

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin IV  
der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
(Kommissarischer Direktor: PD Dr. med. Lutz P. Müller)

**Einfluss der allogenen Stammzelltransplantation  
auf die Präsenz und Charakteristika  
multipotenter Stromazellen des Knochenmarks**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

Vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Lisa Maria Siol  
geboren am 04.07.1991 in Halle (Saale)

Gutachter: PD Dr. med. Lutz P. Müller  
Prof. Dr. med. Claudia Wickenhauser  
PD Dr. med. Philipp Hemmati (Berlin)

02.05.2017

18.12.2017

## Referat

Multipotente Stromazellen (MSC) sind fibroblastenartige Zellen innerhalb der Knochenmark- (KM-) Nische mit wichtigen Funktionen bei Hämatopoese und Regenerationsvorgängen. Zwar sind bei ausgewählten Erkrankungen Veränderungen der MSC bekannt, es fehlen jedoch Kenntnisse über spezifische Einflussfaktoren und deren Ursachen. Über Veränderungen der MSC bei allogenen Stammzelltransplantationen (SZT), welche eine wichtige Therapieoption bei hämatologischen Erkrankungen darstellen, sind in der aktuellen Literatur keine Daten vorhanden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Bestätigung vorbekannter Einflussfaktoren sowie die Analyse des speziellen Einflusses der allogenen SZT auf die Präsenz und Charakteristika von MSC des KM.

Bei 368 Patienten wurden Knochenmarkpunktionen (KMP) durchgeführt und aus dem KM-Aspirat MSC isoliert. Der Einfluss verschiedener Faktoren auf die Präsenz von MSC sowie die Zellzahl der MSC/ml KM wurde statistisch ausgewertet.

Für vorbekannte Einflussfaktoren konnten tendenzielle Zusammenhänge für Alter und Geschlecht der Probanden, bei akuter myeloischer Leukämie (AML), myelodysplastischem Syndrom (MDS) oder Niereninsuffizienz sowie nach Chemotherapie (CTx) oder Ganzkörperbestrahlung (TBI) bestätigt werden. Auffällig war ein Einfluss der allogenen SZT auf die Präsenz von MSC. Die Untersuchung transplantationsassoziiierter Faktoren zeigte eine deutlich schlechtere MSC-Präsenz bei Patienten nach TBI. Außerdem fanden sich deutlich höhere Zellzahlen bei Patienten mit schlechtem Engraftment. Wachstumskinetiken zeigten eine eingeschränkte Proliferationsfähigkeit der MSC nach allogener SZT. In einer Verlaufsguppe von 25 Patienten wurden Veränderungen der MSC vor und an mehreren Zeitpunkten nach allogener SZT erfasst. Nach der SZT konnten deutlich seltener MSC isoliert werden als zuvor. Im beobachteten Zeitraum konnte keine Regeneration der Präsenz von MSC festgestellt werden.

Es konnte erstmals ein anhaltender Einfluss einer allogenen SZT auf die Präsenz von MSC des KM gezeigt werden. Um die Erfolgchancen künftiger Transplantationen zu steigern sowie Verbesserungen hinsichtlich möglicher Therapieoptionen zu erreichen sind weiterführende Untersuchungen nötig. Diese bedürfen größerer Fallzahlen und längerer Beobachtungszeiträume. Außerdem ist die Suche nach Ursachen für die dargestellten Veränderungen erforderlich.

Siol, Lisa Maria: Einfluss der allogenen Stammzelltransplantation auf die Präsenz und Charakteristika multipotenter Stromazellen des Knochenmarks, Halle (Saale), Univ., Med. Fak.; Diss., 70 Seiten, 2017

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	III
Tabellenverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis.....	VI
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Wesentliche Eigenschaften multipotenter mesenchymaler Stromazellen.....	1
1.2 Gewinnung von MSC.....	2
1.3 Vorkommen und physiologische Funktion von MSC .....	3
1.4 Rolle von MSC des KM bei verschiedenen Erkrankungen .....	5
1.5 Ablauf der allogenen Stammzelltransplantation .....	6
1.6 Rolle von MSC bei allogenen SZT .....	7
1.7 Therapeutische Anwendung von MSC.....	8
<b>2. Zielstellung .....</b>	<b>10</b>
<b>3. Material und Methodik.....</b>	<b>11</b>
3.1 Probanden.....	11
3.2 Knochenmarkpunktion .....	11
3.3 MSC-Isolation .....	11
3.4 Charakterisierung der MSC .....	13
3.5 Erstellen einer Wachstumskinetik .....	13
3.6 Datenerfassung .....	13
3.7 Statistische Auswertung .....	14
3.7.1 Deskriptive Analysen .....	14
3.7.2 Univariate Analysen.....	14
3.7.3 Multivariate Analysen.....	14
3.7.4 Bestimmung von Signifikanzen und Effektschätzern.....	15

<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>16</b>
4.1	Allgemeine Charakteristik der Probanden.....	16
4.2	Einflussfaktoren auf die Präsenz von MSC .....	18
4.3	Multivariate logistische Regression.....	21
4.4	Einflussfaktoren auf die Zellzahl der MSC bei erster Passage .....	22
4.5	Analyse der Patienten nach allogener SZT .....	24
4.5.1	Allgemeine Charakteristik der Patienten mit erfolgter allogener SZT .....	24
4.5.2	Präsenz von MSC bei Patienten nach allogener SZT .....	26
4.5.3	Zellzahl der MSC bei erster Passage bei Patienten nach allogener SZT .....	29
4.6	Analyse der Verlaufsgruppe.....	33
4.6.1	Allgemeine Charakteristik der Verlaufsgruppe .....	33
4.6.2	Präsenz von MSC innerhalb der Verlaufsgruppe .....	34
4.6.3	Zellzahl der MSC der Verlaufsgruppe .....	36
4.6.4	Wachstumskinetiken von Gesunden und Patienten nach allogener SZT .....	39
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>40</b>
5.1	Wichtigste Ergebnisse der Studie .....	40
5.2	Einflussfaktoren auf die Präsenz und Zellzahl von MSC .....	41
5.3	Spezifischer Einfluss der allogenen SZT auf MSC .....	44
5.4	Relevanz der Arbeit für das Verständnis der Biologie der KM-Nische.....	46
5.5	Relevanz der Arbeit für die therapeutische Nutzung von MSC.....	46
5.6	Stärken und Schwächen der Arbeit.....	47
5.7	Ausblick.....	48
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>49</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>51</b>
	<b>Thesen</b> .....	<b>58</b>
	<b>Anlagen</b> .....	<b>59</b>

## Abkürzungsverzeichnis

In der vorliegenden Arbeit wurden neben SI-Einheiten und gängigen deutschsprachigen Abkürzungen folgende Abkürzungen und Symbole benutzt:

Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
BMI	Körpermasseindex (Body Mass Index)
CD	Unterscheidungsgruppen (Cluster of Differentiation)
CFU-F	Kolonie-formende Fibroblasten-ähnliche Einheit (Colony-Forming Unit-Fibroblasts)
CLL	Chronische Lymphatische Leukämie
CML	Chronische Myeloische Leukämie
CMV	Zytomegalievirus
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CTx	Chemotherapie
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FKS	fetales Kälberserum
GvHD	Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (Graft-versus-Host Disease)
HL	Hodgkin-Lymphom
HLA	Histokompatibilitätsantigen (Human Leukocyte Antigen)
HSC	Hämatopoetische Stammzellen
ISCT	Internationale Gesellschaft für Zelltherapie (International Society for Cellular Therapy)
KI	Konfidenzintervall
KM	Knochenmark
KMP	Knochenmarkpunktion
MAC	Myeloablative Konditionierung
MD	Mittelwertdifferenz
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MM	Multiples Myelom

MNC	Mononukleäre Zellen
MSC	Multipotente Mesenchymale Stromazellen
MTA	Medizinisch-Technischer Assistent
N	Gruppengröße
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NMA	Nicht-Myeloablative Konditionierung
OR	Quotenverhältnis (Odd's Ratio)
p	Signifikanz
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate Buffered Saline)
PD	Populationsverdopplung (Population Doubling)
PDT	Populationsverdopplungszeit (Population Doubling Time)
RIC	Reduzierte Konditionierung (Reduced Intensity Conditioning)
rpm	Umdrehungen pro Minute (rotations per minute)
SZT	Stammzelltransplantation
Tab.	Tabelle
TBI	Ganzkörperbestrahlung (Total Body Irradiation)
TRAIL	Tumor-Nekrose-Faktor assoziierter Apoptose-induzierender Ligand
TRM	transplantations-assoziierte Mortalität (Transplantation Related Mortality)
♂	männlich
♀	weiblich
*	signifikantes Ergebnis ( $p < 0,05$ )

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Allgemeine Merkmale der Probanden.....	17
Tab. 2: Häufigkeiten der fehlenden MSC-Präsenz.....	18
Tab. 3: Logistische Regression des Validierungs-Sets für die Präsenz von MSC.....	21
Tab. 4: Mittelwertvergleiche in Validierungs- und Discovery-Set.....	23
Tab. 5: Allgemeine Merkmale der Patienten nach allogener SZT .....	25
Tab. 6: Allgemeine Merkmale der Verlaufsgruppe .....	33
Tab. 7: Übersicht MSC-Präsenz der Verlaufsgruppe vor und nach allogener SZT .....	34
Tab. 8: Einfluss von Geschlecht und Alter auf Präsenz-Verlust nach allogener SZT ...	36
Tab. 9: Mittelwertvergleich Zahl MSC/ml KM der Verlaufsgruppe .....	37
Tab. 10: Mögliche Pathomechanismen für die Präsenz von MSC .....	43
Tab. 11: Allgemeine Merkmale der Gesamtgruppe.....	59
Tab. 12: Einfluss diverser Faktoren auf die MSC-Präsenz der Gesamtgruppe .....	60
Tab. 13: Logistische Regression der Gesamtgruppe für die Präsenz von MSC.....	61
Tab. 14: Mittelwertvergleich Zahl MSC/ml KM des Validierungssets .....	62
Tab. 15: Mittelwertvergleich Zahl MSC/ml KM der Gesamtgruppe.....	64
Tab. 16: Präsenz von MSC bei Patienten nach allogener SZT .....	66
Tab. 17: Mittelwertvergleich Zahl MSC/ml KM nach allogener SZT .....	68
Tab. 18: MSC-Präsenz der Verlaufsgruppe .....	70

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Aufteilung der Probe in ihre Schichten nach der zweiten Zentrifugation .....	2
Abb. 2: Vorkommen und Funktion von MSC.....	4
Abb. 3: Patientenflussdiagramm.....	16
Abb. 4: Einfluss von SZT und speziell allogener SZT auf die MSC-Präsenz.....	20
Abb. 5: Einfluss patientenbezogener Faktoren auf die Präsenz von MSC .....	26
Abb. 6: Einfluss spenderbezogener Faktoren auf die Präsenz von MSC .....	27
Abb. 7: Einfluss konditionierungsbezogener Faktoren auf die Präsenz von MSC .....	28
Abb. 8: Einfluss verlaufsbezogener Faktoren auf die Präsenz von MSC .....	28
Abb. 9: Boxplot Zahl MSC/ml KM abhängig von patientenbezogenen Faktoren .....	29
Abb. 10: Boxplot Zahl MSC/ml KM abhängig von spenderbezogenen Faktoren .....	30
Abb. 11: Boxplot Zahl MSC/ml KM abhängig von konditionierungsbezogenen Faktoren ...	31
Abb. 12: Boxplot Zahl MSC/ml KM abhängig von verlaufsbezogenen Faktoren .....	32
Abb. 13: MSC-Präsenz der Verlaufsgruppe vor und nach allogener SZT .....	35
Abb. 14: Boxplot Zahl MSC/ml KM Gesunde versus Verlaufsgruppe.....	37
Abb. 15: Mittelwertvergleich Zahl MSC/ml KM Gesunde versus Verlaufsgruppe .....	38
Abb. 16: Proliferation MSC von Gesunden und Patienten nach allogener SZT.....	39

## 1. Einleitung

### 1.1 Wesentliche Eigenschaften multipotenter mesenchymaler Stromazellen

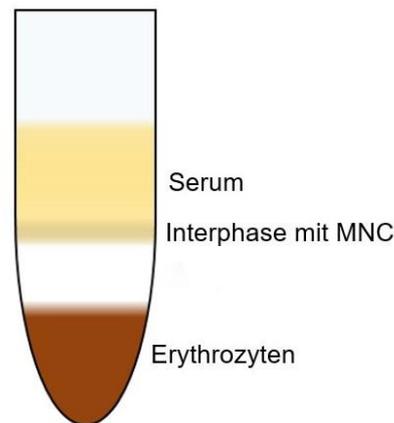
In der KM-Nische gibt es neben den hämatopoetischen Stammzellen (HSC) einen weiteren, mesenchymalen Stammzelltyp, der als Stromakomponente dient (Nombela-Arrieta et al. 2011). Diese Zellen wurden erstmals von Friedenstein und Kollegen 1970 erwähnt. Sie beschrieben stromale Vorläufer, welche sich innerhalb der Populationen von hämatopoetischen Zellen befanden. Diese zeichneten sich durch ihre Fähigkeit zur Bildung von Fibroblasten-ähnlichen Kolonien aus (Friedenstein et al. 1970). Durch zunehmendes Interesse weiterer Forschungsgruppen wurden zusätzliche Eigenschaften dieser Zellen bekannt. Zunächst wurde die Bezeichnung „Mesenchymale Stammzelle“ eingeführt (Caplan 1991; Pittenger et al. 1999). Allerdings konnten für diese Zellen bisher in der Mehrzahl der Untersuchungen keine Kriterien einer Stammzellaktivität in vivo gezeigt werden, sodass in einer Klarstellung der Internationalen Gesellschaft für Zelltherapie (ISCT) der Ausdruck „Multipotente mesenchymale Stromazelle“ (MSC) favorisiert wurde (Horwitz et al. 2005). Dies ist der nun gebräuchliche Terminus.

MSC sind fibroblastenartige, plastik-adhärenzte Zellen (Friedenstein et al. 1974), die sich in vitro als Kolonie-formende Fibroblasten-ähnliche Einheit (CFU-F) darstellen. Um Ergebnisse verschiedener Forschungsgruppen verlässlich vergleichen zu können, wurden von der ISCT im Jahr 2006 drei minimale Kriterien zum Vorliegen von MSC festgelegt, die in jeder Studie kontrolliert werden sollten. Dazu zählen die Plastik-Adhärenz, die fibroblastenartige Morphologie der MSC und ihre Multipotenz mit der Fähigkeit zur osteogenen, chondrogenen und adipogenen Differenzierung (Pittenger et al. 1999). Weiterhin zeigen sie ein typisches Expressionsmuster in der Durchflusszytometrie: negativ ( $\leq 2\%$ ) für CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79 $\alpha$  oder CD19, HLA-DR und positiv ( $\geq 95\%$ ) für CD105, CD73, CD90 (Dominici et al. 2006).

## 1.2 Gewinnung von MSC

Die Isolierung von MSC ist aus verschiedenen Geweben möglich. Sie basiert in der Mehrzahl der von vielen Arbeitsgruppen (AG) verwendeten Protokolle auf der Plastikadhärenz der Zellen. Die Gewinnung von MSC aus dem KM erfolgt zumeist durch die Isolation mittels Plastikadhärenz aus der Fraktion der mononukleären Zellen (MNC). Hierfür existieren teilweise standardisierte Protokolle (Wuchter et al. 2015).

Mittels Dichtegradientenzentrifugation (Boyum 1968) werden MNC aus dem KM-Aspirat gewonnen. Nach einer anschließenden Zentrifugation wird das Zellpellet resuspendiert und auf eine Polymer-Lösung mit spezifischer Dichte (1,077g/ml, z. B. Ficoll) gegeben. Nach erneuter Zentrifugation besteht die Probe aus den in Abb. 1 erkennbaren Schichten.



*Abb. 1: Aufteilung der Probe in ihre Schichten nach der zweiten Zentrifugation*

In der Interphase befinden sich die MNC. Diese wird entnommen, mit Wachstumsmedium resuspendiert und die Zellzahl mittels Auszählung in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Nach einer letzten Zentrifugation werden die Zellen in Kulturflaschen in Wachstumsmedium gesetzt (Mueller et al. 2006). Die Kultivierung erfolgt mit regelmäßigen Mediumwechslern zum Entfernen nicht-adhärenter Zellen. Durch diese Adhärenzselektion können die MSC von anderen MNC separiert werden (Haynesworth et al. 1992). Es wachsen fibroblastenartige Kolonien, die sogenannten CFU-F. Sobald eine bestimmte Konfluenz nach etwa 8 bis 20 Tagen erreicht ist, wird die Zellzahl mikroskopisch bestimmt und es erfolgt die Passage.

Anschließend werden die gewonnenen Zellen erneut kultiviert, für Untersuchungen verwendet oder kryokonserviert (Mueller et al. 2006). Durch die nachfolgende Charakterisierung mittels Durchflusszytometrie und Differenzierungsinduktion werden diese CFU-F-Zellen als MSC charakterisiert. Die Erfahrungen zahlreicher Arbeitsgruppen zeigen, dass es sich bei den Zellen der CFU-F um eine Zellpopulation handelt, die homogen die Konsensus-Kriterien für MSC erfüllt. Hinsichtlich weiterer Charakteristika ist sie jedoch inhomogen (Rennerfeldt und van Vliet 2016). Daher ist die Entstehung von CFU-F als Kriterium für die Präsenz von MSC akzeptiert (Mueller et al. 2006; Wuchter et al. 2015).

### **1.3 Vorkommen und physiologische Funktion von MSC**

In vivo befinden sich humane MSC innerhalb des stützenden Stromas verschiedener Gewebe wie KM, Fett oder peripherem Blut (Barry und Murphy 2004; Horwitz et al. 2005). Sie ähneln den Perizyten und sind wie diese perivaskulär lokalisiert (Crisan et al. 2008). Zusammen mit den HSC bilden sie dort eine „duale Stammzellnische“ (Nombela-Arrieta et al. 2011).

Die physiologische Funktion der MSC ist nicht gänzlich geklärt. MSC regulieren das Überleben, die Selbsterneuerung, Migration und Differenzierung von HSC mithilfe verschiedener Mechanismen, z. B. durch Zell-Zell-Kontakte oder die Produktion von Wachstumsfaktoren, Chemokinen und Molekülen der extrazellulären Matrix (Dazzi et al. 2006; Anthony und Link 2014). In der Stammzellnische tragen die MSC zur Regulierung der Hämatopoese bei (Caplan und Dennis 2006), indem sie zwei Zellen mit entgegengesetzter Wirkung auf HSC aktivieren: Osteoblasten fördern die Aktivität von HSC, wohingegen Adipozyten diese hemmen (Nombela-Arrieta et al. 2011). Weiterhin halten sie HSC in einem ruhenden Zustand, bis diese durch einen geeigneten Stimulus differenzieren und in die Blutzirkulation gelangen (Uccelli et al. 2008). MSC bilden eine schützende Mikroumgebung für die HSC, indem sie diese von verschiedenen Anreizen abschirmen, welche eine Differenzierung oder Apoptose fördern würden (Uccelli et al. 2008).

Die Multipotenz der MSC ist für verschiedene Vorgänge entscheidend. Die Differenzierung zu Osteoblasten ist z. B. für Reparaturen im Knochengewebe bedeutend (Rennerfeldt und van Vliet 2016). Die Bildung von Chondrozyten ist bei der Umstrukturierung nach Frakturen relevant. Im Alter findet sich vermehrt Fettgewebe in Knochen und KM, welches ebenfalls durch MSC gebildet wird (Prockop 1997).

MSC haben immunomodulatorische Funktionen, u. a. durch die Freisetzung von pro- und antiinflammatorischen Chemokinen und Zytokinen (Togel et al. 2005; Lee et al. 2006; Gerdoni et al. 2007). Dazu zählen lösliche Mediatoren wie beispielsweise Interleukin-10, Prostaglandin E2 und Transforming growth factor- $\beta$ . In vitro inhibieren MSC die Aktivierung von T-Zellen, die Differenzierung von dendritischen Zellen und die Proliferation von B-Zellen (Nauta und Fibbe 2007). Sie schwächen das zytolytische Potential der natürlichen Killerzellen. In Tierversuchen wurde eine Immunsuppression nach MSC-Infusion festgestellt (Nombela-Arrieta et al. 2011). Sie tragen zu Reparaturen und Regeneration verschiedener Gewebe bei (Nauta und Fibbe 2007). Abb. 2 zeigt eine Übersicht über Vorkommen und physiologische Funktionen der MSC.

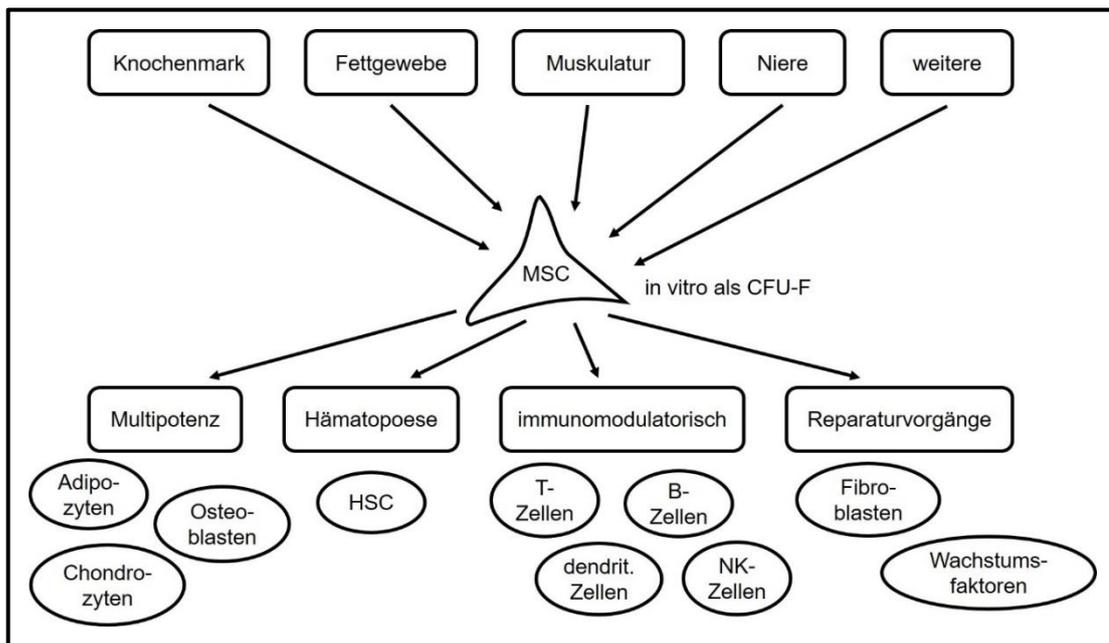


Abb. 2: Vorkommen und Funktion von MSC [modifiziert nach Nombela-Arrieta et al. 2011]

#### **1.4 Rolle von MSC des KM bei verschiedenen Erkrankungen**

Veränderungen von Präsenz und Charakteristika der MSC konnten bei verschiedenen Erkrankungen festgestellt werden. Bei Probanden mit hämatologischen Erkrankungen zeigten sich quantitative und funktionale Veränderungen der MSC (Blau et al. 2011). Bei MDS waren sie strukturell, epigenetisch und funktionell verändert (Flores-Figueroa et al. 2005; Geyh et al. 2013). Es konnten genetische Abweichungen (Krause und Scadden 2015) sowie Veränderungen von Chemokin- und Zytokinproduktion gezeigt werden. Die Zahl von isolierten CFU-F war bei Patienten mit MDS oder sekundärer AML niedriger als bei Gesunden, ebenso die Proliferationsfähigkeit. Weiterhin zeigten MSC bei MDS und AML mehr zelluläre Seneszenz (Geyh et al. 2013). Mit zunehmendem Alter von Probanden zeigten MSC eine geringere genetische Stabilität (Stultz et al. 2016).

