstammzellen (PBSZ)                      | 74 (97%)        |
| Knochenmark   | 1 (1%)          |
| Nabelschnurblut                                       | 1 (1%)          |
| <b>Konditionierung</b>                                |                 |
| Myeloablative Konditionierung (MAC)                   | 25 (33%)        |
| Reduzierte Konditionierung (RIC)                      | 51 (67%)        |
| Ganzkörperbestrahlung (TBI)                           | 29 (38%)        |
| Antithymozytenglobulin (ATG)                          | 58 (76%)        |
| <b>GvHD-Prophylaxe</b>                                |                 |
| Cyclosporin/Methotrexat                               | 13 (17%)        |
| Cyclosporin/MMF                                       | 59 (78%)        |
| Andere  | 3 (4%)          |
| Unbekannt   | 1 (1%)          |

### 3.1.2. Konditionierung vor allogener Stammzelltransplantation

25 (33%) Patienten erhielten eine myeloablative Konditionierung, 51 (67%) eine reduzierte Konditionierung vor der Transplantation; in einem Fall (1%) war die Konditionierung nicht bekannt. 29 (38%) Patienten erhielten eine Ganzkörperbestrahlung (TBI). Ferner erhielten 58 (76%) Patienten Antithymozytenglobulin (ATG). Eine Übersicht über die Konditionierungsschemata vermittelt Tabelle 3. Die GvHD-Prophylaxe wurde bei 13 (17%) Patienten mit Cyclosporin und Methotrexat, bei 59 (78%) Patienten mit Cyclosporin und Mycophenolat-Mofetil durchgeführt. 3 (4%) Patienten erhielten eine andere Konditionierung. Bezüglich der Therapie wurden die Intensität der Konditionierung (myeloablative *versus* reduziert), die Art der Konditionierung, ATG (ja; nein) und die GvHD-Prophylaxe erfasst.

**Tabelle 3:** Überblick über die Konditionierungsschemata (TBI: „total body irradiation“ (Ganzkörperbestrahlung); ATG: Antithymozytenglobulin)

| Konditionierungsregime                            | Anzahl (%) |
|---|------------|
| Fludarabin/Amsacrin/Busulfan/Cytarabin/ATG        | 17 (22)    |
| Fludarabin/Amsacrin/Cytarabin/Busulfan            | 14 (18)    |
| Fludarabin/Amsacrin/Cytarabin/Cyclophosphamid/TBI | 6 (8)      |
| Fludarabin/Amsacrin/Cyclophosphamid/Cytarabin     | 2 (3)      |
| Fludarabin/Amsacrin/Cytarabin/TBI/ATG             | 2 (3)      |
| TBI/Cyclophosphamid                               | 14 (18)    |
| TBI/Fludarabin                                    | 3 (4)      |
| TBI/Cyclophosphamid/Fludarabin                    | 1 (1)      |
| Busulfan/Fludarabin                               | 3 (4)      |
| Clofarabin/Busulfan/Fludarabin                    | 2 (3)      |
| Thiotepa-basierend                                | 1 (1)      |
| Treosulfan/Fludarabin                             | 3 (4)      |
| Busulfan/Cytarabin                                | 7 (9)      |
| Clofarabin/Cytarabin/Fludarabin/TBI               | 1 (1)      |
| Gesamt  | 76 (100)   |

Hinsichtlich der klinischen Ergebnisse wurde der Remissionsstatus nach Transplantation (CR, PR oder refraktär), der Zeitpunkt des Leukozyten- und Thrombozytenengraftments (Leukozyten  $\geq 1,0 \times 10^9/L$ ; Thrombozyten  $\geq 10 \times 10^9/L$ ) und das Auftreten von akuter (Grad II–IV) und chronischer GvHD (Sullivan et al., 1999) erfasst.

### **3.1.3. Studiendesign**

Diese Arbeit wurde im Sinne einer retrospektiven Analyse durchgeführt; sie umfasste den Transplantationszeitraum 2008 – 2011. Ausschlaggebend für die Aufnahme in die Analyse war neben der Diagnose AML oder MDS das Vorhandensein einer durchflusszytometrischen Analyse des Knochenmarks mit Erfassung der Haematogones an Tag 30 und/oder Tag 100 nach Transplantation. Für die Studie wurden zunächst die Auswertungen der Durchflusszytometrie analysiert. Zusätzlich wurden Arztbriefe, Verlaufsbögen des stationären Aufenthalts, die Transplantationsdokumentation, die Akten der Ambulanz sowie die Befunde der Knochenmarkszytologie ausgewertet (AH, UB).

Die klinischen Daten sowie die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messungen wurden im Rahmen dieser Promotionsarbeit in einer Excel-Tabelle erfasst (Microsoft Excel 2007, Microsoft Corp., Redmond, WA). Die Tabelle umfasste die Auswertungen der Durchflusszytometrie aus dem Knochenmark an Tag 30 und 100 nach Transplantation. Die Haematogones wurden im Knochenmark anhand der Koexpression von CD19 und CD10 erfasst, waren außerdem negativ für Oberflächenleichtketten und negativ für CD20. Des Weiteren wurden basierend auf den Immunstaten (des peripheren Bluts) CD3+CD4+ und CD3+CD8+ T-Zellen erfasst, auch reife B-Zellen (CD19+CD20+). Diese Populationen wurden in Prozent bezogen auf die Gesamtzellzahl angegeben.

Neben demographischen Daten wurden die folgenden klinischen Daten erfasst: Datum der Erstdiagnose, Datum der Transplantation, Ereignis (ja/nein), Datum des Rezidivs, Tod (ja/nein) und Todesursache. Weitere Parameter waren der FAB-Subtyp, der Karyotyp, die zytogenetische Risikogruppe (Grimwade et al., 2011), das Stadium (Erstmanifestation versus Rezidiv), der Remissionsstatus (komplett, partiell, keine Remission; Cheson et al., 2003) zum Zeitpunkt der Transplantation, sowie

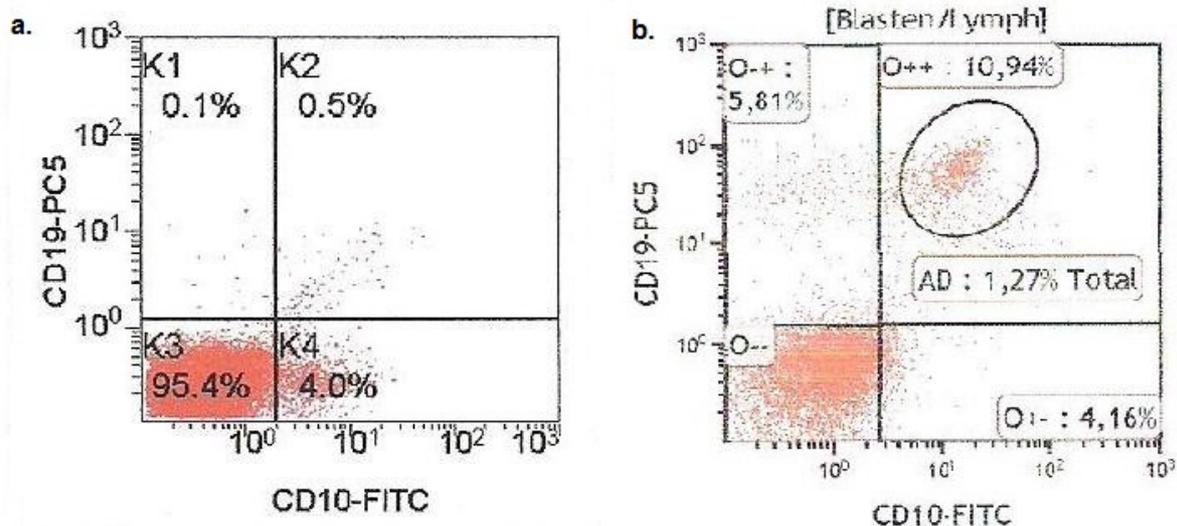
Daten des Spenders (männlich/weiblich, Alter, HLA-Übereinstimmung, Blutgruppe, ABO-Blutgruppenkompatibilität, Cytomegalievirus (CMV)-Serostatus bzw. CMV-Übereinstimmung).

### **3.2. Durchflusszytometrie**

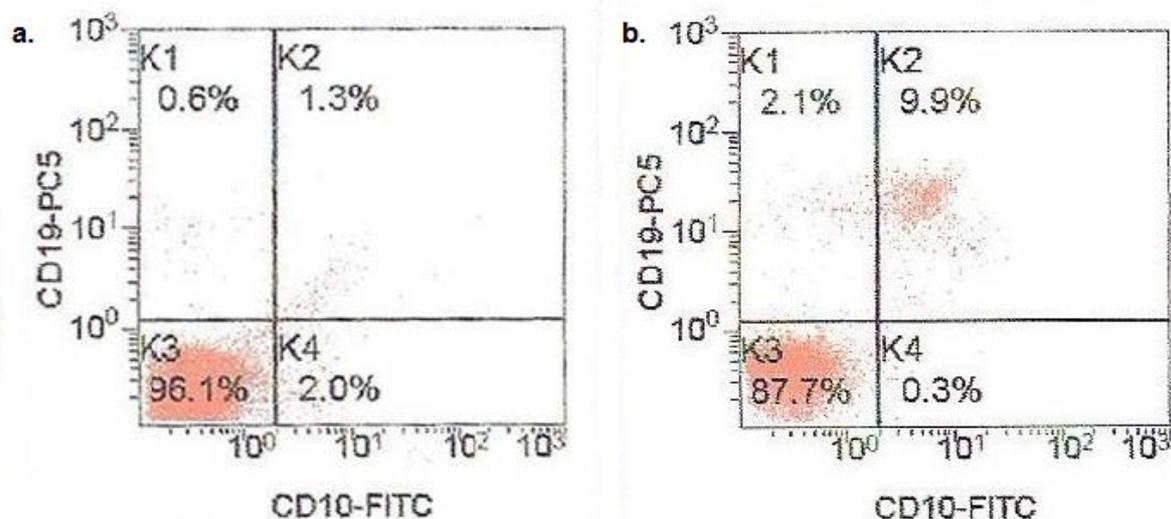
Die multiparametrische Durchflusszytometrie erfolgte nach Lyse der Erythrozyten aus dem Knochenmarkaspirat. Bevor die Zellen mit Antikörpern gefärbt wurden, wurden die Knochenmarkproben mit Erythrozytenlysepuffer (155 mM Ammoniumchlorid, 10 mM Kaliumhydrogencarbonat und 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure) über 10 Minuten bei leichter Bewegung bei Raumtemperatur behandelt. Nachdem die Zellen gewaschen worden waren, wurden die Zellen mit ca.  $1,0 \times 10^6$  Zellen pro 100  $\mu\text{L}$  in „Terasaki Park Medium“ (Gibco, Darmstadt, Deutschland) resuspendiert. Die Zellen wurden mit Antikörpern inkubiert: u.a. CD19-PC5, CD10-FITC, HLA-DR-PE, CD20-ECD und CD45-PC7. In einem separierten Medium wurden die Zellen mit CD19-PC5 und CD34-PC7 angefärbt (Beckman Coulter, Krefeld, BRD). Wir verwendeten FC500 und Navios-Zytometer (Beckman Coulter, Krefeld, BRD).

