

**Aus dem Lehrstuhl für Innere Medizin III**  
Prof. Dr. med. Wolfgang Herr

Der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg



**Analyse des Engraftments bei Patienten mit Myelofibrose nach allogener  
Stammzelltransplantation**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

vorgelegt von

**Johann Nikolaus Barop**  
aus Eutin

**2016**



**Aus dem Lehrstuhl für Innere Medizin III**  
Prof. Dr. med. Wolfgang Herr

Der Fakultät für Medizin  
Der Universität Regensburg



**Analyse des Engraftments bei Patienten mit Myelofibrose nach allogener  
Stammzelltransplantation**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

vorgelegt von

**Johann Nikolaus Barop**  
aus Eutin

**2016**

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	PD Dr. med. Jochen Grassinger
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Ulrich Bogdahn
Tag der mündlichen Prüfung:	29.03.2017

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>5</b>
<b>1.1 Myeloproliferative Neoplasien .....</b>	<b>5</b>
<b>1.2 Primäre Myelofibrose.....</b>	<b>5</b>
1.2.1 Epidemiologie und Ätiologie .....	5
1.2.2 Klinische Befunde und Diagnosekriterien.....	6
1.2.3 Histologische Befunde.....	8
1.2.4 Prognosescores .....	9
1.2.5 Therapeutische Möglichkeiten.....	10
<b>1.3 Die allogene Stammzelltransplantation .....</b>	<b>11</b>
1.3.1 Gewinnung hämatopoetischer Stammzellen.....	12
1.3.2 Spenderauswahl.....	12
1.3.3 Konditionierung .....	13
1.3.4 Komplikationen der Stammzelltransplantation .....	14
1.3.5 Engraftment und Graft Failure bei Patienten mit MF.....	15
<b>1.4 Hämatopoetische Stammzellen und Stammzellnische .....</b>	<b>18</b>
1.4.1 Homing .....	19
1.4.2 Lodgement und Engraftment.....	20
<b>1.5 Fragestellung .....</b>	<b>22</b>
<b>2. Methoden.....</b>	<b>24</b>
<b>2.1 Retrospektive Auswertung der Patientendaten .....</b>	<b>24</b>
2.1.1 Patientenkollektiv und Datenerfassung .....	24
2.1.2 Definitionen .....	25
2.1.3 Statistik.....	25
<b>2.2 Experimentelle Analyse.....</b>	<b>27</b>
2.2.1 Materialien.....	27
2.2.2 Durchflusszytometrische Messungen.....	29
2.2.2.1 Messung der Clearance von SZ aus dem PB nach Transplantation.....	29
2.2.2.2 Färbung von Oberflächenantigenen für die FACS Analyse .....	30
2.2.2.3 Durchflusszytometrische Messung von CD34 <sup>+</sup> und CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>-</sup> Zellen.....	31
2.2.2.4 Korrekturfaktoren der durchflusszytometrisch gemessenen Zellzahlen.....	31

2.2.3 Colony forming cells (CFC) Assay .....	32
2.2.4 Analyse von OPN Rezeptoren auf Stammzellen aus dem PB .....	33
2.2.5 Immunhistochemische Färbungen .....	33
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>35</b>
<b>3.1 Retrospektive Auswertung der Patientendaten .....</b>	<b>35</b>
3.1.1 Patientencharakteristika .....	35
3.1.2 Transplantation.....	38
3.1.3 Engraftment.....	38
3.1.3.1 Neutrophilen Engraftment .....	39
3.1.3.2 Thrombozyten Engraftment.....	40
3.1.3.3 Graft failure.....	41
3.1.4 Analyse von Engraftment beeinflussenden Faktoren.....	42
3.1.4.1 HLA-Kompatibilität.....	42
3.1.4.2 Milzgröße.....	44
3.1.4.3 Weitere untersuchte Faktoren .....	45
3.1.5 Transfusionsbedarf.....	47
3.1.6 Gesamtüberleben und Mortalität .....	48
<b>3.2 Experimentelle Daten.....</b>	<b>49</b>
3.2.1 Messung der Clearance von Stammzellen aus dem PB nach Transplantation ....	49
3.2.1.1 Clearance der CD34 <sup>+</sup> Zellen aus dem PB.....	50
3.2.1.2 Clearance der CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>-</sup> Zellen aus dem PB .....	52
3.2.2 Colony forming cells (CFC) assay.....	53
3.2.3 Analyse von OPN Rezeptoren auf Stammzellen aus dem PB .....	54
3.2.4 Immunhistochemische Färbungen .....	55
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>58</b>
<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>70</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>73</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>80</b>
<b>Lebenslauf .....</b>	<b>81</b>
<b>Erklärung zum Promotionsverfahren.....</b>	<b>82</b>

### Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
AML	Akute myeloische Leukämie
CFC	Colony forming cells
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CR	Complete remission
CSA	Ciclosporin A
EMH	Extramedulläre Hämatopoese
ET	Essentielle Thrombozytämie
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
DIPSS	Dynamic International Prognostic Scoring System
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor
GF	Graft failure
GvHD	Graft versus Host Disease
HSZ	Hämatopoetische Stammzellen
HLA	Humane Leukozytenantigene
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
JAK 2	Januskinase 2
KM	Knochenmark
MAC	Myeloablative conditioning
MF	Myelofibrose
MMF	Mycophenolatmofetil
MPN	Myeloproliferative Neoplasie
MTX	Methotrexat
NRM	Non relapse mortality
OPN	Osteopontin
OS	Overall survival
PB	Peripheres Blut
PBSZ	Periphere Blutstammzellen
PBSZT	Periphere Blutstammzelltransplantation
PMF	Primäre Myelofibrose

PV	Polyzytämia Vera
RIC	Reduced intensity conditioning
SDF-1	stromal cell-derived factor-1
SZ	Stammzellen
TV	Transplantatversagen
trOPN	Thrombin-cleaved Osteopontin
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1

# 1. Einleitung

## 1.1 Myeloproliferative Neoplasien

Als myeloproliferative Neoplasien (MPN) werden protrahiert verlaufende maligne Neoplasien der myeloischen Hämatopoese zusammengefasst. Zu Beginn sind die MPN durch langsame Progredienz gekennzeichnet und zeigen typischerweise eine ausgeprägte Vermehrung einer oder mehrerer Zellreihen im Knochenmark (KM) mit Leuko-, Erythro- und / oder Thrombozytose im peripheren Blut (PB). Je nach Erkrankung zeigen alle Formen eine mehr oder weniger starke Tendenz zur Fibrose des KM sowie als Ausdruck der extramedullären Blutbildung eine Hepatosplenomegalie. Besonders ausgeprägt ist die Fibrosierung bei der primären Myelofibrose (PMF). Die PMF wird gemäß der aktuellen WHO-Klassifikation zu einer der vier Hauptvertreter der MPN gerechnet. Neben PMF umfasst diese Gruppe die essentielle Thrombozytämie (ET) und die Polycythemia vera (PV), in deren Verlauf es im fortgeschrittenem Stadium zu einer fibrotischen Veränderung des KM kommen kann, der sogenannten post-ET Myelofibrose bzw. post-PV-Myelofibrose (sekundäre Myelofibrose). Des Weiteren wird die chronisch myeloische Leukämie (CML) als eine der häufigeren Erkrankungen zu dieser Gruppe gezählt.<sup>1</sup> Im fortgeschrittenem Stadium können diese Erkrankungen in eine akute Leukämie übergehen.

## 1.2 Primäre Myelofibrose

### 1.2.1 Epidemiologie und Ätiologie

Die PMF ist eine Erkrankung des höheren Lebensalters mit einem mittleren Erkrankungsalter von 60 Jahren und tritt nur selten bei jüngeren Patienten auf. 20% der Erkrankten sind zum Zeitpunkt der Diagnosestellung jedoch jünger als 55 Jahre und es sind auch Krankheitsfälle im Kindesalter beschrieben.<sup>2</sup> Die Jahresinzidenz der PMF variiert je nach Literaturangabe in der Größenordnung von 0,5 –

1,5/100.000. Das Geschlechterverhältnis zeigt mit 1,6 : 1 (m : f ) eine leichte Bevorzugung des männlichen Geschlechts.<sup>3</sup>

Die Ätiologie der MF ist weitgehend unbekannt. Im Jahre 2005 gelang ein großer Fortschritt bei der Aufklärung der Pathogenese der MPN mit der Entdeckung einer somatischen Mutation im JAK2-Gen. Diese Mutation findet sich bei mehr als 95% aller Patienten mit PV und bei rund 60% der Patienten mit PMF und ET.<sup>4</sup> Die Januskinase 2 (JAK2) ist ein Teil des JAK-STAT-Signalwegs, einem speziellen Signalübertragungsmechanismus in einigen vielzelligen Organismen. Er trägt zur Regulation der Zellentwicklung, Wachstumskontrolle und Homöostase bei. Der Störung dieses Signalwegs wird eine zentrale Rolle bei der Entstehung der MPN beigemessen. Zu weiteren typischen, jedoch weniger häufig nachweisbaren aktivierenden Mutationen bei MPN gehören erworbene Veränderungen an dem Thrombopoietin Rezeptor (MPL) und dem Calreticulin-Gen.

### 1.2.2 Klinische Befunde und Diagnosekriterien

Die PMF ist charakterisiert durch eine progrediente Fibrosierung des KM, welche bei Fortschreiten der Erkrankung zu einer hämatopoetischen Insuffizienz führt. Weiterhin können die Patienten aufgrund der extramedullären Hämatopoese (EMH) eine ausgeprägte Splenomegalie und Hepatomegalie entwickeln.

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung sind bis zu 21% der Patienten mit PMF beschwerdefrei und fallen oftmals im Rahmen von Routineuntersuchungen auf, in denen klinische und laborchemische Befunde wie eine Splenomegalie oder Veränderungen des Blutbilds den Verdacht auf eine hämatologische Erkrankung lenken. Die Symptome im frühen Krankheitsstadium sind häufig uncharakteristisch und schwach ausgeprägt. Viele Symptome im Krankheitsverlauf der PMF entstehen als Folge des Hyperkatabolismus. Häufigste Beschwerden sind zunehmende Müdigkeit, Leistungsschwäche oder Fieber. Die Leistungsminderung ist größtenteils auf die zunehmende Anämie zurückzuführen, wird aber auch von nicht-anämischen Patienten beklagt.<sup>5</sup>

Morphologische Anomalien im PB sind neben einer Linksverschiebung der Myelopoese das Vorhandensein von Normoblasten und Myeloblasten sowie

atypische Erythrozyten. So findet sich eine Poikilozytose der roten Blutkörperchen mit Dakrozyten (Tränentropfenzellen) in einem leukoerythroblastischen Blutbild.<sup>6</sup>

Die myeloische Zellreihe zeigt eine sich im Krankheitsverlauf stärker ausbildende Linksverschiebung und im späteren Stadium schließlich ein vermehrtes Auftreten von Blasten im PB. Ihr Anteil ist in der Regel geringer als 5%, kann aber besonders bei Patienten mit hohen Leukozytenzahlen bis auf 10% zunehmen. Mit zunehmenden Anteil an Blasten im PB steigt auch das Risiko eines Übergangs in eine akute Leukämie (sekundäre Leukämie).<sup>7</sup>

Für die PMF kennzeichnend ist die teils massive Splenomegalie, die 85-100% der Erkrankten bereits bei Diagnosestellung zeigen.<sup>8</sup> Die Ausdehnung der Milz kann hierbei bis in das kleine Becken reichen. Als Hauptursache für die Milzvergrößerung gilt vor allem die EMH. Ebenfalls ein häufiges Symptom ist die Hepatomegalie, die bei bis zu 70% der Patienten eine direkte Folge der EMH darstellt.

Gemäß der aktuellen Klassifikation der WHO von 2008 müssen die in Tabelle 1 beschriebenen Kriterien erfüllt sein, um die Diagnose der PMF stellen zu können.

## WHO-Kriterien zur Diagnose der primären Myelofibrose

Hauptkriterien	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Typische Knochenmarkmorphologie mit atypischen Megakaryozyten<sup>1</sup> und Myelofibrose oder mit granulozytär-megakaryozytärer Hyperproliferation</li><li>2. Die diagnostischen Kriterien für eine andere hämatologische Systemerkrankung (insb. PV, ET, CML, MDS) sind nicht erfüllt</li><li>3. Nachweis von JAK2-V617F oder einer anderen genetischen Aberration. Wenn keine genetische Aberration nachweisbar: Kein Hinweis für reaktive Knochenmarkfibrose</li></ol>
Nebenkriterien	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Leukoerythroblastisches Blutbild</li><li>2. Erhöhte LDH</li><li>3. Anämie</li><li>4. Tastbare Splenomegalie</li></ol>

<sup>1</sup>Kleine bis große Megakaryozyten mit aberranter Kern-Zytoplasma-Relation und hyperchromatischen, abnorm gelappten Kernen; Haufenbildung

### Tab. 1 WHO-Kriterien zur Diagnose der primären Myelofibrose

Für die Diagnose der PMF müssen alle Haupt- und zwei Nebenkriterien erfüllt sein.

#### 1.2.3 Histologische Befunde

Die Entwicklung der KM-Fibrose hat einen sehr variablen Verlauf und ist bisher nicht abschließend geklärt. Im frühen Stadium der Erkrankung ist die Fibrose noch sehr gering ausgeprägt oder fehlt vollständig. Einzig die erhöhte Anzahl an Megakaryozyten lenkt hierbei den Verdacht auf die PMF. Dieses Stadium wird daher auch als präfibrotisches Stadium bezeichnet.<sup>9</sup>

Die Veränderung der Megakaryopoese spielt eine besondere Rolle hinsichtlich der KM-Morphologie. Es wird angenommen, dass durch Megakaryozyten und Monozyten vermehrt verschiedene Zytokine gebildet werden und sich diese im unterschiedlichen Maße mitogen auf die Fibroblasten und Endothelzellen auswirken<sup>10</sup>. Hierdurch kommt es zu einer gesteigerten Vaskularisation, einer reaktiven Ablagerung von

extrazellulärer Matrix und fakultativen Knochenneubildungen (Osteosklerose). Die Fibrosierung des KM bei der PMF ist demnach eine sekundäre Reaktion auf eine zugrunde liegende Myeloproliferation mit obligater Beteiligung der Megakaryopoese. Im fortgeschrittenen Stadium wird die Hämatopoese kontinuierlich von einem dichten Netzwerk aus groben kollagenen Faserbündeln verdrängt. Die KM-Diagnostik gelingt in Folge oft nur am Stanzpräparat, da bei der Aspiration häufig kein Material gewonnen werden kann (sog. Punctio sicca). In der Terminalphase zeigen diese Präparate ein nahezu zellfreies KM, das nur noch Kollagenfasern und Fettzellen zwischen stark osteosklerotischen Knochenbälkchen beinhaltet.<sup>11</sup>

#### 1.2.4 Prognosescores

Die PMF ist mit erheblichen Komplikationen verbunden, die schwerwiegende Auswirkungen auf die Lebensqualität der Patienten haben und im Verlauf der Erkrankung potenziell lebensbedrohlich werden können. Hinzu kommt, dass das Durchschnittsalter der Patienten bei Diagnosestellung bei 60 Jahren liegt und krankheitsassoziierte Komplikationen durch bereits vorliegende Grunderkrankungen verstärkt werden und sich die Prognose dadurch verschlechtern kann.

Um eine Aussage über den Verlauf der Erkrankung treffen zu können, wurden bereits mehrere Prognosescores etabliert und weiterentwickelt. Die gebräuchlichsten Prognosescores waren der sogenannte Lille- sowie der Cervantes-Score.<sup>12 13</sup> In dem Lillescore wurden lediglich der Hb und die Anzahl an Leukozyten als Prognosefaktoren berücksichtigt, in den Cervantes-Score gingen das Vorhandensein von Allgemeinsymptomen, der Hb, sowie die Blastenzahl im PB ein. Heutzutage finden vor allem die Scoring-Systeme IPSS (International Prognostic Scoring System) und DIPSS (dynamic IPSS) Verwendung, welche folgende gemeinsame Parameter berücksichtigen:<sup>14</sup>

- Alter > 65 Jahre
- B-Symptomatik
- Hämoglobinwert < 10 g/dl
- Anzahl an Leukozyten >  $25 \times 10^9/L$
- >1% Blasten im peripheren Blut

Der IPSS wird bei der Erstdiagnose der PMF angewandt. Die Patienten werden in verschiedene Risikogruppen unterteilt, in Abhängigkeit von der Anzahl an zutreffenden Punkten (0 Punkte entspricht low, 1 Punkt intermediate-1, 2 Punkte intermediate-2 und  $\geq 3$  Punkte entspricht der Risikogruppe high). Der DIPSS legt eine größere Gewichtung auf die Anämie und es konnte gezeigt werden, dass hierdurch eine bessere Risikoabschätzung auch während des gesamten Krankheitsverlaufs möglich ist.<sup>15</sup>

Die mittleren Überlebenszeiten sind in der Literatur unterschiedlich angegeben. Aktuell geht man von Überlebenszeiten von ca. 5 Jahren für Patienten mit intermediärem Risiko und weniger als 2 Jahren für die mit hohem Risiko aus, wohingegen einige Patienten insbesondere solche mit geringem Risiko länger als 10 Jahre überleben.<sup>14</sup>

### 1.2.5 Therapeutische Möglichkeiten

Patienten mit einem Niedrig-Risiko oder Intermediär-Risiko-1-Profil ohne klinische Probleme sollten aufgrund der relativ guten Prognose beobachtet oder in ein entsprechendes Studienkonzept aufgenommen werden. Patienten der Risikogruppe intermediate-2 oder high, die nicht einer kurativen allogenen SZT zugeführt werden können, sollten problemorientiert palliativ oder in einem entsprechenden Studienkonzept behandelt werden.<sup>16</sup>

Zu den konventionellen, palliativen Therapieoptionen gehören u.a. das Zytostatikum Hydroxyurea, das zur Kontrolle einer Hyperproliferation verwendet wird, Wachstumsfaktoren wie Erythropoetin und Androgene, die bei Vorliegen einer Anämie eingesetzt werden können sowie pegyliertes Interferon alpha-2a und Imide (z.B. Thalidomid). Mit dem oralen JAK1/2-Inhibitor Ruxolitinib steht die erste zugelassene, effektive und gut verträgliche medikamentöse Therapie für die Behandlung der PMF bzw. der post-PV-/post-ET-MF zur Verfügung.<sup>17</sup> Ruxolitinib dient insbesondere der Linderung von krankheitsassoziierten Symptomen und kann eine Reduzierung der Milzgröße bewirken.

Gegenwärtig stellt die allogene Stammzelltransplantation (SZT) die einzige kurative Therapieoption dar.

### 1.3 Die allogene Stammzelltransplantation

Die Transplantation blutbildender Stammzellen (SZ) nimmt in der heutigen Zeit einen festen Platz in der Behandlung hämatologischer Neoplasien ein. Je nach Schwere der zugrunde liegenden Erkrankung stellt die allogene SZT die einzige bzw. die erfolversprechendste Therapieform dar mit dem Ziel des Neuaufbaus des blutbildenden und immunologischen Systems im Empfängerorganismus. Als Hauptindikationen für eine allogene SZT gelten vor allem akute Leukämien, myelodysplastische Syndrome, Rezidive von Non-Hodgkin-Lymphomen und Hodgkin-Lymphomen, das Multiple Myelom, sowie die MF. Die MF ist eine Erkrankung des höheren Lebensalters. Es sind jedoch vor allem ältere Patienten, bei denen die Morbidität und Mortalität aufgrund der hohen Toxizität dieser Therapieform deutlich erhöht ist. Die allogene SZT sollte daher bevorzugt bei den Patienten erwogen werden, deren Risikoprofil nach DIPSS intermediate-2 oder high beträgt und deren Allgemeinzustand einem biologischen Alter von unter 60 Jahren entspricht. Neben den in den Prognosescores erwähnten Risikofaktoren, werden zur Indikationsstellung einer SZT bei MF zudem die Anzahl an peripher zirkulierenden Blasten, die Anzahl an Thrombozyten und das Vorliegen von bestimmten chromosomalen Aberrationen berücksichtigt.<sup>18 19</sup>

Bei den hämatologischen Erkrankungen nimmt hinsichtlich der allogenen SZT die akute myeloische Leukämie (AML) eine führende Rolle ein. Standard der initialen Behandlung der AML ist zunächst eine konservative Chemotherapie. Diese beinhaltet eine Induktionstherapie mit dem Ziel der kompletten Remission (CR) und die Postremissionstherapie zur Erhaltung der CR. Unter Berücksichtigung des Ansprechens auf die Induktionstherapie kann im Anschluss an die initiale Therapie die Chemotherapie im Sinne einer Erhaltungstherapie (sog. Konsolidierung) entweder fortgeführt oder bei ungenügendem Ansprechen bzw. im Rezidiv eine SZT erwogen werden. Bei Patienten mit Hochrisikokonstellation, beispielsweise Aberrationen am Chromosom 3 oder 7, komplexen Veränderungen oder unbalancierten Karyotypen, besteht häufig bereits in erster Remission die Indikation zur SZT. Bei circa 15% aller Patienten mit einer AML bis zum Alter von 60 Jahren und bei mehr als 50% der Patienten zwischen 60 bis 65 Jahren ist die Induktionschemotherapie wirkungslos („Therapierefraktärität“).<sup>20</sup> Somit stellt hier die allogene SZT die einzige Option mit kurativem Ansatz dar. Eine allogene SZT sollte

auch bei den Patienten mit AML erwogen werden, bei denen nach erreichter CR ein Rezidiv auftritt, da sich dauerhafte Remissionen durch rein konventionelle Therapie im Rezidiv selten erreichen lassen.<sup>21</sup> Die Indikationsstellung zur allogenen SZT bei dieser Erkrankung fußt somit auf einer individuellen Risikostratifizierung nach einer vielschichtigen Diagnostik bestehend aus Zytogenetik, Molekulargenetik und auf der Chemosensibilität der Erkrankung.

### 1.3.1 Gewinnung hämatopoetischer Stammzellen

Die verwendeten SZ für eine allogene Transplantation stammen entweder von einem Familienspender oder von einem Fremdspender. Die Gewinnung von SZ erfolgt entweder mittels mechanischer Aspiration aus dem Beckenkamm (Knochenmarktransplantation), mittels Stammzellapherese aus dem Blut nach Stimulation und Mobilisation aus dem KM durch hämatopoetische Wachstumsfaktoren oder auch aus Nabelschnurblut von Neugeborenen. Die Verwendung von SZ aus Nabelschnurblut kommt jedoch nur selten zu Anwendung. Die Transplantation peripherer Blutstammzellen (PBSZ) wird im Vergleich zur Transplantation von hämatopoetischen SZ aus dem KM heutzutage deutlich häufiger eingesetzt. Zwar konnte gezeigt werden, dass die Inzidenz von akuter und chronischer GvHD (Graft-versus-Host-Disease) höher ist bei der Verwendung von PBSZ, jedoch scheint in bisherigen Untersuchungen ein Trend zur geringerem Auftreten von Graft failure und Rezidiven zu bestehen.<sup>22</sup> Zudem ist die Stammzellgewinnung mittels Apherese aufgrund der fehlenden Invasivität angenehmer für den Spender und mit geringeren Kosten verbunden.