Zudem konnten bei Erkrankungen des knöchernen Systems Veränderungen von MSC gezeigt werden. Bei Frauen mit postmenopausaler Osteoporose zeigte sich eine geringere Wachstumsrate der MSC (Rodriguez et al. 1999), bei Patienten mit Osteoarthritis proliferierten sie weniger (Barry und Murphy 2004). Defizite der osteogenen Differenzierung konnten bei Probanden mit MDS gefunden werden (Geyh et al. 2013).

MSC können malignen Transformationen unterliegen. Eine veränderte KM-Mikroumgebung kann der Beginn einer hämatologischen Neoplasie sein (Krause und Scadden 2015). Neuere Untersuchungen zeigten, dass MSC bei der Entstehung von Tumoren eine Rolle spielen, indem sie das für Tumoren bedeutende Tumorstroma mitgestalten (Grisendi et al. 2016). Sie könnten einen Teil der krebsassoziierten Fibroblasten mit pro-tumorigenen Funktionen darstellen (Kalluri 2016).

### **1.5 Ablauf der allogenen Stammzelltransplantation**

Eine allogene SZT ist eine Therapiemöglichkeit bei verschiedenen hämatoonkologischen Erkrankungen wie AML, MDS oder Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL). Im Unterschied zur autologen SZT kommen die Stammzellen dabei nicht vom Patienten selbst, sondern von einer anderen Person. Die Spendersuche erfolgt zunächst innerhalb der Familie des Patienten und anschließend über zentrale Register (Familien- versus Fremdspender). Bei der Auswahl eines geeigneten Spenders spielt der Vergleich der Histokompatibilitätsantigene (HLA) eine entscheidende Rolle. Bevorzugt werden Spender, die mit dem jeweiligen Patienten in 10 HLA-Merkmalen übereinstimmen. Kommen mehrere HLA-idente Spender in Frage, werden weitere Kriterien verglichen. Dazu werden beispielsweise Unterschiede bezüglich Geschlecht, Alter und AB0-Blutgruppe zwischen Spender und Empfänger geprüft. Ein weiterer Vergleichspunkt ist der Zytomegalievirus (CMV)-Serostatus des Spenders.

Ist für einen Patienten ein geeigneter Spender gefunden und dessen Einverständnis zur SZT eingeholt, erfolgt die chemotherapeutische Konditionierung des Patienten. Diese erfolgt möglichst myeloablativ und gemeinsam mit einer TBI. Für die dabei verwendeten Substanzen (z. B. Busulfan) ist eine KM-Toxizität bekannt. Bei gesteigertem Risiko, z. B. durch höheres Alter oder vorliegende Begleiterkrankungen, ist auch eine dosisreduzierte Konditionierung möglich. Die Stammzellen werden dem Spender entweder aus dem KM oder dem peripheren Blut entnommen. Nach der Präparation der entnommenen Zellen erfolgt die Transfusion mit einer Dosis, die mindestens  $2 - 3 \times 10^8$  nukleäre Zellen/kg Körpergewicht betragen sollte.

Nach der Transplantation erhält der Patient eine Immunsuppression, um mögliche Abstoßungsreaktionen zu minimieren. Außerdem werden die Patienten zur Reduzierung von Infektionsrisiken auf einer Station mit Umkehrisolierung überwacht. Um diese und weitere Komplikationen schnellstmöglich zu erkennen und therapieren zu können, folgt der Transplantation eine mehrwöchige stationäre Betreuung (Richtlinien zur Herstellung und Anwendung von hämatopoetischen Stammzellzubereitungen, Deutsches Ärzteblatt 2014).

Entscheidend für den Erfolg der allogenen SZT ist das Engraftment, d. h. das Anwachsen der allogenen HSC des Spenders im KM des Empfängers. Das Verfahren der SZT ist mit einer hohen transplantations-assoziierten Mortalität (TRM) durch Komplikationen wie Infektionen oder Graft-versus-Host Disease (GvHD) verbunden. Um die Erfolgchancen allogener SZT zu verbessern, sind neue Erkenntnisse zum Einfluss von Erkrankungen und Therapien auf das KM dringend notwendig.

### **1.6 Rolle von MSC bei allogenen SZT**

Bisherige Erkenntnisse zur Bedeutung von MSC bei allogenen SZT beziehen sich auf die Abstammung und das Anwachsen von MSC oder auf eine mögliche therapeutische Anwendung (siehe auch 1.7).

Bei der Entnahme von MSC nach allogener SZT wurde der Genotyp des Empfängers nachgewiesen. Vom Spender übertragene MSC fanden sich nicht im KM des Empfängers, obwohl im peripheren Blut ein erfolgreiches hämatopoetisches Engraftment mittels Nachweis von Spender-DNS gezeigt wurde (Bacher et al. 2010). Demzufolge sind MSC teilweise strahlen- und chemoresistent, da sie die entsprechenden Vortherapien überstehen. Sie können somit das KM-Stroma neu bilden (Koc et al. 1999). Sogar mehrere Jahre nach erfolgreicher allogener SZT wurden bei Patienten mit schwerer aplastischer Anämie keine vom Spender stammenden MSC gefunden, obwohl mindestens 90% hämatopoetisches Engraftment vorlag. Nach SZT zeigten sich geringere Zellzahlen von MSC bei Isolation von gleich viel MNC als bei Gesunden. Das Wachstum war hingegen nicht eingeschränkt (Stute et al. 2002). Es kann bislang jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass auch MSC vom Spender teilweise anwachsen (Galotto 1999; Koc et al. 1999). Das KM-Stroma könnte nach allogener SZT durch die ansässigen MSC reprogrammiert werden, wodurch die gesunden Spenderzellen besser beim Anwachsen unterstützt werden (Geyh et al. 2013).

Nach allogener SZT wurde eine geringere Differenzierung der MSC zu Osteoblasten festgestellt. Dies war mit vermehrtem Knochenverlust nach der Transplantation (Lee et al. 2002) sowie langanhaltenden Knochenschäden durch die SZT assoziiert (Tauchmanova et al. 2002).

Weitere Erkenntnisse über Veränderungen der MSC durch eine allogene SZT fehlen jedoch. Es ist unklar, ob und wie die Quantität und Qualität der Zellen beeinflusst wird und welche weiteren Faktoren dabei von Bedeutung sind. Aufbauend auf eine Vorarbeit der AG Müller (Promotion Frau Josephine Schneider) konnten in der vorliegenden Arbeit diesbezüglich erste Ansätze genauer betrachtet werden.

### **1.7 Therapeutische Anwendung von MSC**

Aufgrund ihrer immunomodulatorischen, regenerativen und Nischen-bildenden Funktionen versprechen MSC Möglichkeiten der therapeutischen Nutzung bei verschiedenen Erkrankungen. Die Gabe von MSC rief keine toxischen Wirkungen hervor (Koc et al. 2000).

MSC können direkt als Zellen Regenerationsvorgänge bewirken. Sie generierten de novo Myokardzellen (Orlic et al. 2001) und wurden u. a. bei koronarer Herzkrankheit und nach Myokardinfarkt gegeben (Stamm et al. 2003). Kardiomyozyten, welche aus dem KM stammten, wuchsen nach Transplantation an (Deb et al. 2003). MSC konnten außerdem ins Gehirn gelangen und Neurone generieren (Mezey et al. 2003). Ihre Injektion nach Schlaganfall führte seltener zu Apoptose, verringerte die Narbenbildung und verbesserte die Angiogenese (Caplan und Dennis 2006). Weiterhin trugen sie zur Wundheilung bei, indem sie in verschiedene Zelltypen der Haut differenzierten (Sasaki et al. 2008).

Außerdem können MSC über eine Aktivierung oder Freisetzung von verschiedenen Faktoren wirken. MSC trugen zur natürlichen Regeneration bei, indem sie, nach Anregung durch eine inflammatorische Umgebung, verschiedene bioaktive Moleküle freisetzten. Diese wirkten antiapoptotisch, verhinderten Narbenbildung und förderten Angiogenese und Mitose (Caplan und Correa 2011). Bei Patientinnen mit Brustkrebs nach Hochdosis-CTx (Koc et al. 2000) sowie bei Autoimmunerkrankungen (Bianco et al. 2013) konnten positive Effekte durch MSC-Infusionen gezeigt werden. In Mäusen wurden positive therapeutische Effekte bei der rheumatoiden Arthritis (Augello et al. 2007) und bei Diabetes mellitus beobachtet. Hyperglykämien sowie renale Schäden wurden verringert und es kam zu einem Anstieg von Insulin-produzierenden Zellen (Lee et al. 2006).

Weitere Organsysteme, die von MSC-Gaben positiv beeinflusst werden konnten, waren beispielsweise Lunge [Protektion gegen Bleomycin-induzierte Lungenfibrose (Ortiz et al. 2003)], Niere [Verbesserung der Nierenfunktion bei akutem Nierenversagen (Togel et al. 2005)] und Darm [Anwendung bei Morbus Crohn (Newman et al. 2009)].

MSC konnten mit antineoplastischen Faktoren beladen werden und als Vehikel z. B. den Tumor-Nekrose-Faktor assoziierten Apoptose-induzierenden Liganden (TRAIL) in Tumorgewebe bringen (Luetzendorf et al. 2010). Selbst Resistenzen konnten von diesen beladenen MSC überwunden werden, wodurch sie gut therapeutisch nutzbar sind (Mueller et al. 2011).

Bei SZT war eine zusätzliche Verabreichung von MSC vorteilhaft. Das Engraftment konnte verbessert und das Transplantatversagen verringert werden. Außerdem scheint die Ko-Infusion von MSC präventiv gegen die Entstehung von Abstoßungsreaktionen zu sein (Bernardo und Fibbe 2015). Eine erfolgreiche Anwendung bei Patienten mit akuten und chronischen GvHD wurde in mehreren Studien gezeigt (Le Blanc et al. 2008; Kebriaei et al. 2009; Ringden und Le Blanc 2011).

Unklar ist bisher, ob die therapeutische Gabe mit autologen oder allogenen MSC erfolgen sollte. Es ist offen, inwiefern verschiedene Faktoren Einfluss auf die Isolierbarkeit von MSC haben. Demzufolge ist nicht sicher, ob bei Patienten mit beispielsweise höherem Alter oder bestimmten Vorerkrankungen die therapeutische Gabe von autologen MSC möglich ist oder diese eine Therapie mit allogenen MSC benötigen.

## **2. Zielstellung**

MSC sind ein wichtiger Teil der KM-Nische und entscheidend für die Hämatopoese. Sie scheinen eine wesentliche Rolle für die Ausbildung der Spenderhämatopoese nach allogener SZT zu spielen. Neue Erkenntnisse über Faktoren, die die KM-Nische und die MSC des KM beeinflussen, sind für folgende Aspekte wichtig:

- besseres Verständnis der KM-Nische
- Entwicklung von Ansätzen zur Optimierung des Verfahrens der SZT
- Weiterentwicklung von Konzepten zur therapeutischen Nutzung von autologen und allogenen MSC
- Verbesserung der Auswahl von MSC-Spendern.

Bereits in einer Vorarbeit der AG Müller (Promotion Frau Josephine Schneider) wurden Einflussfaktoren auf die Präsenz von MSC im KM gefunden. Dabei wurde ein Einfluss von Geschlecht, Alter, bestehenden Erkrankungen (AML, MDS) und durchgemachten Therapien (CTx, SZT) festgestellt. Bei jüngeren Patienten sowie bei Patienten ohne Vorerkrankungen oder Vortherapien war die Wahrscheinlichkeit höher, MSC im KM zu isolieren.

Damit lag der vorliegenden Arbeit folgende Hypothese zugrunde: Die Präsenz und Isolierbarkeit sowie die Charakteristika von MSC des KM werden durch Alter, Geschlecht, Erkrankungen und insbesondere durch eine allogene SZT wesentlich beeinflusst.

Ziel der Arbeit war es, die in der Vorarbeit beobachteten Einflussfaktoren in einer Validierungsanalyse zu bestätigen, detaillierter zu untersuchen sowie den speziellen Einfluss der allogenen SZT auf die Präsenz und ausgewählte Charakteristika von MSC zu bestimmen. Hierfür wurden bei einer neuen Kohorte die Präsenz von CFU-F und die Zahl der gewonnenen MSC untersucht. Dabei wurden die aus den Vorarbeiten bekannten Variablen erneut betrachtet. In einem zweiten Ansatz wurde bei Patienten mit erfolgter allogener SZT der Einfluss SZT-spezifischer Faktoren wie Spender- und Transplantationscharakteristika auf MSC analysiert. Weiterhin wurde in einer separat erstellten Verlaufgruppe betrachtet, wie sich die Präsenz von MSC nach einer allogenen SZT im Vergleich zu den Daten vor der Transplantation verhielt.

### **3. Material und Methodik**

#### **3.1 Probanden**

Bei den untersuchten Probanden handelte es sich um Patienten der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin IV, Hämatologie und Onkologie, des Universitätsklinikums Halle (Saale), bei denen zum Ausschluss oder zur Verlaufskontrolle einer Erkrankung eine KMP erfolgte. Vor dem Eingriff wurden die Patienten über die Entnahme zusätzlichen Materials aufgeklärt und deren schriftliches Einverständnis hierfür eingeholt. Für die Untersuchungen lag ein gültiges Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vor (Votum vom 20.04.2010; Version: Nr. 2; Amendment 1).

#### **3.2 Knochenmarkpunktion**

Die KMP wurde beim liegenden Patienten am Beckenkamm nach in der Klinik etablierten Standardtechniken vorgenommen. Zunächst erfolgte die Entnahme des für die Diagnostik relevanten Materials. Anschließend wurden 10 bis 40 ml KM-Aspirat in Zitrat-Monovetten (*Saarstedt*, Nümbrecht, Deutschland) gewonnen, jeweils vorsichtig geschwenkt und innerhalb von 8 Stunden im Labor weiterverarbeitet.

#### **3.3 MSC-Isolation**

Die Isolation von MSC erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation zur Gewinnung von MNC und anschließender Adhärenzselektion in der AG Müller durch MTA Frau Katrin Nerger bzw. unter deren Anleitung. Proben mit einer geringen Materialausbeute (< 5 ml), beispielsweise durch Koagulation, wurden verworfen.

Zunächst wurde das Zitratblut mit PBS (*Sigma*; St. Louis, Missouri, USA) verdünnt oder unverdünnt zentrifugiert (1.300 rpm, 10 min). Der Überstand mit den Bestandteilen des Serums wurde verworfen. Die zellulären Bestandteile wurden mit PBS resuspendiert und anschließend auf LSM 1077 (*Lonza*; Basel, Schweiz) geschichtet. Nach erneuter Zentrifugation (1.300 rpm, 25 min, ohne Bremse) wurde die Interphase, welche die MNC enthält, mit einer Pasteurpipette entnommen, mit PBS gespült und zentrifugiert (1.300 rpm, 5 min). Das gewonnene Zellpellet der MNC wurde ggf. einer Erythrozytenlyse (5 min, 4 °C) unterzogen und ein weiteres Mal mit PBS gespült.

Die Zellen wurden anschließend in einem Wachstumsmedium resuspendiert. Dieses Medium bestand aus DMEM (*Gibco, Thermo Scientific; Waltham, Massachusetts, USA*), 15% FKS (*PAN Biotech; Aidenbach, Deutschland*) und 1% Penicillin/Streptomycin (*Sigma; St. Louis, Missouri, USA*).

Mittels Auszählung in einer Neubauer-Zählkammer wurde die Gesamtzahl der gewonnenen MNC bestimmt. Es wurden je etwa  $10 \times 10^6$  MNC in eine Petrischale mit einer Grundfläche von  $60 \text{ cm}^2$  gegeben. Anschließend erfolgte die Kultivierung im Brutschrank ( $37 \text{ °C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ,  $\geq 95\%$  Luftfeuchtigkeit). Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt und dadurch nicht-adhärenente Zellen entfernt. Es erfolgten tägliche Wachstumskontrollen und alle drei Tage ein Mediumwechsel. Dabei konnte das Wachstum von Kolonien, welche aus mindestens 100 Zellen pro Gesichtsfeld bei 10-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop bestanden, beobachtet werden.

Die Passagierung erfolgte, sobald Kolonien zählbar waren und wenigstens 50% der Kolonien mindestens 80% konfluent waren. Es wurde mit PBS gespült und mit Trypsin-EDTA (*Sigma; St. Louis, Missouri, USA*) inkubiert. Zum Abstoppen wurde Wachstumsmedium hinzugegeben. Die Zellsuspension wurde aufgenommen und die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer ermittelt. Anschließend erfolgte die Kryokonservierung in einem dafür geeigneten Medium [FKS mit 10% DMSO (*Carl Roth; Karlsruhe, Deutschland*)] oder eine Subkultivierung für weitere Analysen. Die Zahl an CFU-F-Zellen bei erster Passage wurde als Zahl der gewonnenen MSC für die Analyse der Einflussfaktoren verwendet. Aufgrund des Einschlusses von Patienten mit KM-Infiltraten bei Leukämie oder toxischen KM-Schäden sowie der Durchführung der Aspiration durch unterschiedliche Untersucher bestand eine hohe Varianz der Zahl an MNC sowie der Probenmengen des Aspirats. Um eine dadurch bedingte Verzerrung zu vermeiden, wurde die Zahl von MSC bei erster Passage auf das gewonnene Volumen KM-Aspirat bezogen.

Wenn innerhalb von 20 Tagen keine Kolonien sichtbar waren, konnten keine MSC isoliert werden und die Probe wurde verworfen. Dies wurde dann als „fehlende Präsenz von MSC“ gewertet.

### 3.4 Charakterisierung der MSC

Die Charakterisierung der gewonnenen Zellen als MSC erfolgte stichprobenartig entsprechend etablierter Protokolle (Müller et al. 2006) in der AG durch MTA Frau Katrin Nerger. Dabei wurden die Zellen in der Durchflusszytometrie auf Positivität von CD90, CD105, CD73 und Negativität von HLA-DR, CD14, CD19, CD34, CD45 (Dominici et al. 2006) getestet. Die für MSC typische Fähigkeit zur osteogenen und adipogenen Differenzierung wurde durch die Zugabe spezieller Medien und anschließender Fixierung und Anfärbung nachgewiesen.

### 3.5 Erstellen einer Wachstumskinetik

Das Proliferationsverhalten von MSC ab der ersten Passage wurde mittels Wachstumskinetiken analysiert. Die MSC wurden mit einer Dichte von 200 Zellen/ cm<sup>2</sup> gesetzt (Zeitpunkt 1). Bei 50%iger Konfluenz wurde erneut passagiert (Zeitpunkt 2) und die Zellzahl ermittelt. Die Anzahl der Populationsverdopplungen (PD) und die Populationsverdopplungszeit (PDT) wurden nach etablierten Formeln (Baxter et al. 2004) ermittelt:

$$PD = \frac{\lg \left( \frac{\text{Zellzahl Zeitpunkt 2}}{\text{Zellzahl Zeitpunkt 1}} \right)}{\lg 2}$$

$$PDT = \frac{n \text{ Tage zwischen Zeitpunkt 1 und 2}}{\text{zugehörige PD}}$$

### 3.6 Datenerfassung

Bei vorliegendem Einverständnis wurden alle patientenbezogenen Informationen pseudonymisiert verarbeitet, gespeichert und analysiert. Die Daten wurden retrospektiv mittels Durchsicht von Patientenakten und elektronischen Dokumentationen erfasst.

Dabei wurden u. a. folgende Informationen aufgenommen:

- allgemeine Patientendaten, z. B. Alter, Geschlecht, Body Mass Index (BMI)
- zurückliegende und bestehende Erkrankungen
- Therapien (Medikation, CTx, Bestrahlung)
- Befunde von KMP (Zytologie, Histologie)
- Präsenz von CFU-F-Kolonien und Zellzahl der isolierten MSC.

### **3.7 Statistische Auswertung**

Die Auswertung der Daten wurde mit dem Statistik-Programm SPSS (IBM; Armonk, New York, USA) in der Version 18.0.0 durchgeführt. Ergebnisse mit einem p-Wert < 0,05 wurden als signifikant gewertet. Alle p-Werte wurden explorativ interpretiert. Die Auswahl der Testverfahren sowie die Interpretation der Ergebnisse erfolgte nach Berechnungen in Kooperation mit Frau PD Dr. Susanne Unverzagt vom Institut für Medizinische Epidemiologie, Biometrie und Informatik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

#### **3.7.1 Deskriptive Analysen**

Mittels deskriptiver Statistik wurden für kategoriale Merkmale (z. B. Geschlecht, Erkrankungen, Therapien) absolute und relative Häufigkeiten bestimmt. Der Einfluss von unabhängigen Variablen (z. B. AML, CTx, allogene SZT) auf die Präsenz von MSC als abhängige Variable wurde mit Kreuztabellen ermittelt.

Für nominale Variablen (z. B. Alter, Zellzahl der isolierten MSC) wurden Mittelwerte, das dazugehörige 95%ige Konfidenzintervall (KI = der Bereich, in dem zu 95% der wahre Wert enthalten ist) sowie Streumaße (z. B. Standardabweichung, Varianz) ermittelt.

#### **3.7.2 Univariate Analysen**

Mithilfe eines Mittelwertvergleichs wurde der Einfluss von verschiedenen Faktoren wie Alter, Geschlecht, Vorerkrankungen (z. B. AML, MDS), CTx und allogener SZT auf die Zellzahl der isolierten MSC ermittelt.