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurden die unterschiedlichen Zellpopulationen nach den bereits vorliegenden Messprotokollen retrospektiv reevaluiert und quantifiziert, d.h. es erfolgte eine erneute Auswertung anhand der Kaluza- und CXP-Software (AH, UB).

Die folgenden Abbildungen 4a/b und 5a/b zeigen die durchflusszytometrische Analyse von Haematogones anhand von zwei Beispielpatienten an den Tagen 30 und Tag 100 nach SZT.

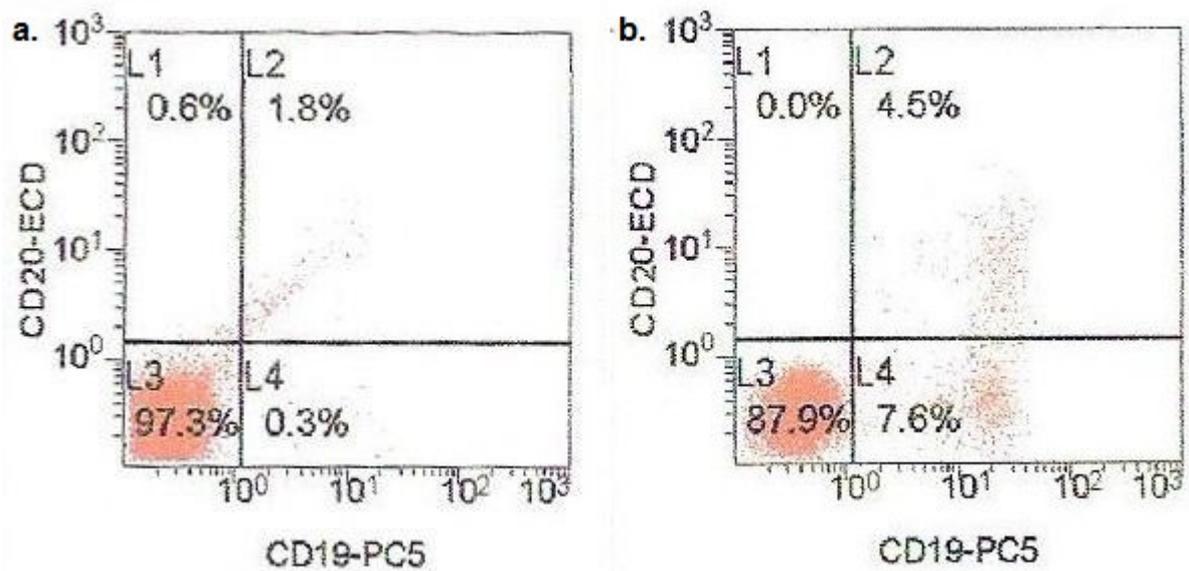


**Abbildung 4:** Beispielpatient A an Tag 30 (a) und Tag 100 (b) nach SZT. Die Haematogones werden im Knochenmark in der multiparametrischen Durchflusszytometrie durch die CD10+CD19+ doppelt positive Zellpopulation definiert. An Tag 100 (b) ist der Anteil an Haematogones deutlich höher als an Tag 30 (a).

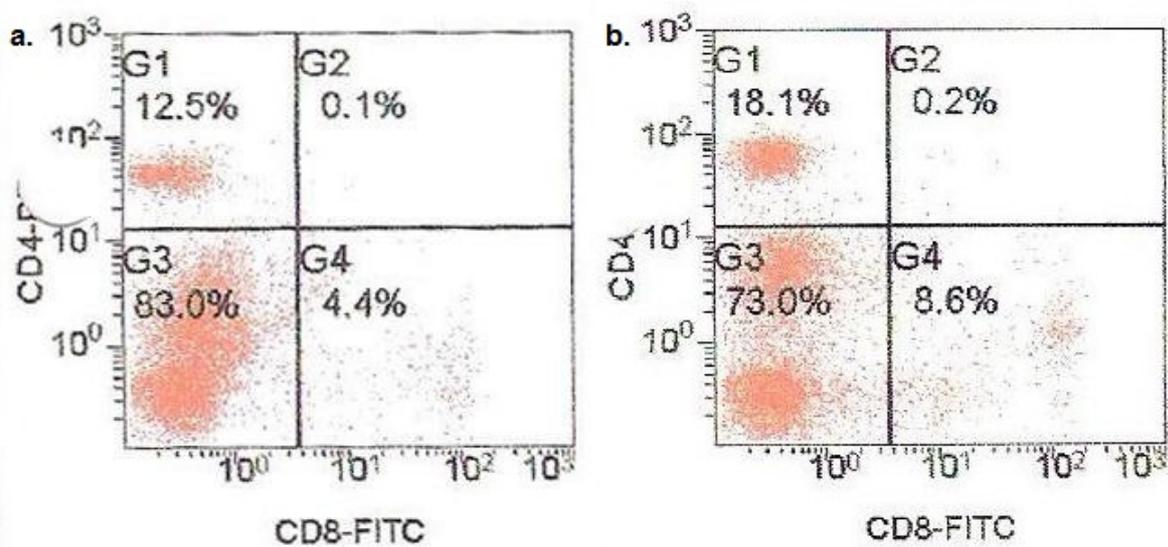


**Abbildung 5:** Beispielpatient B an Tag 30 (a) und Tag 100 (b) nach SZT. Auch hier ist ein Anstieg der Haematogones zwischen den beiden Zeitpunkten festzustellen.

Weiterhin wurden im peripheren Blut folgende Lymphozytensubpopulationen an Tag 30 und Tag 100 nach SZT erfasst: reife B-Zellen (CD19+CD20+) (Abb. 6) sowie T-Helferzellen (CD3+CD4+) und zytotoxische T-Zellen (CD3+CD8+) (Abb. 7).



**Abbildung 6:** Durchflusszytometrische Erfassung reifer B-Zellen (CD19+CD20+) von Beispielpatient A an Tag 30 (a) und Tag 100 (b) nach SZT. Es findet sich ein Anstieg zwischen beiden Zeitpunkten.



**Abbildung 7:** Durchflusszytometrische Erfassung und der T-Zellen (CD4+ sowie CD8+) von Beispielpatient A an Tag 30 (a) und Tag 100 (b) nach SZT.

### 3.3. Statistik

Das Gesamtüberleben („Overall survival“, OS) und ereignisfreie Überleben („event-free survival“, EFS) wurde vom Zeitpunkt der Transplantation an berechnet und gemäß der Kaplan-Meier-Methode geschätzt. Der Einfluss verschiedener Parameter auf das Überleben wurde mithilfe der Cox-Regressions-Analyse ausgewertet und miteinander verglichen. In die univariate Analyse wurden folgende Faktoren einbezogen: Geschlecht des Patienten, Intervall von der Erstdiagnose bis zur Transplantation, die Entität bzw. Genese der Erkrankung (*de novo* AML vs. s-AML vs. MDS), Zahl der Rezidive, zytogenetische Risikogruppe, vorangegangene Therapie, Remissionsstatus vor Transplantation, CMV-Serostatus des Patienten, Konditionierung, Spender- und Empfängercharakteristika (verwandte vs. unverwandte Transplantation; periphere Blutstammzellen vs. KM vs. Nabelschnurblut, HLA-Identität vs. -Mismatch) und das Auftreten einer akuten oder chronischen GvHD. Faktoren, die in der univariaten Analyse eine signifikante Bedeutung aufwiesen, wurden dann noch multivariat analysiert. Signifikanz wurde bei einem P-Wert  $<0,05$  angenommen.