### 1.3.2 Spenderauswahl

Voraussetzung für die Durchführung einer allogenen SZT ist das Vorhandensein eines geeigneten Spenders. Das wichtigste Kriterium für die Spendersuche bei allogener SZT ist die immunologische Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger. Durch serologische und molekulare Testung wird eine Übereinstimmung der humanen Leukozytenantigene (HLA) angestrebt. Es handelt sich hierbei um genetische Merkmale auf der Oberfläche kernhaltiger Zellen, welche für die

Differenzierung zwischen körpereigenen und körperfremd unabdingbar sind. Die genetische Information für die HLA-Antigene wird auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 kodiert. Es werden die HLA-Antigene in Klasse I (HLA-A, -B, -C) auf allen kernhaltigen Zellen und Thrombozyten und in Klasse II (HLA-DR, -DP, -DQ) auf antigenpräsentierenden Zellen unterteilt. Stimmen die HLA-Antigene bei Typisierung mittels genügender Auflösung überein, spricht man von vollständiger Kompatibilität (match). Stammen die SZ von nicht-verwandten Spendern und ergibt sich lediglich eine partielle Übereinstimmung der untersuchten HLA-Merkmale spricht man von unvollständiger Kompatibilität (mismatch). Je nach Anzahl und Lokalisation kommt es bei „mismatched“ Transplantierten häufiger zur Abstoßung des Transplantates und zum Auftreten einer GvHD und damit einhergehend zu einer erhöhten Mortalität.<sup>23</sup>

### 1.3.3 Konditionierung

Der erste Schritt der SZT ist die Konditionierung des Patienten vor der eigentlichen Transplantation. Sie besteht aus einer Chemo- bzw. Radio-Chemo-Therapie mit dem Ziel der Zytoreduktion und Eradikation des Empfänger-KM. Die Vorbehandlung zur allogenen Transplantation umfasst zusätzlich eine starke immunablative Komponente um einer Transplantatabstoßung entgegenzuwirken. Die Einführung dosisreduzierter Konditionierungsverfahren (RIC) vor der Transplantation basiert auf dem Konzept der Elimination maligner Zellen durch einen immunologisch vermittelten „Transplantat-gegen-Tumor-Effekt“ im Vergleich zu einer hochdosierten myeloablativen Chemotherapie (MAC) bei der klassischen Konditionierung. Hieraus resultiert eine niedrigere Rate therapieassoziierter Morbidität und Mortalität, so dass dieses Therapieverfahren auch älteren Patienten und Patienten mit Begleiterkrankungen angeboten werden kann.<sup>24</sup> In mehreren Arbeiten konnte diese Überlegenheit der dosisreduzierten Konditionierung (RIC) gegenüber der Hochdosischemotherapie (MAC) gezeigt werden.<sup>25 26</sup>

### 1.3.4 Komplikationen der Stammzelltransplantation

#### I) Graft versus Host-Disease (GvHD)

Bei der GvHD bzw. Transplantat-gegen-Wirt Erkrankung handelt es sich um die häufigste Komplikation nach allogener SZT und stellt eine der Hauptursachen für die transplantationsassoziierte Morbidität und Mortalität dar. Man unterscheidet die akute von der chronischen GvHD, je nachdem ob sie vor bzw. nach Tag 100 nach der Transplantation auftritt. Ursächlich für die GvHD ist die zytotoxische Aktivität immunkompetenter T- Lymphozyten, die mit dem Transplantat (Graft) auf den Empfänger (Host) übertragen wurden. Die aktivierten Lymphozyten richten sich vor allem gegen die drei Zielorgane Haut, Darm und Leber. Zur Prophylaxe und Therapie der GvHD werden immunsuppressive und antiinflammatorische Medikamente eingesetzt, wie z.B. Ciclosporin A (CSA) als Monotherapeutikum oder in Kombination mit Methotrexat (MTX) oder Mycophenolatmmofetil (MMF). Weiterhin werden auch Antithymozytenglobulin (ATG), Tacrolimus und Everolimus verwendet.<sup>27</sup>

#### II) Immunsuppression und Infektionen

Nach einer allogenen SZT besteht eine starke Funktionsbeeinträchtigung des Immunsystems des Patienten gegenüber Bakterien, Pilzen und Viren, wodurch Infektionen rasch einen lebensbedrohlichen Verlauf nehmen können. Die Schwere des Immundefekts ist abhängig von einer Vielzahl von Faktoren. So besteht für Patienten, die Zellen eines nicht voll HLA-kompatiblen Spenders erhalten haben, einer verlängerten immunsuppressiven Therapie unterzogen wurden oder an einer chronischen Abstoßungsreaktion leiden, ein erhöhtes Risiko einer Infektion. Weiterhin zeigen Patienten, welche T-Zell-depletierte Transplantate zur Reduktion des Risiko für eine GvHD erhielten, eine verzögerte Rekonstitution und damit eine verlängerte Infektionsgefährdung. Tritt jedoch eine schwere akute oder chronische GvHD auf, welche einer umfangreichen Therapie vor allem mit hoch dosierten Glukokortikoiden und Immunsuppressiva bedarf, so führt dies wiederum zu einer stark verzögerten Immunrekonstitution.

### III) Graft failure

Transplantatversagen bzw. Graft failure (GF) ist aufgrund der erhöhten Morbidität und Mortalität eine gefürchtete Komplikation bei der allogenen SZT. Es wird das primäre und das sekundäre GF unterschieden. Bei dem primären GF kommt es zu einem unzureichendem Anwachsen der transplantierten Zellen. Die Patienten erholen sich daher nicht von ihrer Neutropenie ( $ANC < 0,5 \times 10^9/L$ ) und eine Re-Transplantation ist in diesem Fall erforderlich. Davon grenzt sich das sekundäre GF in sofern ab, dass es hierbei nach erfolgtem Anwachsen des Transplantats zu einem Rückgang der Spenderzellen im Empfängerorganismus kommt. Ursächlich ist hierbei die autologe Rekonstitution des KM des Empfängers, wodurch das Transplantat verdrängt wird. Es kann aber auch im Verlauf zur KM-Aplasie und folglich zu einer Panzytopenie kommen. Die Hauptursache des GF ist die T-Zell vermittelte Abstoßungsreaktion.

Darin spiegelt sich auch ein möglicher Nachteil der dosisreduzierten Konditionierung (RIC) gegenüber der myeloablativen Konditionierung wider. So liegt die Zahl der GF in einer Übersichtsarbeit zum outcome nach PSZT bei RIC mit 8% durchaus höher als bei MAC mit 3%.<sup>28</sup> Ein signifikant erhöhtes Risiko für GF besteht weiterhin in der HLA-Inkompatibilität von Spender und Empfänger. Dies konnte bereits mehrfach in Arbeiten, in denen der Verlauf nach allogener SZT bei verschiedenen hämatologischen Erkrankungen untersucht wurde, gezeigt werden.<sup>23 28</sup>

#### 1.3.5 Engraftment und Graft Failure bei Patienten mit MF

In bisherigen Arbeiten zur MF kam es deutlich häufiger zu einem GF bei Transplantationen von nicht verwandten und unvollständig HLA-kompatiblen Spendern.<sup>29 30</sup> In einer großen Metaanalyse wurde die Auswirkung der Inkompatibilität bezüglich des AB0-Blutgruppensystems zwischen Spender und Empfänger auf das Gesamtüberlebens nach hämatologischer SZT untersucht. Es konnte hierbei jedoch keine Auswirkung nachgewiesen werden.<sup>31</sup> Hingegen berichten Remberger et al. über einen Zusammenhang zwischen der Blutgruppeninkompatibilität und dem Auftreten eines GF bei unverwandten Spendern.<sup>32</sup> Für das Engraftment und das GF liegen hierzu über Patienten mit MF in

der Literatur bisher keine Daten vor. Ein weiterer wichtiger Faktor scheint die Anzahl an transplantierten Zellen zu sein. Es zeigte sich, dass die Inzidenz eines GF mit zunehmender Zahl an Transplantierten Zellen abnahm.<sup>28</sup> Eine geringe Zellzahl erhöht jedoch nicht nur das Risiko der GF, sondern wirkt sich generell negativ auf den Verlauf nach der Transplantation aus und korreliert mit einer erhöhten Inzidenz von invasiven Pilzinfektionen und weiteren Infektionen, sowie dem Schweregrad der GvHD.<sup>33</sup>

Trotz großer Fortschritte in der Konditionierung und der GVHD-Prophylaxe birgt die SZT ein hohes Risiko für die Patienten. Je nach Studie zur allogenen SZT bei Patienten mit MF beträgt die Überlebensrate nach 5 Jahren (overall survival, OS) zwischen 35-60% und die behandlungsbedingte Mortalität (treatment-related mortality, TRM) in etwa 35%. Vor allem bei älteren Patienten ist die Morbidität und Mortalität aufgrund der hohen Toxizität deutlich erhöht.

Einen Überblick über Faktoren, die bisher in der Literatur als mögliche Ursachen eines GF oder eines verzögerten Engraftments diskutiert wurden, liefert Tabelle 2.

Reference	N	% of patients with RIC	% of patients with MRD	Graft failure	Non relapse mortality NRM	Overall survival	Risk factors for late engraftment and graft failure
Abelsson, <sup>73</sup> 2012	92	56	40	14%	32 % MAC 24% RIC at 2y	49% MAC 59% RIC at 5y	No difference between MAC and RIC for engraftment
Ballen <sup>29</sup> , 2010	289	21	56	11%	32% at 1 y	50% at 1 y	Higher incidence of graft failure with patients receiving URD transplants. No influence of splenectomy
Guardiola <sup>74</sup> , 1999	55	0	90	9%	27% at 1 y	47% at 5 y	Recipient age at transplant, presence of a cytogenetic abnormality, and the absence of grade II-IV acute GVHD
Gupta <sup>75</sup> , 2009	46	50	54	7% MAC 5% RIC	39 % MAC 23% RIC at 1y	61% MAC 77% RIC at 1y	No difference in graft failure between conditioning regimes
Kerbauy <sup>18</sup> , 2007	104	9	50	7%	34% at 5 y	61% at 5 y	Splenectomy can lead to a faster engraftment
Kröger <sup>25</sup> , 2009	103	100	32	2%	16% at 1 y	67% at 5 y	Splenectomy had a trend for faster leukocyte engraftment
Lissandre <sup>44</sup> , 2011	39	62	NR	3%	30% at 3 y	60% at 3 y	Factors associated with neutrophil engraftment were stem cell source, splenectomy before transplantation and RIC regimen. No influence of numbers of nucleated cells infused
Robin <sup>30</sup> , 2011	147	69	61	10%	39% at 4 y	39% at 4 y	Higher incidence of graft failure with patients receiving URD transplants. Influence of splenectomy or absence of splenomegaly, stem cell source and conditioning regime
Rondelli <sup>50</sup> , 2014	66	100	45	14%	41% at 2 y	53% at 2 y	FluMel plus ATG in HSCT from unrelated donors for MF patients is associated with an increased risk of graft failure
Scott <sup>76</sup> , 2012	170	NR	50	7%	34% at 5 y	57% at 5 y	Post-HCT success dependent on pre-HCT DIPSS Score. No effect of fibrosis, stem cell source or splenectomy on engraftment

## Tab. 2 Literaturübersicht zum Engraftment und Graft failure bei Patienten mit MF

Dargestellt ist eine Übersicht an Arbeiten zum outcome nach allogener SZT bei Patienten mit MF. Angegeben ist die Konditionierung, das Auftreten von NRM und des OS und der Anteil an MRD (matched related donor). Zudem ist der Anteil an Patienten mit Graft failure und die jeweils diskutierten Risikofaktoren dargestellt, welche ein Graft failure oder ein verzögertes Engraftment verursachen.

## 1.4 Hämatopoetische Stammzellen und Stammzellnische

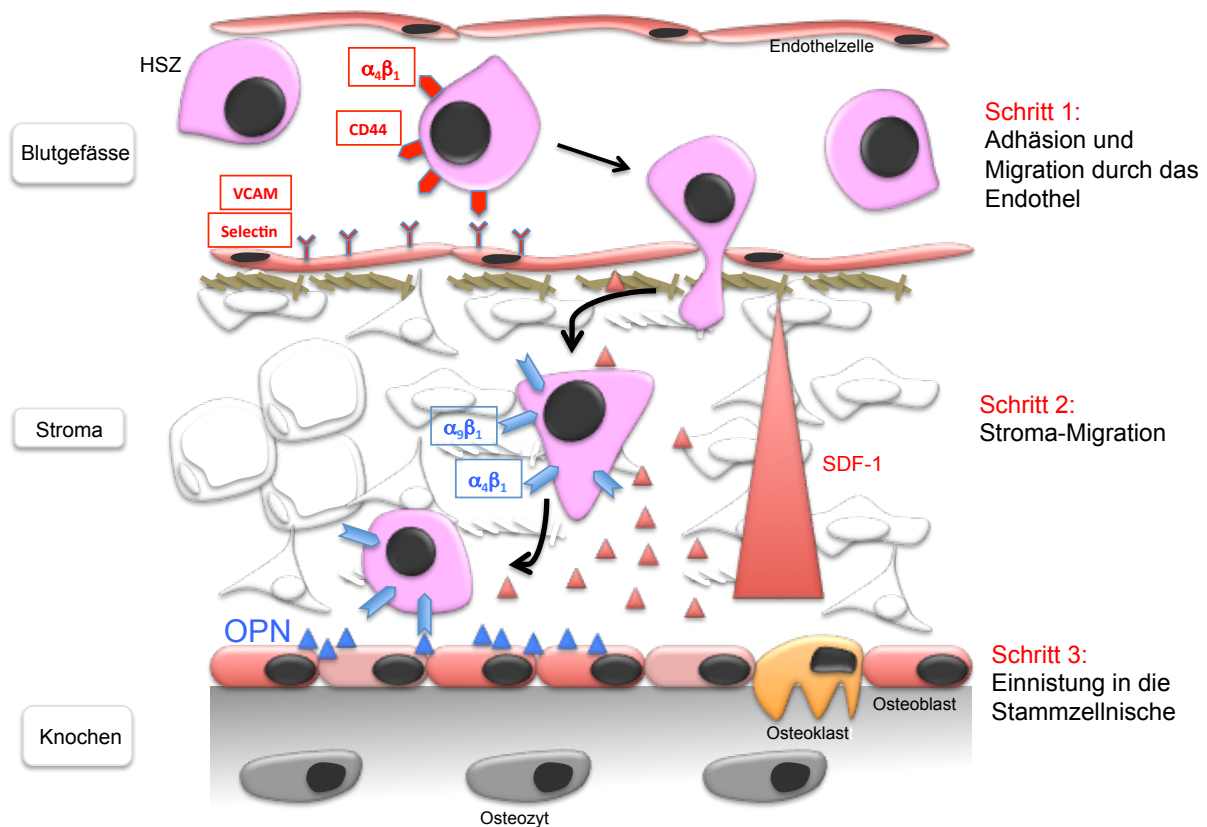
Die lebenslange Regeneration der Hämatopoese nach Transplantation in den Empfängerorganismus setzt zwei essentielle Eigenschaften der hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) voraus: die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und das Potential reife Blutzellen aller Linien hervorzubringen und somit das gesamte Blutsystem zu regenerieren. Die Identifizierung von Markern der HSZ ist Gegenstand der Forschung. Der erste und auch heute am weitesten verbreitete Marker für humane hämatopoetische Vorläuferzellen ist das Oberflächenantigen CD34 (Sialomucin Antigen), welches in den frühen 90er Jahren von Civin et al. beschrieben wurde.<sup>34</sup> Dieses Oberflächenantigen wird von ca. 1-4% der Zellen im KM und von ca. 0,01-0,1% der mononukleären Zellen im PB exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl Zellen des KM als auch periphere Blutzellen, welche dieses Oberflächenmerkmal tragen, das Potential zu einer vollständigen Rekonstitution der Blutbildung nach vorangegangener Chemotherapie haben. HSZ mit der Fähigkeit, nach Transplantation in den Empfängerorganismus zu verschiedenen Blutzelllinien auszureifen, bilden jedoch weniger als 1% der CD34<sup>+</sup> Zellen im KM.<sup>35</sup> Da die CD34<sup>+</sup> Zellen eine sehr heterogene Gruppe mit unterschiedlichem Differenzierungspotenzial darstellen, wurden im Laufe der Zeit weitere phänotypische Kriterien entdeckt, anhand derer sehr frühe Vorläuferzellen weiter charakterisiert werden konnten. Wie gezeigt werden konnte, steht das CD38 Antigen in sehr engem Zusammenhang mit dem Differenzierungspotenzial von Zellen. Zellen, die das CD38 Antigen nicht exprimieren (ca. 1% der humanen CD34<sup>+</sup> KM-Zellen) sind im Gegensatz zu CD38<sup>+</sup> Zellen zu beträchtlicher Selbsterneuerung fähig.<sup>36</sup> Die CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> Zellen stellen somit unter den CD34<sup>+</sup> Zellen eine unreifere Zellpopulation dar. HSZ residieren beim Erwachsenen primär im Bereich des Beckenknochens und der großen Röhrenknochen. Die Regulation der Hämatopoese im KM findet dort im Bereich der hämatopoetischen Stammzellnische statt. Diese Nische wird von Stromazellen und extrazellulären Matrixproteinen gebildet, welche die HSZ-Aktivität durch Zell-Zell-Kontakt, Zell-Stroma-Kontakt und lösliche Wachstumsfaktoren reguliert.<sup>37</sup> Neben dem von Osteoblasten exprimierten Osteopontin (OPN) sind auch weitere Zytokine wie z.B. CXCL 12 (stromal cell-derived factor-1, SDF-1) sowie Adhäsionsmoleküle wie das JAM-A und VCAM (vascular cell adhesion molecule 1) an der Regulation der Hämatopoese beteiligt.<sup>38</sup>

### 1.4.1 Homing

Unter Homing versteht man die Eigenschaft von HSZ sich nach der Transplantation in den Empfängerorganismus im KM anzusiedeln und dort durch Proliferation und Differenzierung die Hämatopoese zu rekonstituieren.

Der erste Schritt beim Homing ist die Interaktion der zirkulierenden HSZ mit den Endothelzellen der Gefäße im KM. Dies wird ermöglicht durch die Expression von Adhäsionsmolekülen (Selektine CD62P und CD62E, ICAM-1 sowie VCAM -1 bzw. CD106) auf den Endothelzellen. Die HSZ wiederum exprimieren sowohl endotheliale Selektine (CD162, CD44) sowie Rezeptoren für VCAM1, wie Integrine  $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_4\beta_7$  und  $\alpha_9\beta_1$ .<sup>39 40</sup> Diese Zell-Zell-Interaktionen ermöglichen es den HSZ fest an das Gefäßsystem zu binden, das Endothel zu überwinden und ins KM zu gelangen.

Das Chemokin CXCL12 (SDF-1) spielt eine entscheidende Rolle bei der Rekrutierung und Verankerung von HSZ im KM. Dieses Zytokin wird in hoher Konzentration im KM-Stroma exprimiert und wirkt chemotaktisch auf die HSZ durch Bindung an zwei verschiedene Chemokinrezeptoren, CXCR4 und CXCR7. In einem Mausmodell konnte der Stellenwert dieser CXCL12/CXCR4-Interaktion eindrücklich gezeigt werden. Durch das Blockieren der CXCR4-Rezeptoren auf den HSZ mit einem spezifischen Antikörper wurde das Homing in das KM so stark beeinträchtigt, dass nur noch ein geringer Teil der transplantierten Zellen in das KM übertreten konnte.<sup>41</sup> Durch Erhöhung der Zellzahl konnte der Homing-defekt jedoch teilweise kompensiert werden. Dies zeigt, dass noch weitere Zytokine an der Adhäsion und Migration der HSZ beteiligt sein müssen.



**Abb. 1 Vereinfachte schematische Darstellung des Homings von HSZ in das KM**  
 Die zirkulierenden HSZ (hämatopoetische Stammzellen) binden mit ihren spezifischen Rezeptoren ( $\alpha_4\beta_1$  und CD44) an die Adhäsionsmoleküle (Selektine und das vascular cell adhesion molecule-1 VCAM -1) auf den Endothelzellen. Nachdem die HSZ das Endothel überwunden haben wirken SDF-1 (stromal cell-derived factor-1) und OPN (Osteopontin) chemotaktisch auf die HSZ und steuern somit die zielgerichtete Migration durch das KM-Stroma in die Stammzellnische

#### 1.4.2 Lodgement und Engraftment

Sobald die zirkulierenden HSZ das Endothel in das KM überwunden haben, durchwandern sie innerhalb kurzer Zeit das KM-Stroma und gelangen in ihre Nischen (sog. Lodgement). Osteopontin (OPN), ein Knochenmatrixprotein, welches sich vor allem im Endost findet und von Osteoblasten und Osteoklasten gebildet wird, übt unterschiedliche zelluläre Funktionen aus, wie die Steuerung der Differenzierung, Adhäsion, Migration und Apoptose der HSZ. Die unterschiedlichen Funktionen sind jedoch abhängig davon, ob das Molekül in voller Länge, oder nach proteolytischer Spaltung durch Thrombin, in Fragmenten vorliegt. Grassinger et al konnten zeigen, dass hauptsächlich die gespaltene Form von OPN im KM vorhanden ist (Thrombin-

cleaved OPN, trOPN). Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass die spezifische Bindung von trOPN über die Integrine  $\alpha_9\beta_1$  und  $\alpha_4\beta_1$  chemotaktisch auf die HSZ wirkt.<sup>38</sup> Die Bindung von  $\alpha_9\beta_1$  an OPN konnte bereits bei Vorarbeiten zu diesem Thema gezeigt werden, der Nachweis der Expression dieses Integrins auf den HSZ gelang zu einem späteren Zeitpunkt.<sup>42</sup> Ein weiteres Bindungsmolekül, das auf den HSZ exprimiert wird und als OPN-Rezeptor fungiert ist CD44. Den Stellenwert von OPN beim Lodgement zeigten Versuche mit OPN-knockout Mäusen. Durch das Fehlen dieses Moleküls am Endost persistierten nach SZT die Zellen deutlich länger im PB und konnten auch nur in wesentlich kleinerer Anzahl in den endostalen Nischen wiedergefunden werden.<sup>43</sup> In vitro zeigte sich, dass trOPN sich hemmend auf die Proliferation und die Differenzierung der HSZ auswirkt. Der genaue Mechanismus dieser Wirkung und dessen Stellenwert in vivo ist bisher unklar, es unterstreicht jedoch die vielfältige Wirkung dieses Moleküls auf die HSZ. Ein ungestörtes Homing und Lodgement sind für das Anwachsen des Transplantates, dem sog. Engraftment somit unerlässlich.

## 1.5 Fragestellung

Der einzige kurative Therapieansatz bei MF besteht bisher in der allogenen SZT. Wie in der Literatur beschrieben sowie bei den in der Klinik und Poliklinik der Inneren Medizin III transplantierten MF Patienten beobachtet wird, kommt es im Vergleich zu Patienten mit anderen malignen hämatologischen Erkrankungen (z.B. AML) nach einer allogenen SZT bei Patienten mit MF oftmals zu einem verzögerten oder zu einem ausbleibendem Anwachsen (Engraftment) der transplantierten Zellen. Letzteres wird auch als Transplantatversagen (Graft failure, GF) bezeichnet und geht mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität einher.

Diese Arbeit gliedert sich in eine klinisch retrospektive Auswertung sowie in einen experimentellen Teil. Im ersten Teil wurden Patienten mit MF und AML, bei denen in der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin III eine allogene SZT durchgeführt wurde, retrospektiv ausgewertet. In dem anschließenden experimentellen Teil wurde untersucht, ob dem bei MF Patienten zu beobachteten verzögerten Engraftment und GF Veränderungen im Homing der transplantierten Zellen zugrunde gelegt werden können.

In der retrospektiven Datenauswertung sollte der klinisch beobachtete Unterschied im Engraftment von MF und AML Patienten nach SZT analysiert werden. Weiterhin lag der Fokus auf der statistischen Auswertung von klinisch erhobenen Parametern und deren Einfluss auf das Engraftment der HSZ. Hierzu wurden die Daten von je 31 Patienten mit MF und AML ausgewertet, die im Zeitraum von 2000 bis 2011 in der Klinik und Poliklinik der Inneren Medizin III des UKR allogene transplantiert wurden. Die Auswahl der Parameter richtete sich hierbei nach in der Literatur diskutierten Einflussfaktoren auf das Engraftment.