#### **3.7.3 Multivariate Analysen**

Für den Einfluss von kategorialen Variablen erfolgte eine binär logistische Regressionsanalyse mittels Vorwärts (Einschluss) - Methode. Die Präsenz von MSC wurde als abhängige Variable festgelegt. Als Kovariaten wurden Alter, Geschlecht, AML, MDS und allogene SZT betrachtet.

Um den Einfluss ausgewählter Variablen auf die Zellzahl der MSC zu ermitteln, wurde das allgemeine lineare Modell angewandt. Die Zellzahl MSC/ml KM sowie die Passagedauer wurden als abhängige Variablen definiert. Geschlecht, AML, MDS und allogene SZT wurden als feste Faktoren, das Alter als Kovariate festgelegt. Als Indikatoren wurden zunehmendes Alter, weibliches Geschlecht, das Vorliegen einer AML oder eines MDS sowie eine zurückliegende SZT angesetzt.

#### **3.7.4 Bestimmung von Signifikanzen und Effektschätzern**

Die Berechnung der Signifikanz  $p$  wurde innerhalb von Kreuztabellen mittels Chi<sup>2</sup>-Test und bei Mittelwertvergleichen durch Varianzanalyse (ANOVA) sowie T-Tests ermittelt. Die Stärke von möglichen Zusammenhängen wurde durch die Betrachtung von Effektschätzern [Odd's Ratio (OR) und Mittelwertdifferenzen (MD)] ermittelt.

Um Ergebnisse zweier Gruppen miteinander vergleichen zu können, wurde das entsprechende OR ermittelt. Dabei bedeutet ein  $OR < 1$  eine niedrigere Wahrscheinlichkeit einer bestimmten Gruppe für beispielsweise das Vorhandensein von MSC. Ein  $OR > 1$  besagt, dass eine Gruppe eine höhere Wahrscheinlichkeit für das ausgewählte Ereignis hat. Bei einem  $OR = 1$  besteht kein Unterschied zwischen den beiden betrachteten Gruppen. Es wurden die dazugehörigen 95%igen KI bestimmt. War darin der Wert „1“ enthalten, kann man keine eindeutigen Unterschiede zwischen den Gruppen annehmen.

Bei der Betrachtung der Zellzahlen wurden Gruppen mittels MD verglichen. Eine positive Differenz einer Gruppe zu einer anderen bedeutet, dass in ersterer mehr Zellen isoliert werden konnten. Bei einer negativen Differenz wurden weniger Zellen isoliert. War die  $MD = 0$  gab es keinen Unterschied zwischen den Gruppen. Es wurde dazu das 95%ige KI bestimmt. Enthielt dies den Wert „0“ konnten fehlende Differenzen der Zellzahlen zwischen den Gruppen nicht ausgeschlossen werden.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Allgemeine Charakteristik der Probanden

Nach Datenschluss im Juni 2014 wurde die finale Datenbank erstellt. Fälle mit fehlenden Informationen sowie doppelt aufgenommene Probanden wurden entfernt (siehe dazu das Patientenflussdiagramm in Abb. 3). Letztlich waren Datensätze von 368 Probanden vollständig vorhanden. Im Zeitraum Juli 2013 bis Juni 2014 wurden 69 KMP innerhalb der Studie neu erfasst, wovon 46 verwertbar waren. Diese wurden als Validierungs-Set analysiert und den aus der Vorarbeit der AG Müller (Promotion Frau Josephine Schneider) vorliegenden Datensätzen, dem Discovery-Set, gegenübergestellt.

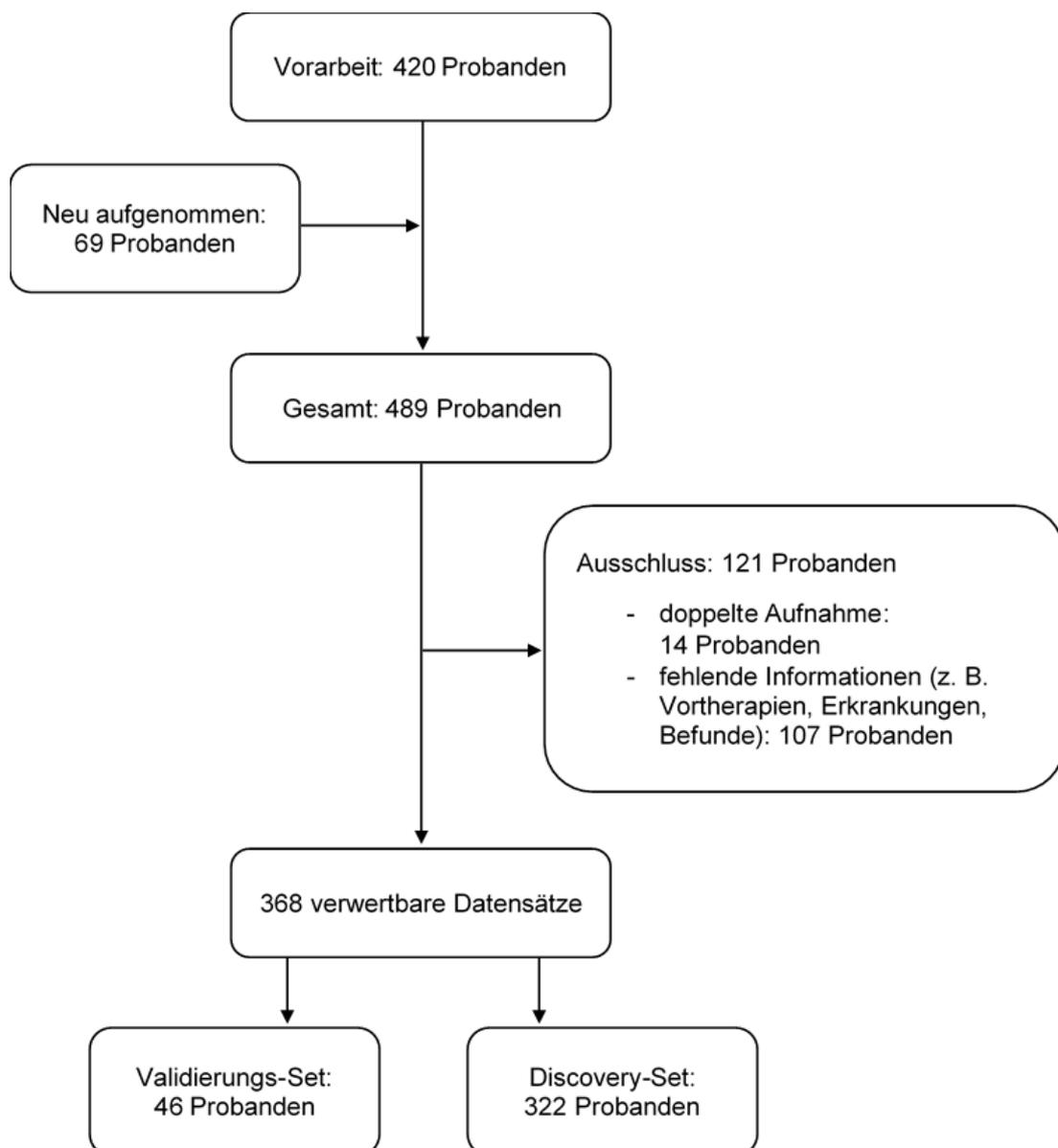


Abb. 3: Patientenflussdiagramm

Die allgemeinen Merkmale der untersuchten Probanden sind in Tab. 1 dargestellt. Diese waren im Validierungs-Set ähnlich verteilt wie im Discovery-Set. Auf einen statistischen Vergleich wurde verzichtet, da dies nicht Ziel der vorliegenden Arbeit war. Tab. 11 (siehe Anlagen) zeigt die Verteilung innerhalb der Gesamtgruppe (N = 368), in welcher Validierungs- und Discovery-Set gemeinsam betrachtet wurden.

Tab. 1: Allgemeine Merkmale der Probanden

	Validierungs-Set (N = 46)	Discovery-Set (N = 322)
	% (Anzahl)	% (Anzahl)
<i>Alter in Jahren</i>		
Median	63	61
Spannweite	19 – 81	15 – 86
<i>Geschlecht</i>		
Männlich	60,9 (28)	60,2 (194)
Weiblich	39,1 (18)	39,8 (128)
<i>Gesunde Spender</i>	2,2 (1)	2,8 (9)
<i>Hämatologische Erkrankungen *</i>		
AML	32,6 (15)	12,4 (40)
ALL	4,3 (2)	5,0 (16)
CML	-	0,9 (3)
CLL	8,7 (4)	4,7 (15)
OMF	-	0,9 (3)
MDS	8,7 (4)	2,2 (7)
HL	2,2 (1)	2,2 (7)
NHL	26,1 (12)	23,9 (77)
MM	6,5 (3)	19,3 (62)
<i>Weitere Vorerkrankungen *</i>		
Niereninsuffizienz	34,8 (16)	17,1 (55)
Diabetes mellitus	19,6 (9)	14,9 (48)
Leberzirrhose	-	1,6 (5)
solide Tumoren	17,4 (8)	14,0 (45)

\* bei Erkrankungen und Therapien sind Mehrfachnennungen möglich

Fortsetzung Tab. 1: allgemeine Merkmale der Probanden

	Validierungs-Set (N = 46)	Discovery-Set (N = 322)
	% (Anzahl)	% (Anzahl)
<i>Erhaltene Therapien *</i>		
CTx	54,3 (25)	53,7 (173)
Rituximab	21,7 (10)	16,1 (52)
Radiatio	23,9 (11)	21,1 (68)
TBI	13,0 (6)	5,3 (17)
Autologe SZT	6,5 (3)	10,6 (34)
Allogene SZT	26,1 (12)	11,2 (36)

\* bei Erkrankungen und Therapien sind Mehrfachnennungen möglich

#### 4.2 Einflussfaktoren auf die Präsenz von MSC

Zur Ermittlung von Einflussfaktoren auf die Präsenz von MSC wurden verschiedene nominale Variablen bezüglich des Fehlens der Präsenz mittels Kreuztabellen verglichen. Es wurden Faktoren ausgewählt, für die aus Vorarbeiten ein Einfluss bekannt oder anhand der Literatur zu vermuten war. Im Validierungs-Set zeigt sich ein eindeutiger Zusammenhang lediglich für die SZT sowie speziell für die allogene SZT (siehe Tab. 2). Die weiteren Untersuchungen wurden entsprechend der Hypothese auf den Einfluss der allogenen SZT fokussiert. Die Daten der Gesamtgruppe sind in Tab. 12 (siehe Anlagen) ersichtlich.

Tab. 2: Häufigkeiten der fehlenden MSC-Präsenz

	Validierungs-Set (N = 46)		Discovery-Set (N = 322)	
	Versagen	OR	Versagen	OR
	in %	[95% KI]	in %	[95% KI]
<i>Altersgruppen</i>				
<b>A:</b> < 40 Jahre	20	<b>AB:</b> 1,88 [0,13 – 26,32]	4,9	<b>AB:</b> 0,11 [0,03 – 0,50]
<b>B:</b> ≥ 40 – < 60 Jahre	11,8	<b>AC:</b> 0,50 [0,05 – 5,24]	31,0	<b>AC:</b> 0,11 [0,03 – 0,45]
<b>C:</b> ≥ 60 Jahre	33,3	<b>BC:</b> 0,27 [0,05 – 1,46]	32,7	<b>BC:</b> 0,92 [0,55 – 1,54]

Fortsetzung Tab. 2: Häufigkeiten der fehlenden MSC-Präsenz

	Validierungs-Set (N = 46)		Discovery-Set (N = 322)	
	Versagen	OR	Versagen	OR
	in %	[95% KI]	in %	[95% KI]
<i>Geschlecht</i>				
Männlich	21,4	0,71	22,2	0,46
Weiblich	27,8	[0,18 – 2,79]	38,3	[0,28 – 0,75]
<i>AML</i>				
Nein	16,1	0,29	25,2	0,30
Ja	40	[0,07 – 1,18]	52,5	[0,16 – 0,60]
<i>MDS</i>				
Nein	21,4	0,27	27,6	0,15
Ja	50	[0,03 – 2,21]	71,4	[0,03 – 0,80]
<i>CTx</i>				
Nein	14,3	0,35	22,8	0,59
Ja	32	[0,08 – 1,56]	33,5	[0,36 – 0,96]
<i>SZT</i>				
Nein	12,5	0,14	24,7	0,39
Ja	50	[0,03 – 0,63]	45,8	[0,22 – 0,70]
<i>Autologe SZT</i>				
Nein	23,3	0,61	26,7	0,46
Ja	33,3	[0,05 – 7,40]	44,1	[0,22 – 0,96]
<i>Allogene SZT</i>				
Nein	11,8	0,10	26,6	0,45
Ja	58,3	[0,02 – 0,45]	44,4	[0,22 – 0,92]
<i>Niereninsuffizienz</i>				
Nein	16,7	0,33	26,2	0,53
Ja	37,5	[0,08 – 1,35]	40	[0,29 – 0,98]
<i>TBI</i>				
Nein	20	0,25	26,9	0,26
Ja	50	[0,04 – 1,48]	58,8	[0,10 – 0,70]

Aus dem Discovery-Set war ein negativer Einfluss von zunehmendem Alter sowie weiblichem Geschlecht auf die Präsenz von MSC bekannt. Im Validierungs-Set war dies aufgrund der geringen Fallzahl und der daraus resultierenden niedrigeren Präzision der Effektschätzer nur bedingt sichtbar.

Es zeigte sich für die Altersgruppe der Patienten, die jünger als 40 Jahre alt waren (in Tab. 4 als Gruppe **A** gekennzeichnet), ein 1,88fach höhere Chance für ein Versagen der MSC-Isolation [95% KI: 0,13 – 26,32] verglichen mit den 40- bis 60-Jährigen (Gruppe **B**). Männer hatten im Vergleich zu Frauen eine 0,71fache Chance [95% KI: 0,18 – 2,79] für das Versagen der MSC-Isolation. Weiterhin war ein Einfluss von AML, MDS, CTx, Niereninsuffizienz sowie TBI auf die Präsenz von MSC im Discovery-Set gesehen worden. Im Validierungs-Set waren all diese Faktoren mit einer geringeren Chance für das Misslingen der MSC-Isolation versehen, wobei jedoch die Konfidenzintervalle teilweise stark schwankten und auch eine höhere Versagenschance für diese Gruppe beinhalteten.

In Abb. 4 ist der Einfluss einer SZT und speziell der allogenen SZT innerhalb des Validierungs- und Discovery-Sets zu sehen. Diese Unterschiede waren sowohl bei den 46 neu aufgenommenen als auch bei den 322 zuvor analysierten Probanden signifikant (\*). Patienten nach einer SZT hatten im Validierungs-Set lediglich eine 0,14fache Chance [95% KI: 0,03 – 0,63] für eine erfolgreiche MSC-Isolation. Für Patienten nach allogener SZT betrug die Chance das 0,10fache [95% KI: 0,02 – 0,45].

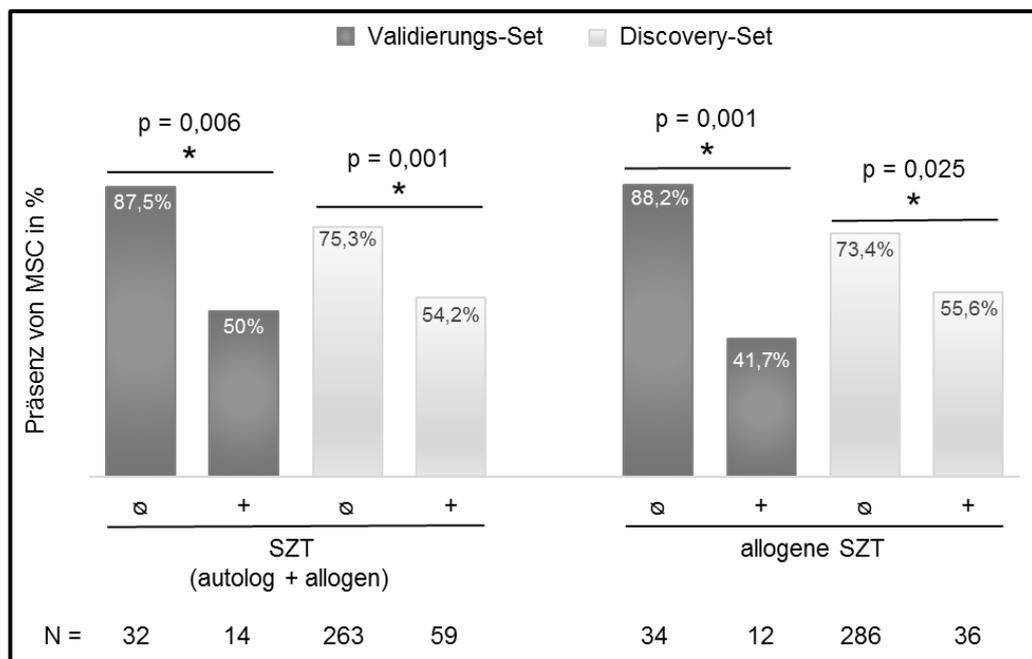


Abb. 4: Einfluss von SZT und speziell allogener SZT auf die MSC-Präsenz

### 4.3 Multivariate logistische Regression

Um eine unabhängige Wirkung bestimmter Faktoren zu identifizieren, wurde eine multivariate logistische Regression mittels Vorwärts (Einschluss) - Methode innerhalb des Validierungs-Sets durchgeführt. Dies erfolgte für solche Faktoren, die in der univariaten Analyse des Validierungs- oder des Discovery-Sets einen deutlichen Zusammenhang zeigten (siehe Tab. 3). Als auffälligstes Ergebnis stellte sich eine Assoziation der fehlenden Präsenz von MSC nach erfolgter allogener SZT dar. Die Chance, bei einem Patienten nach allogener SZT MSC zu isolieren, betrug das 0,06fache [95% KI: 0,01 – 0,45] verglichen mit Patienten ohne allogene SZT. Ein unabhängiger Effekt von Alter, Geschlecht, vorliegender AML oder MDS konnte nicht bestätigt werden. Demzufolge wurde der Einfluss der allogenen SZT auf die Präsenz von MSC in der vorliegenden Arbeit detaillierter betrachtet.

Tab. 3: Logistische Regression des Validierungs-Sets für die Präsenz von MSC

<b>Einflussfaktor</b>	<b>OR [95% KI]</b>	<b>Signifikanz</b>
Alter	0,94 [0,87 – 1,01]	0,091
Geschlecht	0,64 [0,12 – 3,57]	0,611
AML	0,30 [0,04 – 2,05]	0,220
MDS	0,71 [0,06 – 9,24]	0,794
Allogene SZT	0,06 [0,01 – 0,45]	0,006

Die Berechnung innerhalb der Gesamtgruppe zeigte für Patienten nach allogener SZT ebenfalls eine geringere Chance einer erfolgreichen MSC-Isolation. Diese hatten eine 0,38fache [95% KI: 0,19 – 0,76] Chance MSC zu isolieren, verglichen mit Patienten ohne allogene SZT.

Weitere Ergebnisse zeigten sich für den Zusammenhang zwischen fehlender MSC-Präsenz und zunehmendem Alter, bei Frauen sowie bei Vorliegen einer AML oder eines MDS (siehe Tab. 13 in den Anlagen).

#### 4.4 Einflussfaktoren auf die Zellzahl der MSC bei erster Passage

Als Surrogatmarker für die Funktionalität der MSC wurde die Zellzahl der MSC/ml KM bei erster Passage untersucht. In 94,3% der erfolgreichen MSC-Isolationen des Validierungs-Sets konnte diese bestimmt werden. Um Unterschiede abhängig von verschiedenen Faktoren zu erkennen, wurden Mittelwertvergleiche durchgeführt und anschließend MD mit ihren 95%igen KI bestimmt.

Bei der Betrachtung des Einflusses verschiedener Faktoren auf den Mittelwert der MSC/ml KM zeigten sich nicht übereinstimmende Ergebnisse in Validierungs- und Discovery-Set (siehe Tab. 4, Seite 23). Im Validierungs-Set fielen im Mittelwertvergleich zwei Faktoren (Abstand der letzten CTx zur aktuellen KMP sowie autologe SZT) mit einem Einfluss auf die Zellzahl der MSC/ml KM bei erster Passage auf. Die MD wiesen jedoch jeweils ein unpräzises 95%iges KI von etwa -210.000 bis 185.000 MSC/ml KM für den Abstand der letzten CTx zur KMP sowie etwa -170.000 bis 140.000 MSC/ml KM für die autologe SZT auf. Auch im Discovery-Set zeigten diese beiden Faktoren keine eindeutigen Richtungsveränderungen der MD.

Im Discovery-Set fiel hingegen der Vergleich der Altersgruppen auf. Patienten, die jünger als 40 Jahre waren (Gruppe **A**), hatten deutlich höhere Zellzahlen im Vergleich zu Patienten, die zwischen 40 und 60 Jahre alt waren (Gruppe **B**) sowie zu Patienten über 60 Jahren (Gruppe **C**). Die MD zwischen Gruppe A und B betrug 55.578 MSC/ml KM [95% KI: 17.523 – 93.632]. Die Differenz von Gruppe A zu Gruppe C betrug 53.881 MSC/ml KM [95% KI: 17.836 – 89.926]. Somit waren bei jüngeren Probanden bis 40 Jahre etwa 50.000 MSC/ml KM mehr isolierbar als bei älteren Probanden. Zwischen den Gruppen B und C war kein deutlicher Unterschied der Zellzahlen erkennbar.

Tab. 4: Mittelwertvergleiche in Validierungs- und Discovery-Set

Zahl MSC/ml KM bei erster Passage				
	Validierungs-Set (N = 46)		Discovery-Set (N = 322)	
	Mittelwert	MD [95% KI]	Mittelwert	MD [95% KI]
Alter				
A: ≤ 40 Jahre	9.076	<b>AB:</b> 1.178 [-9.692 – 12.049]	66.346	<b>AB:</b> 55.578 [17.523 – 93.632]
B: > 40 – ≤ 60 Jahre	7.898	<b>AC:</b> 4.735 [-6.055 – 15.525]	10.768	<b>AC:</b> 53.881 [17.836 – 89.926]
C: ≥ 60 Jahre	4.341	<b>BC:</b> 3.557 [-3.569 – 10.682]	12.465	<b>BC:</b> -1.697 [-30.272 – 26.879]
Abstand CTx – KMP				
≤ 62 Tage	3.982	-12.347	16.142	3.417
> 62 Tage	16.328	[-210.670 – 185.977]	12.724	[-14.446 – 21.280]
Autologe SZT				
Nein	5.568	-14.119	21.330	3.583
Ja	19.687	[-169.883 – 141.645]	17.747	[-34.840 – 42.005]

Weiterhin wurde u. a. der Einfluss von Geschlecht, Vorerkrankungen (AML, MDS, MM), CTx und SZT auf die Zellzahl der MSC/ml KM bei erster Passage untersucht. Dabei zeigten sich sowohl im Validierungs-Set als auch im Discovery-Set keine deutlichen Trends der MD der Zellzahl der MSC/ml KM (siehe Tab. 14 in den Anlagen).