## 4. Ergebnisse

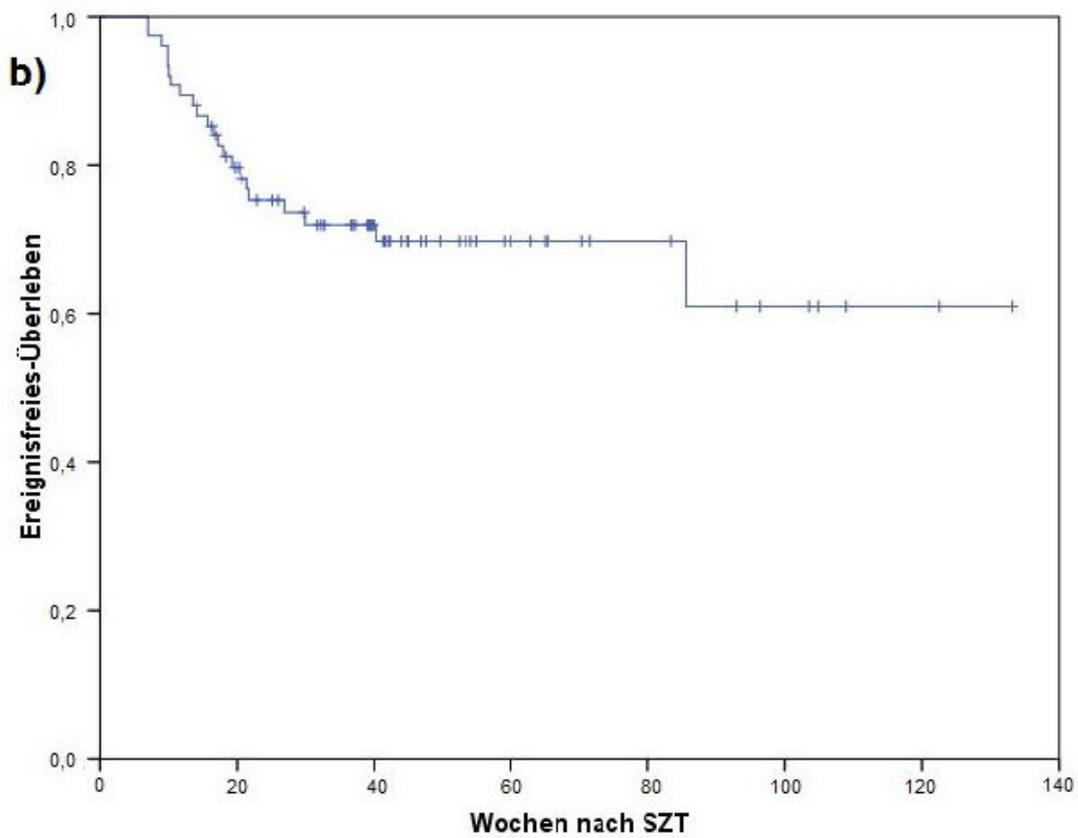
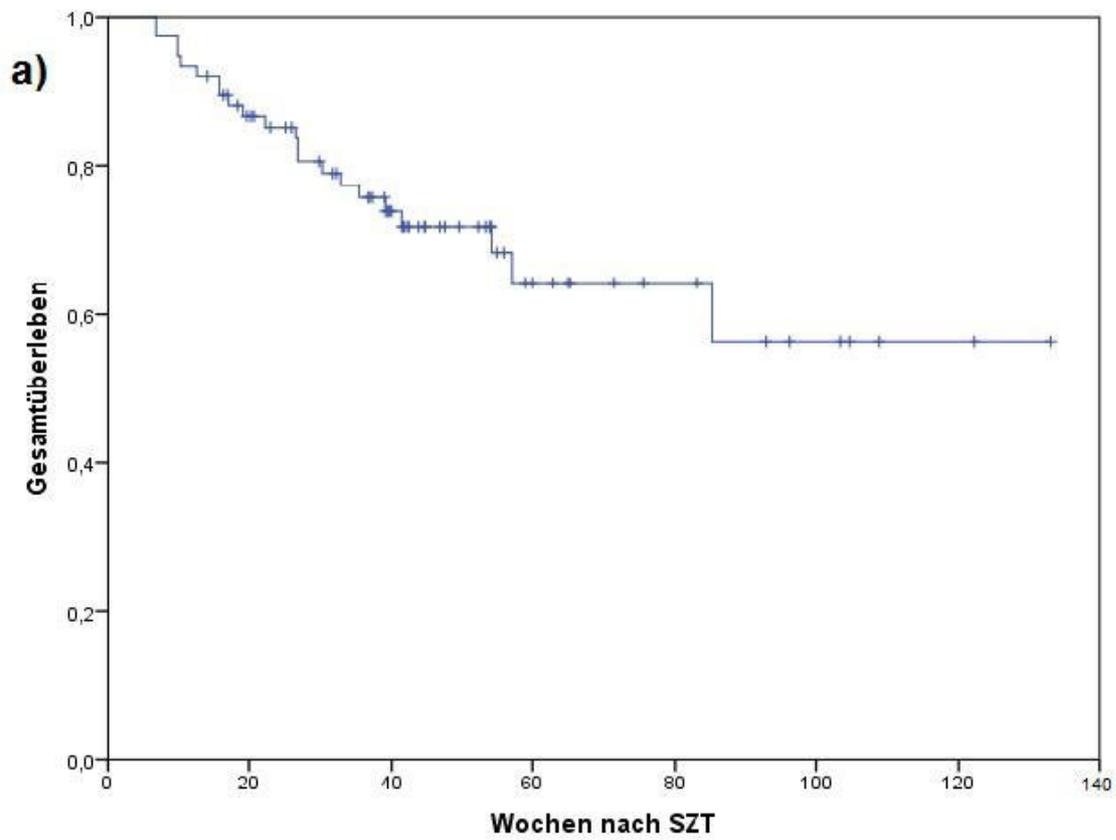
### 4.1. Klinische Ergebnisse

Der mediane Beobachtungszeitraum nach Transplantation betrug 13 Monate. Ein erfolgreiches Leukozytenengraftment ( $\geq 1,0 \times 10^9/L$ ) wurde bei 64 Patienten (84%) dokumentiert. Das Leukozytenengraftment wurde im Median am Tag 15 erreicht (Bereich, 7-32 Tage). Eine aGvHD Grad II-IV wurde bei 17 Patienten (22%) dokumentiert.

Im Analysezeitraum entwickelten 19 von 76 Patienten (25%) ein Rezidiv nach Transplantation (Median: 23 Wochen nach SZT; im Bereich zwischen 7 bis 40 Wochen).

22 Patienten (29%) starben. Bei 16 von den 22 Patienten (73%) war die Todesursache ein Rezidiv. Bei 6 Patienten (27%) war die Todesursache transplantations-assoziiert. Ein Patient (1%) starb aufgrund einer schweren GvHD, vier Patienten (5%) starben nach einer schweren Infektion bzw. Sepsis, in einem Fall (1%) wurde eine andere Todesursache dokumentiert.

Abbildung 8 zeigt das Überleben der gesamten Kohorte nach der Kaplan-Meier-Analyse.



**Abbildung 8:** Gesamtüberleben ("overall survival" OS) **(a)** und ereignisfreies Überleben ("event-free survival", EFS) **(b)** der gesamten Kohorte.

## 4.2. Quantifizierung der Haematogones und Lymphozytensubpopulationen

### 4.2.1. Quantifizierung der Haematogones im Knochenmark

Die durchflusszytometrische Analyse der Haematogones im Knochenmark war bei 41 Patienten (54%) an Tag 30 und bei 59 Patienten (78%) an Tag 100 nach SZT verfügbar. Der mediane Anteil der CD10+CD19+ Haematogones betrug am Tag 30 0,1% aller Zellen (Streubereich 0,0-2,4%). Am Tag 100 zeigte sich ein höheres medianes Level der Haematogones mit 1,6% (Streubereich 0,0-12,4%). Der Durchschnittswert der CD10+CD19+ Haematogones betrug am Tag 30 0,3% (Standardabweichung  $\pm 0,5\%$ ) und am Tag 100 2,1% der Zellen ( $\pm 2,2\%$ ) (sh. Tabelle 4).

**Tabelle 4:** Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messung der CD10+CD19+ positiven Haematogones im Knochenmark (KM) und der CD19+CD20+ positiven reifen B-Zellen im peripheren Blut (PB) an den Tagen 30 und 100 nach SZT (SD: "standard deviation"; Standardabweichung).

| Parameter                   | Tag 30                   |                             | Tag 100                  |                             |
|-----------------------------|--------------------------|-----------------------------|--------------------------|-----------------------------|
|                             | Median<br>(Streubereich) | Durchschnitt<br>( $\pm$ SD) | Median<br>(Streubereich) | Durchschnitt<br>( $\pm$ SD) |
| <b>KM CD10+CD19+</b><br>(%) | 0,1 (0-2,4)              | 0,3 ( $\pm 0,5$ )           | 1,6 (0-12,4)             | 2,1 ( $\pm 2,2$ )           |
| <b>PB CD19+CD20+</b><br>(%) | 0,1 (0-4,0)              | 0,3 ( $\pm 0,6$ )           | 0,6 (0-5,2)              | 0,9 ( $\pm 0,9$ )           |

### 4.2.2. Quantifizierung der Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut

Die durchflusszytometrische Analyse der Lymphozytensubpopulationen (CD3+CD4+; CD3+CD8+) im peripheren Blut war bei 41 Patienten (54%) an Tag 30 und bei 59 Patienten (78%) an Tag 100 nach SZT verfügbar. Der mediane Anteil der CD3+CD4+ Lymphozyten betrug am Tag 30 0,3% aller Zellen (Streubereich 0-14,5%). Der mediane Anteil der CD3+CD8+ Lymphozyten betrug am Tag 30 0,3% aller Zellen (Streubereich 0-10,1%). Am Tag 100 zeigte sich ein höheres medianes

Level der CD3+CD4+ Lymphozyten mit 1,0% (Streubereich 0,2-20,3%). Am Tag 100 zeigte sich ebenfalls ein höheres medianes Level der CD3+CD8+ Lymphozyten mit 1,7% (Streubereich 0,1-10,7%). Der Durchschnittswert der CD3+CD4+ Lymphozyten betrug am Tag 30 1,1% (Standardabweichung  $\pm 2,8\%$ ) und am Tag 100 1,6% der Zellen ( $\pm 2,7\%$ ). Der Durchschnittswert der CD3+CD8+ Lymphozyten betrug am Tag 30 1,1% (Standardabweichung  $\pm 2,2\%$ ) und am Tag 100 2,5% der Zellen ( $\pm 2,5\%$ ) (sh. Tabelle 5).

**Tabelle 5:** Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messung der CD3+CD4+ und CD3+CD8+ positiven Zellen aus peripherem Blut (PB) an den Tagen 30 und 100 nach SZT.

| Parameter              | Tag 30                   |                             | Tag 100                  |                             |
|------------------------|--------------------------|-----------------------------|--------------------------|-----------------------------|
|                        | Median<br>(Streubereich) | Durchschnitt<br>( $\pm$ SD) | Median<br>(Streubereich) | Durchschnitt<br>( $\pm$ SD) |
| <b>PB CD3+CD4+ (%)</b> | 0,3 (0-14,5)             | 1,1 ( $\pm 2,8$ )           | 1,0 (0,2-20,3)           | 1,6 ( $\pm 2,7$ )           |
| <b>PB CD3+CD8+ (%)</b> | 0,3 (0-10,1)             | 1,1 ( $\pm 2,2$ )           | 1,7 (0,1-10,7)           | 2,5 ( $\pm 2,5$ )           |

#### 4.3. Untersuchung des prognostischen Einflusses der Haematogones

Im Folgenden wurde untersucht, inwiefern man mithilfe der Quantifizierung der Haematogones im Knochenmark an den Tagen 30 und 100 nach allogener SZT eine prognostische Aussage zum Überleben der Patienten treffen kann. Wir verglichen das Gesamtüberleben (OS, „overall survival“) und ereignisfreie Überleben („event-free survival“, EFS) der Patienten in Abhängigkeit von bestimmten Schwellwerten der Haematogones im Knochenmark. Der Vergleich der Überlebensprofile der Patienten mit Haematogones ober- und unterhalb des medianen Levels (sh. oben) ergab keine signifikanten Unterschiede (Daten nicht gezeigt). Wir verwendeten dann die Durchschnittswerte („mean haematogones level“ am Tag 30 0,3%; am Tag 100 2,1% aller Zellen). Hierbei ergaben sich dann signifikante Unterschiede im Überleben der Patienten bezogen auf den Durchschnittswert an Tag 100. Für den Tag 30 ergaben

sich hingegen keine signifikanten Unterschiede im Überleben unabhängig von der Wahl der Grenzwerte (auch bei Testung weiterer Grenzwerte, Daten nicht gezeigt).

