

**Aus der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin C  
Hämatologie und Onkologie - Transplantationsmedizin  
Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. Gottfried Dölken  
der Medizinischen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald**

Die allogene periphere Stammzelltransplantation bei Patienten mit B-Zell-Neoplasien: Der Einfluss von Rituximab auf das Engraftment sowie die akute und chronische Graft-versus-Host Erkrankung und den Graft-versus-Leukämie Effekt

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades eines

Doktors der Medizin

der

Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität

Greifswald

2011

vorgelegt von:  
Patrick Fabian Thomsen  
geb. am: 24.08.1972  
in: Hamburg

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Heyo K. Kroemer

1. Gutachter: Prof. Dr. W. Krüger

2. Gutachter: Prof. Dr. M. Freund

3. Gutachter: Prof. Dr. G. Dölken

Ort, Raum: Seminaraum, Klinik C

Tag der Disputation: 26.05.2011



## **Inhalt:**

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Die Stammzelltransplantation	1
1.1.1 Geschichte	1
1.1.2 Gewebetypisierung	4
1.1.3 Kolonie bildende Einheiten	5
1.1.4 Konditionierungsregime	5
1.1.5 Indikationen	6
1.2 Die akute Graft-versus-Host Erkrankung	9
1.2.1 Klinik	9
1.2.2 Die Klassifikation der akuten GvHD	10
1.2.3 Diagnostik und Histologie	11
1.2.4 Pathophysiologie	12
1.2.5 Prophylaxe und Therapie	14
1.3 Die chronische Graft-versus-Host Erkrankung	19
1.3.1 Klinik	19
1.3.2 Die Klassifikation der chronischen GvHD	20
1.3.3 Diagnostik und Histologie	21
1.3.4 Pathophysiologie	23
1.3.5 Therapie der chronischen GvHD	25
1.4 Risikofaktoren der Graft-versus-Host Erkrankung	30
1.5 Komplikationen der Graft-versus-Host Erkrankung	32
1.6 Der Graft-versus-Leukämie Effekt	34
1.7 Fragestellung	37
<b>2. Patienten und Methoden</b>	<b>38</b>
2.1 Patienten	38
2.2 Auswertung	40
2.3 Datenverarbeitung	44

<b>3. Ergebnisse</b>	<b>45</b>
3.1 Stammdaten	45
3.2 Die Vorbehandlung	46
3.3 Die Konditionierung	46
3.4 Transplantation	47
3.5 Therapie mit Donor-Lymphozyten-Transfusion	48
3.6 Die Vorbehandlung mit Rituximab	48
3.7 Die Supportive Therapie	49
3.8 Die GvHD-Prophylaxe	50
3.9 Das Engraftment	50
3.10 Die akute Graft-versus-Host Erkrankung	55
3.11 Die chronische Graft-versus-Host Erkrankung	57
3.12 Überlebensrate und Prognose	61
<b>4. Diskussion</b>	<b>64</b>
4.1 Engraftment	64
4.2 Überlebensrate und Prognose	66
4.3 Akute Graft-versus-Host Erkrankung	68
4.4 Chronische Graft-versus-Host Erkrankung	69
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>73</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>74</b>
<b>I. Anhang</b>	<b>I</b>
I.I Tabellen/Abbildungen	I
I.II Abkürzungen	II
I.IV Eidesstattliche Erklärung	IV
I.V Danksagung	V

# 1. Einleitung

## 1.1 Die Stammzelltransplantation

### 1.1.1 Geschichte

Die allogene Stammzelltransplantation stellt den Austausch des körpereigenen blutbildenden Systems durch ein körperfremdes (allogenes) blutbildendes System dar. Dabei werden nach vollständiger oder partieller Zerstörung des körpereigenen blutbildenden Systems mittels Radio- oder Chemotherapie pluripotente körperfremde hämatopoetische Stammzellen übertragen, aus denen sich aus einem Übergangsstadium (partieller Chimerismus) ein komplettes hämatopoetisches und immunologisches System regeneriert. Die autologe Stammzelltransplantation erfolgt im Gegensatz zur allogenen Transplantation mit körpereigenen hämatopoetischen Stammzellen. Diese werden über einen Zeitraum dem Körper entzogen und kryokonserviert. Problematisch ist hier die Schädigung der Stammzellen durch die Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff, die zu einer Reduktion hämatopoetischer Stammzellen im Graft führt. Nach Art der Stammzellgewinnung unterscheidet sich die Knochenmarktransplantation von der peripheren Stammzelltransplantation.