Die ausführlichen Daten der vollständigen Datenbank sind in Tab. 15 (siehe Anlagen) dargestellt. Ein deutlicher Effekt zeigte sich, wie auch im Discovery-Set, lediglich für das Alter der Probanden.

## **4.5 Analyse der Patienten nach allogener SZT**

### **4.5.1 Allgemeine Charakteristik der Patienten mit erfolgter allogener SZT**

Die erhobenen Daten zeigten sowohl im Validierungs- als auch im Discovery-Set einen Einfluss der allogenen SZT auf die Präsenz von MSC und ließen damit eine spezifische Schädigung von MSC in der KM-Nische durch die allogene SZT vermuten. Es erfolgte daher die detaillierte Untersuchung weiterer transplantations- sowie spender- und empfängerabhängiger Faktoren von Probanden mit durchgemachter allogener SZT. Die Auswahl dieser Faktoren erfolgte aufgrund von Hinweisen auf eine mögliche Toxizität für die KM-Nische in Literatur und vorhandenen Daten. Erkrankungsbezogene Faktoren wie das Vorliegen eines Rezidivs oder einer Remission wurden unzureichend erfasst, sodass auf deren Darstellung verzichtet wurde. Die vorhandenen Daten zeigten keine Unterschiede innerhalb der erkrankungsbezogenen Faktoren.

Von 48 Patienten, bei denen eine KMP nach allogener SZT durchgeführt wurde, wurden 3 Fälle wegen fehlender Informationen entfernt. Dabei wurde in den vorliegenden Akten oder in den elektronischen Dokumentationen in einem Fall keine eindeutige Zuordnung der Konditionierung und in den beiden anderen Fällen kein BMI der Patienten erfasst. Die allgemeinen Merkmale der 45 verbliebenen Probanden nach allogener SZT sind in Tab. 5 (Seite 25) dargestellt. Diese Patienten stellen eine repräsentative Gruppe verglichen mit dem klinischen Alltag dar. Die breite Altersstreuung, die Verteilung der Indikationsstellung für die Transplantation (mehr Patienten mit AML als mit NHL) sowie das Engraftmentversagen von etwa 10% sind typisch.

Tab. 5: Allgemeine Merkmale der Patienten nach allogener SZT

	<b>% (Anzahl)</b>
<i>Alter in Jahren</i>	
Median	56
Spannweite	20 – 71
<i>Geschlecht</i>	
Männlich	66,7 (30)
Weiblich	33,3 (15)
<i>BMI in kg/m<sup>2</sup></i>	
Median	25,1
Spannweite	17,6 – 35,7
<i>Hämatologische Erkrankungen*</i>	
AML	42,2 (19)
ALL	2,2 (1)
CLL	11,1 (5)
MDS	6,7 (3)
NHL	20 (9)
MM	17,8 (8)
<i>Weitere Vorerkrankungen*</i>	
Niereninsuffizienz	31,1 (14)
Diabetes mellitus	11,1 (5)
solide Tumoren	15,6 (7)
CMV-Infektion vor allogener SZT	73,3 (33)
<i>Faktoren während allogener SZT</i>	
Spender und Empfänger verwandt	22,2 (10)
gleiches Geschlecht	73,3 (33)
gleiche Blutgruppe	51,1 (23)
gleicher Rhesusfaktor	75,6 (34)
HLA-Mismatch ( $\leq 9/10$ )	20 (9)
<i>Verlauf nach allogener SZT</i>	
gutes Anwachsen	88,9 (40)
keine GvHD	62,2 (28)

\* Mehrfachnennungen möglich

#### 4.5.2 Präsenz von MSC bei Patienten nach allogener SZT

Insgesamt konnten MSC bei 23 Patienten (51,1%) nach allogener SZT isoliert werden. Die zusätzlich erfassten Informationen wurden hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Präsenz von MSC untersucht (siehe Tab. 16 in den Anlagen). In Abb. 5 ist die Auswertung von patientenbezogenen Faktoren (BMI, Abstand der KMP zur SZT und CMV-Infektion vor SZT) dargestellt. Patienten mit einem BMI  $\leq 18,4\text{kg/m}^2$  hatten eine etwa doppelt so hohe Chance für das Vorliegen von MSC verglichen mit Patienten mit einem höheren BMI; verglichen mit Patienten mit einem BMI zwischen 18,5 und 24,9kg/m<sup>2</sup> betrug das Verhältnis 2,11 [95% KI: 1,31 – 3,39] und mit Patienten mit einem BMI  $\geq 25\text{ kg/m}^2$  2,00 [95% KI: 1,34 – 2,98]. War die SZT länger als 5 Monate her, betrug die Chance einer erfolgreichen MSC-Isolation das 1,42fache [95% KI: 0,40 – 5,07]. Patienten mit einer CMV-Infektion vor der SZT hatten eine 1,68fache [95% KI: 0,44 – 6,39] Chance, dass MSC isoliert werden konnten, verglichen mit Patienten ohne vorherige CMV-Infektion.

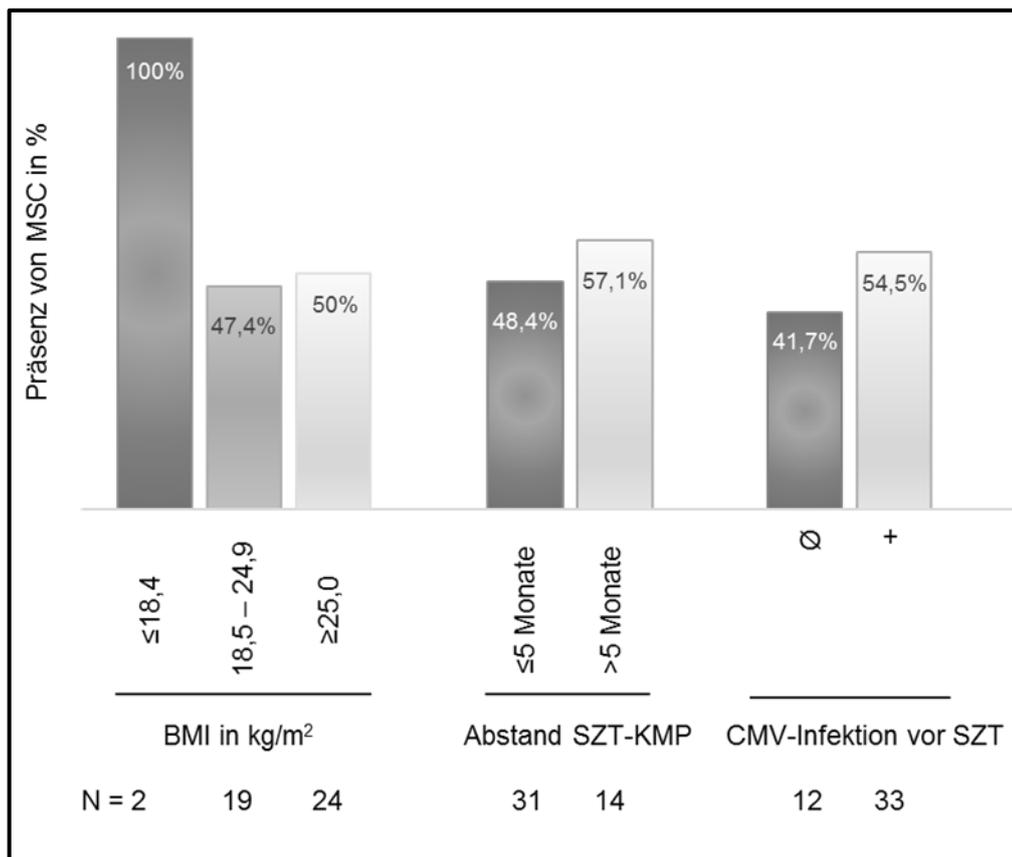


Abb. 5: Einfluss patientenbezogener Faktoren auf die Präsenz von MSC

Es wurden folgende spenderbezogene Faktoren betrachtet: die Übereinstimmung der HLA-Gene, eine bestehende Verwandtschaft sowie die Übereinstimmung von Geschlecht, Blutgruppe und Rhesusfaktor zwischen Spender und Empfänger (siehe Abb. 6). Dabei konnten keine eindeutigen Veränderungen festgestellt werden. Waren beispielsweise Spender und Empfänger miteinander verwandt, betrug die Chance einer erfolgreichen MSC-Isolation das 0,56fache [95% KI: 0,13 – 2,34] gegenüber einem fehlenden Verwandtschaftsverhältnis. Hatten Spender und Empfänger übereinstimmende Geschlechter war die Chance einer erfolgreichen MSC-Isolation 1,68fach [95% KI: 0,44 – 6,39] so hoch wie bei verschiedenen Geschlechtern.

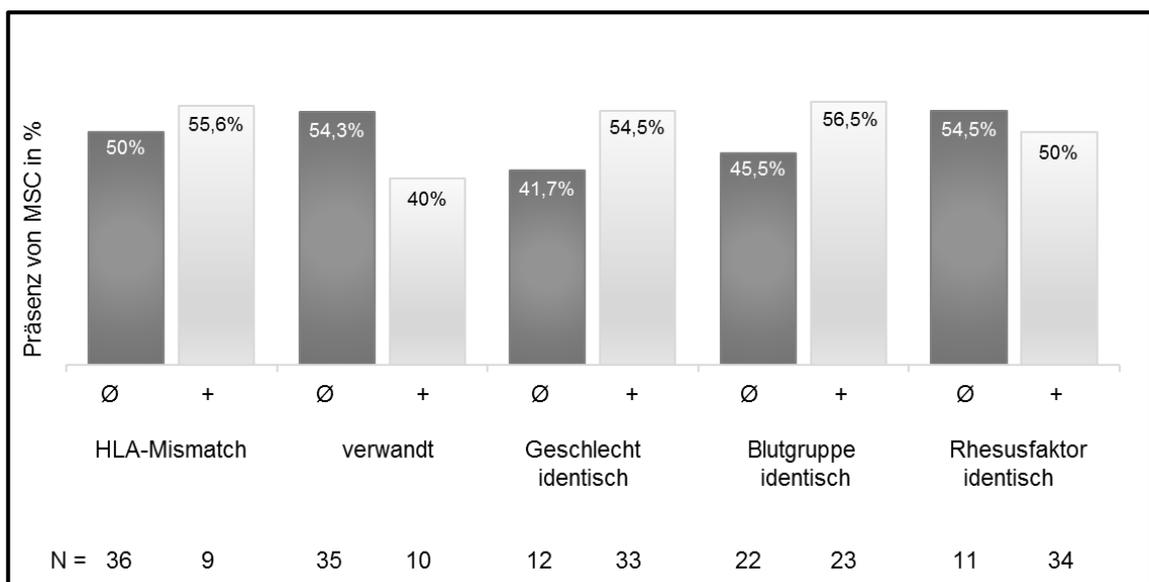


Abb. 6: Einfluss spenderbezogener Faktoren auf die Präsenz von MSC

Bezüglich der Vorbereitungen für die SZT wurden die Faktoren Konditionierungsart (nicht-myeloablative Konditionierung = NMA, reduzierte Konditionierung = RIC, myeloablative Konditionierung = MAC), durchgemachte TBI und Busulfan-haltige Konditionierung untersucht. In Abb. 7 (Seite 28) ist die deutlich geringere Präsenz von MSC bei Patienten nach TBI erkennbar. Nach TBI war die Chance einer erfolgreichen MSC-Isolation lediglich 0,20fach [95% KI: 0,06 – 0,72] so hoch wie ohne TBI. Bezüglich der Konditionierung konnte ein Einfluss der Aggressivität der Therapie gesehen werden. Patienten, die eine MAC erhalten hatten, hatten im Vergleich zu Patienten nach einer RIC eine 1,77fache [95% KI: 0,40 – 7,93] und zu Patienten nach einer NMA eine 1,80fache [95% KI: 0,32 – 10,20] Chance, dass keine MSC gefunden wurden. Hatte ein Patient Busulfan erhalten, betrug die Chance MSC zu isolieren das 0,32fache [95% KI: 0,06 – 1,88] gegenüber Patienten, die kein Busulfan erhalten hatten.

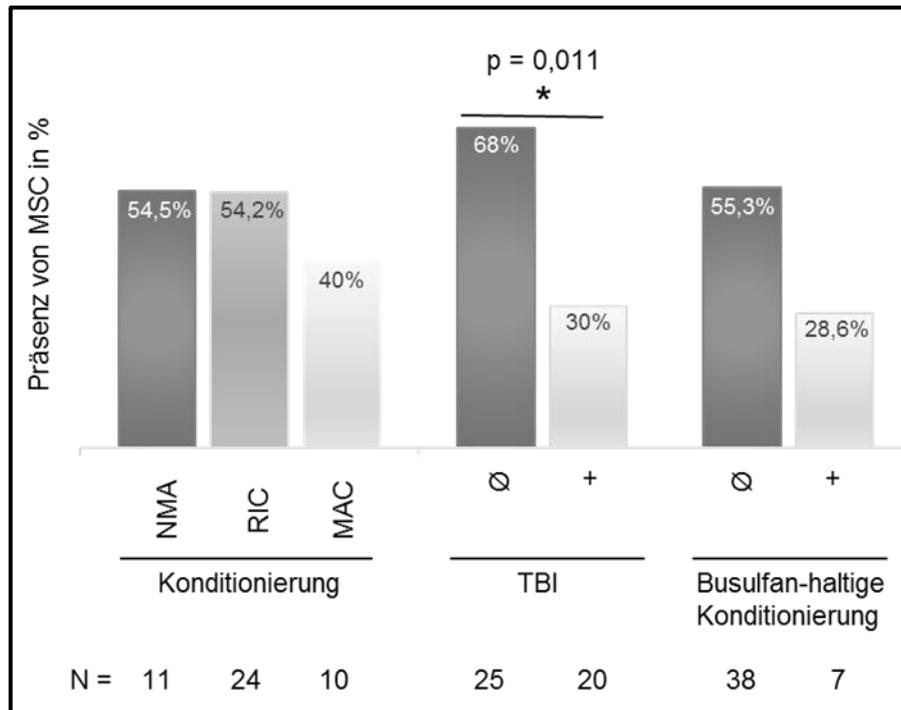


Abb. 7: Einfluss konditionierungsbezogener Faktoren auf die Präsenz von MSC

Hinsichtlich des Verlaufs nach der SZT wurden das Auftreten einer Abstoßungsreaktion (GvHD) und das Anwachsen des Transplantats (Engraftment) betrachtet (siehe Abb. 8). Patienten mit einer GvHD hatten eine 0,77fache [95% KI: 0,23 – 2,58] und Patienten mit einem guten Engraftment eine 1,66fache [95% KI: 0,25 – 11,02] Chance einer erfolgreichen MSC-Isolation gegenüber den jeweiligen Vergleichsgruppen.

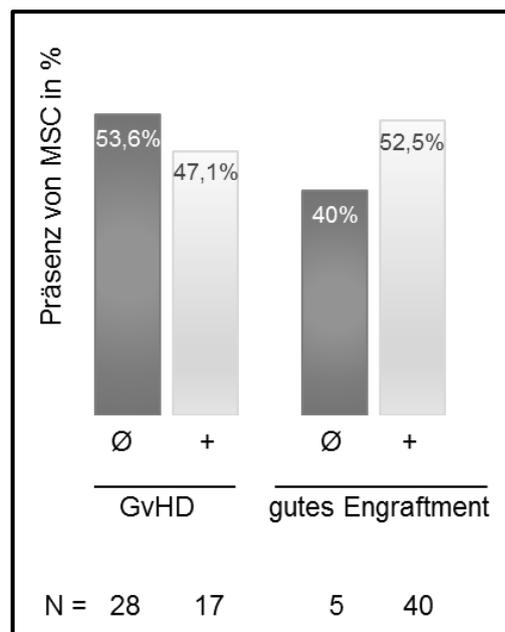


Abb. 8: Einfluss verlaufsbezogener Faktoren auf die Präsenz von MSC

#### 4.5.3 Zellzahl der MSC bei erster Passage bei Patienten nach allogener SZT

Bei allen 23 erfolgreichen MSC-Isolationen der Patienten nach allogener SZT konnte die Zellzahl der MSC/ml KM bei erster Passage bestimmt werden. Der Mittelwert aller Isolationen lag bei 3.526 MSC/ml KM. Der Vergleich der Mittelwerte abhängig von verschiedenen Faktoren erbrachte die in Tab. 17 (siehe Anlagen) dargestellten Trends. Zur Veranschaulichung wurden Boxplots erstellt.

Abb. 9 zeigt die Mediane der Zellzahl der MSC/ml KM nach erster Passage als Boxplot (Box vom 25%- bis 75%-Perzentil) mit Ausreißern (o) für BMI, Abstand der SZT zur betrachteten KMP sowie CMV-Infektion vor der SZT.

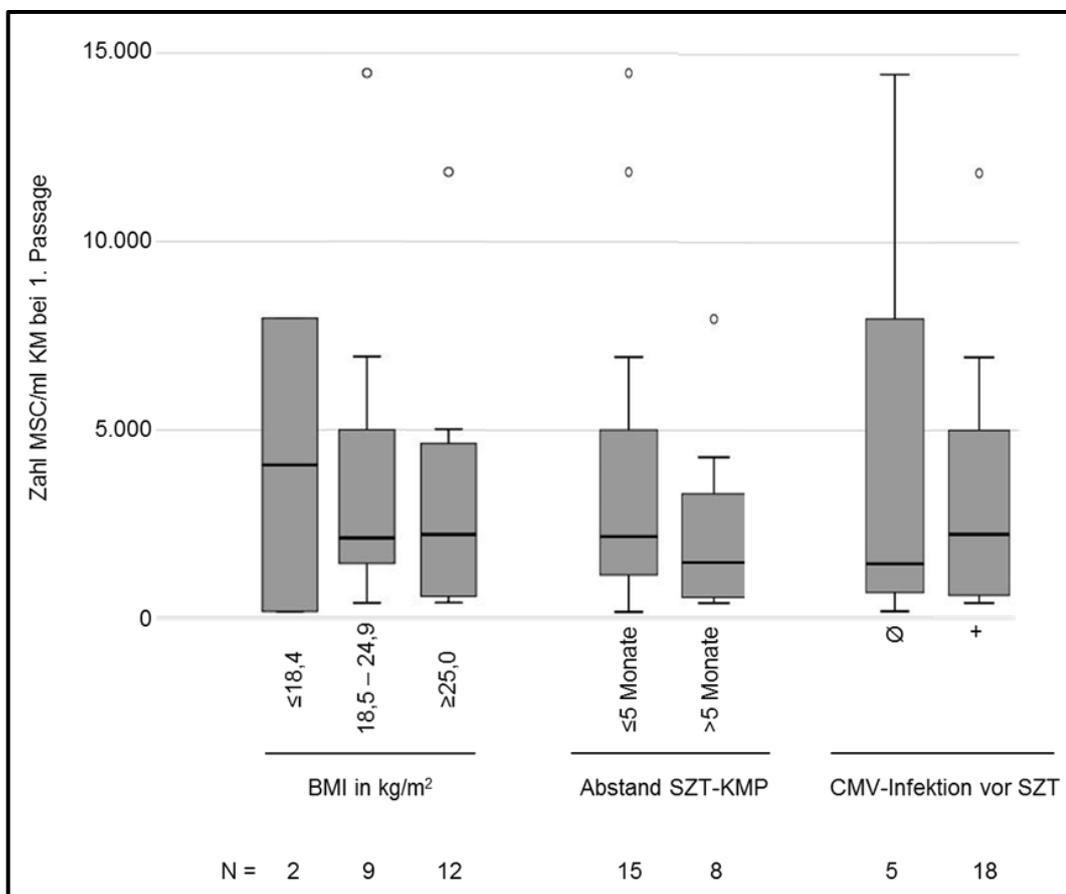


Abb. 9: Boxplot Zahl MSC/ml KM abhängig von patientenbezogenen Faktoren

Im Mittelwertvergleich zeigten sich geringere Zellzahlen mit zunehmendem BMI sowie bei Patienten, die vor der SZT eine CMV-Infektion erlitten hatten. Die MD von Patienten mit einem BMI  $\leq 18,4$  kg/m<sup>2</sup> betrug 936 MSC/ml KM [95% KI: -7.012 – 8.884] und von Patienten mit einem BMI von 18,5 bis 24,9 kg/m<sup>2</sup> 778 MSC/ml KM [95% KI: -3.811 – 5.367] zu Patienten mit einem BMI  $\geq 25,0$  kg/m<sup>2</sup>.

Fand die SZT maximal 5 Monate vor der betrachteten KMP statt, betrug die MD -29 MSC/ml KM [95% KI: -3.549 – 3.491] verglichen mit den KMP, die länger nach der SZT durchgeführt wurden. Hatten Patienten vor der SZT keine CMV-Infektion durchgemacht, konnten 1.824 MSC/ml KM mehr isoliert werden [95% KI: -5.747 – 9.394].

Ein Zusammenhang zwischen diversen transplantations-assoziierten Faktoren und der Zellzahl von MSC/ml KM wurde nicht gesehen. Untersucht wurden HLA-Mismatch, Verwandtschaft zwischen Spender und Empfänger sowie Übereinstimmung von Geschlecht, Blutgruppe und Rhesusfaktor (siehe Abb. 10). Waren Spender und Empfänger HLA-ident, betrug die MD 1.795 MSC/ml KM [95% KI: -2.187 – 5.776] verglichen mit einem HLA-Mismatch. Bestand keine Verwandtschaft zwischen Spender und Empfänger, waren im Mittel 2.776 MSC/ml KM [95% KI: -1.464 – 7.015] mehr isolierbar als bei Paaren mit Verwandtschaftsbeziehungen.