Im anschließenden experimentellen Teil sollte untersucht werden, ob die beobachteten Unterschiede im Engraftment durch das Homing-Verhalten von HSZ erklärt werden können. Es wurden zunächst Verlaufsmessungen von CD34<sup>+</sup> Zellen im PB nach Transplantation sowohl bei Patienten mit MF als auch bei Patienten mit AML durchgeführt. Den Patienten wurde hierbei direkt nach der Transplantation zu definierten Zeitpunkten Blut abgenommen und mittels durchflusszytometrischer

Analyse die Anzahl an zirkulierenden SZ im PB bestimmt. Der Vergleich der Ergebnisse beider Patientengruppen diene der Klärung, ob sich bereits zum frühen Zeitpunkt nach der Transplantation ein Unterschied im Homing-Verhalten zeigt, welcher auf eine Störung der Interaktion der SZ mit dem KM-Endothel und -stroma hinweist und somit eine Ursache für das verzögerte Engraftment sein kann. Mögliche Ursache stellen hierbei Veränderungen der Stammzellnische bei Patienten mit MF dar.

Bereits in Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass bestimmte, von Endothel- und Stromazellen im KM exprimierte Proteine wie OPN, ICAM-1, VCAM-1 und SDF-1, eine zentrale Rolle für die chemotaktische Steuerung des Homings und des Lodgements in die Stammzellnische spielen. In den weiterführenden Versuchen sollte nun mittels immunhistochemischer Untersuchungen von sowohl fibrosierten und gesunden KM-Präparaten geklärt werden, ob die KM-Fibrose bei Patienten mit MF einen Einfluss auf die Expression von Homingproteinen hat und somit ein Zusammenhang hergestellt werden kann zwischen der Expression dieser Proteine und dem verzögertem Engraftment von HSZ nach der Transplantation.

## 2. Methoden

### 2.1 Retrospektive Auswertung der Patientendaten

#### 2.1.1 Patientenkollektiv und Datenerfassung

In der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin III der Universität Regensburg wurde in dem Zeitraum von 2000 bis 2011 bei insgesamt 31 Patienten mit PMF bzw. sekundärer MF nach PV oder ET eine allogene SZT durchgeführt. Zur retrospektiven Analyse wurde dieser Gruppe 31 Patienten mit AML in etwa entsprechendem Alter gegenübergestellt, welche zwischen 2005 und 2011 transplantiert wurden.

Die Auswahl der untersuchten Parameter erfolgte nach entsprechender Literaturrecherche nach den Ergebnissen aus bisherigen Studien, welche sich mit den beeinflussenden Faktoren auf das Gesamtüberleben von Patienten mit MF oder mit dem Engraftment und GF nach HSZT beschäftigten. Wie bereits in Abschnitt 1.3.4 beschrieben, konnte ein besonderer Einfluss auf den Verlauf der Transplantation und das Risiko für Transplantatversagen für die HLA-Inkompatibilität von Spender und Empfänger gezeigt werden. Weitere wichtige Faktoren, welche in den verschiedenen Studien unterschiedlich gewichtet wurden sind weiterhin der Einsatz der dosisreduzierten Konditionierung (RIC) gegenüber der myeloablativen Konditionierung sowie die Inkompatibilität bezüglich des AB0-Blutgruppensystems.<sup>23</sup>

<sup>32</sup> Sowohl für das Gesamtüberleben der behandelten Patienten, als auch für das Engraftment wurden bisher zudem das Alter und das Erkrankungsstadium, sowie die Splenektomie vor der SZT und die Anzahl an transplantierten Zellen als Einflussfaktoren diskutiert und wurden daher auch an dem Patientenkollektiv dieser Arbeit untersucht.<sup>28 25 44</sup>

### 2.1.2 Definitionen

Um den Verlauf der Transplantationen zu analysieren und Vergleiche zwischen den beiden Erkrankungen anstellen zu können, wurden folgende Zeitpunkte definiert:

Als Tag 0 wurde die Transfusion des Stammzellpräparates festgelegt. Das frühe Neutrophilen Engraftment wurde definiert als der erste von drei aufeinander folgenden Tagen, an denen die Zahl an Neutrophilen einen Wert von  $0,5 \times 10^9/L$  übersteigt. Untersucht wurde hierbei der Zeitraum bis zum Tag 50. Für das späte Neutrophilen Engraftment wurde ein Grenzwert von  $2 \times 10^9/L$  Neutrophilen bis zum Tag 100 festgelegt. Das frühe und das späte Thrombozyten Engraftment wurde definiert als der erste von 7 aufeinander folgenden Tagen, an denen die Zahl der Thrombozyten einen Wert von  $20 \times 10^9/L$  bzw.  $50 \times 10^9/L$  übersteigt. Diese Grenzwerte sollten ohne Blutersatzpräparate erreicht und gehalten werden. Das GF wurde über einen Zeitraum von 12 Monaten nach Transplantation untersucht. Das primäre GF ist definiert als persistierende Neutropenie mit einer Anzahl an Neutrophilen  $< 0,5 \times 10^9/L$ . Das sekundäre GF beschreibt ein Absinken der Neutrophilen auf  $< 0,5 \times 10^9/L$  nach einem bereits stattgefundenen Engraftment.

Für das Staging der akuten GvHD, sowie für die Bestimmung des Gesamtgrades der GvHD erfolgte die Einteilung nach Glucksberg.<sup>45</sup> Bei der chronischen GvHD wurde der Schweregrad nach den Kriterien von Shulman in die limitierte und die extensive Variante eingeteilt.<sup>46</sup>

### 2.1.3 Statistik

Die Akten der Patienten wurden auf die zu untersuchenden Parameter hin überprüft und die einzelnen Daten wurden im Programm MS Office Excel 2011 tabellarisch zusammengefasst. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistik-Programm SPSS Version 21. Die in der Patientencharakteristik wiedergegebenen Daten sind in Anzahl mit Prozent und als Median mit Spannweite der Daten (range) wiedergegeben. Die Analyse der Zeit von der Transplantation bis zum Eintreten eines Ereignisses wie das Neutrophilen und Thrombozyten Engraftment, die non relapse mortality (NRM), sowie das Gesamtüberleben (OS, overall survival) fand durch Kaplan-Meier-Schätzungen statt. Die Kurven der dabei untersuchten Merkmale wurden mittels Logrank-Test miteinander verglichen. Zensiert wurden die Patienten,

die bereits vor Ende des Untersuchungszeitraumes ohne Eintreten eines Ereignisses ausgeschieden sind oder das Ereignis zum letzten beobachteten Zeitpunkt noch nicht eingetreten war.

Der angegebene p-Wert beschreibt die Wahrscheinlichkeit mit der das berechnete Ereignis eintritt. Für den p-Wert wurde das Signifikanzniveau auf kleiner 0,05 festgesetzt. Das Konfidenzintervall für die ermittelten Erwartungswerte wurde auf 95% festgelegt und ist jeweils mit der oberen und unteren Intervallgrenze angegeben.

Das Gesamtüberleben wurde für eine Dauer von 2 Jahren betrachtet und wurde gemessen vom Tag der Transplantation bis zum Eintreten des Todes, unabhängig von der Ursache. Die NRM ist definiert als die Mortalität eines Patientenkollektivs, wobei Rezidive als Todesursache ausgeschlossen sind.

Die Daten der durchflusszytometrischen Messungen aus der experimentellen Analyse wurden als Mittelwert +/- Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Zur Bestimmung der statistischen Signifikanz wurde der Student's t-Test angewendet.

## 2.2 Experimentelle Analyse

### 2.2.1 Materialien

Zur Durchführung der Experimente im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurden nachfolgende Geräte, Verbrauchsmaterialien, Zytokine, Chemikalien und Reagenzien verwendet.

#### Geräte

Brutschrank	BBD 6220, Heraeus instruments, Hanau, Deutschland
FACS-Gerät	FACS-Calibur, Becton&Dickson, St. José, CA, USA
Mikroskop	Zeiss Axioskop 2, Jena, Deutschland
Pipettierhilfen	Eppendorf research, 10/100/1000 µl Eppendorf, Hamburg, Deutschland  Pipetboy acu, IBS Integra Biosciences, Wallisellen, Schweiz
Sterilbank	Hera Safe, Heraeus instruments, Hanau, Deutschland
Vortexer	IKA MS3 digital, IKA works Inc., Wilmington, NC, USA
Zentrifuge	Megafuge 3.0, Heraeus instruments, Hanau, Deutschland

#### Verbrauchsmaterial

Falcon 2052	Becton&Dickson, St. José, CA, USA
Falcon 2063	Becton&Dickson, St. José, CA, USA
Falcon 2070	Becton&Dickson, St. José, CA, USA
Falcon 2059	Becton&Dickson, St. José, CA, USA
Falcon 3003	Tissue culture dish 3003, Becton&Dickson, St. José, CA, USA
Microlance 3 Kanüle	Becton&Dickson, St. José, CA, USA

Petrischalen	35 mm, Greine bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pipetten	Costar Stripette 1/5/10/25/50 ml, serologisch, non-pyrogenic, Corning Inc., Corning, N.Y., USA
Spritzen	Syringe Plastipak 3ml, Becton&Dickson, St. José, CA, USA
Zählkammer	Neubauer improved, Tiefe 0,1 mm Marienfeld, Deutschland
Zellkulturplatten	Corning Costar cell culture plates Sigma-Aldrich Co., St.Louis, MO, USA

### Antikörper

CD45-FITC	clone HI30; BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA
CD34-APC	clone 581, Biolegend, San Diego, CA, USA
CD38-PE	clone HIT2, BioLegend, San Diego, CA, USA
anti-SDF-1	Polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, US
anti-VCAM-1 (CD106)	clone E-10, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, US
anti-ICAM-1 (CD54)	clone H4, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, US
anti-Osteopontin	Abcam, Cambridge, UK
isotype anti-mouse	Dako, Glostrup, Denmark
Isotype anti-rabbit	Abcam, Cambridge, UK

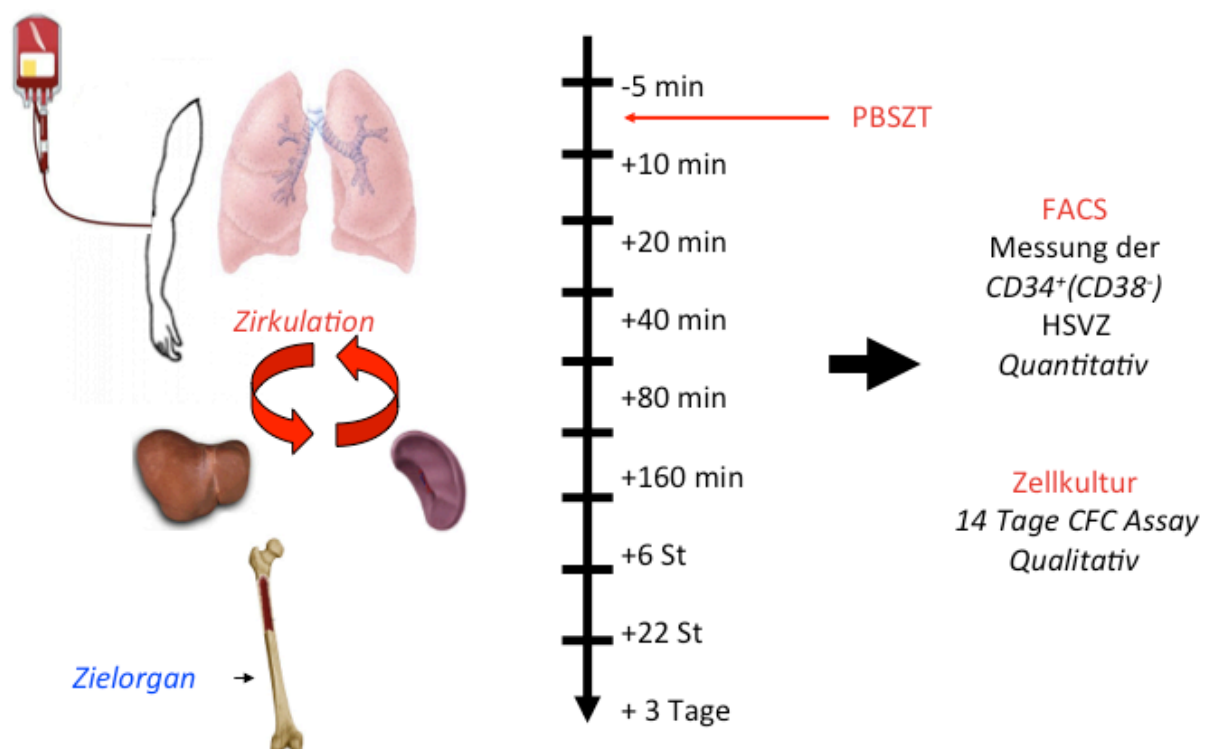
### Reagenzien

Bright-DAB	medac GmbH, Wedel, Deutschland
FBS (foetal bovine serum)	PAA laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Histofine® Simple Stain MAX PO (M)	Nichirei Biosciences INC, Tokyo, Japan
Human Methylcellulose	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA



CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> Zellen im PB bestimmt (siehe Abbildung 2).

Den Patienten wurde jeweils 2,5 ml Blut sowohl kurz vor der Transplantation, als auch zu folgenden Zeitpunkten entnommen: + 10 Minuten (min), + 20 min, + 40 min, + 80 min, + 160 min, + 6 Stunden (h) + 22 h, + 3 Tage (d) und in manchen Fällen zusätzlich + 5 d. Die Analyse der Zellen wurde im Anschluss mittels Durchflusszytometrie und Colony Forming Cell (CFC) Assays durchgeführt.



**Abb. 2 Vereinfachte Darstellung des Ablaufs von der Messung der Clearance.**

Nach der allogenen SZT werden zu definierten Zeitpunkten Blutentnahmen durchgeführt und die Anzahl der zirkulierenden CD34<sup>+</sup> und CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> sowie CFC gemessen.

#### 2.2.2.2 Färbung von Oberflächenantigenen für die FACS Analyse

Für die Färbung wurde je 1 ml der zu analysierenden Blutproben mit 9ml NH<sub>4</sub>Cl-Lysepuffer vermischt und 5 Minuten inkubiert. Um die Lyse zu stoppen wurde anschließend je 15 ml PBS 2%FBS hinzugefügt. Nach einem weiteren Spülgang mit PBS 2%FBS wurde der Ansatz zentrifugiert und nach Abkippen der Überstände wurde in Zählkammern die jeweilige Zellzahl bestimmt. Im weiteren Verlauf wurden jeweils 1 x 10<sup>6</sup> Zellen mit den Antikörpern gefärbt. Hierzu wurden die Zellen mit

jeweils 25 µl einer Lösung mit einer Kombination aus einem CD45-FITC Antikörper (AK), einem CD34-APC AK und einem CD38-PE AK für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Um das Ausmaß der unspezifischen Antikörperbindung zu detektieren, wurden jeweils Negativkontrollen pro Versuchsreihe auch mit der Kombination aus einem CD45-FITC AK, einem CD34-APC AK und einem Isotyp-PE AK gefärbt. Zur Entfernung von überschüssigen, nicht an Zellepitope gebundener AK wurden die Zellen anschließend mit PBS 2%FBS gewaschen, zentrifugiert und in PBS resuspendiert.

#### 2.2.2.3 Durchflusszytometrische Messung von CD34<sup>+</sup> und CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> Zellen

Im Anschluss an die Färbung wurden die FACS-Messungen durchgeführt und basierend auf den sequenziellen Gatingstrategien nach ISHAGE Richtlinien (International Society of Hematotherapy and Graft Engineering)<sup>47</sup> wurde die Anzahl an CD34 Stammzellen bestimmt. Um die exakte Anzahl an CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> Zellen zu bestimmen, wurden zusätzlich aus dem gate für diese Zellpopulation die Ereignisse aus der Isotypfärbung ausgeschlossen.

#### 2.2.2.4 Korrekturfaktoren der durchflusszytometrisch gemessenen Zellzahlen

Die SZT wurde bei den Patienten mit individuellen Parametern, wie unterschiedlicher Anzahl an transfundierten Zellen bei unterschiedlichem Blutvolumen der Patienten durchgeführt. Um die gemessenen Zellzahlen vergleichen zu können, wurden die Ergebnisse der FACS-Messungen über beide Patientenpopulationen gemittelt und für die einzelnen Zeitpunkte der Blutabnahmen neu berechnet.

Zusätzlich unterschied sich die Dauer von Beginn bis zum Ende der Transfusion der SZ von Patient zu Patient. Folglich war der Abstand zwischen Transfusionsbeginn und Abnahme der ersten Blutprobe jeweils unterschiedlich und musste berücksichtigt werden.

Es wurden daher folgende Berechnungen angestellt:

- Das individuelle Blutvolumen ( $v$ ) wurde für weibliche Patienten nach der Formel  $v = (\text{Körpergewicht (kg)} \times 0.047 + 0.86)$  und für männliche Patienten nach der Formel  $v = (\text{Körpergewicht (kg)} \times 0.041) + 1.53$  berechnet.<sup>48</sup>
- Die gemittelte Anzahl der transplantierten Zellen ( $n$ ) wurde nach der Formel  $n = ((\text{Mittelwert der gepoolten Zellen}) \div (\text{Anzahl der Zellen pro kg KG}))$  berechnet.
- Das Blutvolumen ( $bv$ )  $bv = ((v) \div (\text{Mittelwert des gepoolten Blutvolumens}))$
- Die Zeitdauer ( $t$ ) der Transplantationen wurde nach folgender Formel gemittelt  $t = ((Tx - \text{Dauer (Minuten)}) \div (\text{Mittelwert der gepoolten } Tx - \text{Dauer}))$

Die Anzahl der  $CD34^+$  bzw.  $CD34^+CD38^-$  Zellen pro ml Blut ( $c$ ) konnte anschließend mit folgender Formel berechnet werden:  $c = n \times bv \times t$

### 2.2.3 Colony forming cells (CFC) Assay

Bei den CFC Assays handelt es sich um ein in vitro Zellkulturanalyseverfahren zur Charakterisierung des biologischen Potenzials von Stamm- und Progenitorzellen. Es wird das Koloniebildungsverhalten, genauer die Proliferation von Vorläuferzellen nach Stimulation mit bestimmten Wachstumsfaktoren analysiert. In Abhängigkeit der zugesetzten Zytokine bilden sich bestimmte Kolonieformen aus, die dann retrospektiv Rückschlüsse auf das Entwicklungspotential der ursprünglich in den Versuchsansatz eingebrachten Zellen zulassen.

CFC Kulturen wurden zu den oben genannten definierten Zeitpunkten aus Proben des PB angelegt. Zunächst wurden je 500  $\mu$ l der zu analysierenden Blutproben mit 5 ml  $NH_4Cl$ -Lysepuffer vermengt und 5 Minuten inkubiert. Um die Lyse zu stoppen wurde anschließend je 7 ml PBS 2%FBS hinzugefügt. Nach einem weiteren Spülgang wurde der Ansatz zentrifugiert und nach Abkippen der Überstände wurde auf das Zellpellet 200  $\mu$ l Resuspension Solution gegeben. Zu diesem Ansatz wurde anschließend 2 ml Methylcellulose-Medium gegeben. In diesem Medium wurden die Zellen ausplattiert und für 2 Wochen im Brutschrank bei  $37^\circ C / 5\% CO_2 / 95\%$

Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend konnten die gewachsenen Kolonien mittels Lichtmikroskopie ausgezählt werden.

#### 2.2.4 Analyse von OPN Rezeptoren auf Stammzellen aus dem PB

Wie bereits veröffentlichte Daten zeigen konnten, besitzt OPN einen bedeutenden Stellenwert für das Engraftment und Lodgement der SZ ins KM. Es wurde anhand von durchflusszytometrischen Messungen untersucht, inwiefern die transplantierten Zellen den OPN Rezeptor exprimieren.

Die Aliquots der untersuchten CD34<sup>+</sup> Zellen stammten aus überschüssigen Stammzellpräparaten gesunder Probanden, die für eine allogene SZT vorgesehen waren. Die Zellen wurden mittels Leukapherese nach Stimulation mit G-CSF gewonnen. Das schriftliche Einverständnis der Spender sowie die Zustimmung der Ethikkommission lagen vor.

Zunächst wurden die mononukleären Zellen mittels Dichte-Gradienten-Zentrifugation unter Verwendung von LSM 1077 Lymphocyte Separation Medium isoliert und in FBS/ 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) kryokonserviert. Für die folgenden Versuche konnten somit jeweils die benötigte Anzahl an Zellen entnommen werden. Für eine möglichst schonende Gewinnung der CD34<sup>+</sup> Zellen, wurden mit Hilfe der negativen Selektion die ungewünschte Zellfraktion aus dem Ansatz entfernt. Hierfür wurden diese Zellen zunächst mit Maus-anti-human AK gegen CD3, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD20 und CD235 inkubiert. In einem zweiten Schritt wurden diese mit magnetisch gekoppelten sekundären AK inkubiert und schließlich beim Durchfluss durch ein Magnetfeld zurückgehalten. Die aufgefangene Fraktion (lin<sup>-</sup>) war somit nicht durch Interaktion mit den AK potentiell beeinflusst und konnte mittels Durchflusszytometrie analysiert werden.

#### 2.2.5 Immunhistochemische Färbungen

Die Färbungen wurden an formalinfixierten und paraffingebetteten KM-Stanzen durchgeführt und es wurde hierzu die Anleitung aus dem Histofine® Simple Stain MAX PO (M) Protokoll befolgt. Die Stanzen stammten von Patienten mit MF vor Konditionierungsschemotherapie. Als Vergleichspräparate wurden als nicht

pathologisch befundete KM-Stanzen von Patienten verwendet, bei denen im Rahmen von Staginguntersuchungen bei Lymphom eine KM-Diagnostik erfolgte.

Zunächst wurden 3 µm dicke Schnitte der Präparate angefertigt und auf Objektträger gezogen. Nach der Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte erfolgte die Antigendemaskierung durch Erhitzen in 10mM Citratpuffer (pH 6,0) im Wasserbad. Zur Reduzierung unerwünschter Hintergrundfärbung in der Immunhistochemie durch endogene Peroxidase-Aktivität wurden die Schnitte anschließend in eine 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung gebracht. Die Färbeantikörper anti-VCAM-1, anti-ICAM-1, anti-SDF-1 und anti-OPN wurden jeweils einzeln verwendet und in Kombination mit einem Isotype anti-mouse bzw. Isotype anti-rabbit AK in einer Konzentration von 2µg/ml auf die Schnitte gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Antigen-Antikörper-Bindung wurde am Folgetag mit dem Immuno-peroxidase Polymer MAX-PO und einer darauf folgenden Reaktion mit dem Chromogen Bright-DAB sichtbar gemacht.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Retrospektive Auswertung der Patientendaten

#### 3.1.1 Patientencharakteristika

Das mediane Alter der Patienten mit MF betrug zum Zeitpunkt der Transplantation 54 Jahre (36 - 67 Jahre), das der Patienten mit AML 56 Jahre (37 - 68 Jahre).

Nach dem DIPPS ließen sich die Patienten mit MF in die vier Risikogruppen low/ intermediate-1/ intermediate-2 und high einteilen unterteilen, wobei sich eine Verteilung von 3/ 3/ 22/ 2 ergab. Bei einem der Patienten konnte trotz ausgiebigen Aktenstudiums aufgrund fehlender Parameter keine Einteilung erfolgen. Die Entscheidung zur SZT bei Patienten mit Risikoprofil low oder intermediate-1 wurde aufgrund von verschiedenen individuellen Risikofaktoren getroffen, welche nicht in den damals verwendeten Risikoscores berücksichtigt werden. Hierzu gehörten: junges Alter, akute Krankheitsprogression und Vorliegen von Krankheitskomplikationen wie multiple thrombotische Ereignisse und Ösophagusvarizenblutungen. Die Milzgröße wurde vor Transplantation mittels Ultraschall gemessen und es ergab sich ein Median des Längsdurchmessers von 21 cm (11-40 cm). Bei 5 der Patienten fand aufgrund von Komplikationen vor der Transplantation eine Splenektomie statt. Der Grad der KM-Fibrose der Patienten wurde vor der Transplantation anhand von KM-Stanzen bestimmt und nach Bauermeister klassifiziert.<sup>49</sup> Hierbei ergab sich eine Verteilung der Fibrosegrade wie folgt: Grad 4 bei 18 (58%) Patienten, Grad 3 bei 6 (19%), Grad 2 bei 4 (13%) und Grad 1 bei 3 (10%) der Patienten.