Die Grundidee, die eine Entwicklung zu einer Stammzelltransplantation als suffiziente und moderne Therapie maligner hämatologischer Erkrankungen ermöglichte, lag in Maximows im Jahre 1909 publizierter Arbeit. Hier wurden Lymphozyten erstmals als Zellen beschrieben, denen keinesfalls nur stationäre Eigenschaften im Körper zugeschrieben werden können, sie sind zudem vielmehr in der Lage, einen Standortwechsel im Körper vorzunehmen (1). Der radiologische Nachweis dieser Tatsache und darüber hinaus der Nachweis, dass sich ein durch Ganzkörperbestrahlung (TBI) nur teilweise eradiziertes Knochenmark aus unbestrahlten Anteilen rekonstruierte, gelang in den 50er Jahren (2). Unter anderen gelang es Barnes et al. an einem leukämischen Mausmodell 1956 nach TBI eine Knochenmarktransplantation erfolgreich

auszuführen (3). Trotz anhaltender intensiver Arbeiten am Tiermodell und relativ inhomogener Ergebnislage erfolgte für heutige Verhältnisse früh die klinische Anwendung der Methode. Im Jahre 1959 wurden drei wichtige Arbeiten publiziert, die die Methode der konventionellen Knochenmarktransplantation am Patienten untersuchten. Thomas et al. behandelten zwei Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) nach totaler Radioablation mit einer syngenen Knochenmarktransplantation. Auch wenn es bei beiden Patienten wenige Monate darauf zum Rezidiv kam, konnte gezeigt werden, dass sich durch syngenetische Transplantation ein funktionsfähiges hämatopoetisches System generieren lässt und des weiteren ergaben sich Hinweise, dass die alleinige Radiotherapie in hoher ablativer Dosierung nicht ausreicht, um ein Rezidiv zu verhindern (4). In einer weiteren Publikation berichteten Mathe et al. über die Behandlung von fünf Strahlenverunfallten durch eine allogene Knochenmarktransplantation. Auch ohne Gewebetypisierung überlebten vier der fünf Patienten, wobei lediglich ein transitorischer partieller Chimerismus erreicht wurde und das Überleben der Patienten wahrscheinlich auf eine Rekonstitution des eigenen hämatopoetischen Systems zurückzuführen ist (5). Über eine autologe Knochenmarktransplantation von kryokonserviertem Knochenmark eines ALL-Patienten nach TBI, das während einer Remissionphase gewonnen worden war berichteten McGovern et al. Der Patient profitierte zwar in Form einer Remission von der Therapie, erlitt jedoch ein Rezidiv, was zum einen auf den fehlenden Graft-versus-Leukämie-Effekt oder aber auf eine minimale residuale Resterkrankung (MRD) im Transplantat oder Patient zurückzuführen sein kann (6). Die eindeutige Klärung der Ursachen von Rezidiven in oben genanntem Setting steht aus.

Rückblickend stand die klinische Anwendung der Knochenmarktransplantation um die Mitte der 60er Jahre fast vor ihrem Ende, da die Ergebnisse insgesamt als nicht befriedigend bezeichnet werden mussten. Erst neue Impulse aus der Molekularbiologie- und Zytologie in Form der Gewebetypisierung, der Pharmakologie und dem Tierversuch belebten die klinische Forschung in der zweiten Hälfte der 60er Jahre. Storb et al. konnten Anfang der 70er Jahre am caninen Modell die Bedeutung der Gewebetypisierung demonstrieren. Im Vergleich zweier Tiergruppen, die beide eine Konditionierung durch TBI erhalten hatten fanden sich für die Gruppe, welche im bezug auf ihren Spender *mismatches*

aufwiesen signifikant schlechtere Überlebensraten (7). Thomas et al. publizierten 1971 die Auswertung eines allogenen Transplantationsprogrammes. Ausgewertet wurden die Daten von verwandten Spender-Empfänger-Paarungen, die in dem Gewebemerkmale HLA-A eine Übereinstimmung aufwiesen (8).