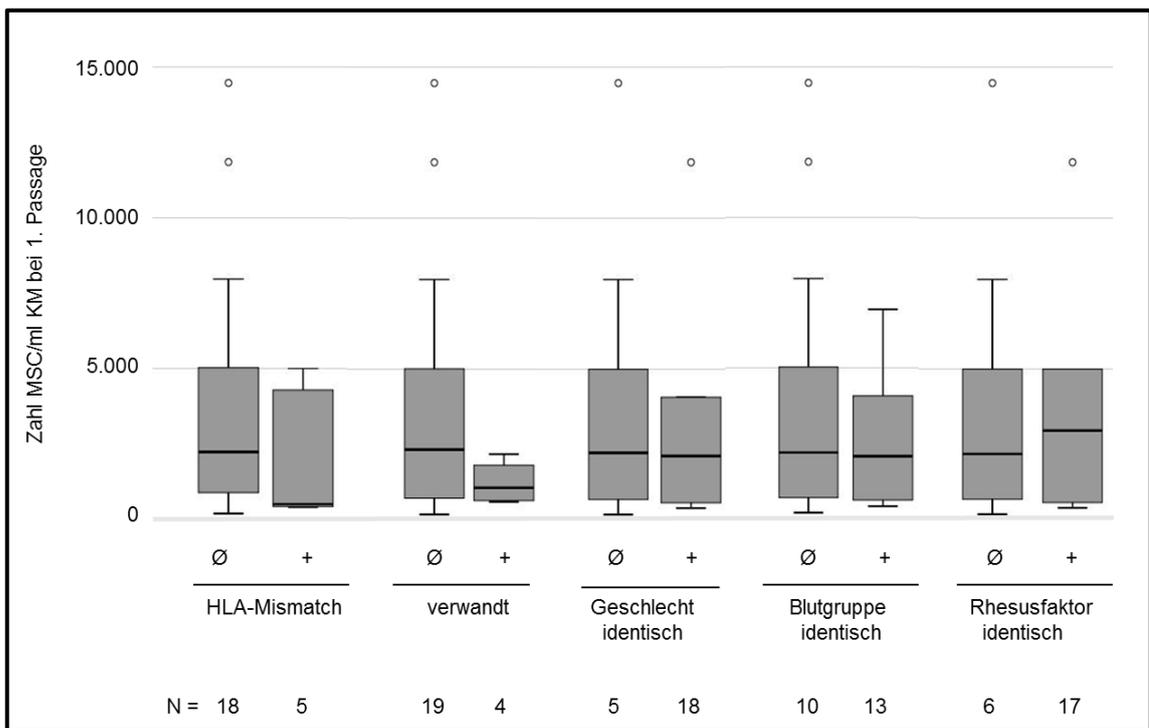


Abb. 10: Boxplot Zahl MSC/ml KM abhängig von spenderbezogenen Faktoren

Abb. 11 zeigt die Boxplots der Zellzahl der MSC/ml KM bei erster Passage abhängig von konditionierungsbezogenen Faktoren. Bei einer MAC konnten vergleichsweise weniger MSC isoliert werden als bei einer RIC (MD: -1.897 MSC/ml KM [95% KI: -7.680 – 3.886]). Bei Patienten, die keine TBI erhalten hatten, konnten im Mittel 434 MSC/ml KM [95% KI: -3.379 – 4.246] mehr gewonnen werden als bei Patienten mit TBI.

Patienten ohne eine Busulfan-haltige Konditionierung hatten zwar im Mittelwertvergleich deutlich niedrigere Zellzahlen als solche, die Busulfan erhalten hatten, jedoch war dies bei der Betrachtung der MD von -6.294 MSC/ml KM aufgrund des breiten 95%igen KI von -68.064 bis 55.478 MSC/ml KM nicht aussagekräftig.

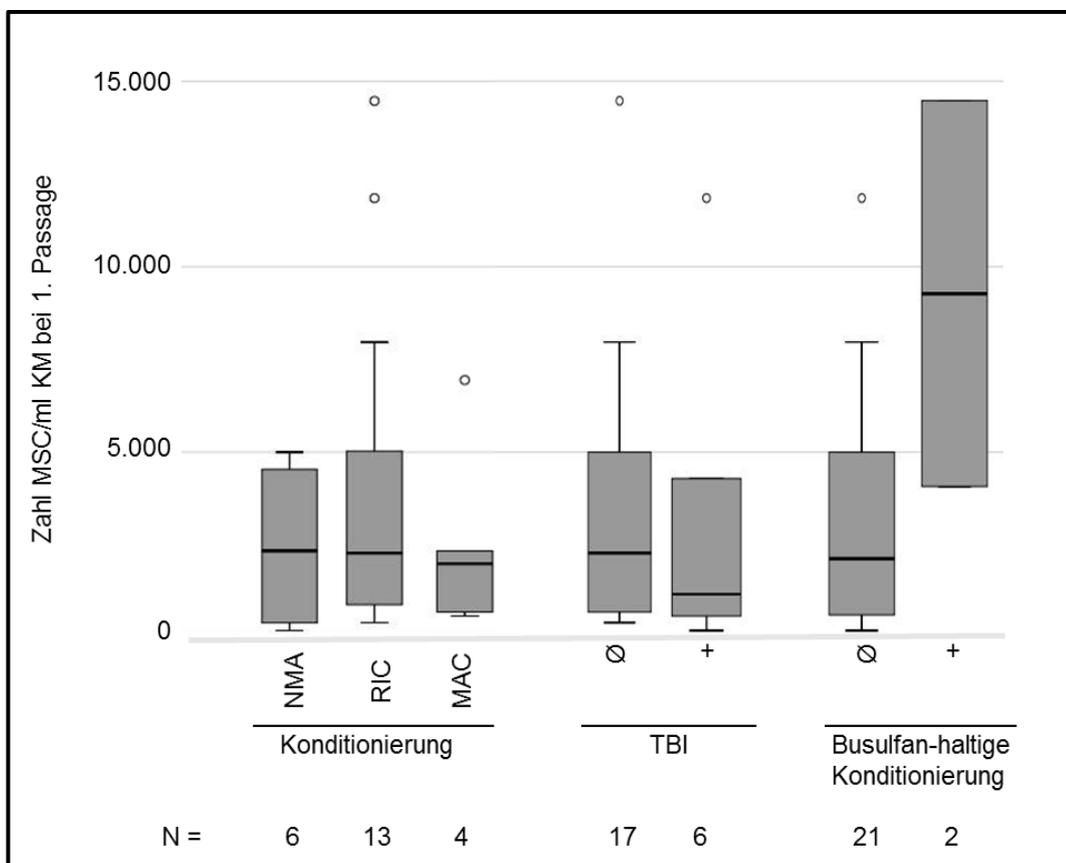


Abb. 11: Boxplot Zahl MSC/ml KM abhängig von konditionierungsbezogenen Faktoren

In Abb. 12 sind Boxplots abhängig von verlaufsbezogenen Faktoren dargestellt. Die Mittelwerte abhängig von einer vorliegenden GvHD differierten lediglich um -44 MSC/ml KM [95% KI: -3.564 – 3.475].

Im Mittelwertvergleich zeigte sich eine deutliche Assoziation ( $p = 0,011$ ) zwischen der Zellzahl der MSC/ml KM und dem Engraftment. Bei schlechtem Anwachsen des Transplantats waren im Mittel 6.816 MSC/ml KM [95% KI: 1.734 – 11.898] mehr vorhanden. Auch der Boxplot verdeutlicht diesen Zusammenhang. Dies könnte ein Zeichen für den erhöhten Regenerationsbedarf des KM sein.

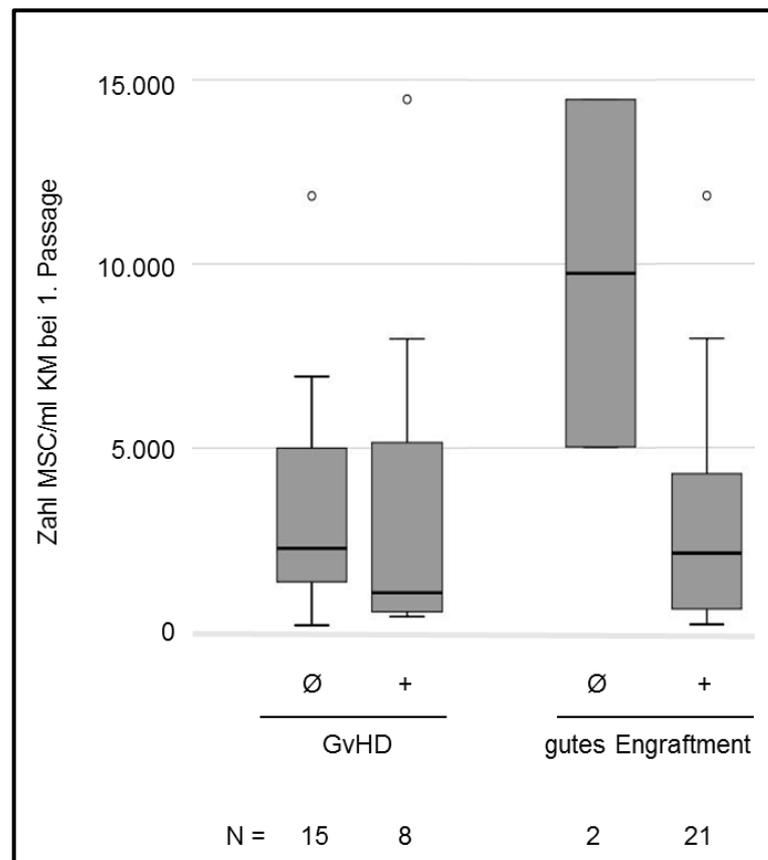


Abb. 12: Boxplot Zahl MSC/ml KM abhängig von verlaufsbezogenen Faktoren

## 4.6 Analyse der Verlaufsgruppe

### 4.6.1 Allgemeine Charakteristik der Verlaufsgruppe

Bei einer separat erstellten Gruppe von 25 Patienten konnten KMP und MSC-Isolationen vor und an mindestens einem Zeitpunkt nach allogener SZT durchgeführt werden. Diese stellten die Verlaufsgruppe dar. Die Probanden waren hinsichtlich Alter und Geschlecht sowie Verteilung der vorliegenden Erkrankungen repräsentativ, sodass diesbezüglich ein niedriges Bias vorlag. Die allgemeinen Merkmale dieser Gruppe sind in Tab. 6 dargestellt.

Tab. 6: Allgemeine Merkmale der Verlaufsgruppe

	% (Anzahl)
<i>Alter in Jahren zum Zeitpunkt der allogenen SZT</i>	
Median	61
Spannweite	18-70
<i>Geschlecht</i>	
Männlich	56 (14)
Weiblich	44 (11)
<i>Hämatologische Erkrankungen*</i>	
AML	44 (11)
ALL	8 (2)
CLL	8 (2)
MDS	8 (2)
NHL	24 (6)
MM	12 (3)
<i>Weitere Vorerkrankungen*</i>	
Niereninsuffizienz	24 (6)
Diabetes mellitus	20 (5)
solide Tumoren	16 (4)

\* Mehrfachnennungen möglich

Bei diesen Patienten wurden im Rahmen von Nachsorgeuntersuchungen der allogenen SZT wiederholte KMP durchgeführt. Dies erfolgte bei 20 Patienten (80%) etwa 30 Tage nach der SZT, bei 4 Patienten (16%) etwa nach 60 Tagen, bei 6 Patienten (24%) zwischen Tag 60 und Tag 120, bei 8 Patienten (32%) etwa nach 180 Tagen und bei 3 Patienten (12%) nach 365 Tagen oder später.

#### 4.6.2 Präsenz von MSC innerhalb der Verlaufsgruppe

Bei den 25 Probanden wurde u. a. der Verlauf der Präsenz von MSC nach allogener SZT genauer betrachtet. In Tab. 7 ist dargestellt, zu welchen Zeitpunkten bei den Patienten KMP stattgefunden haben und ob MSC isoliert werden konnten. Rote Felder bedeuten eine fehlende MSC-Präsenz; grüne Felder zeigen das Vorhandensein von MSC; weiße Felder zeigen Zeitpunkte, an denen keine KMP durchgeführt wurde.

Tab. 7: Übersicht MSC-Präsenz der Verlaufsgruppe vor und nach allogener SZT

Patient	Alter*	Präsenz von MSC			
		vor SZT	Tage nach allogener SZT		
			+30	+90 bis +180	> 180
1 ♂	62	Grün	Grün	Weiß	Rot
2 ♂	61	Grün	Weiß	Grün	Weiß
3 ♂	64	Grün	Weiß	Grün	Weiß
4 ♀	51	Grün	Grün	Weiß	Weiß
5 ♂	64	Grün	Rot	Weiß	Weiß
6 ♂	30	Grün	Rot	Weiß	Weiß
7 ♀	60	Grün	Grün	Grün	Rot
8 ♂	70	Grün	Weiß	Grün	Weiß
9 ♀	68	Grün	Rot	Weiß	Weiß
10 ♀	68	Rot	Weiß	Rot	Weiß
11 ♀	67	Grün	Rot	Weiß	Weiß
12 ♂	42	Grün	Weiß	Rot	Weiß
13 ♀	47	Grün	Rot	Rot	Weiß
14 ♂	47	Grün	Grün	Rot	Weiß
15 ♀	48	Grün	Rot	Grün	Rot
16 ♀	63	Grün	Rot	Weiß	Weiß
17 ♀	70	Grün	Grün	Weiß	Weiß
18 ♂	18	Grün	Weiß	Weiß	Weiß
19 ♀	63	Grün	Weiß	Weiß	Weiß
20 ♂	64	Grün	Rot	Rot	Weiß
21 ♂	55	Grün	Grün	Grün	Weiß
22 ♂	40	Grün	Grün	Weiß	Weiß
23 ♂	53	Grün	Rot	Rot	Weiß
24 ♂	64	Grün	Rot	Weiß	Weiß
25 ♀	26	Grün	Grün	Grün	Weiß

\* zum Zeitpunkt der allogenen SZT

Nach der SZT zeigte sich bei deutlich mehr Patienten eine fehlende Präsenz von MSC. Aufgrund der geringeren Probenzahl für spätere Zeitpunkte war dies insbesondere für das erste halbe Jahr nach allogener SZT erkennbar. MSC konnten bei 96% der Patienten vor der SZT isoliert werden. Danach gelang dies nur noch bei 47,6% ( $p < 0,001$ ). Die Chance nach der allogenen SZT MSC isolieren zu können, war nur 0,04fach [95% KI: 0,01 – 0,31] so hoch wie vor der Transplantation.

Wie in Abb. 13 dargestellt, sank die Präsenz von MSC mit zunehmendem Abstand zur SZT weiter ab. Die Chance, nach 30 bis 120 Tagen nach der SZT erfolgreich MSC zu isolieren, war 0,05fach [95% KI: 0,01 – 0,38] so hoch wie vor der SZT. Nach mehr als 120 Tagen betrug die Chance das 0,03fache [95% KI: 0,00 – 0,26]. Die Abnahme der Präsenz von MSC abhängig vom Abstand zur zurückliegenden SZT war eindeutig ( $p < 0,001$ , siehe auch Tab. 18 in den Anlagen).

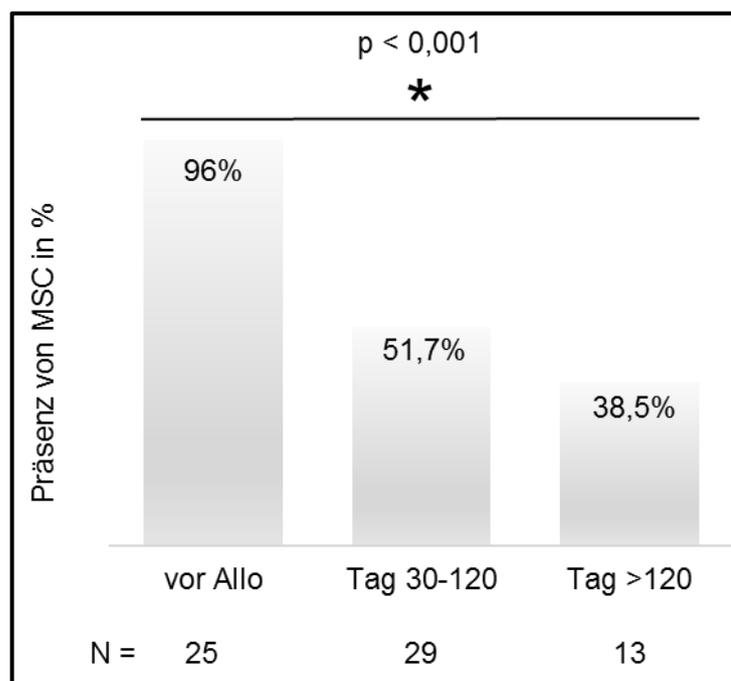


Abb. 13: MSC-Präsenz der Verlaufsguppe vor und nach allogener SZT

Waren bei einem Patienten an mindestens einem Zeitpunkt nach der SZT keine MSC mehr vorhanden, obwohl diese vor der Transplantation isoliert werden konnten, wurde dies als Verlust der Präsenz von MSC gedeutet. Ein Einfluss von Geschlecht oder Alter auf diese Veränderung konnte in der univariaten Analyse nicht gezeigt werden (siehe Tab. 8). Aufgrund der geringen Gruppengröße wurden keine weiteren Analysen, z. B. für die TBI oder eine GvHD, vorgenommen.

Tab. 8: Einfluss von Geschlecht und Alter auf Präsenz-Verlust nach allogener SZT

		Verlust MSC-Präsenz nach allogener SZT in %		OR [95% KI]
		Nein	Ja	
Geschlecht	Männlich (N = 14)	57,1	42,9	1,11
	Weiblich (N = 11)	54,5	45,5	[0,23 – 5,45]
Alter	≤60 Jahre (N = 12)	58,3	41,7	1,20
	>60 Jahre (N = 13)	53,8	46,2	[0,25 – 5,84]

#### 4.6.3 Zellzahl der MSC der Verlaufsgruppe

Aufgrund des beobachteten Einflusses der allogenen SZT auf die MSC-Präsenz wurde eine Schädigung des KM durch die SZT angenommen. Es erfolgte daher die Analyse der Zellzahl der MSC/ml KM bei erster Passage als Marker für die Proliferation. Von insgesamt 44 erfolgreichen MSC-Isolationen gelang es in 38 Fällen (86,4%) die Zellzahl der MSC/ml KM bei erster Passage zu ermitteln. Der Mittelwertvergleich zeigte tendenziell eine Abnahme der Zellzahl nach allogener SZT (siehe Tab. 9, Seite 37). Vor allogener SZT wurden im Mittel 8.749 MSC/ml KM [95% KI: -2.327 – 19.825] mehr isoliert als nach der SZT. Die Zellzahl fiel umso mehr, je länger die Transplantation zurücklag.

Tab. 9: Mittelwertvergleich Zahl MSC/ml KM der Verlaufsgruppe

Zahl MSC/ml KM bei erster Passage		
	Mittelwert	MD [95% KI]
Vor allogener SZT	12.039	8.749
Nach allogener SZT	3.290	[-2.327 – 19.825]
		<b>AB: 8.377</b>
<b>A: Vor SZT</b>	12.039	[-7.393 – 24.146]
Zeitraum <b>B: Tag +30</b>		<b>AC: 10.489</b>
nach SZT <b>bis +120</b>	3.662	[-17.529 – 38.508]
<b>C: Tag &gt;120</b>	1.550	<b>BC: 2.113</b>
		[-26.679 – 30.904]

Beim Vergleich von Boxplots der Zellzahlen der MSC/ml KM von gesunden Probanden, die niemals eine CTx erhalten hatten, und den untersuchten Patienten vor und nach der allogenen SZT, zeigten sich keine relevanten Unterschiede (siehe Abb. 14).

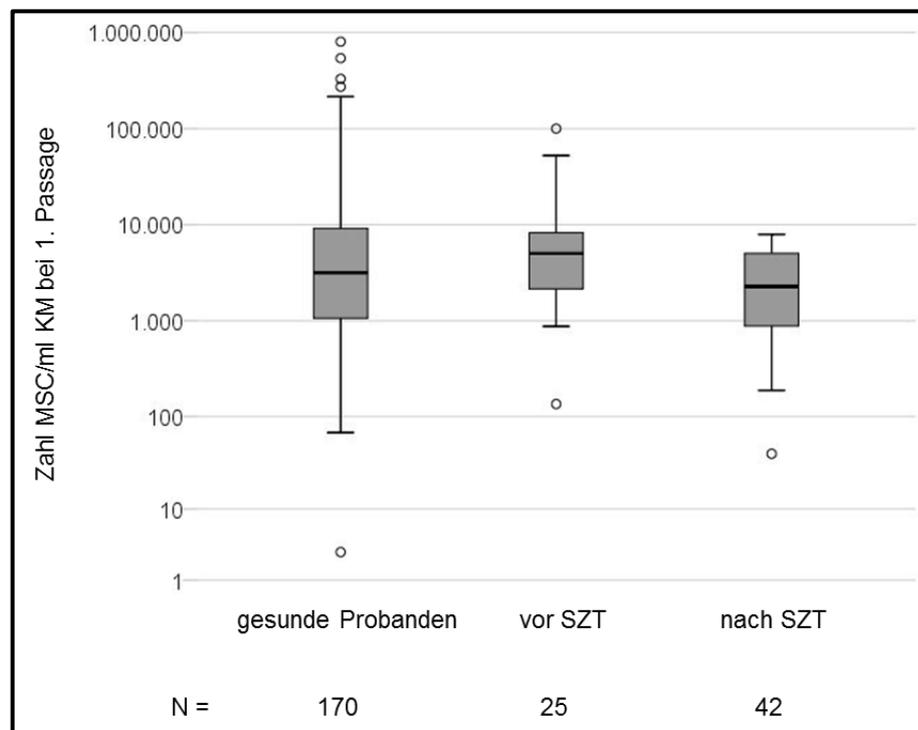


Abb. 14: Boxplot Zahl MSC/ml KM Gesunde versus Verlaufsgruppe

Bei der Darstellung der Mittelwerte dieses Vergleichs zeigte sich jedoch aufgrund des Missachtens von Ausreißern ein anderes Bild. Abb. 15 zeigt die Mittelwerte (o) sowie das 95%ige KI der Mittelwerte (I). Die Patienten hatten bereits vor der SZT verringerte Zellzahlen. Die MD von gesunden Probanden zur Verlaufsguppe vor der allogenen SZT betrug 8.377 MSC/ml KM [95% KI: -7.393 – 24.146] und nach der SZT 10.489 MSC/ml KM [95% KI: -17.529 – 38.508].