#### **4.3.1. Tag 30 nach SZT**

Das Haematogones-Level an Tag 30 nach SZT zeigte keine signifikanten Auswirkungen auf das Überleben:

Das geschätzte Ein-Jahresüberleben ("estimated 1-year OS"  $\pm$ SE) für niedrigere Haematogones (<0,3% aller Zellen, dem Durchschnittswert entsprechend) an Tag 30 betrug  $63\pm 10\%$  gegenüber  $71\pm 17\%$  für Patienten mit einem höheren Haematogones-Level (über dem Durchschnittswert). Das Relative Risiko (RR) betrug für das geschätzte Ein-Jahresüberleben an Tag 30 nach SZT 0,73 (95%iges Konfidenzintervall (95%CI) 0,159-3,349;  $P=0,685$ ). Das durchschnittliche

Gesamtüberleben ("mean OS $\pm$ SE) betrug  $61\pm 6$  Wochen für Patienten mit Haematogones <0,3% an Tag 30 gegenüber  $74\pm 13$  Wochen für Patienten mit Haematogones  $\geq 0,3\%$  aller Zellen.

Das geschätzte Ein-Jahres-ereignisfreie-Überleben (1-year-EFS) betrug  $65\pm 10\%$  für Patienten mit Haematogones <0,3% an Tag 30 gegenüber  $75\pm 15\%$  für Patienten mit Haematogones  $\geq 0,3\%$ . Das Relative Risiko (RR) betrug für das geschätzte "1-year EFS" an Tag 30 nach SZT 0,746 (95%CI 0,162-3,424;  $P=0,71$ ). Das durchschnittliche ereignisfreie Überleben (mean EFS $\pm$ SE) betrug  $61\pm 6$  Wochen für Patienten mit Haematogones <0,3% an Tag 30 gegenüber  $76\pm 12$  Wochen für Patienten mit Haematogones über diesem Grenzwert.

#### **4.3.2. Tag 100 nach SZT**

Das Haematogones-Level an Tag 100 nach allogener SZT zeigte hingegen signifikante Auswirkungen auf das Überleben:

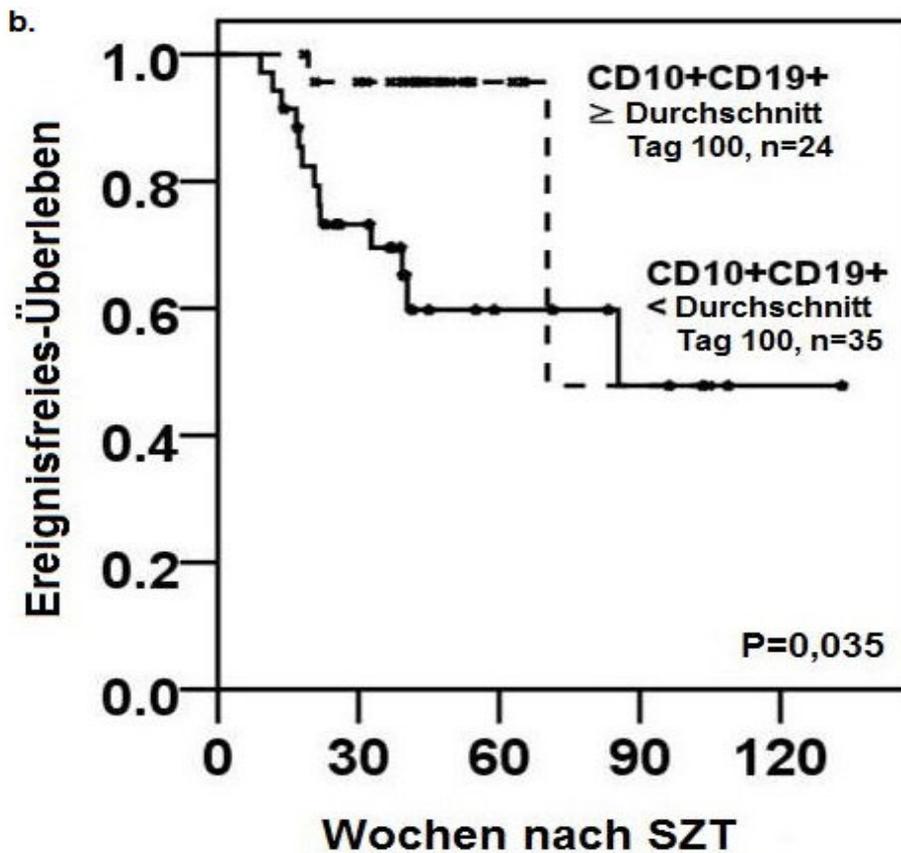
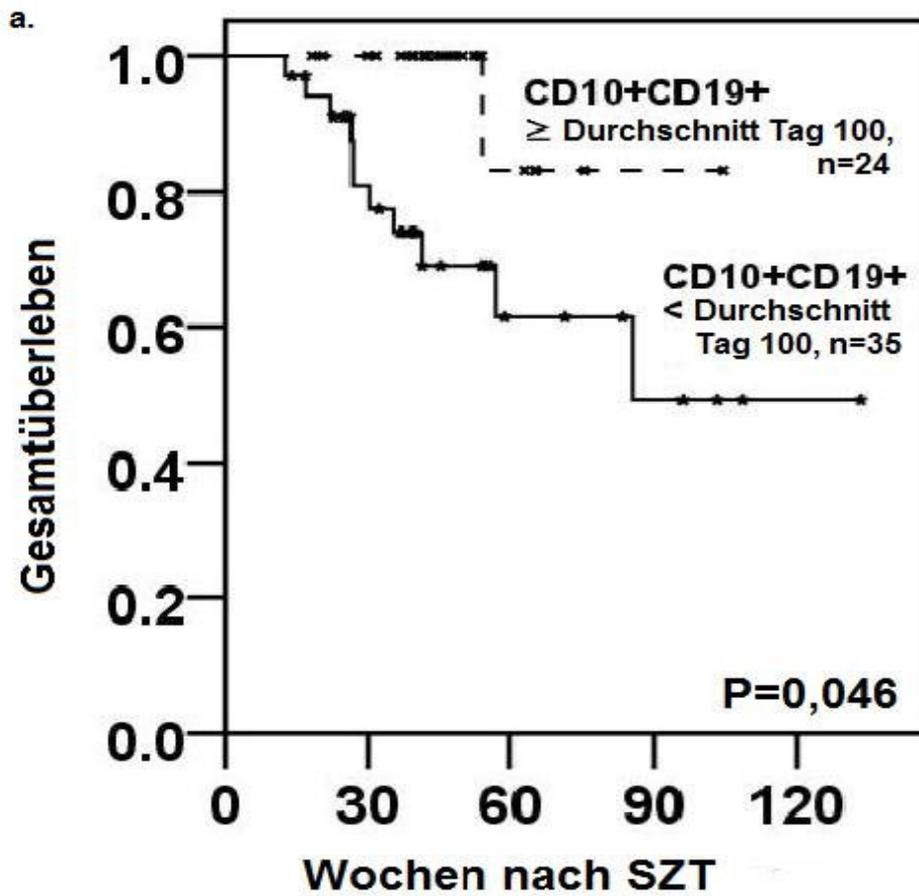
Das geschätzte Ein-Jahresüberleben ("estimated 1-year OS"  $\pm$ SE) für niedrigere Haematogones (<2,1% aller Zellen, dem Durchschnittswert entsprechend) an Tag 100 betrug  $69\pm 9\%$  gegenüber  $83\pm 15\%$  für Patienten mit einem höheren Haematogones-Level (über dem Durchschnittswert). Das Relative Risiko (RR) betrug

für das geschätzte Ein-Jahresüberleben an Tag 100 nach SZT 0,124 (95%CI 0,016-0,967; P=0,05). Das durchschnittliche Gesamtüberleben ("mean" OS±SE) betrug 89±10 Wochen für Patienten mit Haematogones <2,1% an Tag 100 gegenüber 96±8 Wochen für Patienten mit Haematogones ≥2,1% aller Zellevents.

Das geschätzte Ein-Jahres-ereignisfreie-Überleben (1-year-EFS) betrug 60±10% für Patienten mit Haematogones <2,1% an Tag 100 gegenüber 96±4% für Patienten mit Haematogones ≥2,1%. Das Relative Risiko (RR) betrug für das geschätzte "1-year EFS" an Tag 100 nach SZT 0,200 (95%CI 0,045-0,896; P=0,04). Das durchschnittliche ereignisfreie Überleben (mean EFS±SE) betrug 83±11 Wochen für Patienten mit Haematogones <2,1% an Tag 100 gegenüber 84±12 Wochen für Patienten mit Haematogones über diesem Grenzwert (95%CI 63-104 Wochen vs. 61-108 Wochen) (Tabelle 6, Abbildung 9).