15 der Patienten mit AML wurden primär einer allogenen SZT zugeführt aufgrund ungünstiger zyto- und molekulargenetischer Risikofaktoren, die unter anderem unbalancierte Karyotypen, ferner Anomalien der Chromosomen 3 oder 7 und komplexe Veränderungen mit mindestens 3 chromosomalen Aberrationen umfassten. Weitere Gründe für die primäre Transplantation waren der Übergang eines myelodysplastischen Syndroms (MDS) in eine AML und das ungenügende Ansprechen auf die Induktionschemotherapie mit einem Blastenanteil >5% im KM.

Bei den restlichen 16 Patienten wurde die Indikation zur Transplantation aufgrund eines Rezidivs der Erkrankung gestellt.

<b>Patienten mit Myelofibrose (n=31)</b>	
Alter in Jahren, Median (range)	54 (36-67)
Weibl. Geschlecht , no (%)	13 (42)
<b>Erkrankung, no (%)</b>	
Primäre MF	17 (55)
Sekundäre MF	14 (45)
<b>Risikoprofil nach DIPPS, no (%)</b>	
Low	3 (10)
Intermediate-1	3 (10)
Intermediate-2	22 (71)
high	2 (6)
unbekannt	1 (3)
<b>Milzgröße, no (%)</b>	
Größer als Median von 21 cm	13 (42)
Kleiner als Median von 21 cm	13 (42)
Splenektomiert	5 (16)
<b>Fibrosegrad nach Bauermeister no (%)</b>	
Grad 1	3 (10)
Grad 2	4 (13)
Grad 3	6 (16)
Grad 4	18 (58)
<b>Anzahl transplantiertes CD34<sup>+</sup> Zellen/kg KG x 10<sup>6</sup>, Median (range)</b>	
	5,81 (3,53-8,99)
<b>Konditionierungsschema, no (%)</b>	
Myeloablativ (MAC)	4 (13)
Reduced intensity (RIC)	27 (87)
Antithymoglobulin	29 (94)
<b>HLA-Kompatibilität, no (%)</b>	
verwandt	8 (26)
Matched, nicht verwandt	16 (52)
Mismatched, nicht verwandt	7 (22)
<b>Major ABO mismatch, no (%)</b>	
	11 (35)
<b>GvHD Prophylaxe, no (%)</b>	
CSA + MTX	18 (58)
CSA + MMF	10 (32)
CSA	3 (10)

<b>Patienten mit AML (n=31)</b>	
Alter, Median (range) Jahre	56 (37-68)
Weibl.Geschlecht , no (%)	16 (52)
<b>Zeitpunkt der allo HSCT, no (%)</b>	
Primär nach Induktionstherapie	15 (48)
Rezidiv	16 (52)
Anzahl transplantiertes CD34 <sup>+</sup> Zellen/kg KG x 10 <sup>6</sup>	5,98 (2,71-8,57)
<b>Konditionierungsschema, no (%)</b>	
Myeloablativ (MAC)	1 (3)
Reduced intensity (RIC)	30 (97)
Antithymoglobulin	27 (87)
<b>HLA-Kompatibilität, no (%)</b>	
verwandt	4 (13)
Matched, nicht verwandt	18 (58)
Mismatched, nicht verwandt	9 (29)
Major ABO mismatch, no (%)	8 (26)
<b>GvHD Prophylaxe, no (%)</b>	
CSA + MTX	20 (65)
CSA + MMF	10 (32)
Everolimus	1 (3)

**Tab. 3 Übersicht über Transplantationscharakteristika der MF und der AML Patienten**  
Dargestellt sind die wichtigsten Daten zur Transplantation, ergänzend zu den im Text erläuterten Patientencharakteristika.

### 3.1.2 Transplantation

Alle Patienten erhielten von ihrem Spender ein Transplantat, welches aus peripheren Blutstammzellen (PBSZ) gewonnen wurde. 26 der Patienten mit MF wurden mit dosisreduzierter Intensität konditioniert (RIC) und 5 Patienten erhielten eine Kombination aus Ganzkörperbestrahlung (8 Gy) und Chemotherapie mit Fludarabin und Cyclophosphamid (MAC). Die Patienten mit AML erhielten zum größten Teil eine Konditionierung nach dem RIC-Regime, lediglich 1 Patient wurde myelablativ konditioniert.

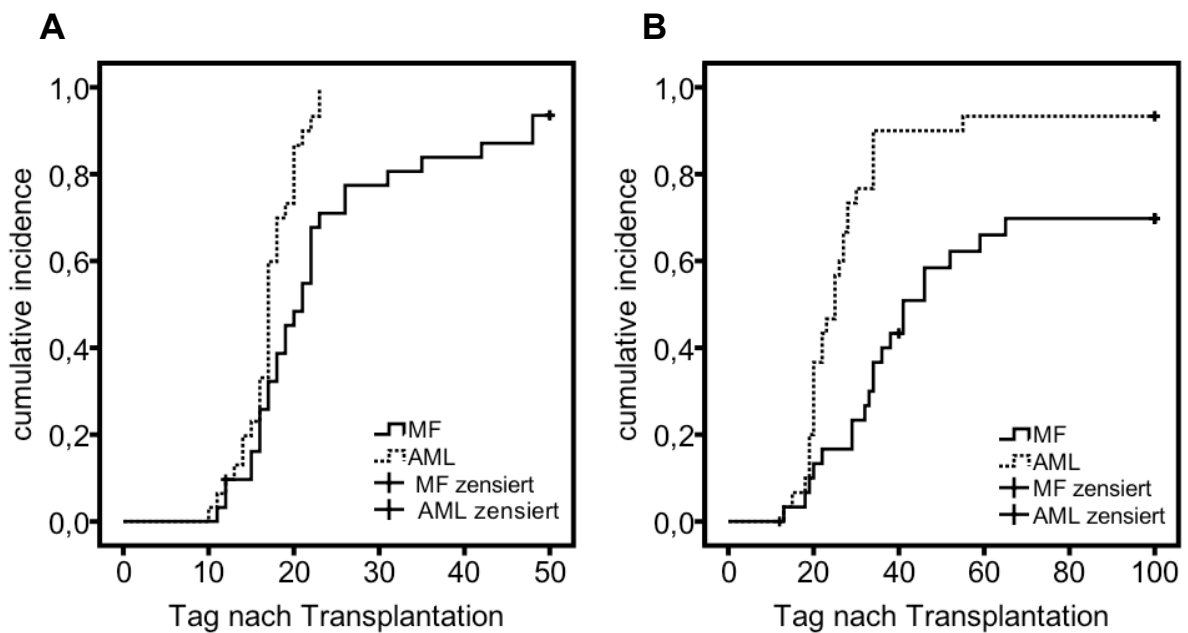
Die Spenderauswahl erfolgte nach immungenetischen Analysen der Genorte HLA-A, -B, -C, -DRB1 und -DQB1 bei Spender und Patient, wobei für 8 der MF Patienten und für 4 der AML Patienten HLA-kompatible Familienspender gefunden werden konnten. Weiterhin wurden bei 16 MF Patienten und 18 AML Patienten nicht verwandte Spender mit HLA-Kompatibilität in den 10 untersuchten Genloci gefunden. 7 MF und 9 AML Patienten erhielten Transplantate von nicht verwandten Spendern mit partieller Übereinstimmung der untersuchten HLA-Merkmale.

### 3.1.3 Engraftment

Die Ergebnisse der Daten bezüglich des Neutrophilen als auch des Thrombozyten Engraftments sind im Folgenden in Form von Kurven nach Kaplan-Meier-Schätzungen angegeben, wobei die kumulative Inzidenz, d.h. die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten des Ereignis „Engraftment“ gegenüber der Zeit aufgetragen ist. Die Patienten, die bereits vor Ende des Untersuchungszeitraumes ohne Eintreten eines Ereignisses ausgeschieden sind, wurden zensiert, d.h. sie wurden in der Berechnung der Inzidenz bis zu diesem Zeitpunkt mitberücksichtigt und für die weiteren Zeitpunkte ausgeschlossen.

### 3.1.3.1 Neutrophilen Engraftment

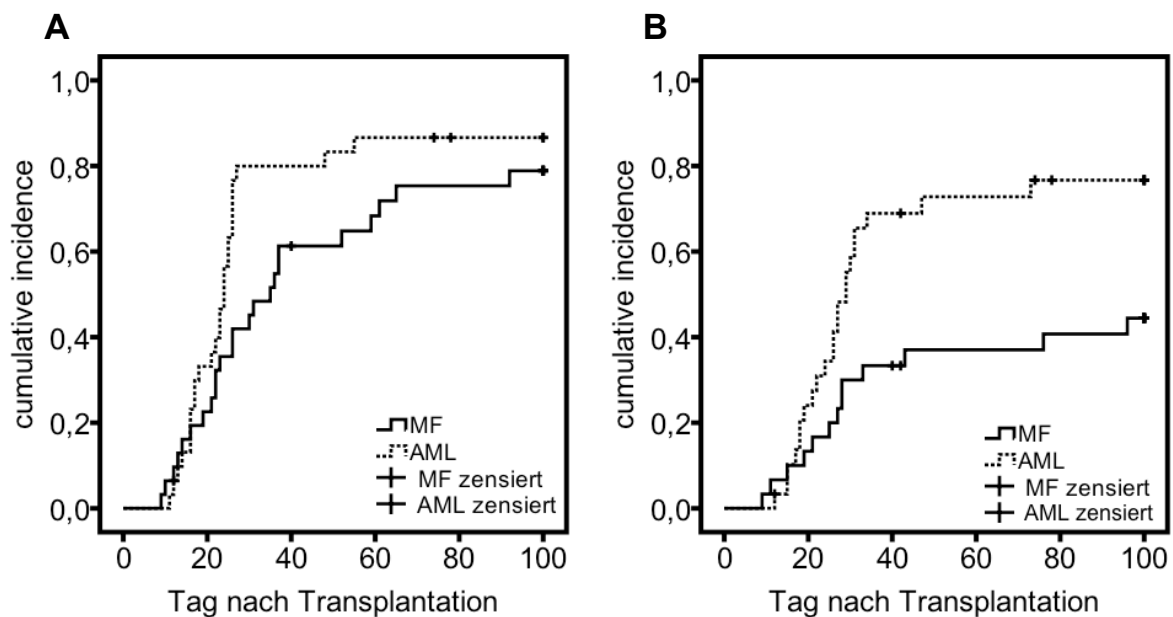
Die frühe Regeneration der neutrophilen Granulozyten ( $ANC > 0,5 \times 10^9/L$ ) bei Patienten mit MF wurde im Mittel an Tag 23 (Spanne 11-48 Tage) und bei Patienten mit AML an Tag 17 (Spanne 10-23 Tage) erreicht. In Abb. 3A ist die kumulative Inzidenz des frühen Engraftments dargestellt, wobei sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Erkrankungen zeigt ( $p < 0,01$ ). MF Patienten erreichten das späte Neutrophilen Engraftment ( $ANC > 2 \times 10^9/L$ ) im Durchschnitt an Tag 35 (Spanne 13-65 Tage) und AML Patienten an Tag 25 (Spanne 12-55 Tage). Die kumulative Inzidenz eines verzögerten Engraftments zeigte sich mit 30% bei MF Patienten deutlich höher als bei Patienten mit AML (7%) ( $p < 0,01$ ).



**Abb. 3 Kumulative Inzidenz des frühen (A) und späten (B) Neutrophilen Engraftments**  
Sowohl das frühe als auch das späte Neutrophilen Engraftment bei MF Patienten zeigen einen signifikant verzögerten Verlauf im Vergleich zu AML Patienten ( $p < 0,01$ )

### 3.1.3.2 Thrombozyten Engraftment

Die durchschnittliche Dauer bis zum Erreichen der Schwelle des frühen Thrombozyten Engraftments ( $\text{Plt} > 20 \times 10^9/\text{L}$ ) betrug 31 Tage (Spanne 9-92 Tage) bei den MF Patienten und 23 Tage (Spanne 11-55 Tage) bei Patienten mit AML. In der Kaplan-Meier-Analyse zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Erkrankungen ( $p=0,09$ ; Abb. 4A). Das späte Thrombozyten Engraftment wurde bei den MF im Mittel nach 33 Tagen (Spanne 11-96 Tage) und bei AML Patienten nach 27 Tagen (Spanne 12-73 Tage) erreicht. Die kumulative Inzidenz eines verzögerten späten Thrombozyten Engraftments zeigte sich mit 56% bei MF Patienten deutlich höher als bei Patienten mit AML (23%) ( $p=0,01$ ; Abb. 4B).



**Abb. 4 Kumulative Inzidenz des frühen (A) und späten (B) Thrombozyten Engraftments**

Das frühe als Thrombozyten Engraftment bei MF Patienten zeigte keinen signifikant verzögerten Verlauf im Vergleich zu AML Patienten ( $p=0,09$ ), hingegen bestand beim späten Thrombozyten Engraftment ein signifikanter Unterschied im Verlauf ( $p=0,01$ )

### 3.1.3.3 Graft failure

Ein GF trat nur bei Patienten mit MF auf. Ein primäres GF ereignete sich bei 2 (6%) der MF Patienten, sodass diese an Tag 39 bzw. 106 retransplantiert werden mussten. Bei 5 (16%) der Patienten trat im Verlauf ein sekundäres GF auf. Diesen Patienten wurden erneut PBSZ transfundiert (sog. „stemcell boost“). Eine Übersicht der Patienten mit GF zeigt die Tabelle 4.

<b>Primäres Graft-failure</b>				
	Konditionierung	HLA-Kompatibilität	ABO-Blutgruppen-differenz	Milzgröße (cm)
Patient # 1	RIC	MNV	ident	> 20
Patient # 2	RIC	MMNV	minor mismatch	11
<b>Sekundäres Graft-failure</b>				
Patient # 1	MAC	MNV	major mismatch	26
Patient # 2	RIC	MNV	major mismatch	40
Patient # 3	RIC	MV	ident	28
Patient # 4	RIC	MNV	major mismatch	20
Patient # 5	RIC	MV	major mismatch	Splenektomie

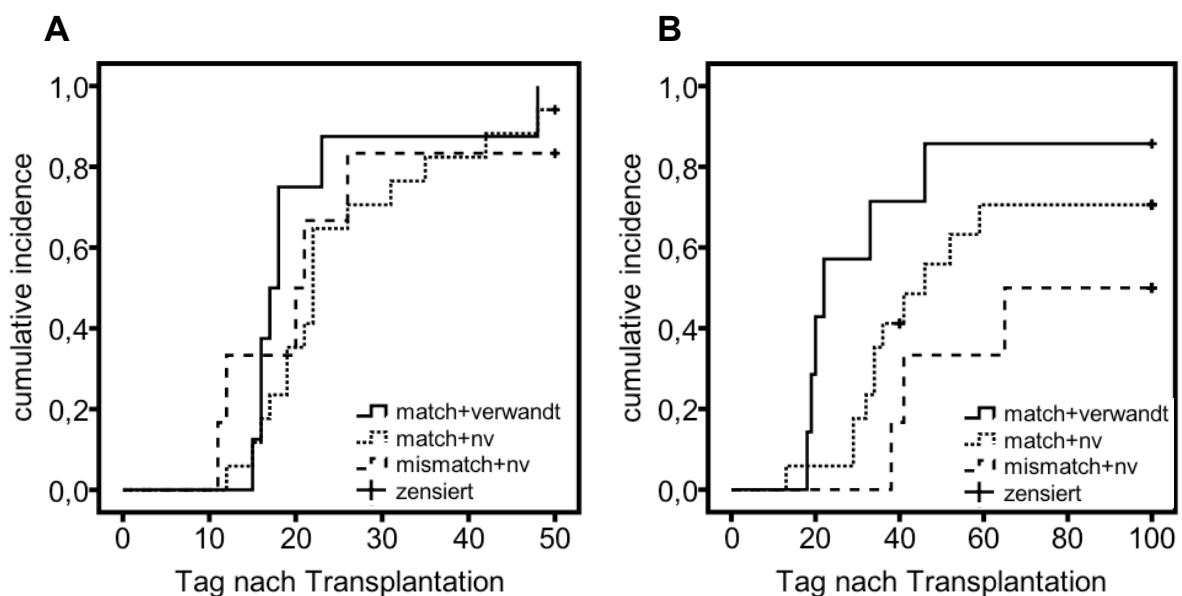
**Tab. 4 Patientencharakteristik von MF Patienten mit primärem bzw. sekundärem GF**  
 MAC: myeloablative conditioning, RIC: reduced-intensity conditioning, MV: matched verwandt, MNV: matched nicht verwandt, MMNV: mismatched nicht verwandt

### 3.1.4 Analyse von Engraftment beeinflussenden Faktoren

#### 3.1.4.1 HLA-Kompatibilität

Zunächst wurde der Einfluss der HLA-Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger auf das Neutrophilen und Thrombozyten Engraftment bei Patienten mit MF (Abb.5) und AML (Abb.6) untersucht.

Bei der Analyse der Auswirkung der HLA-Kompatibilität auf das Neutrophilen Engraftment zeigte sich weder für den Zeitpunkt des frühen, noch für den Zeitpunkt des späten Engraftments ein signifikanter Unterschied in den untersuchten Gruppen. Für das späte Engraftment ist jedoch ein eindeutiger Trend zu schnellerem Engraftment bei verwandten HLA-kompatiblen Transplantationen ersichtlich (Abb. 5B).

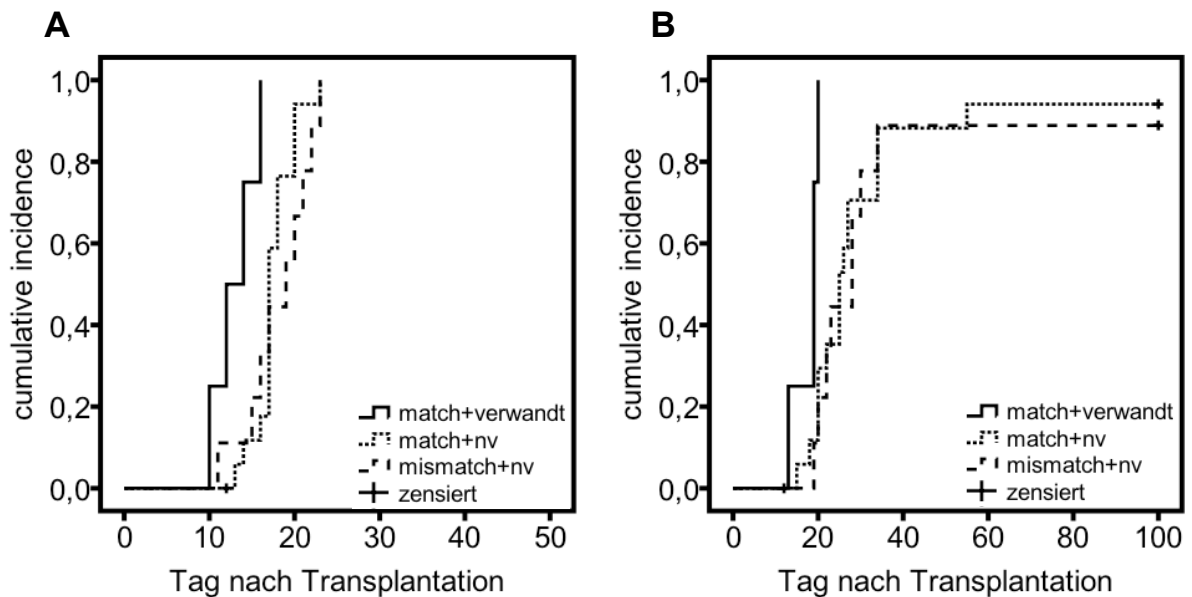


**Abb. 5 Kumulative Inzidenz des frühen (A) und späten (B) Neutrophilen Engraftments in Abhängigkeit von der HLA-Kompatibilität bei Patienten mit MF**

match+nv: HLA-kompatible Transplantation von nicht verwandtem Spender

mismatch+nv: inkomplette Übereinstimmung der HLA-Merkmale bei nicht verwandtem Spender. Es zeigte sich weder für das frühe noch für das späte Engraftment ein signifikanter Unterschied im Vergleich der o.g. Gruppen bei Patienten mit MF. Für das späte Engraftment ist jedoch ein Trend zu schnellerem Engraftment bei verwandten HLA-kompatiblen Transplantationen zu erkennen.

Bei den AML Patienten konnte im log-rank Test ein signifikanter Unterschied sowohl beim frühen ( $p < 0,01$ ), als auch beim späten ( $p < 0,01$ ) Neutrophilen Engraftment festgestellt werden bei Transplantationen von einem verwandten, HLA-kompatiblen Spender gegenüber nicht verwandten bzw. nicht vollständig HLA-kompatiblen Spendern.



**Abb. 6 Kumulative Inzidenz des frühen (A) und späten (B) Neutrophilen Engraftments in Abhängigkeit von der HLA-Kompatibilität bei Patienten mit AML**

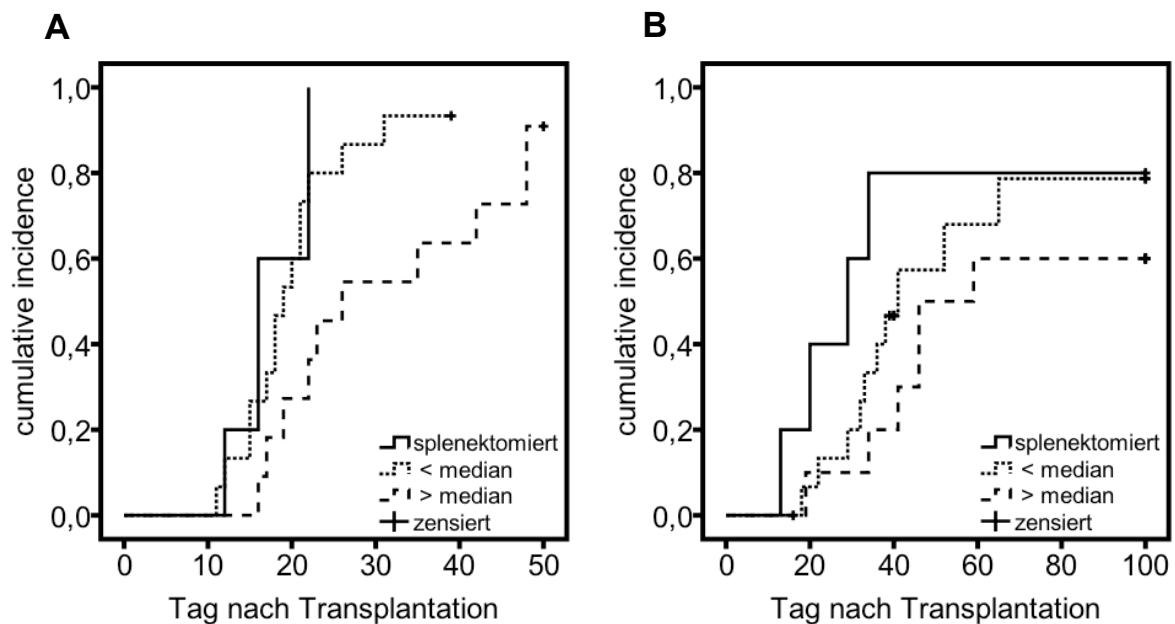
match+nv: HLA-kompatible Transplantation von nicht verwandtem Spender

mismatch+nv: inkomplette Übereinstimmung der HLA-Merkmale bei nicht verwandtem Spender. Es zeigte sich sowohl für das frühe, als auch für das späte Engraftment ein signifikanter Unterschied im Vergleich der o.g. Gruppen bei Patienten mit AML ( $p < 0,01$ ).

### 3.1.4.2 Milzgröße

Als weiterer Risikofaktor wurde der Einfluss der Milzgröße auf das Neutrophilen und Thrombozyten Engraftment untersucht.