Wurde die Anwesenheit von unreifen Vorläuferzellen im peripheren Blut lange Zeit ausschließlich als Malignitätskriterium angesehen, änderte sich diese Sichtweise unter wesentlichem Einfluss einer von Fliedner 1964 veröffentlichten Arbeit, in der der Nachweis von mononukleären pluripotenten, also teilungs- und spezifizierungsfähigen Vorläuferzellen im peripheren Blut gelang (9). Die Entwicklung von Zellseparatoren, die nach dem Prinzip der Apherese arbeiteten, ermöglichten die ersten Arbeiten über die gezielte Separation und Sammlung von spezifischen Progenitorzellen (10). Ende der 70er Jahre führte die Isolation eines Vielfachen an - im peripheren Blut gewöhnlich anwesenden - CFU-GM, isoliert über eine Zeitspanne von lediglich 24 Stunden, zu der Erkenntnis, dass zwischen Markraum und peripherem Blut ein Equilibrium im Bezug auf Stammzellen herrschen müsse. Damit fand sich eine Möglichkeit auf die mehrfachen Knochenmarkpunktionen, die für die konventionelle Knochenmarktransplantation erforderlich sind zu verzichten und eine periphere Stammzellgewinnung vorzunehmen. Im Jahre 1970 gelang die erste periphere Stammzelltransplantation zwischen zwei eineiigen Zwillingen (11). Durch Zytokine wie GM-CSF oder G-CSF kann die Stammzellendichte im Knochenmark erhöht werden. Auch die Mobilisierung der Stammzellen aus der Matrix des Knochenmarkes und damit die Anreicherung in der Peripherie wird durch diese Zytokine gefördert. Im Sinne des Equilibriums wurde so eine reichhaltigere Stammzellernte aus dem peripheren Blut möglich (12). Die weitere Entwicklung der Methode führte über die Anreicherung durch Mehrfachapherese und im Zusammenspiel mit optimierten Konditionierungs- und Supportivtherapien zu einer - in Abhängigkeit von der malignen hämatologischen Grunderkrankung - potentiell kurativen Therapieoption.

### 1.1.2 Gewebetypisierung

Ein schnelles und stabiles Engraftment und damit eine erfolgreiche Transplantation hängen wesentlich von einer sorgfältigen Spenderauswahl ab. Da eine Transplantatabstoßung umgekehrt mit dem Ausmaß der Übereinstimmung im bezug auf die Gewebetypisierung korreliert, kommt hier den serologischen und molekularbiologischen Verfahren eine große Bedeutung zu. Gegenstand der Gewebetypisierung ist der *major-histocompatibility-complex* (MHC). Grundsätzlich können hier unterschieden werden der MHC-I oder auch humanes Leukozyten-Antigen-A (HLA-A,-B oder -Cw) von einem MHC-II oder auch HLA-DR,-DQ oder -DP. Der MHC steht für ein transmembranes Oberflächenprotein aus mehreren Untereinheiten, welches im Falle von MHC-II auf Antigen präsentierenden Zellen (APC) und im Falle von MHC-I auf allen kernhaltigen Körperzellen zu finden ist. Variable Domänen des MHC binden Peptide und präsentieren diese auf der Zelloberfläche. Dabei kann es sich um endogene Peptide handeln (MHC-I) oder aber um proteosomal prozessierte körperfremde Peptide (MHC-II). Über den T-Zell-Rezeptor (TCR) können T-Zellen durch allogenes MHC oder durch über MHC präsentierte körperfremde Peptide aktiviert werden und somit eine Immunreaktion und eine Host-versus-Graft-Reaktion bzw. Graft-versus-Host-Reaktion einleiten. Erschwerend für die Suche eines passenden Spenders, evolutionsbiologisch jedoch äußerst sinnvoll, besteht für den MHC ein ausgeprägter Polymorphismus, sodass eine Vielzahl von Sequenzvariationen für ein Allel besteht (13). In Deutschland gelten nach dem 2. Konsensus diejenigen familiären oder unverwandten Spender als kompatibel, die im Bezug auf HLA-A- und -B-Allele eine durch serologische Typisierung (niedrigauflösend) eine zweistellige Übereinstimmung und HLA-DRB1 und -DQB1 betreffend (hochauflösend) - eine vierstellige molekularbiologische Übereinstimmung aufweisen (14).

### 1.1.3 Kolonie bildende Einheiten

Unter Berücksichtigung der Anforderungen, die an eine für die Transplantation geeignete und letztendlich zu isolierende Progenitorzellpopulation gestellt werden müssen, kommt nur ein bestimmter Stammzelltyp in Frage. Die Eigenschaften eines unendlichen Selbsterneuerungspotentiales, das Charakteristikum der Pluripotenz, sowie die Fähigkeit, ein suffizientes Knochenmark zu generieren, treffen auf die LTC-IC zu. Nach Immunophänotypisierung handelt es sich dabei um pluripotente Progenitorzellen vom Typ CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>/Lin<sup>-</sup>/Thy-1<sup>+</sup> (15, 16).