**Tabelle 6:** Korrelationen des Überlebens (Gesamtüberleben, OS; Ereignisfreies Überleben EFS) mit dem Haematogones-Level im Knochenmark (KM). Es wurden Patienten mit Haematogones unter und über dem Durchschnittswert ("mean") an den Tagen 30 und Tag 100 nach SZT verglichen (\*durchschnittlicher Haematogones-Anteil im KM am Tag 30; \*\*durchschnittlicher Haematogones-Anteil im KM an Tag 100).

|  | CD10+CD19+ Zellen an Tag 30 |                   |                        |      | CD10+CD19+ Zellen an Tag 100 |                   |                        |      |
|--|-----------------------------|-------------------|------------------------|------|------------------------------|-------------------|------------------------|------|
|  | <0,3%*                      | ≥0,3%*            | RR<br>(95%CI)          | P    | <2,1%**                      | ≥ 2,1%**          | RR<br>(95%CI)          | P    |
| Geschätztes 1-Jahres-Überleben ("1-year OS")                 | 63±10                       | 71±17             | 0,730<br>(0,159-3,349) | 0,69 | 69±9                         | 83±15             | 0,124<br>(0,016-0,967) | 0,05 |
| Durchschnittliches OS±SE (95%CI) (Wochen)                    | 61±6<br>(50-72)             | 74±13<br>(48-100) |                        |      | 89±10<br>(68-109)            | 96±8<br>(81-111)  |                        |      |
| Geschätztes 1-Jahres-ereignisfreies Überleben ("1-year EFS") | 65±10%                      | 75±15%            | 0,745<br>(0,162-3,424) | 0,71 | 60±10%                       | 96±4%             | 0,200<br>(0,045-0,896) | 0,04 |
| Durchschnittliches EFS±SE (95%CI) (Wochen)                   | 61±6<br>(49-72)             | 76±12<br>(52-100) |                        |      | 83±11<br>(63-104)            | 84±12<br>(61-108) |                        |      |



**Abbildung 9:** (a) Kaplan-Meier-Diagramm mit Gesamtüberleben (OS) und (b) ereignisfreiem Überleben (EFS) in Abhängigkeit vom Anteil der CD10+CD19+ positiven Zellen (Haematogones) im Knochenmark. Grenzwerte waren 0,3% Haematogones an Tag 30 bzw. 2,1% aller Zell-"events" an Tag 100.

#### 4.4. Uni- und multivariate Analyse prognostischer Faktoren

In der univariaten Analyse für das Gesamtüberleben (OS) hatten die zytogenetische Risikogruppe und das Haematogones-Level an Tag 100 nach SZT (<2,1% aller Zell-"events" vs.  $\geq 2,1\%$  aller "Events") einen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben (Karyotyp: Hazard-Ratio (HR)=2,566, P=0,029; Haematogones-Level: HR=0,124, P=0,046).

Nicht signifikant für das Gesamtüberleben waren der Anteil der Haematogones an Tag 30 nach SZT, das Geschlecht des Patienten, das Intervall von Diagnose bis SZT, das Krankheitsstadium (Erstmanifestation vs. 1. bzw. 2. Rezidiv), Therapie vor SZT, der Remissionsstatus vor SZT, der Spendertyp (verwandt vs. unverwandt), die Stammzellquelle (Knochenmark vs. periphere Blutstammzellen), der CMV-Serostatus des Patienten, die Intensität der Konditionierung (myeloablativ vs. reduziert), das Auftreten einer akuten GvHD Grad II-IV und das Auftreten einer chronischen GvHD.

Auch in der univariaten Analyse für das ereignisfreie Überleben (EFS) hatten die zytogenetische Risikogruppe und der Anteil der Haematogones an Tag 100 nach SZT einen signifikanten Einfluss (Karyotyp: Hazard-Ratio (HR)=2,904, P=0,008; Haematogones-Level: HR=0,200, P=0,035). Alle weiteren untersuchten Parameter (s.o.) waren nicht signifikant für das EFS.

Die Faktoren, die in der univariaten Analyse eine Signifikanz zeigten (zytogenetische Risikogruppe und Haematogones-Level an Tag 100 nach SZT), wurden dann multivariat analysiert. In der multivariaten Analyse für das Gesamtüberleben (OS) zeigten beide Faktoren keine Signifikanz. In der multivariaten Analyse für das ereignisfreie Überleben hatte die zytogenetische Risikogruppe einen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben (HR=3,726 (95%CI:1,275-10,888); P=0,0016). Das Haematogones-Level war in der multivariaten Analyse nicht signifikant.

Tabelle 7 zeigt die Ergebnisse der univariaten Analyse, Tabelle 8 die der multivariaten Analyse.

**Tabelle 7:** Ergebnisse der univariaten Cox-Regressions-Analyse in Bezug auf das Gesamtüberleben (OS) und ereignisfreie Überleben (EFS)

| Parameter  | OS                      |      | EFS                    |      |
|--|-------------------------|------|------------------------|------|
|  | HR<br>(95%CI)           | P    | HR<br>(95%CI)          | P    |
| CD10+CD19+ Haematogones Tag 30<br>< Durchschnitt vs. ≥ Durchschnitt  | 0,730<br>(0,159-3,349)  | 0,69 | 0,745<br>(0,162-3,424) | 0,71 |
| CD10+CD19+ Haematogones Tag 100<br>< Durchschnitt vs. ≥ Durchschnitt | 0,124<br>(0,016-0,967)  | 0,05 | 0,200<br>(0,045-0,896) | 0,04 |
| Geschlecht der Patienten<br>männlich vs. weiblich                    | 1,079<br>(0,466-2,496)  | 0,86 | 1,335<br>(0,609-2,927) | 0,47 |
| Intervall von Diagnose bis<br>Transplantation                        | 1,003<br>(0,973-1,035)  | 0,84 | 0,999<br>(0,967-1,032) | 0,95 |
| <i>de novo</i> vs.<br>sekundäre AML vs. MDS                          | 0,990<br>(0,560-1,752)  | 0,97 | 0,819<br>(0,463-1,449) | 0,49 |
| günstiger Karyotyp vs. intermediär vs.<br>ungünstig                  | 2,566<br>(1,103 -5,970) | 0,03 | 2,904<br>(1,313-6,423) | 0,01 |
| 1. Rezidiv vs. 2. Rezidiv vs.<br>Erstmanifestation                   | 1,019<br>(0,550-1,889)  | 0,95 | 0,974<br>(0,552-1,719) | 0,93 |
| vorherige Therapie<br>nein vs. ja                                    | 1,524<br>(0,350-6,639)  | 0,58 | 2,031<br>(0,472-8,734) | 0,34 |
| Remission vor SZT<br>ja vs. nein vs. keine Therapie                  | 0,975<br>(0,602-1,579)  | 0,92 | 1,053<br>(0,657-1,687) | 0,83 |
| Spender<br>verwandt vs. unverwandt                                   | 0,628<br>(0,185-2,130)  | 0,46 | 0,825<br>(0,280-2,431) | 0,73 |
| PBSC vs. KM vs. Nabelschnurblut                                      | 0,936<br>(0,210-4,165)  | 0,93 | 1,005<br>(0,230-4,390) | 1    |
| HLA-ident vs. HLA-Mismatch   | 1,426<br>(0,615-3,307)  | 0,41 | 1,368<br>(0,620-3,019) | 0,44 |
| CMV-Patientenserostatus (IgG<br>positiv vs. negativ)                 | 0,808<br>(0,346-1,883)  | 0,62 | 0,942<br>(0,423-2,098) | 0,88 |
| myeloablative vs.<br>reduzierte Konditionierung                      | 1,299<br>(0,505-3,336)  | 0,59 | 1,522<br>(0,605-3,828) | 0,37 |
| akute GvHD Grad II-IV  | 2,205<br>(0,649-7,494)  | 0,21 | 2,284<br>(0,676-7,716) | 0,18 |
| chronische GvHD  | 0,367<br>(0,085-1,586)  | 0,37 | 0,442<br>(0,131-1,495) | 0,19 |

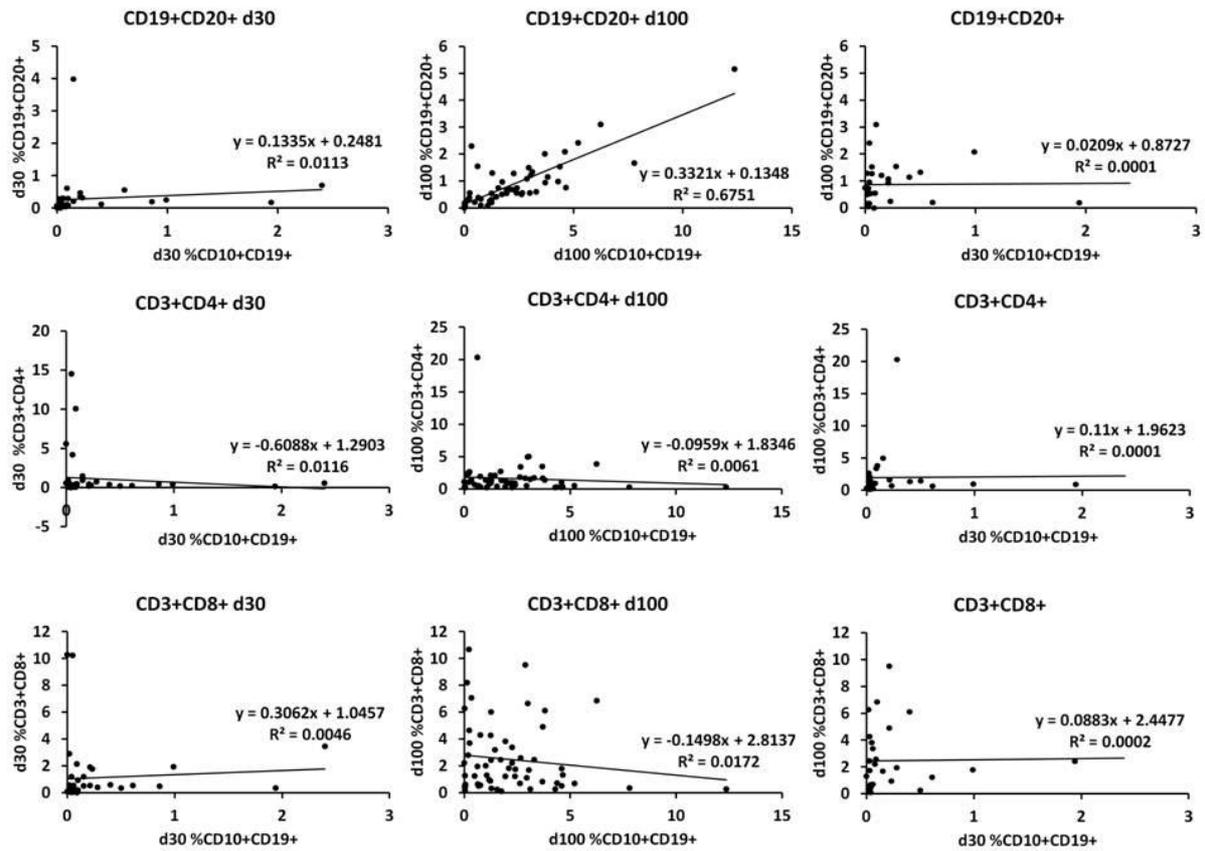
**Tabelle 8:** Ergebnisse der multivariaten Cox-Regressions-Analyse in Bezug auf das Gesamtüberleben (OS) und ereignisfreie Überleben (EFS)

| Parameter  | OS                     |      | EFS                     |      |
|--|------------------------|------|-------------------------|------|
|  | HR (95%CI)             | P    | HR (95%CI)              | P    |
| CD10+CD19+ Haematogones Tag 100<br>< Durchschnitt vs. ≥ Durchschnitt | 0,184<br>(0,022-1,519) | 0,12 | 0,286<br>(0,062-1,325)  | 0,11 |
| günstiger Karyotyp vs. intermediär vs.<br>ungünstig                  | 2,570<br>(0,766-8,618) | 0,13 | 3,726<br>(1,275-10,888) | 0,02 |