Sowohl Patienten, die vor der Transplantation splenektomiert wurden, als auch die Patientengruppe mit einer Milzgröße die kleiner als der Median war (21cm im Durchmesser), zeigten im Vergleich zu den Patienten mit stark vergrößerter Milz (>Median) ein signifikant früheres Engraftment ( $p=0,01$  bzw.  $p=0,03$ ). Für das späte Engraftment konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der Milzgröße nachgewiesen werden. Es zeigte sich jedoch ein Trend zu früherem Engraftment bei splenektomierten Patienten im Vergleich zu Patienten mit stark vergrößerter Milz ( $p=0,1$ ).

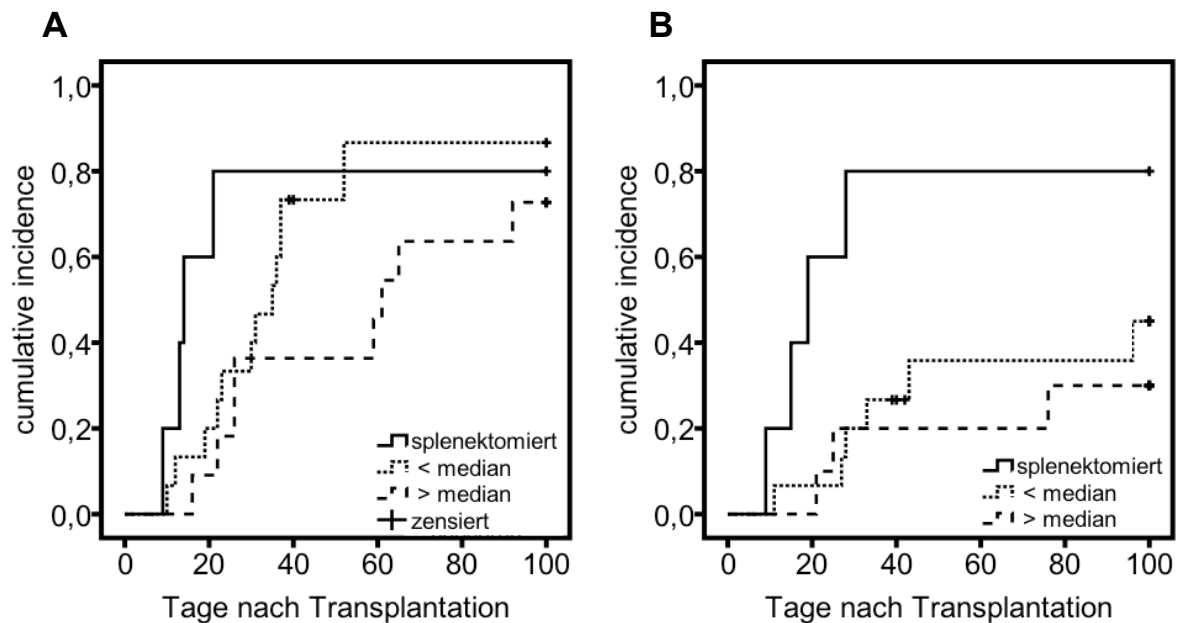


**Abb.7 Kumulative Inzidenz des frühen (A) und späten (B) Neutrophilen Engraftments in Abhängigkeit von der Milzgröße bei Patienten mit MF**

Das frühe Neutrophilen Engraftment zeigte einen signifikant verzögerten Verlauf bei Patienten mit stark vergrößerter Milz im Vergleich zu splenektomierten Patienten. Das späte Neutrophilen Engraftment zeigte keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Milzgröße

Bei der Analyse des der Auswirkung der Milzgröße auf das frühe Thrombozyten Engraftment zeigte sich lediglich ein Trend ( $p=0,1$ ) im Vergleich sowohl der splenektomierten Patienten, als auch der Patienten mit kleinerer Milz zu den

Patienten mit stark vergrößerter Milz. Für das späte Thrombozyten Engraftment konnte kein Unterschied bezüglich der Milzgröße nachgewiesen werden. Hingegen ergab sich ein signifikanter Unterschied in der kumulativen Inzidenz zwischen den splenektomierten Patienten und den Patienten mit leicht bzw. stark vergrößerter Milz ( $p=0,03$  bzw.  $p=0,02$ ).



**Abb. 8 Kumulative Inzidenz des frühen (A) und späten (B) Thrombozyten Engraftments in Abhängigkeit von der Milzgröße bei Patienten mit MF**

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied im frühen Thrombozyten Engraftment hinsichtlich der Milzgröße, beim späten Thrombozyten Engraftment stellte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den splenektomierten Patienten und den Patienten mit sowohl geringgradiger als auch höhergradiger Splenomegalie heraus ( $p=0,03$  bzw.  $p=0,02$ )

Die Milzgröße im kurzfristigen Verlauf nach der Transplantation wurde bei 19 Patienten dokumentiert und konnte ausgewertet werden. Der Zeitraum der Untersuchung fand in einem Zeitraum von 2-4 Monaten nach Transplantation statt. Durchschnittlich zeigte sich eine Größenregredienz von 5,4 cm (Spanne 0,3-13 cm).

### 3.1.4.3 Weitere untersuchte Faktoren

Es wurden weitere Faktoren untersucht wie das Patientenalter, die Blutgruppendifferenz zwischen Spender und Empfänger, die Anzahl an transfundierten  $CD34^+$  Zellen sowie das Auftreten einer GvHD mit der Fragestellung,

ob diese Faktoren ein verzögertes oder fehlendes Engraftment bewirken können. Bei den MF Patienten wurden zusätzlich der Grad der Fibrose und die Anzahl an peripheren Blasten vor Transplantation auf den Zusammenhang mit dem verzögerten Engraftment untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab.5 zusammengestellt. Es ergab sich für keinen der untersuchten Faktoren eine signifikante Auswirkung auf das frühe oder das späte Engraftment.

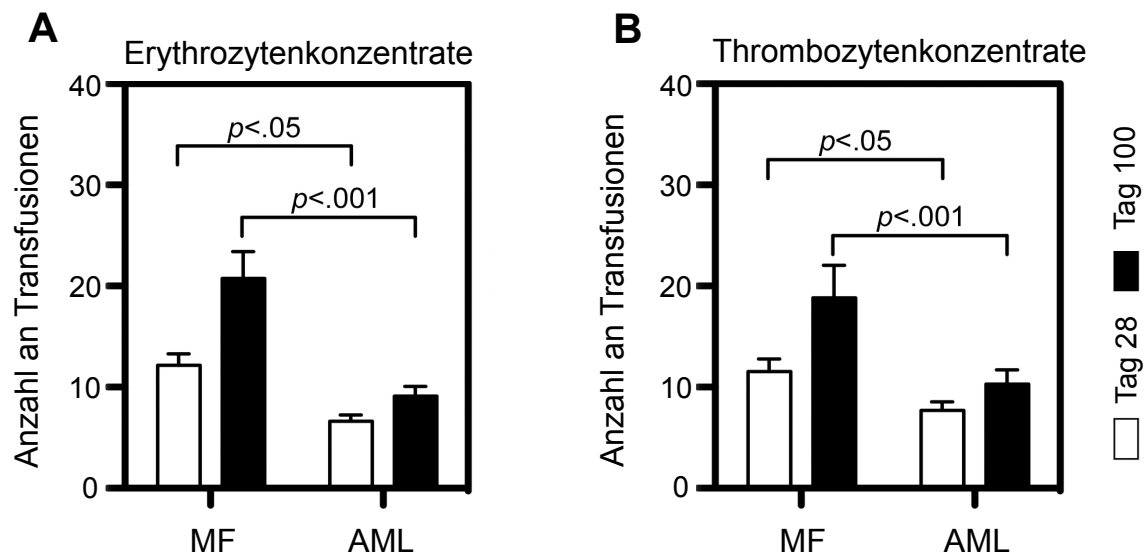
	MF		AML	
	Frühes Engraftment	Spätes Engraftment	Frühes Engraftment	Spätes Engraftment
Patientenalter >55 Jahre vs. < 55 Jahre	0,15	0,69	0,38	0,39
ABO Blutgruppendifferenz	0,54	0,88	0,63	0,43
Anzahl transfundierter Zellen <6 x 10 <sup>6</sup> vs. >6 x 10 <sup>6</sup> pro kg KG	0,08	0,84	0,88	0,45
Knochenmarkfibrose (nach Bauermeister)	0,23	0,18	n.a.	n.a.
Anzahl peripherer Blasten <1% vs. 1-10% vs. >10%	0,54	0,9	n.d.	n.d.
GvHD keine vs. aufgetreten	0,74	0,06	0,22	0,76
GvHD Grad I / II vs. Grad III / IV	0,37	0,12	0,14	0,41

**Tab. 5 Weitere untersuchte Parameter und deren Zusammenhang mit der Dauer des Engraftments**

Werte geben die p-Werte an im Vergleich der Gruppen untereinander. (Ermittelt mit dem log-rank-test)

### 3.1.5 Transfusionsbedarf

Das verzögerte Engraftment spiegelt sich auch in dem erhöhten Bedarf an Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentraten wider. Der durchschnittliche Bedarf an Transfusionen war sowohl an Tag 28 als auch an Tag 100 bei MF Patienten signifikant höher als bei Patienten mit AML ( $12,2 \pm 1,1$  und  $20,7 \pm 2,7$  vs.  $6,6 \pm 0,6$  und  $9,1 \pm 1,0$ ;  $p < 0,05$ ). Auch zeigte sich ein signifikant höherer Bedarf an Thrombozytenkonzentraten bei Patienten mit MF im Verlauf nach der Transplantation ( $11,5 \pm 1,3$  und  $18,8 \pm 3,2$  vs.  $7,7 \pm 0,8$  und  $10,3 \pm 1,4$ ;  $p < 0,05$ )



**Abb. 9 Anzahl an transfundierten Erythrozyten- (A) bzw. Thrombozytenkonzentraten (B) bei Patienten mit MF und AML bis Tag 28 und Tag 100 nach Transplantation**

Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  SD

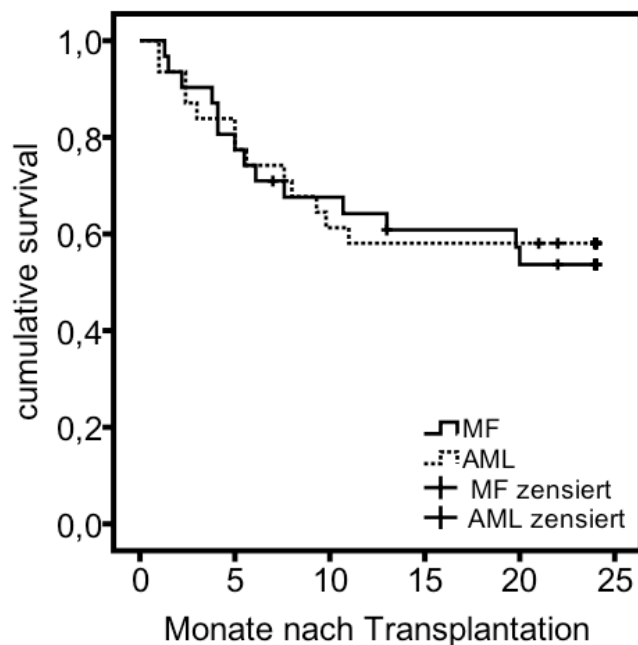
Der durchschnittliche Bedarf an Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentraten war sowohl an Tag 28 als auch an Tag 100 nach Transplantation bei MF Patienten signifikant höher als bei Patienten mit AML ( $p < 0,05$ ).

### 3.1.6 Gesamtüberleben und Mortalität

Der Verlauf der Patienten wurde in einem Zeitraum von 24 Monaten nach Transplantation ausgewertet und es ergab sich ein 2-Jahres-Gesamtüberleben (Overall-survival, OS) von 54% (95% CI, 36-72) bei den Patienten mit MF und 58% (95% CI, 41-76) bei Patienten die aufgrund einer AML transplantiert wurden (Abb.10).

Insgesamt sind 14 MF Patienten in den ersten 2 Jahren nach der Transplantation verstorben, wobei ein Patient nach primärem GF verstarb, 7 Patienten an Infektionen, 1 Patient an diffuser Lungenblutung, 2 Patienten an Organversagen, 2 Patienten an GvHD und 1 Patient am Rezidiv und Übergang in eine AML. In der Gruppe der AML Patienten verstarben insgesamt 13 Patienten im Verlauf der ersten zwei Jahre. 6 Patienten verstarben in Folge eines Rezidivs, 3 Patienten an GvHD, 3 Patienten an Organversagen und 1 Patient an einer Infektion.

Die NRM nach zwei Jahren betrug bei MF Patienten 42% (95% CI, 18-60) und lag bei den AML Patienten bei 23% (95% CI, 7-40).



**Abb. 10 Overall survival der Patienten mit MF und AML bei einem Beobachtungszeitraum von 2 Jahren**  
Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich der o.g. Gruppen.

## 3.2 Experimentelle Daten

### 3.2.1 Messung der Clearance von Stammzellen aus dem PB nach Transplantation

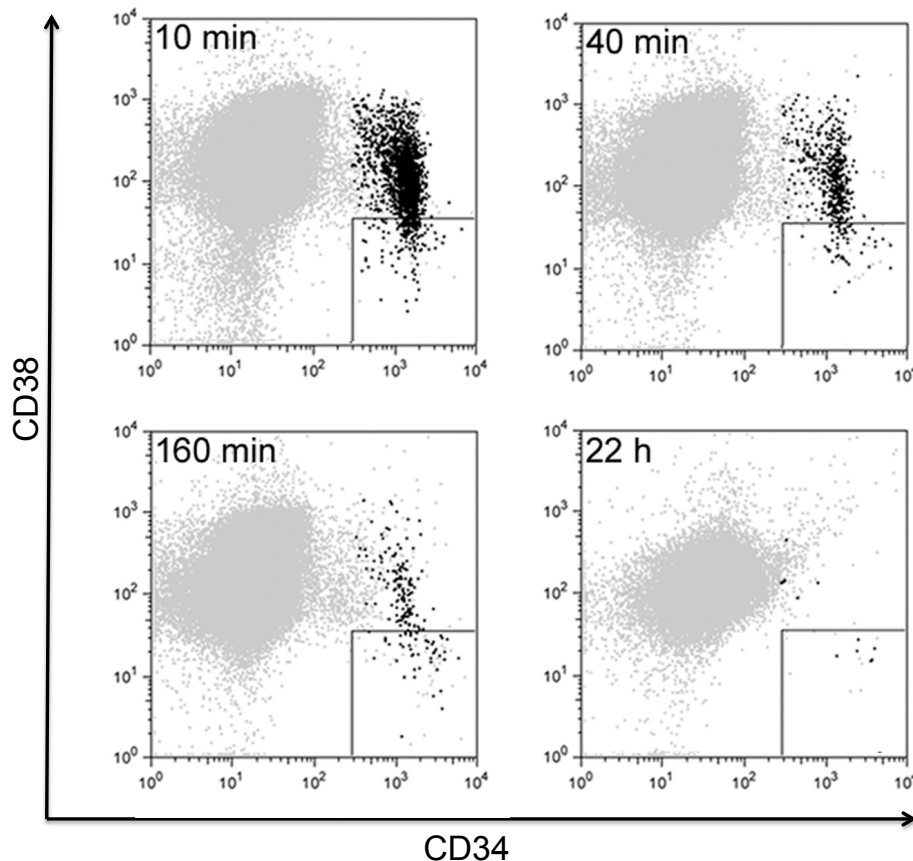
Es wurden jeweils 5 Patienten mit MF und AML analysiert, welche zuvor mit einem auf Fludarabin basierendem RIC-Regime konditioniert wurden. Je 4 Patienten erhielten ihr Transplantat von unverwandten, HLA-kompatiblen Spendern. Ein MF Patient wurde nicht vollständig kompatibel transplantiert und ein AML Patient erhielt das Transplantat von einem HLA-kompatiblen Geschwisterspender. Das mediane Alter der Patienten mit MF betrug zum Zeitpunkt der Transplantation 64 Jahre (47-71,  $\bar{x}$  60 Jahre) und das der Patienten mit AML 48 Jahre (38-61,  $\bar{x}$  49 Jahre).

MF	Alter (Jahre)	Ge-schlecht	Gewicht (kg)	Dauer der Tx (min)	Anzahl transfundierter Zellen x 10 <sup>6</sup> /kgKG	Milz-größe (cm)
# 1	71	M	86	47	4,35	19
# 2	48	M	90	10	5,7	23,3
# 3	64	M	80	50	8,03	15
# 4	50	W	60	20	8,02	19
# 5	68	W	60	84	7,6	17
<b>AML</b>						
# 1	38	W	76	40	6,07	11,6
# 2	47	M	74	60	4,32	15,3
# 3	61	M	72	35	7,6	n.a.
# 4	54	W	67	60	4,59	13,5
# 5	43	M	71	47	7,49	9

**Tab. 6 Übersicht über Transplantationsdaten bezüglich der Messung der Clearance von CD34<sup>+</sup> und CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> Zellen aus dem PB bei Patienten mit MF und AML**

Um das Homing-Verhalten zu untersuchen, wurden bei den Patienten kurz vor der Transplantation sowie zu definierten Zeitpunkten danach die Anzahl an CD34<sup>+</sup> und CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> Zellen im PB bestimmt.

Abb. 11 zeigt repräsentativ die FACS-Profile eines Patienten über den zeitlichen Verlauf.



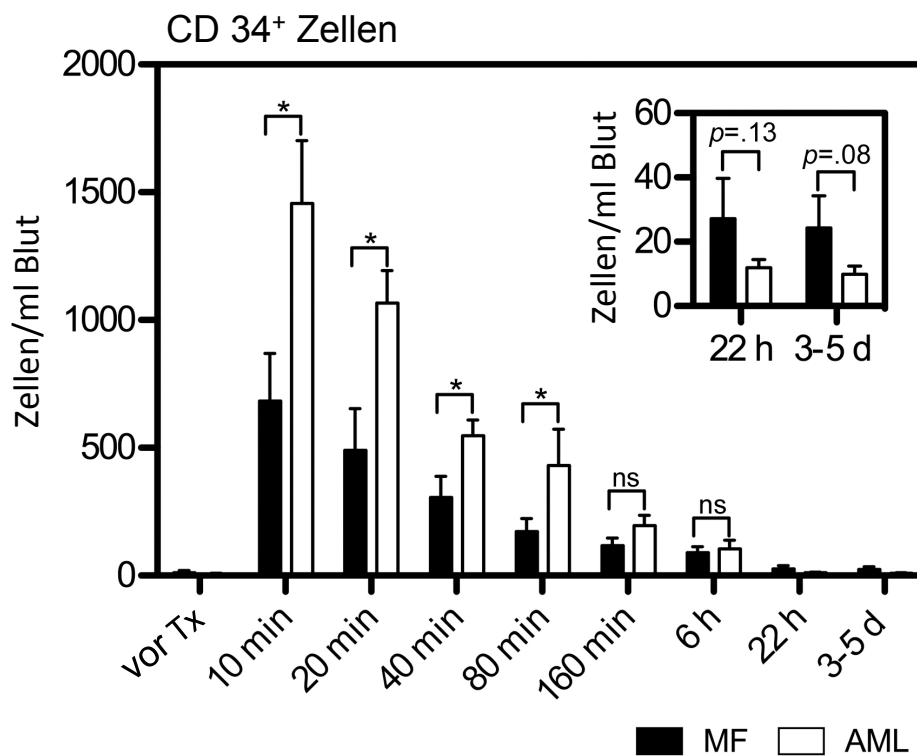
**Abb. 11 FACS Profile zur Darstellung des zeitlichen Verlaufs der CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> Zellen im PB zu definierten Zeitpunkten nach Transplantation**

Dargestellt sind die Ergebnisse der FACS-Messung in Form von dotplots von vier ausgewählten Zeitpunkten der Verlaufsmessung eines Patienten. Deutlich wird hierbei die rasche Abnahme der Zahl von im PB zirkulierenden CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> Zellen im zeitlichen Verlauf.

### 3.2.1.1 Clearance der CD34<sup>+</sup> Zellen aus dem PB

Abb. 12 zeigt die Ergebnisse aller Verlaufsmessungen der CD34<sup>+</sup> Zellen. Bereits nach 40 min waren mehr als 75% der transplantierten Zellen nicht mehr im PB nachweisbar. Es zeigte sich jedoch eine signifikant unterschiedliche Anzahl an Zellen zwischen den beiden Erkrankungen zugunsten der AML in der frühen Phase nach

der Transplantation. So zirkulierten nach 10, 20 und 40 min  $1475 \pm 244$ ,  $1066 \pm 127$  und  $456 \pm 61$   $CD34^+$  Zellen/ml Blut bei Patienten mit AML, bei Patienten mit MF hingegen  $682 \pm 186$ ,  $489 \pm 162$  und  $306 \pm 81$  Zellen zu gleichen Zeitpunkten ( $p < 0,05$ ). Nach 6 Stunden konnte kein Unterschied mehr nachgewiesen werden ( $89 \pm 23$  Zellen/ml bzw.  $103 \pm 35$  Zellen/ml,  $p > 0,05$ ) und zu späteren Zeitpunkten kehrte sich das Verhältnis um, mit einem Trend zu mehr zirkulierenden Zellen bei Patienten mit MF. Nach 22 Stunden konnten noch  $27 \pm 12$  bzw.  $11 \pm 2$   $CD34^+$  Zellen/ml und nach 3-5 Tagen  $24 \pm 10$  bzw.  $10 \pm 3$   $CD34^+$  Zellen/ml bei den Patienten mit MF bzw. AML nachgewiesen werden.



**Abb. 12 Messung der Clearance von  $CD34^+$  Zellen aus dem PB nach Transplantation**

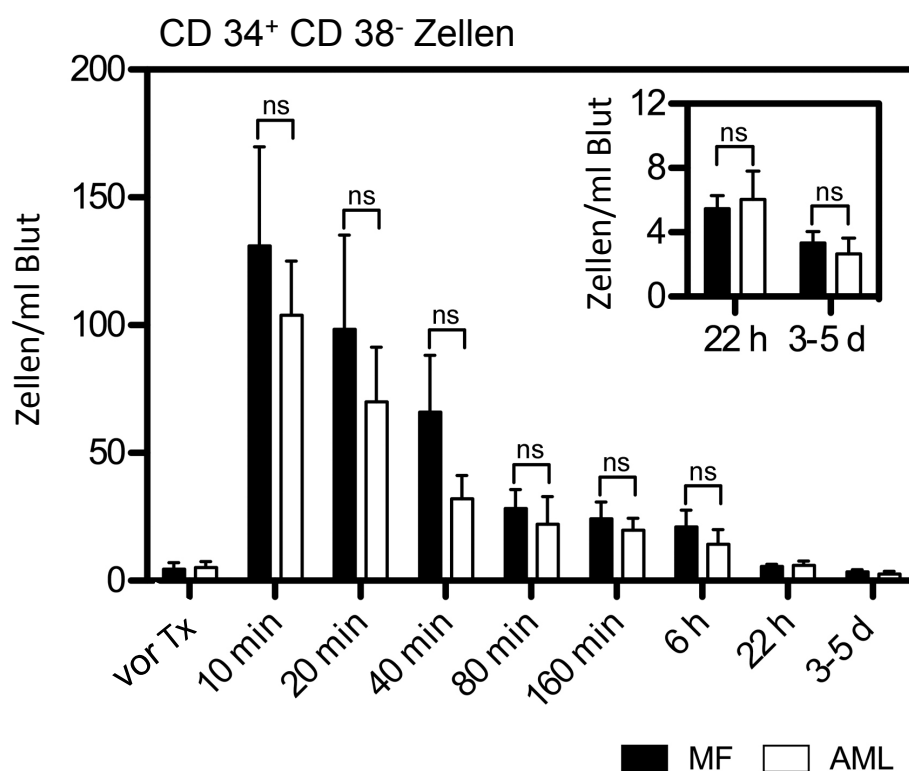
Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  SD, \* $p < 0,05$ , ns: nicht signifikant

Dargestellt sind die gemittelten Ergebnisse aller Verlaufsmessungen der Patienten mit MF sowie mit AML, aufgetragen gegen die Zeitpunkte der Blutentnahme.