Die absolute Zahl an in der Peripherie zirkulierender Stammzellen befindet sich physiologischer Weise in einem Fließgleichgewicht. Für die allogene Transplantation wird dem gesunden Spender das Transplantat aus dem peripheren Blut im *steady-state* entnommen werden. Die steady-state Mobilisation erfolgt mit Granulozyten-Kolonie-stimulierendem Faktor (G-CSF). Bei autologer Transplantation kann die sogenannte Chemomobilisation erfolgen. Hier erfolgt die Stimulation mit G-CSF oder GM-CSF und Leukapherese nach einer Chemotherapie.

### 1.1.4 Konditionierungsregime

Einer Stammzelltransplantation ist die Konditionierungstherapie vorangestellt. Diese kann aus einer hochdosierten Chemotherapie oder aus einer Chemotherapie in Kombination mit einer Ganzkörperbestrahlung bestehen. Wesentliche Ziele der Konditionierung sind dabei die Immunsuppression im Empfängerorganismus, um ein Engraftment des allogenen Transplantates nicht zu gefährden; des weiteren soll der malignen Zellklon beseitigt werden und durch die Myeloablation Raum für das Transplantat und seine Proliferation geschaffen werden.

Standardregime können auf einer Chemotherapie oder Ganzkörperbestrahlung (TBI) beruhen. Standardsubstanzen der Chemotherapie sind Busulfan (14-16 mg pro Kilogramm Körpergewicht Gesamtdosis) in Kombination mit Cyclophosphamid (120-200 mg pro Kilogramm Körpergewicht Gesamtdosis). Ergänzend bzw. alternativ werden vorwiegend die Substanzen Etoposid, Thiotepa

oder Melphalan eingesetzt. Die Ganzkörperbestrahlung erfolgt fraktioniert bis zu einer kumulativen Dosis von 1200 cGy.

Dosisreduzierte also nicht-myeloablative Regime suchen den GvL-Effekt zu nutzen. Dabei werden die *reduced intensity chemotherapy* (RIC) von einer minimalen Konditionierung unterschieden. Im Rahmen der RIC wird mit Busulfan 8 mg pro Kilogramm Körpergewicht, Fludarabin 150 mg/m<sup>2</sup> und Anti-Thymocyten-Globulin (ATG) behandelt. Eine toxizitätsreduzierte Option ist die Kombination von Fludarabin mit Treosulfan 36 g/m<sup>2</sup> und optional ATG. Als eine minimale Konditionierung wird die Kombination TBI 2 Gy mit Fludarabin und eventuell ATG bezeichnet. Hier leistet die Konditionierung also nicht die Eradikation des malignen Zellklones, sondern schafft lediglich die Voraussetzungen für ein Engraftment. Ergänzend kann eine Nachbehandlung in Form einer Donor-Lymphozyten-Transfusion (DLI) erfolgen. Die Indikation zur DLI kann die gefährdete Remission oder das drohende Rezidiv sein. Auch die Situation vor einem *graft-failure* kann eine DLI rechtfertigen. Auch der prophylaktische Einsatz der DLI bei hohem Risiko ist gerechtfertigt.

### 1.1.5 Indikationen

Eine Indikation zur allogenen peripheren Stammzelltransplantation können sowohl maligne als auch nicht-maligne Erkrankungen des hämatopoetischen Systems darstellen.

Bei der ALL kann nach primärem Induktionsversagen oder nach dem 1. Rezidiv in der 2. Remission eine Stammzelltransplantation indiziert sein. Durch allogene Stammzelltransplantation in Kombination mit Hochdosischemotherapie (HDC) können so Heilungsraten von 10-20% nach primärem Induktionsversagen und eine Langzeitüberlebensrate von 10-25% bei Transplantation nach 2. Rezidiv erzielt werden. Auch Patienten in der 2. Remission können von einer Stammzelltransplantation profitieren. Bei HLA-Übereinstimmung wurden 5-Jahres-Überlebensraten von 30% ermittelt (17). Auch Hochrisikopatienten in 1. Remission können von einer Stammzelltransplantation profitieren. So konnten Yanada et al. in einer Metaanalyse, die 7 Studien und 1274 Patienten einschloss,

zeigen, dass eine allogene Stammzelltransplantation mit einer signifikant besseren Prognose korreliert als eine Therapievariante ohne Stammzelltransplantation (18). Ob ein familiärer oder nicht- familiärer Spender vorliegt, hatte hier auf die Gesamtüberlebensrate und Rezidivwahrscheinlichkeit keinen Einfluss (19).