#### 4.5. Korrelationen zwischen Haematogones und reifen Lymphozyten

In einer logistischen Regressionsanalyse zeigten die CD10+CD19+ Zellen aus dem Knochenmark an Tag 100 eine positive Korrelation mit den reifen B-Lymphozyten (CD19+CD20+) im peripheren Blut ( $R^2=0.6751$ ;  $P<0,001$ ) (Abb. 10). Dagegen zeigten die Haematogones aus dem Knochenmark an Tag 30 nach SZT keine signifikante Korrelation mit den reifen B-Lymphozyten im peripheren Blut. Die T-Lymphozyten im peripheren Blut (CD3+CD4+, CD3+CD8+) zeigten zu keinem der beiden Untersuchungszeitpunkte eine signifikante Korrelation mit den Haematogones.

Es fand sich keine signifikante Korrelation zwischen dem Haematogones-Anteil im Knochenmark an Tag 30 und dem Leukozytenengraftment ( $R^2=0,003$ ).



**Abbildung 10:** Korrelation reifer Lymphozyten (oberste Zeile CD19+CD20+ B-Zellen, mittlere Zeile CD3+CD4+ T-Zellen, unterste Zeile CD3+CD8+ T-Zellen) im peripheren Blut mit den CD10+CD19+ Haematogones im Knochenmark an Tag 30 (linke Spalte) und Tag 100 (rechte Spalte).

## 5. Diskussion

Haematogones sind physiologische unreife B-Vorläuferzellen, die im Knochenmark von gesunden Menschen gefunden werden (McKenna et al., 2001; Sevilla et al., 2010). Höhere Haematogones-Konzentrationen wurden bei Kindern und Jugendlichen festgestellt (Brady et al., 1999; Longacre et al., 1989). Interessanterweise zeigten jüngste Studien, dass Patienten mit hämatologischen Erkrankungen mit einem höheren Anteil an Haematogones nach Chemotherapie oder Nabelschnurbluttransplantation eine bessere Prognose hatten (Chantepeie et al., 2011; Honebrink et al., 2012).

Methoden, um eine Risikostratifizierung für AML- und MDS-Patienten nach einer allogenen SZT durchzuführen, sollten leicht verfügbar und für möglichst viele Patienten mit diesen Entitäten anwendbar sein. Etabliert sind für die Posttransplantationsphase u.a. Chimärismusanalysen (Lange et al., 2011; Bornhäuser et al., 2009), die Analyse der residuellen Mutationslast z.B. im Falle von *NPM1*-Mutationen bei AML (Bacher et al., 2009) oder die Analyse der Expression des Wilms-Tumorsuppressor-Gens (*WT1*) (Cilloni et al., 2009). Auch zytomorphologische Aspekte könnten für Patienten mit AML (Christopeit et al., 2012) und MDS (Christopeit et al., 2012) in der Posttransplantationsphase eine Rolle spielen.

In dieser Studie wurde die prognostische Bedeutung der Quantität der CD10+CD19+ Zellen im Knochenmark nach allogener SZT mittels Durchflusszytometrie bei Patienten mit AML- und MDS untersucht.

Diese Studie ist eine der ersten, die die prognostische Bedeutung von Haematogones im Knochenmark in Bezug auf das Überleben nach allogener SZT mittels Durchflusszytometrie bei Patienten mit AML und MDS untersucht. Wir konnten zeigen, dass eine erhöhte Zahl von CD10+CD19+ Zellen im Knochenmark an Tag 100 nach Transplantation eine günstige prognostische Bedeutung hat. Der Anteil der physiologischen B-Vorläuferzellen im Knochenmark an Tag 100 nach Transplantation beschreibt somit eine Ergänzung der bisherigen prognostischen Parameter für myeloische Neoplasien. Als Grenzwert stellte sich in unserer Analyse ein Haematogones-Anteil von 2,1% am Tag 100 der mittels Durchflusszytometrie ermittelten Zellen dar. Patienten mit einem höheren Haematogones-Anteil an Tag 100 hatten ein signifikant verbessertes Gesamt- und ereignisfreies Überleben.

Allerdings zeigte der Haematogones-Anteil keinen signifikanten Einfluss in der multivariaten Analyse, weshalb er nicht als prognostisch unabhängiger Parameter interpretiert werden konnte.

Dieser Zusammenhang bleibt zu klären. Am wahrscheinlichsten ist es, dass ein höherer Haematogones-Anteil in der Post-transplantationsphase einen Indikator für die Knochenmarkregeneration darstellt, welche indirekt auch die Eradikation der leukämischen Zellen reflektiert (Chantepie et al., 2011), und auch einen Garant für eine verbesserte Immunabwehr darstellen könnte.

Allerdings gilt es zu sehen, dass es sich hier um eine retrospektive Studie handelt, welche an einem einzigen Zentrum durchgeführt wurde. Somit bleibt die Validierung durch weitere unabhängige Studiengruppen abzuwarten. Ferner müssen die Grenzwerte für die Haematogones sowie die bestgeeigneten Zeitpunkte zur Bestimmung nach Transplantation weiter geprüft werden.

Es zeigte sich, dass eine erhöhte Anzahl an Haematogones (CD10+CD19+) mit einer erhöhten Zahl von reifen B-Lymphozyten (CD10+CD2+) im peripheren Blut korrelierte. Die reifen T-Lymphozyten (CD3+CD4+, CD3+CD8+) zeigten zu keinem der beiden Untersuchungszeitpunkte eine signifikante Korrelation mit den Haematogones.

Unsere Ergebnisse stehen im Einklang zu einigen früheren Arbeiten:

Dem Nachweis einer hohen Zahl an Haematogones bzw. physiologischen B-Vorläuferzellen im Knochenmark nach Therapie wurde bereits vorher eine günstige prognostische Bedeutung bei Patienten mit AML oder MDS zugeschrieben (Chantepie et al., 2011). Chantepie *et al.* untersuchten eine Kohorte von 120 Patienten mit AML in erster kompletter Remission. Die Haematogones wurden mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Betrug der Haematogones-Anteil über 0,01% der nukleären Zellen, zeigten die Patienten ein besseres Leukämiefreies-Überleben (29,2 vs. 11,7 Monate; P=0,001) und auch ein besseres Gesamtüberleben (nicht erreicht vs. 23,5 Monate; P=0,011). Die Analyse von Honebrink *et al.* zeigte, dass die Anzahl der Haematogones im Knochenmark auch nach einer Nabelschnurbluttransplantation bei AML-Patienten ebenfalls einen prognostischen Einfluss hat. Die Autoren untersuchten die Haematogones im Knochenmark mittels Durchflusszytometrie bei 88 Patienten mit AML an den Tagen 21 und 100 nach einer Nabelschnurbluttransplantation („cord blood“). Ein hoher Anteil an CD10+CD19+

Zellen an Tag 21 war mit einer geringeren Rate einer akuten GvHD Grad III-IV ( $P=0,01$ ) assoziiert. Ein hoher Anteil an Tag 100 war mit einem verbesserten Gesamtüberleben ( $P=0,02$ ) und einer geringeren therapieassoziierten-Mortalität verbunden ( $P\leq 0,01$ ). Shima *et al.* untersuchten Haematogones im Knochenmark als prognostischen Indikator bei 108 Patienten mit AML, MDS, ALL und Non-Hodgkin-Lymphomen nach allogener SZT. Die Haematogones wurden mithilfe der Durchflusszytometrie zum Zeitpunkt des Donor-Engraftments ermittelt. Patienten, bei denen die Haematogones über 5% der mononukleären Zellen im Knochenmark lagen, wiesen ein signifikant längeres Überleben und rezidivfreies Überleben auf, unabhängig vom primären Krankheitsstatus oder der Spenderquelle. Außerdem zeigte sich bei den Patienten mit Haematogones über 5% der mononukleären Zellen im Knochenmark eine geringere Frequenz von schwerer akuter GvHD (Shima *et al.*, 2013).

Zusammenfassend kann man sagen, dass der Anteil der Haematogones an Tag 100 nach allogener SZT einen neuen prognostischen Parameter für Patienten mit AML und MDS nach Transplantation darstellt, welcher aber in weiteren Studien noch untersucht werden sollte. Es könnte interessant sein, diese neue Kenngröße mit anderen bereits bewährten prognostischen Parametern für die Posttransplantationsphase zu vergleichen wie beispielsweise dem Chimärismus (Lange *et al.*, 2011; Bornhäuser *et al.*, 2009), der residuellen Mutationslast (Bacher *et al.*, 2009), oder der *WT1*-Genexpression (Cilloni *et al.*, 2009). Somit könnte die Quantifizierung der Haematogones im Knochenmark einen Subgruppenübergreifenden und mit machbarem technischen Aufwand zu bestimmenden neuen prognostischen Parameter für die Posttransplantationsphase darstellen.