Es zeigte sich eine signifikant höhere Anzahl an zirkulierenden  $CD34^+$  Zellen im PB bei Patienten mit AML in der frühen Phase nach der Transplantation. Zu späteren Zeitpunkten kehrte sich das Verhältnis um, mit einem Trend zu mehr zirkulierenden Zellen bei Patienten mit MF.

### 3.2.1.2 Clearance der CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> Zellen aus dem PB

Um die Frage zu klären, ob sich die gleichen Unterschiede im Homing-Verhalten auch bei den unreiferen Vorläuferzellen zeigen, wurde zusätzlich die Anzahl an CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> Zellen im PB der Patienten gemessen (Abb. 13). Verglichen mit der Anzahl der CD34<sup>+</sup> Zellen, zeigte sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen, lediglich ein Trend zu höheren Zellzahlen an früheren Zeitpunkten. Es ließ sich zudem nachweisen, dass nach 10, 20 und 40 Minuten der Anteil an CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> Zellen an der Gesamtanzahl an CD34<sup>+</sup> Zellen etwa 3,5 fach höher bei Patienten mit MF gegenüber AML Patienten war.



**Abb. 13 Messung der Clearance von CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>Zellen aus dem PB nach Transplantation**

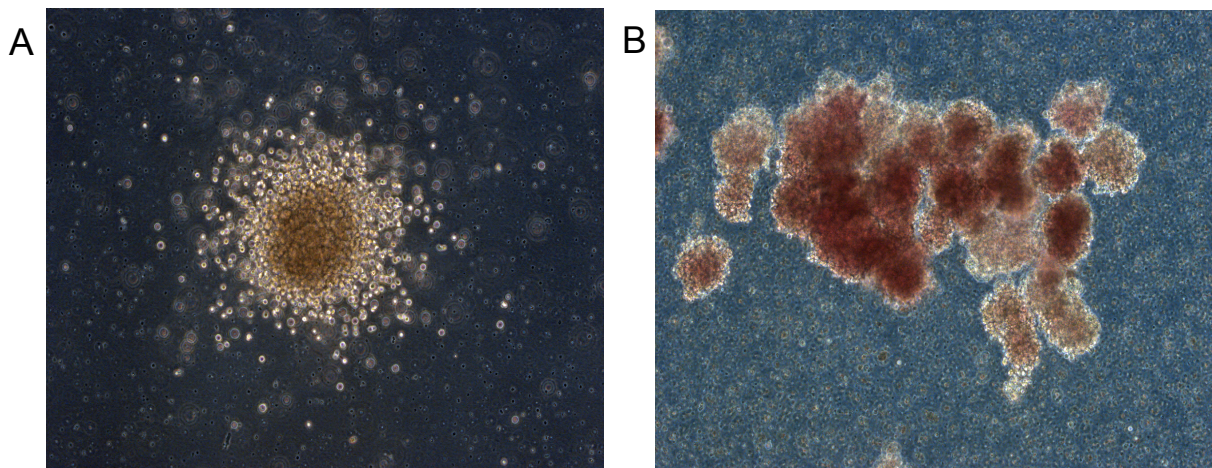
Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  SD, ns: nicht signifikant

Dargestellt sind die gemittelten Ergebnisse aller Verlaufsmessungen der Patienten mit MF, sowie der Patienten mit AML, aufgetragen gegen die Zeitpunkte der Blutentnahme.

Es zeigte sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen, lediglich ein Trend zu einer höheren Anzahl an zirkulierenden CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> Zellen zu früheren Zeitpunkten.

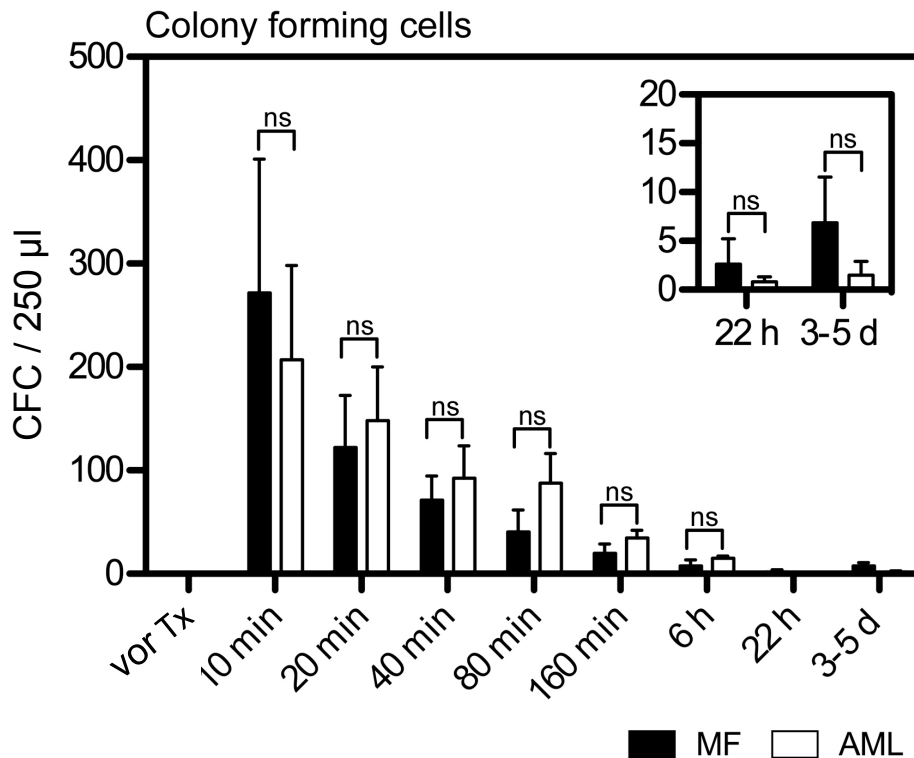
### 3.2.2 Colony forming cells (CFC) assay

Da die Anzahl an CD34 und CD38 exprimierenden Zellen nur eine eingeschränkte Aussage bezüglich des biologischen Potenzials der SZ zulässt, wurde die Anzahl an koloniebildenden Zellen mit Hilfe eines CFC Assays bestimmt. In Abb. 14 sind exemplarisch zwei Kolonien der CFC Assays nach zweiwöchiger Inkubation abgebildet. Abb. 15 zeigt die Ergebnisse der mikroskopisch ausgezählten und über alle Patienten gemittelten Zellkulturen. Wie bereits bei der Auswertung der Clearance von CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> Zellen, zeigte sich auch hier zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen. Zu späteren Zeitpunkten nach der Transplantation zeigt sich jedoch ein Trend zu einer höheren Anzahl an CFC im PB von Patienten mit MF.



**Abb. 14 Lichtmikroskopische Bilder von Zellkolonien eines CFC Assays.**

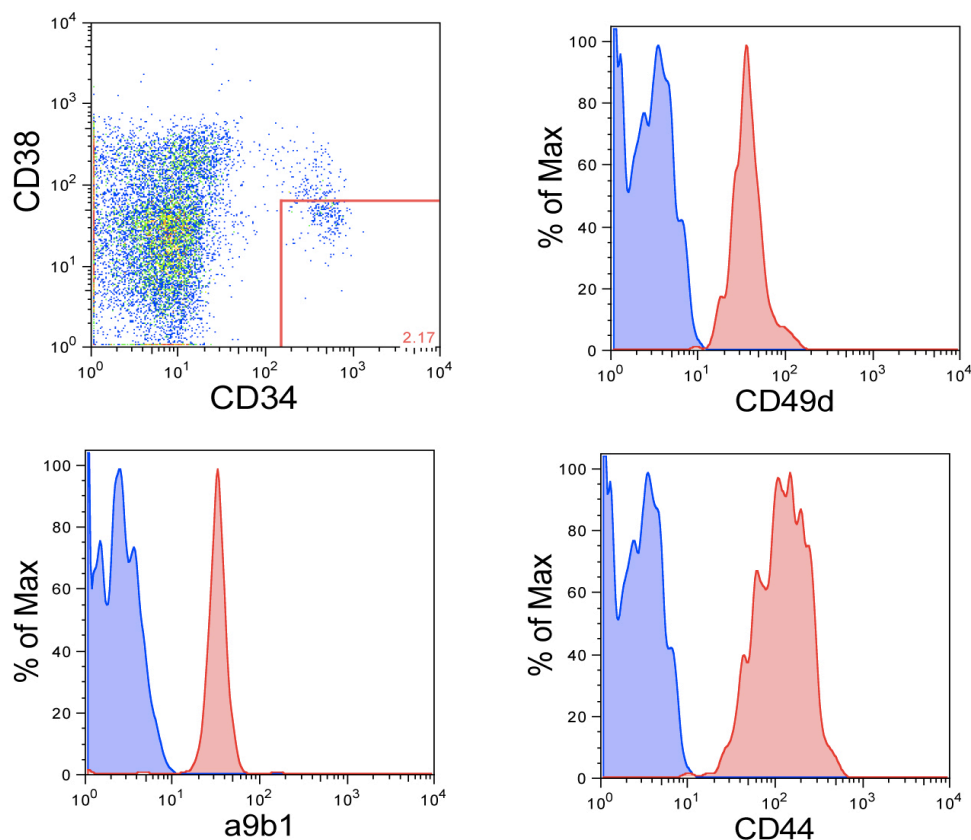
Dargestellt ist ein Beispiel aus der weißen Zellreihe (A: GM-CFU, granulocyte-macrophage colony forming unit) und der roten Zellreihe (B: E-BFU, erythroid burst-forming unit) eines CFC Assays nach zweiwöchiger Inkubation.



**Abb. 15 Auszählung von Zellkolonien nach zweiwöchiger Inkubation der CFC Assays**  
 Dargestellt sind die gemittelten Ergebnisse der Auszählung von Zellkolonien der CFC Assays der Patienten mit MF, sowie der Patienten mit AML, aufgetragen gegen die Zeitpunkte der Blutentnahme. Es zeigte sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen.

### 3.2.3 Analyse von OPN Rezeptoren auf Stammzellen aus dem PB

Das erfolgreiche Homing und Lodgement der transplantierten SZ wird ermöglicht durch die Expression bestimmter Adhäsionsmoleküle auf den Endothelzellen sowie bestimmter Knochenmatrixproteine, wie unter anderem dem OPN. OPN findet sich vor allem im Endost und wird von Osteoblasten und Osteoklasten im KM gebildet. Um das OPN wiederum binden zu können, bedarf es der Expression der Integrine  $\alpha_9\beta_1$ ,  $\alpha_4\beta_1$  (CD49d) und CD44 auf der Oberfläche der HSZ. Das Ergebnis der durchflusszytometrischen Messung dieser Oberflächenmoleküle zeigt Abb. 16 exemplarisch anhand eines Patienten. Insgesamt konnte auf mehr als 99% der  $CD34^+$  und  $CD34^+CD38^-$  Zellen die Expression von CD44 und CD49d nachgewiesen werden. Weiterhin exprimieren  $93.6 \pm 3\%$  der  $CD34^+$  Zellen und  $87.5 \pm 6\%$  der  $CD34^+CD38^-$  Zellen das Integrin  $\alpha_9\beta_1$ .



**Abb. 16 Expression von OPN Rezeptoren auf PBSZ**

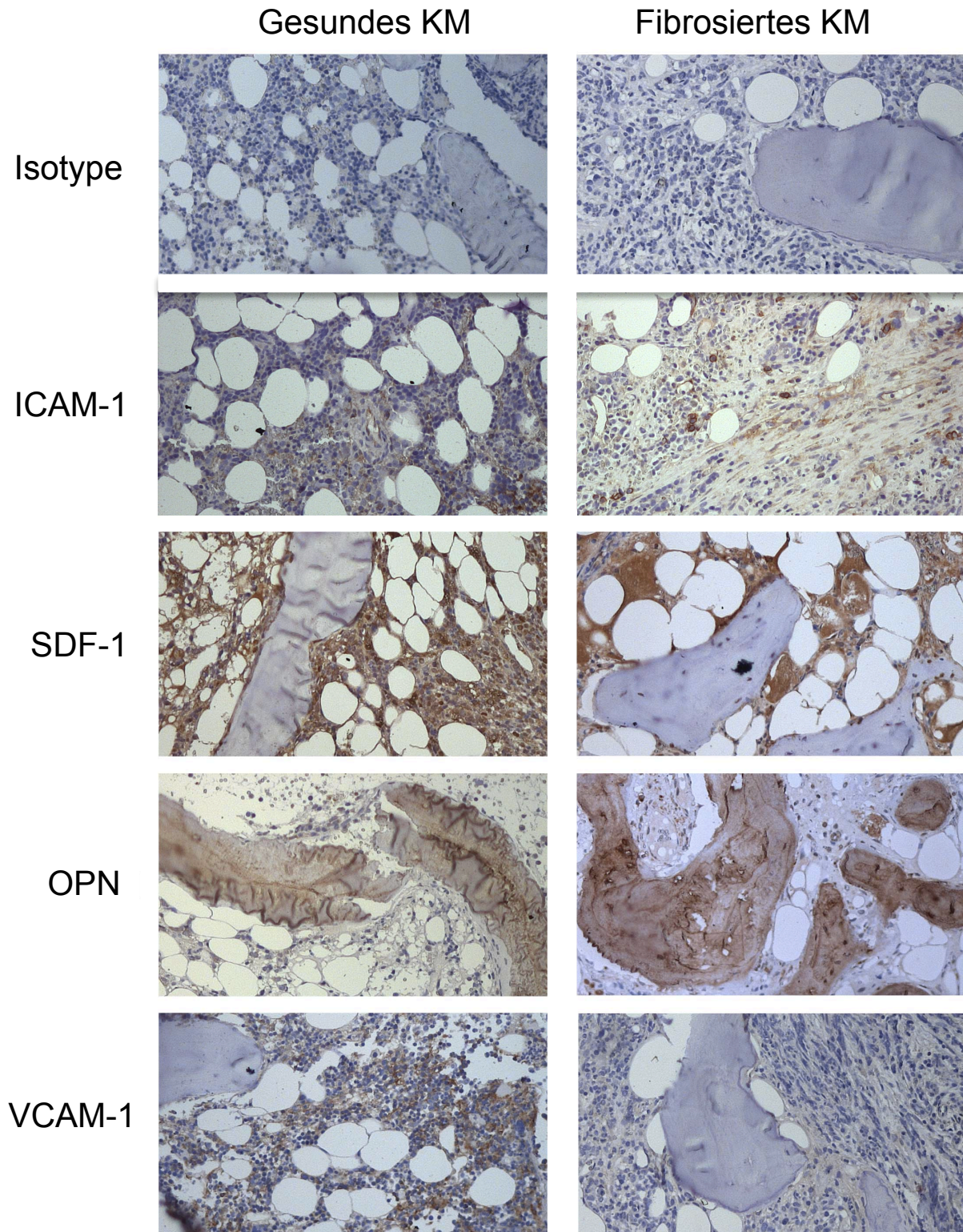
Dargestellt ist die mittels durchflusszytometrischer Analyse gemessene Expression der OPN Rezeptoren  $\alpha_9\beta_1$ ,  $\alpha_4\beta_1$  (CD49d) und CD44 auf HSZ eines gesunden Spenders.

### 3.2.4 Immunhistochemische Färbungen

Wie bereits unter Punkt 1.4 beschrieben, bedarf es für ein erfolgreiches Homing zunächst der Interaktion der zirkulierenden HSZ mit den Endothelzellen der Gefäße im KM. Dies wird ermöglicht durch die Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und VCAM -1 auf den Endothelzellen, welche an die spezifischen Rezeptoren auf den HSZ binden. Weiterhin müssen für die Rekrutierung und Verankerung der HSZ im KM bestimmte Chemokine wie CXCL12 (SDF-1) und OPN von den Zellen im KM-Stroma exprimiert werden.

Bereits in den Vorversuchen (siehe Punkt 3.2.4) konnte gezeigt werden, dass die für das Homing benötigten OPN Rezeptoren auf den HSZ im PB exprimiert werden. Die immunhistochemischen Färbungen sollten nun die Frage klären, ob sich ein Unterschied zeigt in der Expression von ICAM-1, VCAM-1, CXCL12 und OPN im KM

von Patienten mit MF im Vergleich zu Patienten mit gesunden KM. Abb. 17 zeigt repräsentativ das Ergebnis jeweils einer Färbung an gesundem und an fibrosiertem KM. In der semiquantitativen Auswertung der Schnittpräparate unter dem Mikroskop konnte kein Unterschied in der Expression von ICAM-1, CXCL12 und OPN zwischen den Vergleichsgruppen nachgewiesen werden. Hingegen zeigte sich eine deutlich abgeschwächte Färbung von VCAM-1 in den fibrosierten KM Proben von Patienten mit MF im Vergleich zu gesundem KM.



**Abb. 17 Knochenmarkbiopsien von Patienten mit fibrosierten und nicht fibrosierten KM.** Es wurde mit spezifischen Antikörpern gegen SDF-1, OPN, VCAM-1 und ICAM-1 bzw. der entsprechenden Isotypkontrolle gefärbt und im Durchlichtmikroskop analysiert. Nur bei den Präparaten die mit anti-VCAM-1 AK gefärbt wurden zeigte sich ein deutlicher Unterschied in der Expression zwischen fibrosierten und nicht-fibrosierten KM.

## 4. Diskussion

Die allogene SZT stellt für Patienten mit MF bisher den einzigen kurativen Therapieansatz dar. Bei einem Teil der Patienten kommt es zu einem verzögerten Anwachsen (Engraftment) der transplantierten HSZ im KM und in einigen Fällen sogar zu einem Versagen des Transplantats (Graft failure), was zu der nicht unerheblichen Morbidität und transplantations-assoziierten Mortalität dieser Therapie beiträgt. In der Klinik und Poliklinik der Inneren Medizin III wurde besonders bei Patienten mit MF eine Verzögerung des Engraftments und ein vermehrtes GF nach Transplantation beobachtet. Durch eine Gegenüberstellung des Patientenkollektivs von MF Patienten mit einer Vergleichsgruppe von Patienten mit AML konnte diese klinische Beobachtung im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. So zeigten sich sowohl beim frühen als auch beim späten Neutrophilen Engraftment signifikante Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen. Weiterhin konnte bei den Thrombozytenzahlen ein Trend zu langsamerer Regeneration und im Verlauf ein signifikanter Unterschied beim späten Thrombozyten Engraftment bei Patienten mit MF im Vergleich zur AML beobachtet werden. Generell trat ein GF nur bei Patienten mit MF auf. Ein primäres GF ereignete sich bei 2 (6%) der MF Patienten und bei 5 (16%) kam es im Verlauf zu einem sekundären GF. In einer großen Multicenterstudie von Olsen et al. wurden die Ergebnisse der SZT verschiedener hämatologischer Erkrankungen eingeschlossen, wobei lediglich bei 0,6% der Patienten ein primäres GF und bei 5% der Patienten ein sekundäres GF auftrat.<sup>28</sup> Hingegen zeigten mehrere Arbeiten, welche nur Patientengruppen untersuchten, die aufgrund einer MF eine SZT erhielten, eine deutlich häufigere Inzidenz für das Auftreten eines GF von >10%.<sup>29 30</sup>

Als eine mögliche Ursache wurde bereits mehrfach ein Zusammenhang zwischen dem GF und der HLA-Kompatibilität von Spender und Empfänger beschrieben.<sup>28,23</sup> In den bisherigen Arbeiten wurde der Verlauf nach allogener SZT bei verschiedenen hämatologischen Erkrankungen untersucht, wobei sich jeweils das beste outcome bei HLA-kompatiblen Geschwisterspendern zeigte. Bei Transplantationen von nicht verwandten Spendern ist das outcome umso schlechter, je größer die Anzahl der

Fehlpaarungen bezüglich der Genloci ist. Der jeweilige Einfluss der einzelnen HLA-Genloci konnte jedoch bisher nicht eindeutig geklärt werden. In einer aktuellen prospektiven Multicenter-Studie zur SZT bei MF wurden die Patienten in zwei Gruppen unterteilt in Abhängigkeit davon, ob sie mit dem Stammzellspender verwandt oder nicht verwandt waren. Primäres GF wurde bei 3% der verwandten und bei 24% der nicht-verwandten Patienten beobachtet, sekundäres GF bei 3% bzw. 12% der Patienten.<sup>50</sup> Es zeigte sich jedoch bei den nicht-verwandten Transplantationen kein Unterschied zwischen HLA-kompatiblen Spendern und unvollständig kompatiblen Spendern. Auch in der Studie von Robin et al. konnte der Vorteil der HLA-kompatiblen Geschwisterspende gegenüber der inkompatiblen Spende hinsichtlich des Engraftments gezeigt werden.<sup>30</sup> Bei dem Patientenkollektiv, welches in dieser Arbeit analysiert wurde, konnte lediglich ein Trend zu schnellerem Engraftment bei bestehender Verwandtschaft von Spender und Empfänger nachgewiesen werden. Es zeigte sich jedoch kein Unterschied in der Transplantation von nicht verwandten Spendern, die HLA-kompatibel oder unvollständig kompatibel transplantiert wurde. Eine mögliche Ursache hierfür liegt möglicherweise in der Größe der untersuchten Gruppe an Patienten mit MF. Auch wenn bisher der Zusammenhang zwischen dem verzögerten Engraftment und GF in Bezug auf die HLA-Kompatibilität nicht abschließend geklärt werden konnte, ist in Hinblick auf das langfristige outcome nach Transplantation die Übereinstimmung von HLA-Merkmalen zwischen Spender und Empfänger von besonderer Bedeutung. So zeigten Kröger et al, dass sowohl die kumulative Inzidenz der therapiebedingten Mortalität nach einem Jahr signifikant höher war bei Patienten, die mit einem HLA-Mismatch vom unverwandten Spender transplantiert wurden, als auch das Gesamtüberleben nach HLA-Mismatch-Transplantation geringer ist.<sup>25</sup>

Für die MF kennzeichnend ist die teils massive Splenomegalie. Die Sequestration von PBSZ in der vergrößerten Milz bewirkt möglicherweise ein verzögertes Engraftment oder sogar ein GF. Im Rahmen der myeloablativen Konditionierung berichtet eine Studie über ein schnelleres Engraftment bei Patienten, die nach Splenektomie transplantiert wurden.<sup>51</sup> Auch Kröger et al. berichten über die Rolle der Splenektomie vor dosisreduzierter Konditionierung von einen Trend zu rascherem Engraftment.<sup>25</sup> In einer kleineren Studie mit 10 Patienten, wurde die Auswirkung der

Splenomegalie auf das Engraftment untersucht. Bei allen Patienten wurde ein Engraftment der transplantierten Zellen erreicht, es zeigte sich jedoch bei 5 Patienten mit stark vergrößerter Milz ein verzögertes Neutrophilen Engraftment. Weiterhin wiesen 2 der 5 Patienten ein verzögertes Thrombozyten Engraftment auf.<sup>52</sup> In Übereinstimmung dazu zeigte sich bei Analyse der Patienten im Rahmen dieser Arbeit ein signifikante Verzögerung des Engraftments bei Patienten mit stark vergrößerter Milz gegenüber splenektomierten Patienten bzw. Patienten, deren Milz kleiner als der Median waren. Bei der Auswirkung der Milzgröße auf das frühe Thrombozyten Engraftment ließ sich lediglich ein Trend zur Verzögerung bei starker Milzvergrößerung nachweisen. Interessanterweise wurden keine Unterschiede im späten Neutrophilen und Thrombozyten Engraftment bezüglich der Milzgröße gefunden, es zeigte sich jedoch ein Trend zu früherem Engraftment bei splenektomierten Patienten im Vergleich zu Patienten mit stark vergrößerter Milz. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich die deutlich vergrößerte Milz negativ auf das Engraftment nach Transplantation auswirkt.