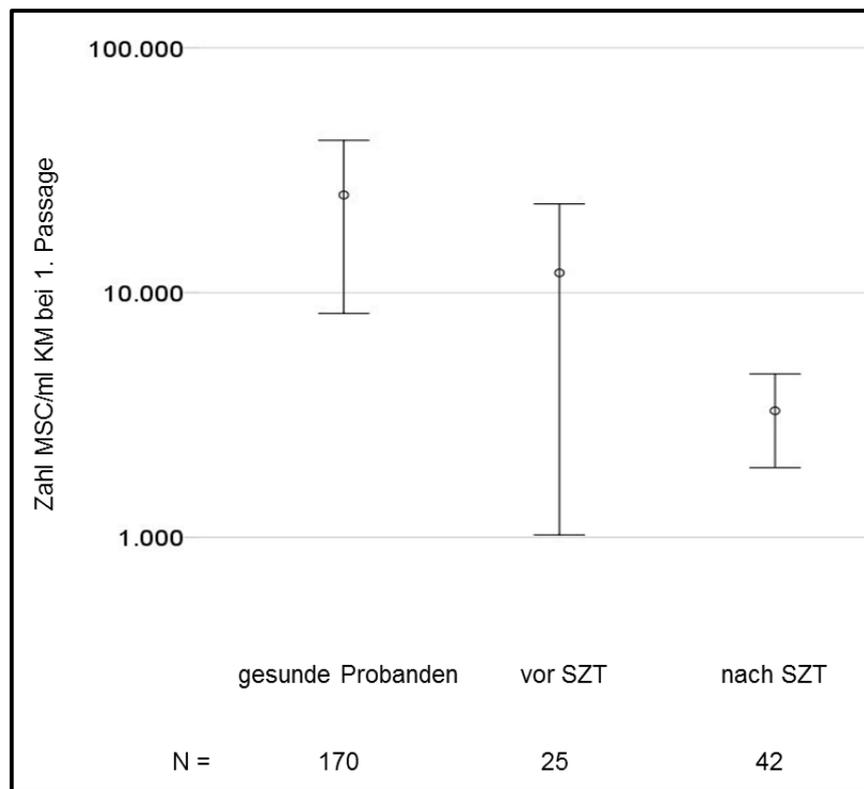


Abb. 15: Mittelwertvergleich Zahl MSC/ml KM Gesunde versus Verlaufsguppe

Aufgrund dieser Beobachtungen wurden Wachstumskinetiken erstellt, um mögliche Veränderungen im Proliferationsverhalten der MSC nach allogener SZT festzustellen.

#### 4.6.4 Wachstumskinetiken von Gesunden und Patienten nach allogener SZT

MSC zeigten in vitro eine Proliferation mit einer PDT von ca. 1,3 bis 2 Tagen (Mueller et al. 2006). Bei vorgeschädigten MSC zeigten sich Hinweise für Seneszenz und damit eine reduzierte Proliferation der MSC (Luetzkendorf et al. 2015).

Mittels Wachstumskinetiken konnte das Proliferationsverhalten von MSC verglichen werden. Abb. 16 zeigt den logarithmischen Anstieg der Zellzahl der MSC sowie die PDT von Patienten nach allogener SZT (durchgezogene Linien pSZT#1 und pSZT#2) und gesunden Kontrollen (gestrichelte Linien C#1-3). Nach allogener SZT proliferierten die MSC ab der ersten Passage in vitro weniger als die Zellen gesunder Spender. Dies drückte sich in einer geringeren Zunahme der Zellzahl im Verlauf aus. Damit verbunden war eine von Beginn an höhere PDT.

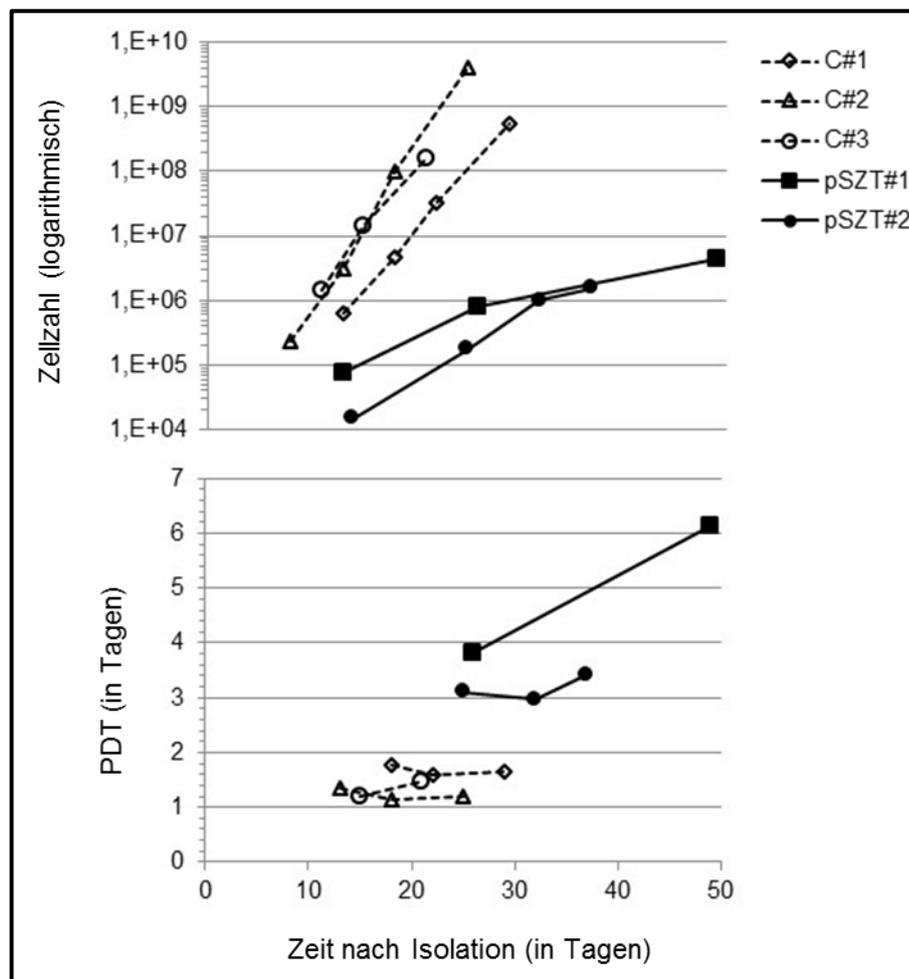


Abb. 16: Proliferation MSC von Gesunden und Patienten nach allogener SZT

## 5. Diskussion

### 5.1 Wichtigste Ergebnisse der Studie

Die vorliegende Arbeit konnte Einflussfaktoren der MSC des KM, welche aus Voruntersuchungen bekannt waren, teilweise bestätigen. Auffallend war ein auch in der multivariaten Analyse deutlicher Einfluss einer erfolgten allogenen SZT. Erstmals konnte gezeigt werden, dass die allogene SZT die Präsenz und Charakteristika von MSC veränderte. Patienten nach allogener SZT hatten eine 0,06fache [95% KI: 0,01 – 0,45] Chance auf eine erfolgreiche MSC-Isolation verglichen mit Patienten ohne allogene SZT. Weiterhin war eine verminderte Präsenz von MSC mit zunehmendem Alter, bei Frauen, bei Vorliegen einer AML oder eines MDS, nach CTx oder TBI sowie bei Patienten mit Niereninsuffizienz als Trends erkennbar. Bei der Betrachtung der Zellzahl der isolierten MSC konnten im Validierungs-Set keine Zusammenhänge festgestellt werden. Vorbekannt war, dass das Alter einen Einfluss auf die Zellzahl der MSC/ml KM hatte, was tendenziell sichtbar war.

Ausgehend vom beobachteten Einfluss der allogenen SZT auf die Präsenz von MSC des KM wurden weitere Faktoren, die in Zusammenhang mit der allogenen SZT standen, betrachtet. Es wurden patienten-, spender-, erkrankungs-, konditionierungs- sowie verlaufsbezogene Faktoren untersucht. Dabei wurden keine deutlichen Zusammenhänge zwischen den geprüften Faktoren und der Präsenz von MSC gefunden.

Bei einer Verlaufsgruppe mit 25 Patienten konnte die Isolation vor und nach allogener SZT verglichen werden. Nach allogener SZT waren MSC deutlich seltener isolierbar als vor der Transplantation (OR: 0,04 [95% KI: 0,01 – 0,31]). Der Vergleich mit gesunden Probanden zeigte, dass sowohl vor als auch nach der SZT die Zellzahl der MSC/ml KM bei erster Passage verringert war. Außerdem fand sich bei MSC von Patienten nach allogener SZT eine eingeschränkte Proliferation verglichen mit MSC von gesunden Kontrollen.

## 5.2 Einflussfaktoren auf die Präsenz und Zellzahl von MSC

Die vorgestellten Daten zeigten einen negativen Einfluss einer allogenen SZT auf die Präsenz von MSC deutlich im Validierungs-Set sowie innerhalb der Gesamtgruppe von 368 Probanden. Über die Beeinflussung der MSC-Präsenz nach allogener SZT gab es zum aktuellen Zeitpunkt keine Daten anderer Autoren. Bisherige Untersuchungen zeigten, dass MSC nach SZT vom Empfänger stammten und nicht durch Spender-MSC ersetzt wurden (Koc et al. 1999; Stute et al. 2002; Bacher et al. 2010; Geyh et al. 2013). Nach allogener SZT lag eine reduzierte Zellzahl der MSC aufgrund von Störungen der Stromalen Mikroumgebung vor (Galotto 1999). Mit zunehmendem Abstand zur Transplantation war die Zellzahl weiter fallend. Eine mögliche Ursache wurde in einer zögerlichen Regeneration des KM gesehen (Stute et al. 2002). Somit war es sinnvoll, die generelle Präsenz von MSC nach allogener SZT genauer zu untersuchen.

Bis auf den Einfluss der allogenen SZT bzw. einer SZT im Allgemeinen konnten keine deutlichen Auffälligkeiten innerhalb des Validierungs-Sets gefunden werden. Dies war vor allem der kleinen Fallzahl von 46 Probanden zuzuschreiben.

Bei der Betrachtung der Gesamtdaten von Validierungs- und Discovery-Set fielen weitere Einflussfaktoren auf. Zunächst konnte, wie auch in anderen Arbeiten (Galotto 1999; Nishida et al. 1999) beschrieben, ein Einfluss des Alters auf eine geringere Präsenz von MSC gezeigt werden. Eine mögliche Ursache wurde in der geringeren genetischen Stabilität der MSC mit zunehmendem Alter vermutet (Stultz et al. 2016). Ein weiterer Grund für diesen Zusammenhang könnte die Abnahme der Knochenmasse sein (Caplan und Dennis 2006).

Das Geschlecht der Probanden hatte ebenfalls einen Einfluss auf die Präsenz von MSC. Bei Frauen wurden deutlich seltener (63% gegenüber 77,9% bei Männern) MSC isoliert. Die Zellzahl war jedoch bei Männern im Mittel niedriger, die MD betrug  $-5.933 \text{ MSC/ml KM}$  [95% KI:  $-25.303 - 13.437$ ]. Ursachen für die Unterschiede zwischen Männern und Frauen waren bisher nicht bekannt. Denkbar wären Unterschiede im Hormonhaushalt oder auch ein Bias durch die Selektion der Patienten.

Hatte ein Proband eine Vorerkrankung, beispielweise AML oder MDS, war die Präsenz von MSC deutlich niedriger. Grund dafür waren möglicherweise zytogenetische (Blau et al. 2011) sowie epigenetische Veränderungen der MSC, z. B. induziert durch Seneszenz (Flores-Figueroa et al. 2008).

Zurückliegende Therapien hatten einen Einfluss auf die Präsenz und Zellzahl der MSC. Nach einer TBI wurden geringere MSC-Zellzahlen ermittelt, möglicherweise aufgrund der durch die Bestrahlung reduzierten Knochendichte (Banfi et al. 2001). Allerdings sind MSC nicht so radiosensitiv wie HSC, sodass sie immer noch bei Probanden mit zurückliegender Radiatio nachgewiesen werden konnten (Kimler et al. 1985; Greenberger 1991). Auch nach einer CTx wurden MSC weiterhin isoliert, jedoch in reduzierter Zellzahl. MSC waren gegen verschiedene Zytostatika mit unterschiedlichen Wirkmechanismen resistent und hatten eine hohe Apoptose-Schwelle (Mueller et al. 2006). Allgemein wird durch KM-schädigende Vortherapien wie Radio- oder Chemotherapie die stromale Mikroumgebung geschädigt (Galotto 1999), was Einfluss auf Präsenz und Zellzahl der MSC hat.

Es ist zu beachten, dass die vorgestellten Daten Erkenntnisse über das Verhalten der MSC *in vitro* sind, da die Zellen etwa um den 12. Tag (maximal nach 20 Tagen) nach der KMP ausgewertet wurden. Somit können die dargestellten Trends keine Aussage über mögliche Veränderungen der MSC *in vivo* machen. Es stellt sich z. B. die Frage, ob die niedrigere MSC-Präsenz nach allogener SZT durch ein komplettes Fehlen der Zellen oder durch ein schlechteres Wachsen oder sogar ein Absterben in der Kultur zustande kam.

Eine Zusammenfassung von in der Literatur beschriebenen Ursachen für den Einfluss verschiedener Faktoren ist in Tab. 10 (Seite 43) dargestellt.

Tab. 10: Mögliche Pathomechanismen für die Präsenz von MSC

<b>Allogene SZT</b>	
○ Schädigung der Stromalen Mikroumgebung	(Galotto 1999)
○ schlechtes Engraftment/ Differenzierung in reifes Gewebe	(Stute et al. 2002)
<b>Alter</b>	
○ Geringere genetische Stabilität der MSC mit zunehmendem Alter	(Stultz et al. 2016)
○ Altersbedingt weniger Knochenmasse	(Caplan und Dennis 2006)
○ Unterschiedliche Zusammensetzung von MSC-Subtypen in fetalem, pädiatrischem und adultem KM	(Maijenburg et al. 2012)
	(Nishida et al. 1999)
	(Galotto 1999)
<b>Vorerkrankungen (AML, MDS)</b>	
○ Zytogenetische Veränderungen	(Blau et al. 2011)
○ Epigenetische Veränderungen/ Seneszenz	(Geyh et al. 2013)
<b>Vorthherapie (CTx, Radiatio, TBI)</b>	
○ Radiatio: geringere Knochendichte	(Banfi et al. 2001)
○ Schädigung der Stromalen Mikroumgebung	(Galotto 1999)
○ MSC sind weniger radiosensitiv als HSC	(Greenberger 1991), (Kimler et al. 1985)
○ Resistent gegen verschiedene Zytostatika, hohe Apoptose-Schwelle	(Mueller et al. 2006)

Eine Vielzahl von Einflussfaktoren bewirken Veränderungen der Präsenz von MSC. Dabei bleibt der Vergleich zwischen verschiedenen Untersuchungen schwierig, da sie sich hinsichtlich Gruppengröße, erfasster Faktoren und vor allem in der Methodik der Isolation und Kultivierung von MSC unterscheiden.

### **5.3 Spezifischer Einfluss der allogenen SZT auf MSC**

Trotz der Kenntnis, dass viele Faktoren einen Einfluss auf MSC haben, zeigten die vorliegenden Daten, dass die allogene SZT im Validierungsset die größte Bedeutung hatte. Bereits in der Vorarbeit (Promotion Frau Josephine Schneider) zeigte sich ein deutlicher Einfluss der allogenen SZT. Es ist jedoch fraglich, welche möglichen Ursachen die schlechtere Präsenz von MSC nach allogener SZT hat.

Vor einer allogenen SZT erhalten die Patienten immer KM-schädigende Maßnahmen wie Chemo- oder Radiotherapien. Solche Vortherapien hatten eine negative Wirkung auf die MSC (Banfi et al. 2001). In Untersuchungen von Galotto und Kollegen lag bereits weniger als 20 Tage nach der SZT ein KM-Schaden vor. Es ist davon auszugehen, dass dies durch Vortherapien (mit-)bedingt war. Dieser Schaden blieb bei Erwachsenen bis zum Ende des Beobachtungszeitraums bestehen. Bei Kindern stieg die CFU-F-Zellzahl innerhalb circa eines Jahres auf fast normale Werte, was eine altersabhängige Regenerationsfähigkeit vermuten lässt. Dabei ist jedoch zu beachten, dass alle Erwachsenen eine TBI erhalten hatten, aber nicht alle Kinder, was einen weiteren Einfluss haben könnte (Galotto 1999). Aufgrund der hohen Apoptose-Schwelle und der Resistenz gegen Zytostatika verschiedener Wirkmechanismen waren MSC nach verschiedenen KM-schädigenden Therapien weiterhin vorhanden, jedoch in reduzierter Zellzahl. Die Chance einer erfolgreichen Isolation nahm ab (Mueller et al. 2006).

Dass das KM bereits vor der SZT im Vergleich zu gesunden Probanden geschädigt sein könnte, zeigten Vergleiche der Mittelwerte der Zellzahlen von MSC/ml KM innerhalb der vorliegenden Arbeit. Dabei hatten gesunde Probanden tendenziell mehr MSC/ml KM als die untersuchten Patienten vor der allogenen SZT. Nach der SZT fiel die Zellzahl weiter ab (siehe 4.6.3). Auch die Dosis der zuvor verabreichten Konditionierung könnte die Schädigung des KM mitbestimmen. Bei Patienten, die eine MAC erhalten hatten, zeigte sich eine geringere Präsenz von MSC im Vergleich zu Patienten mit einer NMA oder RIC. Im Speziellen lag eine tendenziell niedrigere MSC-Präsenz auch bei Patienten vor, die eine Busulfan-haltige CTx erhalten hatten (siehe 4.5.2).

Eine Beeinflussung der MSC beispielsweise durch Immuneffekte, die bei der allogenen SZT eine Rolle spielen, ist denkbar. Dazu zählen u. a. Übereinstimmungen von verschiedenen, immunologisch bedeutsamen Merkmalen zwischen Spender und Empfänger oder das Auftreten einer GvHD. Die vorliegenden Daten zeigten jedoch keinen Einfluss dieser Faktoren (siehe 4.5.2).

Hatten die Patienten bereits vor der Transplantation eine CMV-Infektion durchgemacht, deutete sich eine höhere Präsenz von MSC an. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass eine eventuelle erneute Infektion durch die Transplantation aufgrund des immunologischen Gedächtnisses besser bewältigt wurde.

Bei einem guten Anwachsen nach der Transplantation war die Präsenz von MSC tendenziell höher. Geyh und Kollegen vermuteten, dass ansässige MSC das Engraftment von Spender-MSC verbessern könnten (Geyh et al. 2013). Ein gutes Anwachsen des Transplantats könnte demzufolge durch eine hohe MSC-Präsenz gefördert werden. Hingegen war die Zellzahl der MSC/ml KM bei erster Passage bei Patienten mit schlechtem Engraftment höher (siehe 4.5.3). Dies könnte ein Hinweis für einen erhöhten Regenerationsbedarf des KM sein.

Nach einer allogenen SZT litten Patienten an einem lang anhaltenden Knochenschaden (Tauchmanova et al. 2002). Dies beeinflusst die Regeneration des KM und dessen Nische, was offensichtlich auch die MSC betraf. Die MSC zeigten eine reduzierte Proliferationsfähigkeit. Es wurde bei Patienten mit MDS eine Seneszenz der MSC beschrieben (Geyh et al. 2013). Davon ist auch bei anderen toxischen Schädigungen wie beispielsweise einer allogenen SZT auszugehen. Eine weitere Arbeit beschreibt einen Verlust des Differenzierungspotentials sowie der Markerexpression mit vermehrter Seneszenz (Luetzkendorf et al. 2015).

#### **5.4 Relevanz der Arbeit für das Verständnis der Biologie der KM-Nische**

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die KM-Nische durch eine allogene SZT und den damit zusammenhängenden Faktoren (z. B. Gabe von KM-toxischen Medikamenten, vermehrtes Auftreten von Infektionen) merklich geschädigt wird. Dies ist an der reduzierten Präsenz und Zellzahl der MSC, welche einen wichtigen Teil der KM-Nische ausmachen, erkennbar.

Die Regeneration des KM ist ein langwieriger Prozess. Innerhalb des ersten halben Jahres nach allogener SZT konnte kein Anstieg der MSC-Zellzahl oder eine Verbesserung der Präsenz gezeigt werden. Die MSC und die KM-Nische scheinen in diesem kurzen Zeitraum noch nicht wieder zu regenerieren. Künftig sind Untersuchungen zur Regeneration des KM sowie möglicher Unterstützung dieses Prozesses nötig, um die Therapiechancen zu verbessern.

#### **5.5 Relevanz der Arbeit für die therapeutische Nutzung von MSC**

Studien konnten zeigen, dass die Gabe von MSC keine toxischen Wirkungen mit sich brachte (Koc et al. 2000; Bernardo und Fibbe 2015). Infolgedessen gab es in den letzten Jahren zahlreiche Untersuchungen zum therapeutischen Nutzen von MSC-Infusionen, unter anderem im Bereich der SZT und bei Abstoßungsreaktionen (siehe 1.7).

Es wurde gezeigt, dass die gemeinsame Gabe von HSC und MSC sicher durchführbar war. Sie konnte das Engraftment verbessern sowie das Auftreten von Transplantatversagen verringern. Insgesamt verbesserten MSC-Infusionen das Outcome von SZT (Bernardo und Fibbe 2015). Bei der Therapie der GvHD spielen MSC mittlerweile eine bedeutende Rolle (Schule und Berger 2015).

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Patienten höheren Alters oder mit zurückliegender (allogener) SZT eine schlechtere MSC-Präsenz aufwiesen. Demzufolge sind bei diesen Patienten autologe Therapiekonzepte nicht sinnvoll. Sie haben zu wenige eigene Zellen, um einen ausreichenden Therapieerfolg zu realisieren. Diese Patienten benötigen unbedingt die therapeutische Gabe von allogenen MSC.

## 5.6 Stärken und Schwächen der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals ein anhaltender Einfluss einer allogenen SZT auf die Präsenz und Zellzahl von MSC gezeigt werden. Ursachen und Mechanismen für die reduzierte MSC-Präsenz nach SZT bedürfen näherer Untersuchungen.

Die aus der Vorarbeit der AG Müller (Promotion Frau Josephine Schneider) bekannten Trends konnten größtenteils mithilfe der Effektschätzer bestätigt werden. Durch die vorgestellten Untersuchungen konnten neue Erkenntnisse zur Biologie der KM-Nische gewonnen werden.

Der Betrachtung der Gesamtgruppe lag mit 368 Probanden eine große Fallzahl zugrunde, sodass für viele Ergebnisse präzise Schätzungen der Effekte erfolgen konnten. Im Validierungs-Set sowie bei den Untergruppen nach allogener SZT lagen nur relativ kleine Fallzahlen vor, wodurch die 95%igen KI der Effektschätzer breit ausfielen und nicht eindeutig waren. Diese Ergebnisse müssen überprüft werden. Außerdem ist kritisch anzumerken, dass die Arbeit ausschließlich auf retrospektiv erhobenen Daten beruht.