## **6. Zusammenfassung**

Die Messung der CD10+CD19+ positiven B-Vorläuferzellen, genannt Haematogones, anhand der multiparametrischen Durchflusszytometrie an Tag 100 nach allogener Stammzelltransplantation im Knochenmark stellt einen neuen prognostischen Parameter für Patienten mit AML und MDS dar. Dies sollte in unabhängigen Studien weiter geprüft werden und auch für Patienten mit anderen hämatologischen Entitäten nach allogener Stammzelltransplantation evaluiert werden.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Aggarwal K, Aggarwal M, Aggarwal VK, Pujani M, Nain M. Increased hematogones in an infant with bicytopenia and leucocytosis: a case report. *Cases J.* 2010; 3:75.
2. Appelbaum F R, Gundacker H, Head D R, Slovak M L, Willman C L, Godwin J E, Anderson J E, Petersdorf S H. Age and acute leukemia. *Blood.* 2006; 107(9): 3481-5.
3. Bacher U, Badbaran A, Fehse B, Zabelina T, Zander AR, Kröger N. Quantitative monitoring of NPM1 mutations provides a valid minimal residual disease parameter following allogeneic stem cell transplantation. *Exp Hematol.* 2009; 37(1): 135-142.
4. Biggs JC, Horowitz MM, Gale RP, Ash RC, Helbig W, Jacobsen N, Phillips GL, Rimm AA, Ringdén O et al. Bone marrow transplants may cure patients with acute leukemia never achieving remission with chemotherapy. *Blood.* 1992; 80(4): 1090-3.
5. Bornhäuser M, Oelschlaegel U, Platzbecker U, Bug G, Lutterbeck K, Kiehl M, et al. Monitoring of donor chimerism in sorted CD34+ peripheral blood cells allows the sensitive detection of imminent relapse after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica.* 2009; 94(11): 1613-1617.
6. Brady KA, Atwater SK, Lowell CA. Flow cytometric detection of CD10 (cALLA) on peripheral blood B lymphocytes of neonates. *Br J Haematol* 1999; 107(4): 712-715.
7. Chantepie SP, Salaun V, Parienti JJ, et al. Hematogones. A new prognostic factor for acute myeloblastic leukemia. *Blood.* 2011; 117(4): 1315-1318.
8. Cheson BD, Bennett JM, Büchner T, Willman CL, Schiffer CA, Doehner H, Tallman MS, Lister TA, Lo-Coco F, Willemze R, Biondi A, Hiddemann W, Larson RA, Löwenberg B, Sanz MA, Head DR, Ohno R, Bloomfield CD. International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. 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.* 2003; 21(24): 4642-9.

9. Christopeit M, Janssen N, Weber T, Bacher U, Lautenschläger C, Oehme A, et al. Cyclosporine area under the curve after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation is an indicator of Epstein-Barr virus DNAemia. *Leuk Lymphoma*. 2013; 54(1): 133-7.
10. Christopeit M, Miersch K, Klyuchnikov E, et al. Evaluation of BM cytomorphology after allo-SCT in patients with AML. *Bone Marrow Transplant*. 2012; 47(12): 1538-44.
11. Cilloni D, Renneville A, Hermitte F, et al. Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: a European LeukemiaNet study. *J Clin Oncol*. 2009; 27(31): 5195-5201.
12. Ehninger G, Link H, Berdel WE. Akute myeloische Leukämie. *Deutscher Ärzteverlag*. 2008; 7-100.
13. Estey EH, Shen Y, Thall PF. Effect of time to complete remission on subsequent survival and disease-free survival time in AML, RAEB-t, and RAEB. *Blood* 2000; 95; 72-2.
14. Falantes JF, Calderón C, Márquez FJ, Alonso D, Martín Noya A, Carillo E, Martino ML, Montero I, González J, Parody R, Espigado I, Pérez-Simón JA. Clinical Prognostic Factors for Survival and Risk of Progression to Acute Myeloid Leukemia in Patients with Myelodysplastic Syndromes with < 10% Marrow Blasts and Non-Unfavorable Cytogenetic Categories. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2013; 13(2):144-52.
15. Falini B, Nicoletti I, Bolli N, Mertelli MP, Liso A, Gorello P, Mandelli F, Mecucci C, Mertelli MF. Translocations and mutations involving the nucleophosmin (NPM1) gene in lymphomas and leukemias. *Haematologica*. 2007; 92(4): 519-532.
16. Ferrara F, Mirto S. Serum LDH value as a predictor of clinical outcome in acute myelogenous leukemia of the elderly. *Br J Haematol*. 1996; 92: 627-31.
17. Frassoni F, Labopin M, Gluckmann E, Prentice HG, Vernant JP, Zwaan F, Granena A, Gahrton G, De Witte T, Gratwohl A, Reiffers J, Gorin NC. Results of allogeneic bone marrow transplantation for acute leukemia have improved in Europe

with time--a report of the acute leukemia working party of the European group for blood and marrow transplantation (EBMT). *Bone Marrow Transplant.* 1996; 17(1): 13-8.

**18.** Fuchs R. Akute myeloische Leukämie - Therapie-Forschung-Perspektiven. *Uni-Med.* 2002; 168.

**19.** Gatta G, Capocaccia R, De Angelis R, Stiller C, Coebergh JW. Cancer survival in European adolescents and young adults. *Eur J. Cancer.* 2003; 39(18): 2600-2610.

**20.** Gelsi-Boyer V, Brecqueville M, Devillier R, Murati A, Mozziconacci J, Birnbaum D. Mutations in *ASXL1* are associated with poor prognosis across the spectrum of malignant myeloid diseases. *J Hematol Oncol.* 2012; 5: 12.

**21.** Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood.* 2010; 116(3): 354-365.

**22.** Haferlach T. Myelodysplastische Syndrome von A bis Z. *Thieme.* 2008; 7-8.

**23.** Honebrink T, Dayton V, Burke MJ, et al. Impact of bone marrow hematogones on umbilical cord blood transplantation outcomes in patients with acute myeloid leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012; 18(6): 930-936.

**24.** 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.

**25.** Kröger N, Bacher U, Bader P, et al. NCI First International Workshop on the Biology, Prevention, and Treatment of Relapse after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: report from the Committee on Disease-Specific Methods and Strategies for Monitoring Relapse following Allogeneic Stem Cell Transplantation. Part I: Methods, acute leukemias, and myelodysplastic syndromes. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010; 16(9): 1187-1211.

- 26.** Kröger N. & Zander A. Allogene Stammzelltherapie - Grundlagen, Indikationen und Perspektiven. *Uni-Med.* 2008; 76-114.
- 27.** Lange T, Hubmann M, Burkhardt R, et al. Monitoring of WT1 expression in PB and CD34(+) donor chimerism of BM predicts early relapse in AML and MDS patients after hematopoietic cell transplantation with reduced-intensity conditioning. *Leukemia.* 2011; 25(3): 498-505.
- 28.** List A, Dewald G, Bennett J. Lenalidomide in the myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion. *N Engl J Med.* 2006; 355: 1456-1465.
- 29.** Longacre TA, Foucar K, Crago S et al. Hematogones: a multiparameter analysis of bone marrow precursor cells. *Blood.* 1989; 73(2): 543-552.
- 30.** Lúcio P, Parreira A, van den Beemd MW, van Lochem EG, van Wering ER, Baars E, Porwit-MacDonald A, Bjorklund E, Gaipa G, Biondi A, Orfao A, Janossy G, van Dongen JJ, San Miguel JF. Flow cytometric analysis of normal B cell differentiation: a frame of reference for the detection of minimal residual disease in precursor-B-ALL. *Leukemia.* 1999; 13(3): 419-27.
- 31.** Malcovati L. Red Blood Cell Transfusion Therapy and Iron Chelation with Myelodysplastic Syndromes. *Clinical Lymphoma and Myeloma.* 2009; 9(3): 305-311.
- 32.** Massenkeil G, Nagy M, Neuburger S, Tamm I, Lutz C, le Coutre P, Rosen O, Wernecke K D, Dorken B, Arnold R. Survival after reducedintensity conditioning is not inferior to standard high-dose conditioning before 80 allogeneic haematopoietic cell transplantation in acute leukaemias. *Bone Marrow Transplant.* 2005; 36(8): 683-689.
- 33.** Mayer RJ, Davis RB, Schiffer CA, Berg DT, Powell BL, Schulman P, Omura GA, Moore JO, McIntyre OR, Frei E. Intensive postremission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia. Cancer and Leukemia Group B. *N.Engl.J.Med.* 1994; 331(14): 896-903.
- 34.** McKenna RW, Washington LT, Aquino DB, Picker LJ, Kroft SH. Immunophenotypic analysis of hematogones (B-lymphocyte precursors) in 662

consecutive bone marrow specimens by 4-color flow cytometry. *Blood*. 2001; 98(8): 2498-2507.

**35.** Moore JO, George SL, Dodge RK, Amrein PC, Powell BL, Kolitz JE, Baer MR, Davey FR, Bloomfield CD, Larson RA, Schiffer CA. 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*. 2005; 105(9): 3420-7.

**36.** Muehleck SD, McKenna RW, Gale PF, Brunning RD. Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-positive cells in bone marrow in the absence of hematologic malignancy. *Am J Clin Pathol*. 1983; 79(3): 277-84.

**37.** Padua RA, Guinn BA, Al-Sabah AI, Smith M, Taylor C, Pettersson T, et al. RAS, FMS and p53 mutations and ppor clinical outcome in myelodysplasias: a 10-year follow-up. *Leukemia* 1998; 12(6): 887-92.

**38.** Ravandi F, Burnett AK, Agura ED, Kantarjian HM. Progress in the treatment of acute myeloid leukamie. *Cancer*. 2007; 110(9): 1900-10.

**39.** Sayer HG, Kroger M, Beyer J, et al. Reduced intensity conditioning for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with acute myeloid leukemia: disease status by marrow blasts is the strongest prognostic factor. *Bone Marrow Transplant*. 2003; 31(12): 1089-1095.