Der Einfluss der Milz auf die Verteilung der neutrophilen Granulozyten wurde in einem Tiermodell mit Ratten mit variierenden Milzgrößen untersucht. Es konnte hierbei beobachtet werden, dass ein Teil der Neutrophilen in der Milz gepoolt werden und mit zunehmender Splenomegalie der Anteil an zirkulierenden Neutrophilen vermehrt in den Milz-Pool verschoben wird. Bei der Untersuchung der Tiere mit massiver Splenomegalie befanden sich bis zu 50% der gesamten Neutrophilen in der Milz.<sup>53</sup> Diese Befunde legen nahe, dass eine mögliche Ursache des verzögerten Anstiegs der Neutrophilenzahl nach Transplantation bei Patienten mit MF im Pooling von Neutrophilen in der Milz besteht. Eine Splenektomie zur Verbesserung des Engraftments stellt jedoch aufgrund der hohen Mortalität keine Option dar und sollte weiterhin nur bei klinischen Komplikationen in Erwägung gezogen werden. Weiterhin ist die Milz ein wichtiges Immunorgan und spielt eine große Rolle in der Immunrestitution nach Transplantation. Eine mögliche Alternative zur Splenektomie zur Verbesserung des Engraftments besteht in der Anwendung der JAK-Inhibitoren. In der von Vertovsek und Kollegen durchgeführten Studie zu JAK-Inhibitoren zeigte, unabhängig vom JAK-2-Mutationsstatus, bei 52% der behandelten Patienten eine Verkleinerung der Milz um mehr als 50%.<sup>54</sup> Durch den Einsatz dieser Medikamente vor der Transplantation ließen sich somit nicht nur die

krankheitsbedingt konstitutionellen Symptome der Patienten reduzieren, sondern ebenfalls die Engraftmentchancen vor allem für Patienten mit massiver Splenomegalie verbessern.

In der Studie von Olsson et al. wurde als weiterer möglicher Einflussfaktor auf das Engraftment die Übereinstimmung bezüglich der AB0-Blutgruppe zwischen Spender und Empfänger diskutiert.<sup>28</sup> In der univariaten Analyse zeigte sich hier ein signifikanter Unterschied zwischen einer Major- und Minor-Blutgruppeninkompatibilität und blutgruppenkompatiblen Transplantationen. Zuvor wurde der gleiche Zusammenhang bereits in anderen Arbeiten untersucht, in denen der Einfluss der Blutgruppenkompatibilität auf die Häufigkeit des GF nach myeloablativer Konditionierung analysiert wurde.<sup>32 55</sup> Stussi et al. fanden jedoch keinen Zusammenhang zwischen verzögertem Neutrophilen bzw. Thrombozyten Engraftment und der AB0 Blutgruppenkompatibilität. In der Studie von Remberger et al. hingegen wurde eine erhöhte Inzidenz des GF bei Transplantationen von nicht verwandten Spendern beschrieben, die mit einem AB0-Major-Mismatch transplantiert wurden. Es wurde jedoch keine Aussage zu dem Engraftmentverlauf der Patienten gemacht. Bei der Analyse des Engraftmentverlaufs der Patienten dieser Arbeit zeigte sich weder bei Patienten mit MF noch bei Patienten mit AML ein Zusammenhang von verzögertem Engraftment und der Blutgruppenkompatibilität. Einen Hinweis auf den Einfluss der Blutgruppenkompatibilität lässt lediglich der hohe Anteil an MF Patienten mit einem Major-Mismatch bei den sekundären graft failure (4 von 5 Patienten) zu. Dieses Ergebnis muss jedoch aufgrund der geringen Patientenzahlen kritisch beurteilt werden.

Der Grad der Fibrose des KM stellt einen möglichen negativen Einflussfaktor hinsichtlich des Engraftments dar. Im Verlauf der Erkrankung wird die Hämatopoese immer stärker von einem dichten Netzwerk aus groben kollagenen Faserbündeln verdrängt. Es kommt zudem zu einer Verstärkung der Trabekel und einem diffusen Knochengeflechtwachstum. So besteht die Möglichkeit, dass die starke Fibrosierung eine Veränderung der Stammzellnische bewirkt, in der das Homing und Anwachsen der transplantierten Zellen erschwert ist. In der Auswertung der Patientendaten im Rahmen dieser Arbeit ließ sich jedoch kein Zusammenhang zwischen dem Fibrosegrad und dem Verlauf des Engraftments bei MF Patienten feststellen. In der Literatur wurde bereits mehrfach ein rascher Rückgang der KM Fibrose nach

erfolgreicher Stammzelltransplantation beschrieben.<sup>56 25 57</sup> Thiele et al konnten zeigen, dass es 6 Monate nach myeloablativer Therapie und anschließender Transplantation zur kompletten Regression der Fibrose bei den untersuchten Patienten kam. Kröger et al untersuchten ein Patientenkollektiv nach reduziertem Konditionierungsschema mit der gleichen Fragestellung. Es wurde hierbei nach der SZT eine vollständige oder nahezu vollständige Regression der KM-Fibrose bei 59% der Patienten am Tag 100, bei 90% am Tag 180 und 100% am Tag 360 beobachtet. Auf das frühe Engraftment scheint die Fibrose somit keinen Einfluss zu haben. Durch den zügig verlaufenden Rückgang der Fibrose nach der Transplantation entstehen verbesserte physiologische Verhältnisse, die es den hämatopoetischen SZ ermöglichen sich zu vermehren und auszudifferenzieren. Dies erklärt, warum die SZT auch bei Patienten erfolgreich ist, deren Hämatopoese aufgrund der starken Fibrose nahezu vollständig aus dem KM verdrängt wurde.

Um eine Aussage über den Verlauf der Erkrankung treffen zu können, wurden die Scoring-Systeme IPSS und DIPSS etabliert, welche u.a. das Patientenalter und die Anzahl der Blasten als wichtige prognostische Parameter berücksichtigen.<sup>14</sup> Beide Parameter wurden in dieser Arbeit im Hinblick auf das Engraftment der transplantierten Zellen untersucht. Es konnte jedoch in dem untersuchten Patientenkollektiv kein Zusammenhang zu dem verzögerten Verlauf des Anstiegs der Zahl der Neutrophilen oder Thrombozyten hergestellt werden.

Untersuchungen in Bezug auf die Zahl an transplantierten CD34<sup>+</sup> Zellen zeigten, dass durch die Transplantation einer höheren Anzahl an Zellen ein positiver Effekt sowohl auf das Neutrophilen als auch auf das Thrombozyten Engraftment erzielt werden kann.<sup>58</sup> Besonders im Hinblick auf die vergrößerte Milz und dem möglichen Pooling der transplantierten Zellen bei Patienten mit MF wäre dies ein möglicher Ansatzpunkt, das Engraftment zu beschleunigen. Das Patientenkollektiv dieser Arbeit wurde hinsichtlich der Anzahl an transplantierten Zellen daher in zwei Gruppen unterteilt, wobei die Aufteilung nach größer und kleiner als der Median an transplantierten Zellen erfolgte. Es konnte jedoch nur ein Trend zu schnellerem frühem Engraftment bei Patienten mit MF festgestellt werden, denen mehr Zellen als der Median transplantiert wurden. Möglicherweise ließe sich der Effekt durch weiter gesteigerte Zellzahlen erhöhen. Remberger et al. konnten jedoch zeigen, dass bei einer sehr großen Zahl an transplantierten Zellen ( $>11 \times 10^6$  /kg) das

Gesamtüberleben signifikant abnimmt und die Zahl an Rezidiven zunimmt.<sup>58</sup> Es sollte daher die Zahl an transplantierten Zellen von  $11 \times 10^6$ /kg nicht überschritten werden. Die akute GvHD ist eine häufige Komplikation der allogenen hämatopoetischen SZT, die bereits in der frühen Posttransplantationsphase auftreten kann. Die ersten Anzeichen und Symptome einer akuten GvHD treten dabei meist um den Zeitpunkt des Neutrophilen Engraftments auf. Die Möglichkeit, dass ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer GvHD, bzw des Schweregrades dieser Erkrankung und der Verzögerung des engraftments besteht, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Es konnte jedoch kein Zusammenhang festgestellt werden.

In einer prospektiven Studie von Kröger et al betrug bei den Patienten, die nach RIC einer allogenen SZT zugeführt wurden, die 1-Jahres NRM 16%. Die NRM der untersuchten Kohorte an MF Patienten dieser Arbeit ist vergleichsweise hoch (42% nach 2 Jahren), ist jedoch vergleichbar mit den Ergebnissen (39% nach 2 Jahren) aus der Studie von Claudiani et al.<sup>59</sup> Aufgrund der relativ kleinen Patientenzahlen können keine endgültigen Aussagen über die zugrundeliegenden Ursachen getroffen werden. Mögliche Erklärungen sind das hohe Patientenalter und die vermehrte Anzahl an Patienten mit hohem Risikoprofil vor der Transplantation (77% der Patienten mit DIPSS intermediate-2 oder high). Im Hinblick auf das Gesamtüberleben der beiden untersuchten Patientengruppen dieser Arbeit gab es keinen signifikanten Unterschied im 2-Jahres- OS (54% und 58%).

Das verzögerte Engraftment und die schlechtere Rekonstitution der Hämatopoese der Patienten mit MF spiegelt sich zudem auch in der Zahl der Blut- und Thrombozytentransfusionen wider. Der Bedarf an Blutprodukten bei MF Patienten war im Vergleich zu den AML-Patienten signifikant größer. Es besteht somit nicht nur ein größeres Risiko für die Mortalität nach der Transplantation, es entstehen zudem auch höhere Kosten.

Die Ergebnisse der klinischen Daten zeigen eine signifikante Verzögerung des Engraftments bei Patienten mit MF. Es konnte jedoch mit keinem der in Hinblick auf das Engraftment untersuchten Faktoren die Verzögerung im Vergleich zu anderen hämatologischen Erkrankungen hinreichend erklärt werden. Es kann daher vermutet werden, dass die progressive Osteosklerose, Neovaskularisierung und Fibrose des

KM eine Dysregulation der Interaktion zwischen den transplantierten SZ und dem Mikroenvironment im KM bewirken und somit sowohl das Homing als auch das Engraftment der SZ gestört sind.

In Vorarbeiten wurde im Tiermodell das Homing von HSZ ins KM untersucht und es konnte hierbei gezeigt werden, dass bei mehr als 80% der transplantierten SZ innerhalb der ersten 5 Stunden nach Transplantation ein erfolgreiches Homing ins KM stattgefunden hat.<sup>60</sup> Es ist daher anzunehmen, dass die Abnahme der Anzahl an peripher zirkulierenden SZ als ein Marker für das Homing der Zellen ins KM herangezogen werden kann. Um das Homing-Verhalten der transplantierten SZ unserer Patienten zu untersuchen, wurde kurz vor der Transplantation sowie zu definierten Zeitpunkten danach die Anzahl an CD34<sup>+</sup> und CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> Zellen im PB durchflusszytometrisch gemessen. Mehr als 75% der transplantierten CD34<sup>+</sup>-Zellen waren bereits nach 40 Minuten nicht mehr im PB nachweisbar und die Anzahl an zirkulierenden CD34<sup>+</sup> Zellen nach 22 Stunden befand sich auf dem gleichen Niveau wie vor der Transplantation. Ein ähnlicher Ansatz wurde von Donmez et al. untersucht. Die Autoren beschrieben, dass die autolog transplantierten CD34<sup>+</sup> Zellen nach 24 Stunden nicht mehr im PB nachweisbar waren.<sup>61</sup>

Bei der Auswertung der Ergebnisse der beiden untersuchten Erkrankungen zeigte sich eine signifikant niedrigere Anzahl an zirkulierenden CD34<sup>+</sup> Zellen bei Patienten mit MF im Vergleich zu AML-Patienten in der frühen Phase nach der Transplantation. Thiele et al. beschrieben bereits ein vermehrtes Pooling von HSZ in der Milz bei Patienten mit PMF.<sup>62</sup> Eine mögliche Ursache besteht somit in einem vermehrten Pooling der linienspezifisch bereits differenzierteren CD34<sup>+</sup> Zellen in der vergrößerten Milz. Der Einfluss der Milzgröße auf das Engraftment konnte bereits anhand der klinischen Daten gezeigt werden. Es ist daher anzunehmen, dass ein Zusammenspiel mehrerer Faktoren besteht, welche zu der erniedrigten Anzahl und dem verzögerten Anstieg an Neutrophilen im Verlauf nach der Transplantation bei MF-Patienten beitragen: sowohl das Pooling der CD34<sup>+</sup> Zellen direkt nach der Transplantation als auch der Neutrophilen im Verlauf in der vergrößerten Milz. Interessanterweise konnte jedoch kein Unterschied in der Anzahl der zirkulierenden CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> Zellen zu gleichen Zeitpunkten beobachtet werden. Bei den CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> Zellen handelt es sich um undifferenzierte frühe Progenitorzellen.<sup>36</sup> Es

scheint demnach keinen Unterschied im Homing-Verhalten der frühen Progenitorzellen zwischen den beiden Erkrankungen zu geben. Plett et al kamen in ihrer Arbeit über das Homing-Verhalten von HSZ im Mausmodell zu dem Ergebnis, dass die frühen undifferenzierten SZ nach Transplantation bevorzugt in das KM wandern und sich weniger in der Milz der Tiere finden lassen.<sup>63</sup> Es besteht daher die Annahme, dass die frühen undifferenzierten SZ auch bei Patienten mit MF bevorzugt in das KM, die bereits differenzierteren Zellen jedoch aufgrund ihrer veränderten Expression an Oberflächenmolekülen vermehrt in die Milz wandern. Kerre et al untersuchten das Engraftment-Verhalten von humanen HSZ in NOD/SCID Mäusen und konnten zeigen, dass sowohl ein Homing der CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> als auch der CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> Zellen in das KM und in die Milz stattfindet.<sup>64</sup> Interessanterweise überlebten nach 3 Tagen lediglich die Zellen, die in das KM der Tiere eingewandert waren. Weiterhin zeigten die Zellen im KM ein unterschiedliches Verhalten bezüglich der Zellexpansion. So begannen sich die CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> Zellen bereits nach 3 Tagen zu vermehren, die Anzahl der CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> Zellen jedoch zeigte keine Veränderung in der ersten Woche und eine starke Zunahme der Zellzahl wurde erst ab der dritten Woche nach Transplantation beobachtet. Möglicherweise besteht bei Patienten mit MF eine vergleichbare Ursache des verzögerten Engraftments, indem die bereits differenzierten SZ, welche für die frühe Regeneration der Hämatopoese notwendig sind, in der vergrößerten Milz gepoolt werden und in dessen Mikromilieu die weitere Proliferation der Zellen gestört ist. Die undifferenzierteren CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> Zellen, die in das KM wandern und für die späte Regeneration nötig sind, benötigen hingegen einen längeren Zeitraum, um proliferieren und ausdifferenzieren zu können.

Die Anzahl an CD34 und CD38 exprimierenden Zellen lässt nur eine geringe Aussage über das Entwicklungspotential der SZ zu, weshalb zusätzlich aus den entnommenen Proben die Anzahl an koloniebildenden Zellen mit Hilfe eines CFC Assays bestimmt wurde. Wie bereits bei der Auswertung der Clearance von CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> Zellen gesehen wurde, konnte auch hier zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen gemessen werden. Zu späteren Zeitpunkten nach der Transplantation zeigte sich jedoch ein Trend zu einer größeren Anzahl an CFC im PB von Patienten mit MF. Die Tatsache, dass zu späten Zeitpunkten in der Verlaufsmessung sowohl ein erhöhter Anteil an CD34<sup>+</sup> als auch der CFC Zellen im PB bei Patienten mit MF nachweisbar war, deutet

möglicherweise zusätzlich auf eine milzunabhängige Ursache des verzögerten Engraftments hin. Eine wesentliche Voraussetzung für das Engraftment ist zunächst ein erfolgreiches Homing der HSZ in das KM des Empfängers. Das Homing der HSZ wird gesteuert über die Interaktion mit chemotaktischen Proteinen, aber auch über die Interaktion von Adhäsionsmolekülen mit deren Rezeptoren auf den HSZ. Die Ausschüttung von hämatopoetischen, angiopoetischen und fibrogenen Wachstumsfaktoren führt im Laufe der Erkrankung zu einem Umbau durch Osteosklerose, Neoangiogenese und vor allem zur Fibrosierung.<sup>65</sup> Eine mögliche Ursache eines Homing- und Engraftmentdefekts liegt somit in der veränderten Struktur des Mikroenvironments im KM. Eine entscheidende Rolle bei der Rekrutierung und Verankerung von HSZ im KM spielt das Chemokin CXCL12 (stromal cell-derived factor SDF-1).<sup>66</sup> Cho et al. konnten nachweisen, dass im KM von Patienten mit MF eine erhöhte proteolytischen Aktivität vorliegt und es somit zu einer Degradierung von CXCL12 kommt.<sup>67</sup> Weiterhin findet sich eine vermehrte Expression von CXCL12 in der Milz bei Patienten mit MF.<sup>68 69</sup> Es kann daher spekuliert werden, dass - bedingt durch die erhöhte proteolytische Aktivität im KM der Patienten - eine Unterbrechung der CXCL12/CXCR4 Achse vorliegt, welche ein reduzierten Homing der HSZ in das KM bewirkt und statt dessen durch eine verstärkte chemotaktische Wirkung durch CXCL12 ein Homing in die Milz stattfindet. Migliaccio et al hingegen fanden sowohl bei immunhistochemischen Untersuchung von KM Proben von Gata1 low Mäusen, einem Tiermodell mit vergleichbarem Verlauf der Fibrose wie bei der MF, als auch bei KM Proben von Patienten mit MF einen deutlich erhöhte CXCL12 Expression im KM. Die Untersuchung der KM Proben im Rahmen dieser Arbeit erbrachte keinen Hinweis auf einen Unterschied in der Expression von CXCL12 im Vergleich zu gesundem KM. Migliaccio et al konnten ferner zeigen, dass lediglich die Menge an CXCL12 im KM, aber nicht die Expression im KM bei Gata1 low Mäusen erhöht ist und postulierten daher, dass es vor allem zu einer gesteigerten Aufnahme in der erhöhten Anzahl von mutierten Megakaryozyten kommt. Wie bereits beschrieben ist CXCL12 sehr empfindlich gegenüber dem Abbau durch Proteasen und möglicherweise werden sowohl das intakte Protein als auch seine Spaltprodukte in der Immunfärbung detektiert. Somit ist es möglich, dass es sich bei der starken Anfärbung von CXCL12 die in dem KM bei den Gata1low Mäusen und MF Patienten beobachtet wurden, um das proteolytisch gespaltene

CXCL12 handelt. Zusammenfassend besteht die Möglichkeit, dass trotz der ausgeprägten CXCL12-Immunfärbung im KM des Tiermodells und die normwertige Färbung im Rahmen dieser Arbeit des KM der MF Patienten, zum Einen die vermehrte Aufnahme von funktionellem CXCL12 durch die hohe Anzahl von mutierten Megakaryozyten und zum Anderen die inaktiven Abbauprodukte von CXCL12 in der extrazelluläre Matrix gemessen wurden.

Neben CXCL12 wurde von Grassinger et al mit OPN ein weiteres von Osteoblasten sezerniertes Protein beschrieben, welches ebenfalls hoch chemotaktisch auf murine und humane HSZ wirkt. Das Glykoprotein OPN wird von Thrombin innerhalb der endostalen KM-Nische gespalten und bindet dann spezifisch über eine Integrin-Bindungsstelle an  $\alpha_4\beta_1$  und  $\alpha_9\beta_1$  auf den HSZ.<sup>38</sup> Voraussetzung für das erfolgreiche Homing ist somit, dass diese OPN-Rezeptoren auf G-CSF mobilisierten HSZ im PB exprimiert werden. In den Versuchen im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl  $\alpha_4\beta_1$  und  $\alpha_9\beta_1$ , sowie CD44 auf G-CSF mobilisierten SZ stark exprimiert werden. Der Vergleich der immunhistochemischen Färbungen konnte keine Veränderung in der Menge des exprimierten OPN im fibrosiertem KM im Vergleich zu nicht fibrosiertem KM nachweisen. Es wäre daher anzunehmen, dass sich Änderungen der KM Nischen bei der Fibrose nicht auf die Expression von OPN auswirken. Andererseits könnte auch wie bei CXCL12, die vermehrte Protease-Aktivität zu einer Spaltung von OPN führen und lediglich die inaktiven Fragmente des proteolytisch gespaltenen OPN in der immunhistochemischen Färbung gemessen werden.

Der erste Schritt beim Homing ist die Adhäsion der zirkulierenden HSZ an die Endothelzellen der Gefäße im KM. Einen maßgeblichen Anteil an dieser Zell-Zell-Interaktion kommt den von den Endothelzellen exprimierten Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM-1 zu.<sup>40 70</sup> Bei der zunächst durchgeführten Untersuchung der Expression von ICAM-1 im KM von MF Patienten im Vergleich zu gesundem KM konnte kein Unterschied in der Expression nachgewiesen werden. Hingegen zeigten die immunhistochemischen Untersuchungen von VCAM-1 einen deutlichen Verlust dieses Adhäsionsmoleküls in den KM Proben von MF Patienten im Vergleich zu nicht fibrosierten KM. Hinsichtlich des Stellenwertes von VCAM-1 beim Homing der HSZ konnten Simmons et al zeigen, dass es durch eine zytokinvermittelte Zunahme der Expression von VCAM-1 im KM zu einer deutlichen Zunahme der Bindung von

Progenitorzellen an die Stromazellen im KM kommt. Weiterhin konnte dieser Effekt durch die Blockierung der Integrine auf den CD34<sup>+</sup> Zellen, welche spezifisch an VCAM-1 binden, aufgehoben werden.<sup>70</sup> In einer Studie zur Mobilisierung von HSZ aus dem KM durch G-CSF konnte zudem gezeigt werden, dass im Zuge der Mobilisierung VCAM-1 durch Metalloproteasen gespalten wird. Es wurde daher postuliert, dass ein wesentlicher Schritt zur Mobilisierung von HSZ die proteolytische Spaltung von VCAM-1 an den Osteoblasten im KM ist.<sup>71</sup> In diesem Zusammenhang wiesen Xu et al. neben der erhöhten Anzahl an CD34<sup>+</sup> Zellen im PB von Patienten mit MF auch deutlich erhöhte Plasmaspiegel an Metalloproteasen und gelöstem VCAM-1 nach. Weiterhin korrelierte die Anzahl an zirkulierenden CD34<sup>+</sup> Zellen mit der Menge des gemessenen VCAM-1 im PB. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Zunahme an Proteasen im KM der Patienten mit MF zu einer vermehrten Mobilisierung von CD34 Zellen führt. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die verringerte Expression von VCAM-1 bzw. dessen Inaktivierung im KM mit ursächlich für den Homing-Defekt bei Patienten mit MF ist.

Das verzögerte Engraftment und das damit einhergehende Risiko für ein GF bei Patienten mit MF führt nicht nur zu einem erhöhten Risiko therapieassoziierter Mortalität, sondern verursacht zudem auch höhere Kosten für Blutprodukte und Antibiotika. Es sollten daher vermehrt Ansätze verfolgt werden, welche zu einer Beschleunigung der Rekonstitution der Hämatopoese dieser Patienten beitragen. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen den Schluss zu, dass sowohl durch eine Reduktion der Milzgröße sowie einer Verringerung der proteolytischen Aktivität im KM ein verbessertes Homing von HSZ erreicht werden könnte.

Bisher ist Ruxolitinib der einzige kommerziell verfügbare JAK-2-Inhibitor, welcher für die Therapie der MF zugelassen ist. Dieses Medikament führt nachweislich zu einer deutlichen Reduktion der Milzgröße, unabhängig von dem JAK2-Status des Patienten. In neueren Studien konnte zudem ein deutlicher Rückgang der Fibrose unter der Therapie nachgewiesen werden.<sup>72</sup> In wieweit sich das Mikroenvironment des KM im Hinblick auf die Zytokinspiegel und Proteaseaktivität unter der Therapie verändert, ist bisher noch unklar. In dem Kollektiv an MF Patienten, welche dieser Arbeit zugrunde liegt, wurde Ruxolitinib nicht vor der SZT eingesetzt, da sich das Medikament zum Zeitpunkt der Transplantationen (2000-2011) noch in der

Entwicklungs- und Zulassungsphase befand (Zulassung 2012). Erste Ergebnisse für Patienten die vor der SZT mit Ruxolitinib behandelt wurden, zeigen eine signifikante Reduktion der Milzgröße sowie der durch Zytokine induzierten klinische Symptome.<sup>17</sup> Über die Dauer bis zum Engraftment wurde in dieser Studie keine Angabe gemacht. Es trat jedoch bei einem der Patienten ein GF auf (7%), verglichen mit 6% der Patienten in dieser Arbeit. Es wurden jedoch nur insgesamt 14 Patienten in dieser Studie betrachtet, sodass der Wert von 7% an Patienten mit einem GF kritisch zu betrachten ist. Um eine valide Aussage treffen zu können, bedarf es daher weiteren Untersuchungen mit höheren Patientenzahlen. Weiterhin sollte untersucht werden, ob sich durch die medikamentöse Reduktion der Zytokinspiegel im KM der Patienten ein positiver Effekt auf das Engraftment bei den betroffenen Patienten erzielen ließe.