Mögliche Fehlerquellen lagen beispielsweise bei der Gewinnung der MSC. Die Menge des gewonnenen Materials bei der KMP sowie die Zeit bis zur Verarbeitung der Proben könnten einen Einfluss auf die Qualität der weiteren Untersuchungsschritte haben. Auch wurden die KMP von verschiedenen Ärzten durchgeführt, weswegen die Zellzahl der MSC auf die Menge des KM-Aspirats in ml bezogen wurde, um eine Verzerrung zu verringern. Die vorliegenden Daten beziehen sich allesamt auf das Verhalten von MSC in vitro, da bisher ein geeigneter Marker fehlt, um mehr über MSC und ihre Funktion in vivo sagen zu können.

## 5.7 Ausblick

SZT stellen heutzutage eine unverzichtbare Therapiemöglichkeit bei hämatologischen Erkrankungen dar. Die Literatur zeigt, dass MSC ein mögliches therapeutisches Instrument darstellen. Um dies künftig besser nutzen zu können und das Verfahren der SZT weiter zu optimieren sind weiterführende Untersuchungen zu Biologie und Anwendungsmöglichkeiten von MSC sowie zur Biologie der SZT nötig.

Die vorliegende Arbeit bestätigte die Feststellungen aus einer Vorarbeit der AG Müller (Promotion Frau Josephine Schneider), dass Geschlecht sowie Vorerkrankungen einen Einfluss auf MSC und somit die KM-Nische haben. Da in der Literatur bisher unklar ist, welche genauen Ursachen dafür vorliegen, sollte der Einfluss von Hormonen oder genetischen Schädigungen intensiver analysiert werden.

Der Einfluss einer allogenen SZT auf die MSC konnte in den vorgestellten Ergebnissen sicher gezeigt werden. Nun müssen die Untersuchungen mit einer größeren Fallzahl wiederholt werden, um beschriebene Tendenzen hinsichtlich spezifischer Einflussfaktoren bestätigen zu können. Es wurde beispielweise eine Beeinflussung durch das Engraftment festgestellt. Ein Einfluss spezifischer Medikamente sowie beispielweise posttransplantärer Infektionen wurde innerhalb der vorliegenden Daten nicht erfasst, sodass weitere Untersuchungen dazu nötig sind. Eine weitere ungeklärte Frage ist, wie lange das KM zur Regeneration nach einer allogenen SZT braucht. Zusätzliche Daten in größeren Abständen nach der SZT müssen erhoben werden.

Im Hinblick auf die Gewinnung von therapeutisch nutzbaren MSC ist eine verbesserte Auswahl von Spendern anzustreben. Dafür liefert die vorliegende Arbeit bereits gute Hinweise. Geeignet sind wahrscheinlich junge Patienten ohne Vorerkrankungen oder KM-schädigende Vortherapien wie CTx oder SZT.

Alle dargestellten Daten sind retrospektiv erhobene Aussagen über das Verhalten der MSC in vitro. Es sollte angestrebt werden, ähnliche Daten in prospektiven Analysen zu erheben. Außerdem müssen die bisherigen Kenntnisse über MSC sobald möglich in vivo kontrolliert werden.

## 6. Zusammenfassung

MSC sind fibroblastenartige Zellen mit der Fähigkeit zur Differenzierung in Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten. Sie kommen in verschiedenen Geweben vor und bilden im KM gemeinsam mit HSC die duale Stammzellnische. Sie regulieren die Hämatopoese, haben immunomodulatorische Funktionen und sind an Reparaturvorgängen beteiligt. Bei einigen hämatoonkologischen Erkrankungen waren Veränderungen von Zellzahl oder Proliferationsfähigkeit oder das Vorliegen von genetischen Veränderungen der MSC bekannt. Ihre Gewinnung und Kultivierung in vitro ist mittels standardisierten Protokollen möglich. Die Betrachtung verschiedener Charakteristika der gewonnenen Zellen ermöglicht eine Aussage über Zustand und Funktionsfähigkeit von KM und KM-Nische. Eine therapeutische Anwendung von MSC ist z. B. nach Myokardinfarkt oder bei GvHD mit positiven Ergebnissen beschrieben.

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit dem Ziel, die in einem Discovery-Set (AG Müller) detektierten Einflussfaktoren auf MSC zu bestätigen. Der Schwerpunkt lag auf der Analyse des Einflusses einer allogenen SZT auf MSC des KM. Die allogene SZT ist eine therapeutische Möglichkeit bei hämatologischen Neoplasien wie z. B. AML oder MDS. Bisher gab es keine Kenntnisse zu Veränderungen der Quantität und Qualität von MSC durch die allogene SZT.

Für vorbekannte Einflussfaktoren zeigten sich im Validierungs-Set folgende Trends: Die Präsenz von MSC war schlechter bei Patienten über 60 Jahren, bei Frauen, bei Patienten mit AML oder MDS, nach CTx, nach autologer SZT, bei Patienten mit Niereninsuffizienz sowie nach TBI. Die negative Assoziation zwischen allogener SZT und MSC-Präsenz konnte im Validierungs-Set hervorgehoben werden. Die Chance einer erfolgreichen MSC-Isolation bei Patienten nach allogener SZT betrug das 0,10fache [95% KI: 0,02 – 0,45] verglichen mit Patienten ohne allogene SZT.

Bei der Betrachtung der Zellzahl der MSC/ml KM zeigte sich ein vorbeschriebener Effekt durch das Alter der Probanden tendenziell im Mittelwertvergleich. Es fielen zunächst zwei andere Faktoren auf: Abstand der letzten CTx zur KMP sowie autologe SZT. Diese wiesen jedoch unpräzise 95%ige KI der MD auf.

Sowohl in der allgemeinen deskriptiven Analyse als auch in der multivariaten logistischen Regression (OR: 0,06 [95% KI: 0,01 – 0,45]) des Validierungs-Sets stach der Einfluss der allogenen SZT heraus. Dies zeigt die Bedeutung der allogenen SZT für MSC des KM. Es wurden Zusammenhänge von zusätzlichen SZT-spezifischen Faktoren untersucht, z. B. die chemotherapeutische Konditionierung, die Übereinstimmung von verschiedenen Faktoren zwischen Spender und Empfänger, das Engraftment oder das Vorliegen einer behandlungsbedürftigen GvHD. Zusätzlich wurden Veränderungen der Präsenz im zeitlichen Verlauf nach der Transplantation untersucht.

Bei einer Fallzahl von 45 Probanden zeigte sich eine deutliche Assoziation einer geringeren MSC-Präsenz nach TBI (OR: 0,20 [95% KI: 0,06 – 0,72]). Dies deutet, in Übereinstimmung mit Publikationen anderer Forschungsgruppen, auf die damit einhergehende KM-Schädigung hin. Die Betrachtung der Mittelwerte der MSC/ml KM zeigte einen Einfluss eines schlechten Engraftments auf die Zellzahl der MSC (MD: 6.816 MSC/ml KM [95% KI: 1.734 – 11.898]).

In einer Gruppe von 25 Probanden wurde die Präsenz und Zellzahl von MSC vor und nach allogener SZT untersucht. Dabei zeigte sich eine geringere MSC-Präsenz nach der Transplantation (OR: 0,04 [95% KI: 0,01 – 0,31]). Im ersten halben Jahr nach der SZT war ein tendenzieller Abfall der Präsenz erkennbar. Auch mit größerem Abstand zur SZT konnte keine Regeneration der Präsenz festgestellt werden, wobei für spätere Zeitpunkte zunehmend weniger Daten vorlagen. Die Zellzahl der MSC war nach allogener SZT ebenfalls verringert. Wachstumskinetiken zeigten, dass MSC von Patienten nach allogener SZT weniger proliferierten und die Zellzahlen im Verlauf weniger anstiegen als bei Gesunden.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals ein anhaltender Einfluss einer allogenen SZT auf die Präsenz von MSC des KM gezeigt werden. Spezifische Ursachen für diese Veränderungen konnten innerhalb der vorgestellten Untersuchungen nicht gefunden werden. In Zukunft sollten die gezeigten Ergebnisse nach allogener SZT durch Untersuchungen mit einer größeren Fallzahl und einem längeren Beobachtungszeitraum bestätigt und Gründe für die schlechtere Präsenz von MSC ermittelt werden. Die Gewinnung zunehmender Erkenntnisse über MSC und die KM-Nische sind wichtig, um die Erfolgchancen künftiger Transplantationen zu steigern sowie Verbesserungen hinsichtlich möglicher Therapieoptionen zu erreichen.

## Literaturverzeichnis

- Anthony, Bryan A.; Link, Daniel C. (2014): Regulation of hematopoietic stem cells by bone marrow stromal cells. In: *Trends in immunology* 35 (1), S. 32–37.
- Augello, Andrea; Tasso, Roberta; Negrini, Simone Maria; Cancedda, Ranieri; Pennesi, Giuseppina (2007): Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis. In: *Arthritis and rheumatism* 56 (4), S. 1175–1186.
- Bacher, Ulrike; Asenova, Svetlana; Badbaran, Anita; Zander, Axel Rolf; Alchalby, Haefaa; Fehse, Boris et al. (2010): Bone marrow mesenchymal stromal cells remain of recipient origin after allogeneic SCT and do not harbor the JAK2V617F mutation in patients with myelofibrosis. In: *Clinical and experimental medicine* 10 (3), S. 205–208.
- Banfi, A.; Bianchi, G.; Galotto, M.; Cancedda, R.; Quarto, R. (2001): Bone marrow stromal damage after chemo/radiotherapy: occurrence, consequences and possibilities of treatment. In: *Leukemia & lymphoma* 42 (5), S. 863–870.
- Barry, Frank P.; Murphy, J. Mary (2004): Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 36 (4), S. 568–584.
- Baxter, M. A.; Wynn, R. F.; Jowitt, S. N.; Wraith, J. E.; Fairbairn, L. J.; Bellantuono, I. (2004): Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 22 (5), S. 675–682.
- Bernardo, Maria Ester; Fibbe, Willem E. (2015): Mesenchymal stromal cells and hematopoietic stem cell transplantation. In: *Immunology letters* 168 (2), S. 215–221.
- Bianco, Paolo; Cao, Xu; Frenette, Paul S.; Mao, Jeremy J.; Robey, Pamela G.; Simmons, Paul J.; Wang, Cun-Yu (2013): The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. In: *Nature medicine* 19 (1), S. 35–42.
- Blau, O.; Baldus, C. D.; Hofmann, W. K.; Thiel, G.; Nolte, F.; Burmeister, T. et al. (2011): Mesenchymal stromal cells of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia patients have distinct genetic abnormalities compared with leukemic blasts. In: *Blood* 118 (20), S. 5583–5592.

- Boyum, A. (1968): Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. In: *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. Supplementum* 97, S. 77–89.
- Bundesärztekammer (2014): Richtlinie zur Herstellung und Anwendung von hämatopoetischen Stammzellzubereitungen. In: *Deutsches Ärzteblatt* 111 (33-34).
- Caplan, A. I. (1991): Mesenchymal stem cells. In: *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 9 (5), S. 641–650.
- Caplan, Arnold I.; Correa, Diego (2011): The MSC: an injury drugstore. In: *Cell stem cell* 9 (1), S. 11–15.
- Caplan, Arnold I.; Dennis, James E. (2006): Mesenchymal stem cells as trophic mediators. In: *Journal of cellular biochemistry* 98 (5), S. 1076–1084.
- Crisan, Mihaela; Yap, Solomon; Casteilla, Louis; Chen, Chien-Wen; Corselli, Mirko; Park, Tea Soon et al. (2008): A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. In: *Cell stem cell* 3 (3), S. 301–313.
- Dazzi, Francesco; Ramasamy, Rajesh; Glennie, Sarah; Jones, Simon P.; Roberts, Irene (2006): The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. In: *Blood reviews* 20 (3), S. 161–171.
- Deb, Arjun; Wang, Shaohua; Skelding, Kimberly A.; Miller, Dylan; Simper, David; Caplice, Noel M. (2003): Bone marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart: A study of gender-mismatched bone marrow transplantation patients. In: *Circulation* 107 (9), S. 1247–1249.
- Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.; Krause, D. et al. (2006): Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. In: *Cytotherapy* 8 (4), S. 315–317.
- Flores-Figueroa, Eugenia; Arana-Trejo, Rosa Maria; Gutierrez-Espindola, Guillermo; Perez-Cabrera, Adrian; Mayani, Hector (2005): Mesenchymal stem cells in myelodysplastic syndromes: phenotypic and cytogenetic characterization. In: *Leukemia research* 29 (2), S. 215–224.
- Flores-Figueroa, Eugenia; Montesinos, Juan Jose; Flores-Guzman, Patricia; Gutierrez-Espindola, Guillermo; Arana-Trejo, Rosa Maria; Castillo-Medina, Sebastian et al. (2008): Functional analysis of myelodysplastic syndromes-derived mesenchymal stem cells. In: *Leukemia research* 32 (9), S. 1407–1416.

- Friedenstein, A. J.; Chailakhjan, R. K.; Lalykina, K. S. (1970): The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. In: *Cell and tissue kinetics* 3 (4), S. 393–403.
- Friedenstein, A. J.; Chailakhyan, R. K.; Latsinik, N. V.; Panasyuk, A. F.; Keiliss-Borok, IV (1974): Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. In: *Transplantation* 17 (4), S. 331–340.
- Galotto, M. (1999): Stromal damage as consequence of high-dose chemo/radiotherapy in bone marrow transplant recipients. In: *Experimental hematology* 27 (9), S. 1460–1466.
- Gerdoni, Ezio; Gallo, Barbara; Casazza, Simona; Musio, Silvia; Bonanni, Ivan; Pedemonte, Enrico et al. (2007): Mesenchymal stem cells effectively modulate pathogenic immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. In: *Annals of neurology* 61 (3), S. 219–227.
- Geyh, S.; Oz, S.; Cadeddu, R-P; Fröbel, J.; Brückner, B.; Kündgen, A. et al. (2013): Insufficient stromal support in MDS results from molecular and functional deficits of mesenchymal stromal cells. In: *Leukemia* 27 (9), S. 1841–1851.
- Greenberger, J. S. (1991): Toxic effects on the hematopoietic microenvironment. In: *Experimental hematology* 19 (11), S. 1101–1109.
- Grisendi, Giulia; Spano, Carlotta; Rossignoli, Filippo; D'souza, Naomi; Golinelli, Giulia; Fiori, Agnese et al. (2016): Tumor Stroma Manipulation By MSC. In: *Current drug targets*.
- Haynesworth, S. E.; Goshima, J.; Goldberg, V. M.; Caplan, A. I. (1992): Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. In: *Bone* 13 (1), S. 81–88.
- Horwitz, E. M.; Le Blanc, K.; Dominici, M.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F. C. et al. (2005): Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. In: *Cytotherapy* 7 (5), S. 393–395.
- Kalluri, Raghu (2016): The biology and function of fibroblasts in cancer. In: *Nature reviews. Cancer* 16 (9), S. 582–598.
- Kebriaei, Partow; Isola, Luis; Bahceci, Erkut; Holland, Kent; Rowley, Scott; McGuirk, Joseph et al. (2009): Adult human mesenchymal stem cells added to corticosteroid therapy for the treatment of acute graft-versus-host disease. In: *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 15 (7), S. 804–811.

- Kimler, Bruce F.; Park, Chan H.; Yakar, Daniel; Mies, Rita M. (1985): Radiation response of human normal and leukemic hemopoietic cells assayed by in vitro colony formation. In: *International Journal of Radiation Oncology\*Biology\*Physics* 11 (4), S. 809–816.
- Koc, O. N.; Gerson, S. L.; Cooper, B. W.; Dyhouse, S. M.; Haynesworth, S. E.; Caplan, A. I.; Lazarus, H. M. (2000): Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 18 (2), S. 307–316.
- Koc, O. N.; Peters, C.; Aubourg, P.; Raghavan, S.; Dyhouse, S.; DeGasperi, R. et al. (1999): Bone marrow-derived mesenchymal stem cells remain host-derived despite successful hematopoietic engraftment after allogeneic transplantation in patients with lysosomal and peroxisomal storage diseases. In: *Experimental hematology* 27 (11), S. 1675–1681.
- Krause, Daniela S.; Scadden, David T. (2015): A hostel for the hostile: the bone marrow niche in hematologic neoplasms. In: *Haematologica* 100 (11), S. 1376–1387.
- Le Blanc, Katarina; Frassoni, Francesco; Ball, Lynne; Locatelli, Franco; Roelofs, Helene; Lewis, Ian et al. (2008): Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease. A phase II study. In: *The Lancet* 371 (9624), S. 1579–1586.
- Lee, Ryang Hwa; Seo, Min Jeong; Reger, Roxanne L.; Spees, Jeffrey L.; Pulin, Andrey A.; Olson, Scott D.; Prockop, Darwin J. (2006): Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (46), S. 17438–17443.
- Lee, Won Young; Cho, Sung Won; Oh, Eun Sook; Oh, Ki Won; Lee, Jong Min; Yoon, Kun Ho et al. (2002): The effect of bone marrow transplantation on the osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 87 (1), S. 329–335.
- Luetzkendorf, Jana; Mueller, Lutz P.; Mueller, Thomas; Caysa, Henrike; Nerger, Katrin; Schmoll, Hans-Joachim (2010): Growth inhibition of colorectal carcinoma by lentiviral TRAIL-transgenic human mesenchymal stem cells requires their substantial intratumoral presence. In: *Journal of cellular and molecular medicine* 14 (9), S. 2292–2304.

- Luetzkendorf, Jana; Nerger, Katrin; Hering, Julian; Moegel, Angelika; Hoffmann, Katrin; Hoefers, Christiane et al. (2015): Cryopreservation does not alter main characteristics of Good Manufacturing Process-grade human multipotent mesenchymal stromal cells including immunomodulating potential and lack of malignant transformation. In: *Cytotherapy* 17 (2), S. 186–198.
- Maijenburg, Marijke W.; Kleijer, Marion; Vermeul, Kim; Mul, Erik P. J.; van Alphen, Floris P J; van der Schoot, C Ellen; Voermans, Carlijn (2012): The composition of the mesenchymal stromal cell compartment in human bone marrow changes during development and aging. In: *Haematologica* 97 (2), S. 179–183.
- Mezey, Eva; Key, Sharon; Vogelsang, Georgia; Szalayova, Ildiko; Lange, G. David; Crain, Barbara (2003): Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (3), S. 1364–1369.
- Mueller, L. P.; Luetzkendorf, J.; Mueller, T.; Reichelt, K.; Simon, H.; Schmoll, H. J. (2006): Presence of mesenchymal stem cells in human bone marrow after exposure to chemotherapy: evidence of resistance to apoptosis induction. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 24 (12), S. 2753–2765.
- Mueller, L. P.; Luetzkendorf, J.; Widder, M.; Nerger, K.; Caysa, H.; Mueller, T. (2011): TRAIL-transduced multipotent mesenchymal stromal cells (TRAIL-MSC) overcome TRAIL resistance in selected CRC cell lines in vitro and in vivo. In: *Cancer gene therapy* 18 (4), S. 229–239.
- Nauta, Alma J.; Fibbe, Willem E. (2007): Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. In: *Blood* 110 (10), S. 3499–3506.
- Newman, Robert; Yoo, Dana; LeRoux, Michelle; Danilkovitch-Miagkova, Alla (2009): Treatment of Inflammatory Diseases with Mesenchymal Stem Cells. In: *IADT* 8 (2), S. 110–123.
- Nishida, S.; Endo, N.; Yamagiwa, H.; Tanizawa, T.; Takahashi, H. E. (1999): Number of osteoprogenitor cells in human bone marrow markedly decreases after skeletal maturation. In: *Journal of bone and mineral metabolism* 17 (3), S. 171–177.
- Nombela-Arrieta, César; Ritz, Jerome; Silberstein, Leslie E. (2011): The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 12 (2), S. 126–131.
- Orlic, D.; Kajstura, J.; Chimenti, S.; Jakoniuk, I.; Anderson, S. M.; Li, B. et al. (2001): Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. In: *Nature* 410 (6829), S. 701–705.

- Ortiz, Luis A.; Gambelli, Frederica; McBride, Christine; Gaupp, Dina; Baddoo, Melody; Kaminski, Naftali; Phinney, Donald G. (2003): Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (14), S. 8407–8411.
- Pittenger, M. F.; Am Mackay; Beck, S. C.; Jaiswal, R. K.; Douglas, R.; Mosca, J. D. et al. (1999): Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. In: *Science (New York, N.Y.)* 284 (5411), S. 143–147.
- Prockop, D. J. (1997): Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. In: *Science (New York, N.Y.)* 276 (5309), S. 71–74.
- Rennerfeldt, Deena A.; van Vliet, Krystyn J. (2016): Concise Review: When Colonies Are Not Clones: Evidence and Implications of Intracolony Heterogeneity in Mesenchymal Stem Cells. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 34 (5), S. 1135–1141.
- Ringden, O.; Le Blanc, K. (2011): Mesenchymal stem cells for treatment of acute and chronic graft-versus-host disease, tissue toxicity and hemorrhages. In: *Best practice & research. Clinical haematology* 24 (1), S. 65–72.
- Rodriguez, J. P.; Garat, S.; Gajardo, H.; Pino, A. M.; Seitz, G. (1999): Abnormal osteogenesis in osteoporotic patients is reflected by altered mesenchymal stem cells dynamics. In: *Journal of cellular biochemistry* 75 (3), S. 414–423.
- Sasaki, M.; Abe, R.; Fujita, Y.; Ando, S.; Inokuma, D.; Shimizu, H. (2008): Mesenchymal Stem Cells Are Recruited into Wounded Skin and Contribute to Wound Repair by Transdifferentiation into Multiple Skin Cell Type. In: *The Journal of Immunology* 180 (4), S. 2581–2587.
- Schule, Silke; Berger, Andre (2015): Mesenchymal stromal cells in the treatment of graft-versus-host disease: where do we stand? In: *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 58 (11-12), S. 1265–1273.
- Stamm, Christof; Westphal, Bernd; Kleine, Hans-Dieter; Petzsch, Michael; Kittner, Christian; Klinge, Heiko et al. (2003): Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. In: *The Lancet* 361 (9351), S. 45–46.
- Stultz, Brian G.; McGinnis, Kathleen; Thompson, Elaine E.; Lo Surdo, Jessica L.; Bauer, Steven R.; Hursh, Deborah A. (2016): Chromosomal stability of mesenchymal stromal cells during in vitro culture. In: *Cytotherapy* 18 (3), S. 336–343.