**40.** Schmid C, Schleuning M, Ledderose G, Tischer J, Kolb HJ. Sequential regimen of chemotherapy, reduced-intensity conditioning for allogeneic stem-cell transplantation, and prophylactic donor lymphocyte transfusion in high-risk acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *J Clin Oncol*. 2005; 23(24): 5675-87.

**41.** Schmid C, Schleuning M, Schwerdfeger R, Hertenstein B, Mischak-Weissinger E, Bunjes D, Harsdorf SV, Scheid C, Holtick U, Greinix H, Keil F, Schneider B, Sandherr M, Bug G, Tischer J, Ledderose G, Hallek M, Hiddemann W, Kolb HJ. Long-term survival in refractory acute myeloid leukemia after sequential treatment with

chemotherapy and reduced-intensity conditioning for allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2006; 108(3): 1092-9.

**42.** Schmitt-Graeff A, Thiele J, Zuk I, Kvasnicka HM. Essential thrombocythemia with ringed sideroblasts: a heterogenous spectrum of diseases, but not a distinct entity. *Haematologica*. 2002; 87(4): 392-9.

**43.** Schnittger S, Schoch C, Kern W, Mecucci C, Tschulik C, Mertelli MF, Haferlach T, Hiddemann W, Falini B. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood*. 2005; 106(12): 3733-9.

**44.** Shima T, Miyamoto T, Kikushige Y, Mori Y, Kamezaki K, Takase K, Henzan H, Numata A, Ito Y, Takenaka K, Iwasaki H, Kamimura T, Eto T, Nagafuji K, Teshima T, Kato K, Akashi K. Quantitation of hematogones at the time of engraftment is a useful prognostic indicator in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2013; 121: 840-8.

**45.** Sullivan KM. Graft-versus-host-disease. In: Thomas ED, Blume KG, Forman SJ, eds. Hematopoietic Cell Transplantation. Boston: *Blackwell Science*. 1999; 515-36.

**46.** Visser O, Trama A, Maynadié M, Stiller C, Marcos-Gragera R, De Angelis R, Mallone S, Tereanu C, Allemani C, Ricardi U, Schouten HC. Incidence, survival and prevalence of myeloid malignancies in Europe. *Eur J Cancer*. 2012 Nov;48(17):3257-3266.

**47.** Wald BR, Heisel MA, Ortega JA. Frequency of early death in children with acute leukemia presenting with hyperleukocytosis. *Cancer*. 1982; 50: 150-3.

**48.** Wusthof M, Heinrich J, Zabelina T, et al. In haematopoietic SCT recipients, pre- and post-transplant cytomorphologic remission status has strong prognostic relevance, but no predictive value during reduced-conditioning phase in AML patients. *Acute leukaemia*. 2011; 46: 277-278.

## 8. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Modell der Leukämogenese bei AML. Es wird angenommen, dass die mutierte Rezeptortyrosinkinase die Zellproliferation steigert und eine weitere Mutation die Zelldifferenzierung blockiert (Ehninger et al., 2008)..... 8
- Abbildung 2:** Stufendiagnostik bei Patienten mit AML (Ehninger et al., 2008). Die erste diagnostische Stufe beruht auf dem klinischen Verdacht anhand von Anamnese, klinischer Untersuchung und dem Blutbild. Die Diagnosesicherung erfolgt auf Stufe 2 mithilfe einer Knochenmarkpunktion. Stufe 3 beinhaltet mögliche Differenzialdiagnosen sowie die Umfelddiagnostik zur Therapie..... 10
- Abbildung 3:** (a) Knochenmark mit normalen Megakaryozyten (400x-fache Vergrößerung) (b) Kleinere und große Haematogones (1.000x-fache Vergrößerung) (Agarwal et al., 2010)..... 17
- Abbildung 4:** Beispielpatient A an Tag 30 (a) und Tag 100 (b) nach SZT. Die Haematogones werden im Knochenmark in der multiparametrischen Durchflusszytometrie durch die CD10+CD19+ doppelt positive Zellpopulation definiert. An Tag 100 (b) ist der Anteil an Haematogones deutlich höher als an Tag 30 (a)..... 26
- Abbildung 5:** Beispielpatient B an Tag 30 (a) und Tag 100 (b) nach SZT. Auch hier ist ein Anstieg der Haematogones zwischen den beiden Zeitpunkten festzustellen. 26
- Abbildung 6:** Durchflusszytometrische Erfassung reifer B-Zellen (CD19+CD20+) von Beispielpatient A an Tag 30 (a) und Tag 100 (b) nach SZT. Es findet sich ein Anstieg zwischen beiden Zeitpunkten. .... 27
- Abbildung 7:** Durchflusszytometrische Erfassung und der T-Zellen (CD4+ sowie CD8+) von Beispielpatient A an Tag 30 (a) und Tag 100 (b) nach SZT. .... 27
- Abbildung 8: Gesamtüberleben ("overall survival" OS) (a) und ereignisfreies Überleben ("event-free survival", EFS) (b) der gesamten Kohorte. .... 30
- Abbildung 9:** (a) Kaplan-Meier-Diagramm mit Gesamtüberleben (OS) und (b) ereignisfreiem Überleben (EFS) in Abhängigkeit vom Anteil der CD10+CD19+ positiven Zellen (Haematogones) im Knochenmark. Grenzwerte waren 0,3% Haematogones an Tag 30 bzw. 2,1% aller Zell-"events" an Tag 100..... 36

**Abbildung 10:** Korrelation reifer Lymphozyten (oberste Zeile CD19+CD20+ B-Zellen, mittlere Zeile CD3+CD4+ T-Zellen, unterste Zeile CD3+CD8+ T-Zellen) im peripheren Blut mit den CD10+CD19+ Haematogones im Knochenmark an Tag 30 (linke Spalte) und Tag 100 (rechte Spalte). ..... 40

## 9. Tabellenverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabelle 1:</b> Patienten- und Transplantationscharakteristika .....   | 20 |
| <b>Tabelle 2:</b> Patienten- und Spendercharakteristika .....  | 22 |
| <b>Tabelle 3:</b> Überblick über die Konditionierungsschemata (TBI: „ <i>total body irradiation</i> “ (Ganzkörperbestrahlung); ATG: Antithymozytenglobulin).....   | 23 |
| <b>Tabelle 4:</b> Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messung der CD10+CD19+ positiven Haematogones im Knochenmark (KM) und der CD19+CD20+ positiven reifen B-Zellen im peripheren Blut (PB) an den Tagen 30 und 100 nach SZT (SD: "standard deviation"; Standardabweichung) .....   | 31 |
| <b>Tabelle 5:</b> Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messung der CD3+CD4+ und CD3+CD8+ positiven Zellen aus peripherem Blut (PB) an den Tagen 30 und 100 nach SZT.....  | 32 |
| <b>Tabelle 6:</b> Korrelationen des Überlebens (Gesamtüberleben, OS; Ereignisfreies Überleben EFS) mit dem Haematogones-Level im Knochenmark (KM). Es wurden Patienten mit Haematogones unter und über dem Durchschnittwert ("mean") an den Tagen 30 und Tag 100 nach SZT verglichen (*durchschnittlicher Haematogones-Anteil im KM am Tag 30; **durchschnittlicher Haematogones-Anteil im KM an Tag 100). ..... | 35 |
| <b>Tabelle 7:</b> Ergebnisse der univariaten Cox-Regressions-Analyse in Bezug auf das Gesamtüberleben (OS) und ereignisfreie Überleben (EFS) .....   | 38 |
| <b>Tabelle 8:</b> Ergebnisse der multivariaten Cox-Regressions-Analyse in Bezug auf das Gesamtüberleben (OS) und ereignisfreie Überleben (EFS) .....   | 39 |

## 10. Danksagung

Mein allergrößter Dank gilt meiner Doktormutter, Frau PD Dr. Ulrike Bacher. Sie hat das Thema der Dissertation für mich gefunden und mich von Anfang bis Ende sehr umfassend betreut. Sie war stets für mich erreichbar, opferte viel Zeit für mich und war mir immer mit Rat und Tat eine große Hilfe. Ich weiß ihre Hilfe sehr zu schätzen und bin sehr froh und dankbar, dass ich mich entschlossen habe meine Doktorarbeit bei ihr zu beginnen. Vielen, vielen Dank!

Ich bedanke mich außerdem bei Herrn Dr. Maximilian Christopeit, der mir bei der statistischen Auswertung der Arbeit geholfen hat und mir auch bei späteren Fragen immer eine Hilfe war.

Ich bedanke mich bei dem Team aus der Immunphänotypisierung der II. Medizinischen Klinik, Frau Christiane Horn, Frau Elke Rühlmann und Frau Katrin Kluge. Ich wurde in dem Labor mit offenen Armen empfangen, mir wurde stets ein Computer freigeräumt und niemand war sich zu schade, mit mir in den Keller zu gehen, um für mich ältere Akten herauszusuchen.

Außerdem bedanke ich mich bei Frau Dr. Tatjana Zabelina, die mir einen großen Teil der Daten zukommen ließ, und bei Herrn PD Dr. Francis Ayuk, der mir in der KMT-Ambulanz die klinischen Grundlagen der Stammzelltransplantation vermittelte. Ferner gilt mein Dank Herrn Prof. Kröger für die Unterstützung der Arbeit. In diesem Sinne bin ich auch Herrn Prof. Bokemeyer zu großem Dank verpflichtet.

Ein weiterer Dank gilt meinem guten Freund, Herrn Stephan Hesper, meinem Bruder, Herrn Nils Heiland und meinem Stiefvater, Herrn Wolfgang Bost, die mich ebenfalls unterstützt haben. Herzlich bedanken möchte ich mich auch noch bei Herrn Dr. Stephan Brandl, der mir Frau Bacher als Doktormutter empfahl und für mich den Kontakt zu ihr herstellte.

Zu allerletzt möchte ich mich bei meinem Partner, Herrn Matthias Knöpker und meiner Mutter, Frau Regine Heiland, bedanken. Alle beide standen mir stets zur Seite und hatten immer ein Ohr und aufbauende Worte für mich übrig.

Und ich möchte mich noch bei meinem verstorbenen Vater, Herrn Dr. Joachim Heiland, bedanken, der mich mit seiner Dissertationsschrift inspiriert hat.

## **11. Lebenslauf**

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

## **12. 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.

Hamburg, den

.....

Anneke Heiland