## Zusammenfassung

Die allogene Stammzelltransplantation (SZT) ist ein etabliertes Verfahren zur Behandlung von malignen und nicht-malignen Erkrankungen der Hämatopoese und stellt für Patienten mit Myelofibrose (MF) bisher den einzigen kurativen Therapieansatz dar. Wie in der Literatur beschrieben sowie bei den in der Klinik und Poliklinik der Inneren Medizin III transplantierten MF Patienten beobachtet wird, kommt es im Vergleich zu Patienten mit anderen malignen hämatologischen Erkrankungen nach einer allogenen SZT bei Patienten mit MF oftmals zu einem verzögerten oder einem ausbleibendem Anwachsen (Engraftment) der transplantierten Zellen. Letzteres wird auch als Transplantatversagen (Graft failure, GF) bezeichnet und geht mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität einher. Im Rahmen dieser Arbeit konnte in der retrospektiven Datenauswertung durch eine Gegenüberstellung des Patientenkollektivs von MF Patienten mit einer Vergleichsgruppe von Patienten mit AML diese klinische Beobachtung bestätigt werden. Weiterhin lag der Fokus auf der statistischen Auswertung von klinisch erhobenen Parametern und deren Einfluss auf das Engraftment der hämatopoetischen Stammzellen (HSZ), wobei sich die Auswahl der untersuchten Parameter nach in der Literatur diskutierten Einflussfaktoren auf das outcome nach SZT richtete. Lediglich für die Milzgröße konnte in dieser Arbeit ein signifikanter Einfluss auf das Engraftment gezeigt werden. Ob ein Zusammenhang zwischen dem verzögerten Engraftment und GF in Bezug auf die HLA-Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger besteht, konnte nicht abschließend geklärt werden. Es zeigte sich lediglich ein Trend zu schnellerem Engraftment bei den Patienten, welche ihr Transplantat von einem HLA-kompatiblen Geschwisterspender erhielten. Eine mögliche Ursache hierfür liegt in der geringen Größe der untersuchten Gruppe an Patienten mit MF.

Da durch keinen der untersuchten Faktoren die Verzögerung im Engraftment im Vergleich zu anderen hämatologischen Erkrankungen hinreichend erklärt werden konnte, bestand die Vermutung, dass die progressive Osteosklerose, Neovaskularisierung und Fibrose des Knochenmarks (KM) eine Dysregulation der Interaktion zwischen den transplantierten HSZ und dem Mikroenvironment im KM

bewirken und somit sowohl das Homing als auch das Engraftment der HSZ gestört sind.

Um das Homing-Verhalten von HSZ zu untersuchen, wurden Verlaufsmessungen von CD 34<sup>+</sup> und CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> Zellen sowie von CFC im peripheren Blut (PB) nach Transplantation sowohl bei Patienten mit MF als auch bei Patienten mit AML durchgeführt. Den Patienten wurde direkt nach der Transplantation zu definierten Zeitpunkten Blut abgenommen und mittels durchflusszytometrischer Analyse die Anzahl an zirkulierenden HSZ im PB bestimmt. Es zeigte sich hierbei eine signifikant niedrigere Anzahl an zirkulierenden CD34<sup>+</sup> Zellen bei Patienten mit MF im Vergleich zu AML Patienten in der frühen Phase nach der Transplantation. Eine mögliche Ursache besteht in einem vermehrten Pooling der linienspezifisch bereits differenzierteren CD34<sup>+</sup> Zellen in der vergrößerten Milz. Interessanterweise konnte jedoch kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der zirkulierenden CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> Zellen und CFC zu gleichen Zeitpunkten beobachtet werden. Es scheint demnach keinen Unterschied im Homing-Verhalten der frühen Progenitorzellen zwischen den beiden Erkrankungen zu geben.

Zur Untersuchung von milzunabhängigen Ursachen des verzögerten Engraftments wurden zudem immunhistochemische Untersuchungen von KM Proben von Patienten mit MF sowie von nicht fibrotischem KM durchgeführt. Bereits in Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass bestimmte Proteine wie OPN, ICAM-1, VCAM-1 und SDF-1, die von Endothel- und Stromazellen im KM exprimiert werden, eine zentrale Rolle in der chemotaktische Steuerung des Homings und des Lodgements in die Stammzellnische einnehmen. Für die Adhäsionsproteine OPN, ICAM-1 und SDF-1 konnte kein Nachweis einer Änderung der Expression in den KM Proben von MF Patienten im Vergleich zu nicht fibrosiertem KM gezeigt werden, hingegen konnte ein deutlicher Verlust von VCAM-1 in den KM Proben der MF Patienten nachgewiesen werden. Es kann vermutet werden, dass dieser Verlust durch die Zunahme an Proteasen im fibrosierten KM der Patienten mit MF verursacht wird.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das verzögerte Engraftment bei Patienten mit MF durch ein Zusammenspiel vieler Faktoren verursacht wird. Hierbei führend ist die teils massive Splenomegalie, die nach der

Transplantation zu einem Pooling der CD34<sup>+</sup> Zellen führt und daher eine Verzögerung des Engraftments bewirkt. Weiterhin bedingt das veränderte Mikromilieu im fibrosierten KM eine vermehrte proteolytische Spaltung von VCAM-1, was möglicherweise eine Beeinträchtigung des Homings der HSZ in das KM verursacht. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen den Schluss zu, dass sowohl durch eine Reduktion der Milzgröße sowie einer Verringerung der proteolytischen Aktivität im KM ein verbessertes Homing von HSZ erreicht werden könnte. Ein möglicher medikamentöser Ansatz ist hierbei der Einsatz von JAK2 Inhibitoren, welche nachweislich zu einer deutlichen Reduktion der Milzgröße führen und bei denen in neueren Studien ein deutlicher Rückgang der Fibrose unter der Therapie nachgewiesen werden konnte. Möglicherweise führt der Rückgang der Fibrose auch zu einer Normalisierung der Zytokinspiegel im KM und somit zu besseren Voraussetzungen für ein erfolgreiches Engraftment.

## Literaturverzeichnis

1. Tefferi, A., Thiele, J. & Vardiman, J. W. The 2008 World Health Organization classification system for myeloproliferative neoplasms: order out of chaos. *Cancer* **115**, 3842–7 (2009).
2. DeLario, M. R. *et al.* Clinical, histopathologic, and genetic features of pediatric primary myelofibrosis--an entity different from adults. *Am. J. Hematol.* **87**, 461–4 (2012).
3. Barosi, G. Myelofibrosis with myeloid metaplasia: diagnostic definition and prognostic classification for clinical studies and treatment guidelines. *J. Clin. Oncol.* **17**, 2954–70 (1999).
4. Kralovics, R. *et al.* A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N. Engl. J. Med.* **352**, 1779–90 (2005).
5. Mesa, R. A. *et al.* The burden of fatigue and quality of life in myeloproliferative disorders (MPDs): an international Internet-based survey of 1179 MPD patients. *Cancer* **109**, 68–76 (2007).
6. Thiele, J. & Kvasnicka, H. M. [Chronic myeloproliferative disorders. The new WHO classification]. *Pathologe* **22**, 429–43 (2001).
7. Tefferi, A. *et al.* Leukemia risk models in primary myelofibrosis: an International Working Group study. *Leukemia* **26**, 1439–41 (2012).
8. O'Reilly, R. A. Splenomegaly in 2,505 patients in a large university medical center from 1913 to 1995. 1913 to 1962: 2,056 patients. *West. J. Med.* **169**, 78–87 (1998).
9. Thiele, J., Kvasnicka, H. M., Zankovich, R. & Diehl, V. Clinical and morphological criteria for the diagnosis of prefibrotic idiopathic (primary) myelofibrosis. *Ann. Hematol.* **80**, 160–5 (2001).
10. Kreipe, H., Büsche, G., Bock, O. & Hussein, K. Myelofibrosis: molecular and cell biological aspects. *Fibrogenesis Tissue Repair* **5**, S21 (2012).
11. Thiele, J., Steinberg, T., Zankovich, R. & Fischer, R. Primary myelofibrosis-osteomyelosclerosis (agnogenic myeloid metaplasia): correlation of clinical findings with bone marrow histopathology and prognosis. *Anticancer Res.* **9**,

12. Dupriez, B. *et al.* Prognostic factors in agnogenic myeloid metaplasia: a report on 195 cases with a new scoring system. *Blood* **88**, 1013–8 (1996).
13. Cervantes, F. *et al.* Myelofibrosis with myeloid metaplasia in young individuals: disease characteristics, prognostic factors and identification of risk groups. *Br. J. Haematol.* **102**, 684–90 (1998).
14. Cervantes, F. *et al.* New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood* **113**, 2895–901 (2009).
15. Passamonti, F. *et al.* Dynamic International Prognostic Scoring System (DIPSS) predicts progression to acute myeloid leukemia in primary myelofibrosis. *Blood* **116**, 2857–8 (2010).
16. Barbui, T. *et al.* Philadelphia-negative classical myeloproliferative neoplasms: critical concepts and management recommendations from European LeukemiaNet. *J. Clin. Oncol.* **29**, 761–70 (2011).
17. Jaekel, N. *et al.* Allogeneic hematopoietic cell transplantation for myelofibrosis in patients pretreated with the JAK1 and JAK2 inhibitor ruxolitinib. *Bone Marrow Transplant.* **49**, 179–184 (2013).
18. Kerbauy, D. M. B. *et al.* Hematopoietic cell transplantation as curative therapy for idiopathic myelofibrosis, advanced polycythemia vera, and essential thrombocythemia. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **13**, 355–65 (2007).
19. Hussein, K., Pardanani, A. D., Van Dyke, D. L., Hanson, C. A. & Tefferi, A. International Prognostic Scoring System-independent cytogenetic risk categorization in primary myelofibrosis. *Blood* **115**, 496–9 (2010).
20. Schmid, C. *et al.* Long-term survival in refractory acute myeloid leukemia after sequential treatment with chemotherapy and reduced-intensity conditioning for allogeneic stem cell transplantation. *Blood* **108**, 1092–9 (2006).
21. Breems, D. A. *et al.* Prognostic index for adult patients with acute myeloid leukemia in first relapse. *J. Clin. Oncol.* **23**, 1969–78 (2005).
22. Anasetti, C. *et al.* Peripheral-blood stem cells versus bone marrow from unrelated donors. *N. Engl. J. Med.* **367**, 1487–96 (2012).
23. Crocchiolo, R. *et al.* HLA matching affects clinical outcome of adult patients undergoing haematopoietic SCT from unrelated donors: a study from the

- Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo and Italian Bone Marrow Donor Registry. *Bone Marrow Transplant.* **44**, 571–7 (2009).
24. Samuelson, S. *et al.* Allogeneic haematopoietic cell transplantation for myelofibrosis in 30 patients 60-78 years of age. *Br. J. Haematol.* **153**, 76–82 (2011).
  25. Kröger, N. *et al.* Allogeneic stem cell transplantation after reduced-intensity conditioning in patients with myelofibrosis: a prospective, multicenter study of the Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood* **114**, 5264–70 (2009).
  26. Hessling, J. *et al.* Dose-reduced conditioning regimen followed by allogeneic stem cell transplantation in patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Br. J. Haematol.* **119**, 769–72 (2002).
  27. Wolff, D. *et al.* The treatment of chronic graft-versus-host disease: consensus recommendations of experts from Germany, Austria, and Switzerland. *Dtsch. Ärzteblatt Int.* **108**, 732–40 (2011).
  28. Olsson, R. *et al.* Graft failure in the modern era of allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant.* **48**, 537–43 (2013).
  29. Ballen, K. K. *et al.* Outcome of transplantation for myelofibrosis. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **16**, 358–67 (2010).
  30. Robin, M. *et al.* Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for myelofibrosis: a report of the Société Française de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire (SFGM-TC). *Br. J. Haematol.* **152**, 331–339 (2011).
  31. Kanda, J. *et al.* Impact of ABO mismatching on the outcomes of allogeneic related and unrelated blood and marrow stem cell transplantations for hematologic malignancies: IPD-based meta-analysis of cohort studies. *Transfusion* **49**, 624–35 (2009).
  32. Remberger, M. *et al.* Major ABO blood group mismatch increases the risk for graft failure after unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **13**, 675–82 (2007).
  33. Ringdén, O. *et al.* Decreased treatment failure in recipients of HLA-identical bone marrow or peripheral blood stem cell transplants with high CD34 cell doses. *Br. J. Haematol.* **121**, 874–85 (2003).
  34. Civin, C. I. *et al.* Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic

- progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J. Immunol.* **133**, 157–65 (1984).
35. Civin, C. I. *et al.* Sustained, retransplantable, multilineage engraftment of highly purified adult human bone marrow stem cells in vivo. *Blood* **88**, 4102–9 (1996).
  36. Terstappen, L. W., Huang, S., Safford, M., Lansdorp, P. M. & Loken, M. R. Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+CD38- progenitor cells. *Blood* **77**, 1218–27 (1991).
  37. Haylock, D. N. & Nilsson, S. K. Stem cell regulation by the hematopoietic stem cell niche. *Cell Cycle* **4**, 1353–5 (2005).
  38. Grassinger, J. *et al.* Thrombin-cleaved osteopontin regulates hemopoietic stem and progenitor cell functions through interactions with alpha9beta1 and alpha4beta1 integrins. *Blood* **114**, 49–59 (2009).
  39. Lévesque, J. P., Leavesley, D. I., Niutta, S., Vadas, M. & Simmons, P. J. Cytokines increase human hemopoietic cell adhesiveness by activation of very late antigen (VLA)-4 and VLA-5 integrins. *J. Exp. Med.* **181**, 1805–15 (1995).
  40. Peled, A. *et al.* The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood* **95**, 3289–96 (2000).
  41. Peled, A. *et al.* Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science* **283**, 845–8 (1999).
  42. Smith, L. L. *et al.* Osteopontin N-terminal domain contains a cryptic adhesive sequence recognized by alpha9beta1 integrin. *J. Biol. Chem.* **271**, 28485–91 (1996).
  43. Nilsson, S. K. *et al.* Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood* **106**, 1232–9 (2005).
  44. Lissandre, S. *et al.* Retrospective study of allogeneic haematopoietic stem-cell transplantation for myelofibrosis. *Bone Marrow Transplant.* **46**, 557–61 (2011).
  45. Glucksberg, H. *et al.* Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation* **18**, 295–304 (1974).
  46. Shulman, H. M. *et al.* Chronic graft-versus-host syndrome in man. A long-term

- clinicopathologic study of 20 Seattle patients. *Am. J. Med.* **69**, 204–17 (1980).
47. Sutherland, D. R., Anderson, L., Keeney, M., Nayar, R. & Chin-Yee, I. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. *J. Hematother.* **5**, 213–26 (1996).
  48. Pape, Hans-Christian; Kurtz, Armin; Silbernagl, S. *Physiologie*.
  49. Bauermeister, D. E. Quantitation of bone marrow reticulin--a normal range. *Am. J. Clin. Pathol.* **56**, 24–31 (1971).
  50. Rondelli, D. *et al.* MPD-RC 101 prospective study of reduced-intensity allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with myelofibrosis. *Blood* **124**, 1183–91 (2014).
  51. Li, Z., Gooley, T., Applebaum, F. R. & Deeg, H. J. Splenectomy and hemopoietic stem cell transplantation for myelofibrosis. *Blood* **97**, 2180–1 (2001).
  52. Ciurea, S. O. *et al.* Effects of extensive splenomegaly in patients with myelofibrosis undergoing a reduced intensity allogeneic stem cell transplantation. *Br. J. Haematol.* **141**, 80–3 (2008).
  53. Rohrer, C., Arni, U. & Deubelbeiss, K. A. Influence of the spleen on the distribution of blood neutrophils. Quantitative studies in the rat. *Scand. J. Haematol.* **30**, 103–9 (1983).
  54. Verstovsek, S. *et al.* Safety and efficacy of INCB018424, a JAK1 and JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. *N. Engl. J. Med.* **363**, 1117–27 (2010).
  55. Stussi, G. *et al.* Consequences of ABO incompatibility in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **30**, 87–93 (2002).
  56. Thiele, J. *et al.* Dynamics of bone marrow changes in patients with chronic idiopathic myelofibrosis following allogeneic stem cell transplantation. *Histol. Histopathol.* **20**, 879–89 (2005).
  57. Kröger, N. *et al.* Rapid regression of bone marrow fibrosis after dose-reduced allogeneic stem cell transplantation in patients with primary myelofibrosis. *Exp. Hematol.* **35**, 1719–22 (2007).
  58. Remberger, M. *et al.* Effect of Total Nucleated and CD34(+) Cell Dose on Outcome after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol. Blood*

- Marrow Transplant.* **21**, 889–93 (2015).
59. Claudiani, S. *et al.* Treosulfan based reduced toxicity conditioning followed by allogeneic stem cell transplantation in patients with myelofibrosis. *Hematol. Oncol.* (2014). doi:10.1002/hon.2183
  60. Ellis, S. L. *et al.* The relationship between bone, hemopoietic stem cells, and vasculature. *Blood* **118**, 1516–24 (2011).
  61. Donmez, A. *et al.* The clearance time of infused hematopoietic stem cell from the blood circulation. *Transfus. Apher. Sci.* **48**, 235–9 (2013).
  62. Thiele, J., Kvasnicka, H. M. & Czeslick, C. CD34+ progenitor cells in idiopathic (primary) myelofibrosis: a comparative quantification between spleen and bone marrow tissue. *Ann. Hematol.* **81**, 86–9 (2002).
  63. Plett, P. A., Frankovitz, S. M. & Orschell, C. M. Distribution of marrow repopulating cells between bone marrow and spleen early after transplantation. *Blood* **102**, 2285–91 (2003).
  64. Kerre, T. C. *et al.* Both CD34+38+ and CD34+38- cells home specifically to the bone marrow of NOD/LtSZ scid/scid mice but show different kinetics in expansion. *J. Immunol.* **167**, 3692–8 (2001).
  65. Lataillade, J.-J. *et al.* Does primary myelofibrosis involve a defective stem cell niche? From concept to evidence. *Blood* **112**, 3026–35 (2008).
  66. Jung, Y. *et al.* Regulation of SDF-1 (CXCL12) production by osteoblasts; a possible mechanism for stem cell homing. *Bone* **38**, 497–508 (2006).
  67. Cho, S. Y. *et al.* The effect of CXCL12 processing on CD34+ cell migration in myeloproliferative neoplasms. *Cancer Res.* **70**, 3402–10 (2010).
  68. Wang, X. *et al.* C-X-C motif chemokine 12 influences the development of extramedullary hematopoiesis in the spleens of myelofibrosis patients. *Exp. Hematol.* **43**, 100–9.e1 (2015).
  69. Miwa, Y. *et al.* Up-regulated expression of CXCL12 in human spleens with extramedullary haematopoiesis. *Pathology* **45**, 408–16 (2013).
  70. Simmons, P. J. *et al.* Vascular cell adhesion molecule-1 expressed by bone marrow stromal cells mediates the binding of hematopoietic progenitor cells. *Blood* **80**, 388–95 (1992).
  71. Lévesque, J. P., Takamatsu, Y., Nilsson, S. K., Haylock, D. N. & Simmons, P. J. Vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) is cleaved by neutrophil

- proteases in the bone marrow following hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* **98**, 1289–97 (2001).
72. Caocci, G. *et al.* Modulation of bone marrow microenvironment following ruxolitinib therapy in myelofibrosis. *Leuk. Lymphoma* 1–4 (2015).  
doi:10.3109/10428194.2015.1079320
73. Abellsson, J. *et al.* The outcome of allo-HSCT for 92 patients with myelofibrosis in the Nordic countries. *Bone Marrow Transplant.* **47**, 380–6 (2012).
74. Guardiola, P. *et al.* Allogeneic stem cell transplantation for agnogenic myeloid metaplasia: a European Group for Blood and Marrow Transplantation, Société Française de Greffe de Moelle, Gruppo Italiano per il Trapianto del Midollo Osseo, and Fred Hutchinson Cancer Research Ce. *Blood* **93**, 2831–8 (1999).
75. Gupta, V. *et al.* A retrospective comparison of conventional intensity conditioning and reduced-intensity conditioning for allogeneic hematopoietic cell transplantation in myelofibrosis. *Bone Marrow Transplant.* **44**, 317–320 (2009).
76. Scott, B. L. *et al.* The Dynamic International Prognostic Scoring System for myelofibrosis predicts outcomes after hematopoietic cell transplantation. *Blood* **119**, 2657–64 (2012).

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Betreuerin Frau Dr. med. Christina Hart für ihren fachlichen Beistand, ihre große Hilfsbereitschaft und Unterstützung im Laufe der Betreuung dieser Arbeit danken.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Ernst Holler für die Möglichkeit, diese Dissertation in der Abteilung für Hämatologie/Onkologie durchzuführen und die Bereitstellung des theoretischen Teils dieser Arbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Herrn PD Dr. med. Jochen Grassinger für die Ausarbeitung des praktischen Teils dieser Arbeit, sowie die wissenschaftliche Betreuung und anregenden Diskussionen, welche die vorliegende Arbeit maßgeblich vorangetrieben haben.

Darüber hinaus möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe Stammzellen unter der Leitung von PD Dr. med. Jochen Grassinger für die nette Aufnahme und die mir entgegengebrachte Hilfsbereitschaft und Freundschaftlichkeit bedanken. Insbesondere bei der Anleitung und großen Unterstützung bei der Durchführung der Versuche gilt mein herzlicher Dank Gunnar Müller und Dr. rer. nat. Sabine Klatt.

Zuletzt gilt mein Dank meiner Familie und meinen Freunden, die mir in der gesamten Ausbildungszeit eine große Stütze waren und die mein Studium zu einem sehr besonderen Lebensabschnitt gemacht haben.

## Lebenslauf

Johann Barop, geb. 29.01.1986 in Eutin

<b>Schulbildung</b>	1993 – 1997 1997 – 2005	Grund- und Hauptschule Süsel Johann H. Voss-Gymnasium, Eutin Allgemeine Hochschulreife (Abitur)
<b>Hochschulausbildung</b>	2006 – 2010	Studium der Biologie Universität zu Regensburg Bachelor of Science
	2010 – 2015	Studium der Humanmedizin Universität zu Regensburg  1. Staatsexamen 08/2011 2. Staatsexamen 11/2014 3. Staatsexamen 12/2015
<b>Famulaturen</b>	02/2012 – 03/2012	Chirurgie Charité Berlin
	08/2012 – 09/2012	Pädiatrie Hansekl. Stralsund
	02/2013 – 03/2013	Klinik und Poliklinik Innere Medizin III/Hämatologie-Onkologie Universitätsklinikum Regensburg
	02/2014 – 03/2014	Anästhesiologie St. Josephs KH, Berlin
<b>Praktisches Jahr</b>	11/2014 – 03/2015	HNO – Heilkunde Universitätsklinikum Regensburg
	03/2015 – 06/2015	Innere Medizin Spitalzentrum Biel, Schweiz

## Wissenschaftliche Tätigkeiten

01/2010 – 04/2010	Bachelorarbeit Untersuchung zur subzellulären Lokalisation des Fanconi assoziierten Proteins EHHADH
-------------------	--

## **Erklärung zum Promotionsverfahren**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg 30.05.2016

---

Johann Barop