- Stute, N.; Fehse, B.; Schroder, J.; Arps, S.; Adamietz, P.; Held, K. R.; Zander, A. R. (2002): Human mesenchymal stem cells are not of donor origin in patients with severe aplastic anemia who underwent sex-mismatched allogeneic bone marrow transplant. In: *Journal of hematotherapy & stem cell research* 11 (6), S. 977–984.
- Tauchmanova, Libuse; Serio, Bianca; Del Puente, Antonio; Risitano, Antonio Maria; Esposito, Antonella; Rosa, Gennaro de et al. (2002): Long-lasting bone damage detected by dual-energy x-ray absorptiometry, phalangeal osteosonogrammetry, and in vitro growth of marrow stromal cells after allogeneic stem cell transplantation. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 87 (11), S. 5058–5065.
- Togel, Florian; Hu, Zhuma; Weiss, Kathleen; Isaac, Jorge; Lange, Claudia; Westenfelder, Christof (2005): Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. In: *American journal of physiology. Renal physiology* 289 (1), F31-42.
- Uccelli, Antonio; Moretta, Lorenzo; Pistoia, Vito (2008): Mesenchymal stem cells in health and disease. In: *Nature reviews. Immunology* 8 (9), S. 726–736.
- Wuchter, Patrick; Bieback, Karen; Schrezenmeier, Hubert; Bornhauser, Martin; Muller, Lutz P.; Bonig, Halvard et al. (2015): Standardization of Good Manufacturing Practice-compliant production of bone marrow-derived human mesenchymal stromal cells for immunotherapeutic applications. In: *Cytotherapy* 17 (2), S. 128–139.

## **Thesen**

1. MSC sind ein wichtiger Teil der KM-Nische. Sie sind entscheidend für Hämatopoese, Immunomodulation und Regenerationsvorgänge. Eine therapeutische Anwendung ist bei verschiedenen Indikationen möglich.
2. In Vorarbeiten wurden verschiedene Einflussfaktoren auf die Präsenz und Charakteristika von MSC beschrieben, u.a. Negativwirkungen durch eine allogene SZT.
3. Ziele dieser Arbeit waren die Bestätigung von bekannten Einflussfaktoren sowie die Analyse von Veränderungen der MSC durch eine allogene SZT.
4. Im Validierungs-Set deutete sich übereinstimmend mit Vorarbeiten eine geringere Präsenz von MSC bei älteren Probanden, Frauen, Patienten mit AML, MDS oder Niereninsuffizienz sowie nach Chemotherapie an.
5. Patienten, die eine allogene SZT erhalten hatten, zeigten eine deutlich niedrigere Präsenz von MSC als Probanden ohne SZT.
6. In einer Verlaufsgruppe zeigte sich bei Patienten nach allogener SZT eine deutlich geringere Präsenz von MSC verglichen mit dem Zustand vor der SZT.
7. Für die geringere MSC-Präsenz nach allogener SZT konnte eine Assoziation zur TBI gezeigt werden. Die Analyse weiterer transplantations-assoziiertes Faktoren erbrachte keine Zusammenhänge.
8. Nach allogener SZT war die Zellzahl der MSC/ml KM tendenziell vermindert. Die Populationsverdopplung und damit die Proliferationsfähigkeit von MSC war eingeschränkt.
9. Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals einen anhaltenden Einfluss der allogenen SZT auf Präsenz und Zellzahl von MSC des KM. Weitere Untersuchungen mit größeren Fallzahlen sind nötig, um die Ergebnisse zu bestätigen und Ursachen zu finden.
10. Die vorgestellten Ergebnisse bestätigen, dass eine Spenderauswahl für die therapeutische Nutzung von MSC in Kenntnis des Alters sowie der Krankengeschichte erfolgen sollte.

## Anlagen

Tab. 11: Allgemeine Merkmale der Gesamtgruppe

<b>Gesamtgruppe (N = 368)</b>	
	<b>% (Anzahl)</b>
<i>Alter in Jahren</i>	
Median	61
Spannweite	15-86
<i>Geschlecht</i>	
Männlich	60,3 (222)
Weiblich	39,7 (146)
<i>Hämatologische Erkrankungen *</i>	
AML	14,9 (55)
ALL	4,9 (18)
CML	0,8 (3)
CLL	5,2 (19)
OMF	0,8 (3)
MDS	3,0 (11)
HL	2,2 (8)
NHL	24,2 (89)
MM	17,7 (65)
<i>Weitere Vorerkrankungen *</i>	
Niereninsuffizienz	19,3 (71)
Diabetes mellitus	15,5 (57)
Leberzirrhose	1,4 (5)
solide Tumoren	14,4 (53)
<i>Erhaltene Therapien *</i>	
CTx	53,8 (198)
Rituximab	16,8 (62)
Radiatio	21,5 (79)
TBI	6,3 (23)
Autologe SZT	10,1 (37)
Allogene SZT	13,0 (48)
<i>Gesunde Spender</i>	2,7 (10)

\* bei Erkrankungen und Therapien Mehrfachnennungen möglich

Tab. 12: Einfluss diverser Faktoren auf die MSC-Präsenz der Gesamtgruppe

		Präsenz von MSC		OR
		Nein	Ja	[95% KI]
Alter	<b>A:</b> < 40 Jahre (N = 46)	3 (6,5%)	43 (93,5%)	<b>AB:</b> 0,18 [0,05 – 0,60]
	<b>B:</b> ≥ 40 bis < 60 Jahre (N = 130)	37 (28,5%)	93 (71,5%)	<b>AC:</b> 0,14 [0,04 – 0,48]
	<b>C:</b> ≥ 60 Jahre (N = 192)	63 (32,8%)	129 (67,2%)	<b>BC:</b> 0,82 [0,50 – 1,32]
Geschlecht	Männlich (N = 222)	49 (22,1%)	173 (77,9%)	0,48 [0,30 – 0,77]
	Weiblich (N = 146)	54 (37,0%)	92 (63,0%)	
AML	Nein (N = 313)	76 (24,3%)	237 (75,7%)	0,33 [0,19 – 0,60]
	Ja (N = 55)	27 (49,1%)	28 (50,9%)	
NHL	Nein (N = 279)	82 (29,4%)	197 (70,6%)	1,35 [0,78 – 2,34]
	Ja (N = 89)	21 (23,6%)	68 (76,4%)	
MM	Nein (N = 303)	84 (27,7%)	219 (72,3%)	0,93 [0,51 – 1,68]
	Ja (N = 65)	19 (29,2%)	46 (70,8%)	
MDS	Nein (N = 357)	96 (26,9%)	261 (73,1%)	0,21 [0,06 - 0,73]
	Ja (N = 11)	7 (63,6%)	4 (36,4%)	

Fortsetzung Tab. 12: Einfluss diverser Faktoren auf die MSC-Präsenz der Gesamtgruppe

		Präsenz von MSC		OR
		Nein	Ja	[95% KI]
CTx	Nein (N = 170)	37 (21,8%)	133 (78,2%)	0,56 [0,35 – 0,89]
	Ja (N = 198)	66 (33,3%)	132 (66,7%)	
Abstand letzte CTx bis zur KMP	≤ 62 Tage (N = 108)	40 (37,0%)	68 (63,0%)	1,34 [0,73 – 2,44]
	> 62 Tage (N = 85)	26 (30,6%)	59 (69,4%)	
SZT	Nein (N = 295)	69 (23,4%)	226 (76,6%)	0,35 [0,21 – 0,60]
	Ja (N = 73)	34 (46,6%)	39 (53,4%)	
Allogene SZT	Nein (N = 320)	80 (25%)	240 (75%)	0,36 [0,20 – 0,67]
	Ja (N = 48)	23 (47,9%)	25 (52,1%)	
Autologe SZT	Nein (N = 331)	87 (26,3%)	244 (73,7%)	0,47 [0,23 – 0,94]
	Ja (N = 37)	16 (43,2%)	21 (56,8%)	

Tab. 13: Logistische Regression der Gesamtgruppe für die Präsenz von MSC

Einflussfaktor	OR [95% KI]	Signifikanz
Alter	0,978 [0,961 – 0,996]	0,019
Geschlecht	0,501 [0,309 – 0,815]	0,005
AML	0,494 [0,260 – 0,938]	0,031
MDS	0,288 [0,079 – 1,051]	0,059
Allogene SZT	0,381 [0,191 – 0,763]	0,006

Tab. 14: Mittelwertvergleich Zahl MSC/ml KM des Validierungssets

		Zahl MSC/ml KM bei erster Passage	
		Mittelwert	MD [95% KI]
Alter	A: < 40 Jahre (N = 4)	9.076	AB: 1.178 [-9.692 – 12.049]
	B: ≥ 40 bis < 60 Jahre (N = 14)	7.898	AC: 4.735 [-6.055 – 15.525]
	C: ≥ 60 Jahre (N = 15)	4.341	BC: 3.557 [-3.569 – 10.682]
Geschlecht	Männlich (N = 20)	5.467	-2.429
	Weiblich (N = 13)	7.896	[-7.874 – 3.015]
AML	Nein (N = 25)	7.281	3.537
	Ja (N = 8)	3.744	[-2.618 – 9.692]
NHL	Nein (N = 23)	6.375	-160
	Ja (N = 10)	6.535	[-6.025 – 5.705]
MM	Nein (N = 30)	6.159	-2.910
	Ja (N = 3)	9.069	[-12.225 – 6.406]
MDS	Nein (N = 31)	6.648	3.697
	Ja (N = 2)	2.951	[-7.518 – 14.912]

Fortsetzung Tab. 14: Mittelwertvergleich Zahl MSC/ml KM des Validierungssets

		<b>Zahl MSC/ml KM bei erster Passage</b>	
		<b>Mittelwert</b>	<b>MD [95% KI]</b>
CTx	Nein (N = 17)	7.270	1.745
	Ja (N = 16)	5.525	[-3.610 – 7.100]
Abstand letzte CTx zur KMP	≤ 62 Tage (N = 14)	3.982	-12.347
	> 62 Tage (N = 2)	16.328	[-210.670 – 185.977]
SZT	Nein (N = 26)	5.703	-3.398
	Ja (N = 7)	9.101	[-9.873 – 3.077]
Allogene SZT	Nein (N = 28)	6.702	1.835
	Ja (N = 5)	4.867	[-5.652 – 9.322]
Autologe SZT	Nein (N = 31)	5.568	-14.119
	Ja (N = 2)	19.687	[-169.883 - 141.645]

Tab. 15: Mittelwertvergleich Zahl MSC/ml KM der Gesamtgruppe

		Zahl MSC/ml KM bei erster Passage	
		Mittelwert	MD [95% KI]
Alter	A: < 40 Jahre (N = 41)	60.758	AB: 50.447 [17.013 – 83.881]
	B: ≥ 40 bis < 60 Jahre (N = 88)	10.311	AC: 49.293 [17.374 – 81.211]
	C: ≥ 60 Jahre (N = 122)	11.466	BC: -1.154 [-25.884 – 23.575]
Geschlecht	Männlich (N = 165)	17.080	-5.933 [-25.303 – 13.437]
	Weiblich (N = 86)	23.013	
AML	Nein (N = 224)	20.697	14.728 [-14.907 – 44.363]
	Ja (N = 27)	5.969	
NHL	Nein (N = 187)	22.585	13.617 [140 – 27.093]
	Ja (N = 64)	8.969	
MM	Nein (N = 209)	20.271	6.917 [-17.714 – 31.547]
	Ja (N = 42)	13.354	
MDS	Nein (N = 247)	19.297	11.537 [-61.911 – 84.985]
	Ja (N = 4)	7.760	

Fortsetzung Tab. 15: Mittelwertvergleich Zahl MSC/ml KM der Gesamtgruppe

		<b>Zahl MSC/ml KM bei erster Passage</b>	
		<b>Mittelwert</b>	<b>MD [95% KI]</b>
CTx	Nein (N = 126)	25.040	11.901
	Ja (N = 125)	13.139	[-6.429 – 30.230]
Abstand letzte CTx zur KMP	≤ 62 Tage (N = 65)	13.522	667
	> 62 Tage (N = 55)	12.855	[-14.907 – 16.241]
SZT	Nein (N = 213)	19.969	5.651
	Ja (N = 38)	14.318	[-20.006 – 31.307]
Allogene SZT	Nein (N = 226)	20.287	11.784
	Ja (N = 25)	8.503	[-18.900 – 42.469]
Autologe SZT	Nein (N = 231)	19.215	1.273
	Ja (N = 20)	17.941	[-32.698 – 35.245]

Tab. 16: Präsenz von MSC bei Patienten nach allogener SZT

		Präsenz von MSC		OR
		Nein	Ja	[95% KI]
BMI in kg/m <sup>2</sup>	<b>A:</b> ≤ 18,4 (N = 2)	0 (0%)	2 (100%)	<b>AB:</b> 2,11 [1,31 – 3,39] <sup>1</sup>
	<b>B:</b> 18,5 – 24,9 (N = 19)	10 (52,6%)	9 (47,4%)	<b>AC:</b> 2,00 [1,34 – 2,98] <sup>1</sup>
	<b>C:</b> ≥ 25,0 (N = 24)	12 (50%)	12 (50%)	<b>BC:</b> 1,11 [0,33 – 3,71]
Abstand SZT-KMP	≤ 5 Monate (N = 31)	16 (51,6%)	15 (48,4%)	1,42 [0,40 – 5,07]
	> 5 Monate (N = 14)	6 (42,9%)	8 (57,1%)	
CMV-Infektion vor der SZT	Nein (N = 12)	7 (58,3%)	5 (41,7%)	1,68 [0,44 – 6,39]
	Ja (N = 33)	15 (45,5%)	18 (54,5%)	
HLA-Match	HLA-ident (10/10) (N = 36)	18 (50%)	18 (50%)	1,25 [0,29 – 5,43]
	Mismatch (≤ 9/10) (N = 9)	4 (44,4%)	5 (55,6%)	
Spender + Empfänger verwandt	Nein (N = 35)	16 (45,7%)	19 (54,3%)	0,56 [0,13 – 2,34]
	Ja (N = 10)	6 (60%)	4 (40%)	
Gleiches Geschlecht	Nein (N = 12)	7 (58,3%)	5 (41,7%)	1,68 [0,44 – 6,39]
	Ja (N = 33)	15 (45,5%)	18 (54,5%)	
Gleiche Blutgruppe	Nein (N = 22)	12 (54,5%)	10 (45,5%)	1,56 [0,48 – 5,06]
	Ja (N = 23)	10 (43,5%)	13 (56,5%)	

<sup>1</sup> für Kohorten-Analyse Präsenz von MSC = ja

Fortsetzung Tab. 16: Präsenz von MSC bei Patienten nach allogener SZT

		Präsenz von MSC		OR
		Nein	Ja	[95% KI]
Gleicher Rhesusfaktor	Nein (N = 11)	5 (45,5%)	6 (54,5%)	0,83 [0,21 – 3,26]
	Ja (N = 34)	17 (50%)	17 (50%)	
Konditionierung	<b>A: MAC</b> (N = 10)	6 (60%)	4 (40%)	<b>AB: 1,77</b> [0,40 – 7,93]
	<b>B: RIC</b> (N = 24)	11 (45,8%)	13 (54,2%)	<b>AC: 1,80</b> [0,32 – 10,20]
	<b>C: NMA</b> (N = 11)	5 (45,5%)	6 (54,5%)	<b>BC: 1,02</b> [0,24 – 4,26]
TBI	Nein (N = 25)	8 (32%)	17 (68%)	0,20 [0,06 – 0,72]
	Ja (N = 20)	14 (70%)	6 (30%)	
Busulfan	Nein (N = 38)	17 (44,7%)	21 (55,3%)	0,32 [0,06 – 1,88]
	Ja (N = 7)	5 (71,4%)	2 (28,6%)	
GvHD	Nein (N = 28)	13 (46,4%)	15 (53,6%)	0,77 [0,23 – 2,58]
	Ja (N = 17)	9 (52,9%)	8 (47,1%)	
Gutes Engraftment	Nein (N = 5)	3 (60%)	2 (40%)	1,66 [0,25 – 11,02]
	Ja (N = 40)	19 (47,5%)	21 (52,5%)	

Tab. 17: Mittelwertvergleich Zahl MSC/ml KM nach allogener SZT

		Zahl MSC/ml KM bei erster Passage	
		Mittelwert	MD [95% KI]
BMI in kg/m <sup>2</sup>	A: ≤ 18,4 (N = 2)	4.077	AB: 158 [-7.977 – 8.293]
	B: 18,5 bis 24,9 (N = 9)	3.918	AC: 936 [-7.012 – 8.884]
	C: ≥ 25,0 (N = 12)	3.140	BC: 778 [-3.811 – 5.367]
Abstand SZT-KMP	≤ 5 Monate (N = 15)	3.516	-29
	> 5 Monate (N = 8)	3.545	[-3.549 – 3.491]
CMV-Infektion vor der SZT	Nein (N = 5)	4.953	1.824
	Ja (N = 18)	3.130	[-5.747 – 9.394]
HLA-Match	HLA-ident (10/10) (N = 18)	3.916	1.795
	Mismatch (≤ 9/10) (N = 5)	2.122	[-2.187 – 5.776]
Spender + Empfänger verwandt	Nein (N = 19)	4.009	2.776
	Ja (N = 4)	1.233	[-1.464 – 7.015]
Gleiches Geschlecht	Nein (N = 5)	3.805	356
	Ja (N = 18)	3.449	[-3.705 – 4.417]

Fortsetzung Tab. 17: Mittelwertvergleich Zahl MSC/ml KM nach allogener SZT

		Zahl MSC/ml KM bei erster Passage	
		Mittelwert	MD [95% KI]
Gleiche Blutgruppe	Nein (N = 10)	2.407	-1.980
	Ja (N = 13)	4.387	[-5.240 – 1.280]
Gleicher Rhesusfaktor	Nein (N = 6)	3.958	584
	Ja (N = 17)	3.374	[-3.224 – 4.393]
Konditionierung	<b>A: MAC</b> (N = 4)	2.466	<b>AB: -1.897</b> [-7.680 – 3.886]
	<b>B: RIC</b> (N = 13)	4.363	<b>AC: 47</b> [-6.482 – 6.576]
	<b>C: NMA</b> (N = 6)	2.419	<b>BC: 1.944</b> [-3.048 – 6.936]
TBI	Nein (N = 17)	3.639	434
	Ja (N = 6)	3.206	[-3.379 – 4.246]
Busulfan	Nein (N = 21)	2.979	-6.294
	Ja (N = 2)	9.273	[-68.064 – 55.478]
GvHD	Nein (N = 15)	3.511	-44
	Ja (N = 8)	3.555	[-3.564 – 3.475]
Gutes Engraftment	Nein (N = 2)	9.749	6.816
	Ja (N = 21)	2.934	[1.734 – 11.898]

Tab. 18: MSC-Präsenz der Verlaufsgruppe

		Präsenz von MSC		OR
		Nein	Ja	[95% KI]
Vor allogener SZT		1	24	
(N = 25)		(4%)	(96%)	0,04
Nach allogener SZT		22	20	[0,01 – 0,31]
(N = 42)		(52,4%)	(47,6%)	
Zeitraum nach allogener SZT	<b>A:</b> Vor allogener SZT	1	24	<b>AB:</b> 0,05
	(N = 25)	(4%)	(96%)	[0,01 – 0,38]
	<b>B:</b> Tag +30 bis +120	14	15	<b>AC:</b> 0,03
	(N = 29)	(48,3%)	(51,7%)	[0,00 – 0,26]
	<b>C:</b> Tag >120	8	5	<b>BC:</b> 0,58
	(N = 13)	(61,5%)	(38,5%)	[0,15 – 2,21]

## **Erklärungen**

(1) Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

(2) Erklärung zum Wahrheitsgehalt der Angaben

Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

(3) Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Halle (Saale), den 19.03.2017

Lisa Maria Siol

## **Lebenslauf**

Name: Lisa Maria Siol  
Geburtsdatum: 04.07.1991  
Geburtsort: Halle (Saale)  
Familienstand: verheiratet, 1 Tochter

### Schulbildung

1997 – 1998 Grundschole „Im Rosental“ Merseburg  
1998 – 2001 Grundschole Merseburg-Süd  
2001 – 2009 Georg-Cantor-Gymnasium Halle (Saale)  
Schulabschluss: allgemeine Hochschulreife, Juni 2009

### Hochschulstudium

2009 – 2011 Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg  
09/2011 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
2011 – 2015 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
10/2014 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
11/2014 – 10/2015 Praktisches Jahr  
11/2015 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
12/2015 Approbation als Ärztin

### Beruflicher Werdegang

Seit SS 2016 Lehrauftrag der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg für die Tätigkeit als ärztliche Tutorin im Dorothea-Erxleben-Lernzentrum (SkillsLab)

Halle (Saale), den 19.03.2017

Lisa Maria Siol

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei den beiden ehemaligen Direktoren der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin IV *Herrn Prof. Dr. med. Hans-Joachim Schmoll* und *Herrn Prof. Dr. med. Carsten Müller-Tidow* für die Möglichkeit bedanken, dieses interessante Thema an ihrer Klinik bearbeiten zu können.

Mein besonderer Dank gilt *Herrn PD Dr. med. Lutz P. Müller* für die hervorragende Betreuung der Arbeit, das Beantworten unzähliger Fragen und die stete Motivation. Ich möchte mich bei der AG Müller für die erfreuliche Zusammenarbeit bedanken. Insbesondere möchte ich *Frau Katrin Nerger* für die Durchführung der MSC-Isolationen und *Frau Dr. rer. nat. Jana Lützkendorf* für die Unterstützung bei experimentellen Fragestellungen sowie beiden für den immer perfekt funktionierenden Austausch der aktuellsten Daten danken. Weiterhin möchte ich *Frau Kinga Ligeti* und *Frau Dr. med. Sandra Paul* für ihre Bereitschaft zur Fortführung der Knochenmarkpunktionen der Verlaufsgruppe und das Aushalten der vielen Erinnerungen dafür danken.

Ich möchte *Frau PD Dr. rer. nat. Susanne Unverzagt* vom Institut für Medizinische Epidemiologie, Biometrie und Informatik für die Beratung hinsichtlich statistischer Fragen danken. Außerdem möchte ich *Frau Josephine Schneider* für die Bekanntmachung mit der Datenbank und die Beantwortung einiger anfänglicher Unklarheiten danken. Meiner sehr guten Freundin *Kristin Rieger* möchte ich für ihre hilfreichen Anmerkungen zu Stil und Aufbau der Arbeit danken.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern *Ina* und *Steffen*, meinen Schwestern *Anna* und *Mara* sowie meinem geliebten Ehemann *Martin* für die jahrelange moralische Unterstützung bedanken, die das Gelingen und die Fertigstellung dieser Arbeit überhaupt erst möglich gemacht haben.