Ein großer Teil der an chronisch lymphatischer Leukämie (CLL) erkrankten Patienten müssen weiterhin als inkurabel gelten. Die autologe Stammzelltransplantation erbrachte keine Heilungserfolge. Durch eine allogene periphere Stammzelltransplantation ist eine Heilung möglich und es zeigten sich gute Ergebnisse in Verbindung mit RIC-Protokollen und Nutzung des Graft-versus-Leukämie-Effektes (20). Eine Indikation für die allogene periphere Stammzelltransplantation bei CLL kann bei jüngeren Patienten ein Rezidiv nach fludarabinhaltiger Therapie sein.

In der Therapie von non-Hodgkin Lymphomen ist der Stellenwert der allogenen Stammzelltransplantation vorerst noch nicht geklärt. Patienten mit indolenten non-Hodgkin Lymphomen können von einer Stammzelltransplantation in Kombination mit einer Chemotherapie profitieren. Im Vergleich mit der autologen Transplantation scheint die transplantationsbedingten Mortalität im allogenen Setting zwar höher zu sein, es finden sich jedoch signifikant geringere Rezidivraten (21). Kriterien wie Patientenalter <50 Jahren, Vorhandensein eines HLA-identischen verwandten Spenders, mehrfaches Rezidiv in der Anamnese können jedoch die Indikationsstellung erleichtern. In der Zusammenschau ist die Indikation zur allogenen Transplantation bei NHL daher noch individuell zu stellen.

Die allogene Stammzelltransplantation kann bei Patienten mit multiplen Myelom (MM) ein kurativer Therapieansatz sein. Allerdings finden sich im Vergleich mit der autologen Transplantation Hinweise auf eine höhere transplantationsbedingte Mortalität bei besserer Langzeitüberlebensrate. Ein Graft-versus-Myelom-Effekt konnte im allogenen Setting gezeigt werden (22). Gute Ergebnisse mit RIC und allogener Transplantation nach HDT und autologer Transplantation konnten Kröger et al. nachweisen. Bei n=47 (Alter 31-64) Patienten, von denen 24 einen HLA-identischen verwandten Spender aufwiesen, fanden sich eine

Gesamtüberlebensrate von 70%, ein ereignisfreies Überleben von 54% und 55% CR bei einem Follow-up von im Mittel 15 Monaten (23).

Bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) ist eine allogene periphere Stammzelltransplantation die kurative Therapie. Dabei hängt die Indikationsstellung zum einen von der Verfügbarkeit des geeigneten Donors ab und zum anderen vom zytogenetischen Risikoprofil der vorliegenden AML (24). Bei niedrigem Risiko (*low-risk*) erfolgt die allogene Transplantation nach dem 1. Rezidiv oder bei partieller Remission nach Induktions- oder Konsolidierungs-Chemotherapie. Bei intermediärem Risiko (*standard-risk*) erfolgt die allogene Transplantation mit verwandtem und im Gewebetyp übereinstimmenden Spender (mrd) in der 1. Remission. Liegt ein solcher Spender nicht vor erfolgt die konventionelle Konsolidierung und als weitere Therapieoptionen bleiben die autologe periphere Stammzelltransplantation und die Chemotherapie. Bei hohem Risiko (*high-risk*), z. B. bei komplex-aberrantem Karyotyp erfolgt die Indikationsstellung meist als Einzelfallentscheidung oder im Rahmen von klinischen Studien.

Bei der chronisch myeloischen Leukämie (CML) liegt die Heilungsrate bei Transplantation in der frühen chronischen Phase bei 70 %. Indiziert ist die Transplantation hier in der akzelerierte Phase oder in der Blastenkrise. Leider findet sich jedoch eine hohe transplantationsbedingte Mortalität und Morbidität. Seit der Anwendung von spezifischen Tyrosinkinase-Inhibitoren wie z. B. Imatinib verliert die Transplantation hämatopoetischer Stammzellen als Bestandteil der Therapie einer CML massiv an Bedeutung. Patienten mit inkomplettem Ansprechen oder progredienter Erkrankung sind jedoch nach wie vor auf die Transplantation angewiesen (25).

Auch bei nicht malignen Erkrankungen wie der schweren aplastischen Anämie, der Thalassämie, der Sichelzellenanämie, bei immunologischen Defektzuständen oder angeborenen Stoffwechselerkrankungen kann eine periphere allogene Stammzelltransplantation indiziert sein.

### 1.2 Die akute Graft-versus-Host Erkrankung

#### 1.2.1 Klinik

Die akute Graft-versus-Host Erkrankung tritt ca. zwischen Tag +8 und Tag +100 auf. Weisdorf et al. konnten bei 42% der Patienten nach konventioneller Knochenmarktransplantation eine akute Graft-versus-Host Erkrankung in einer moderaten bis hochgradigen Ausprägung feststellen (26). Auch höhere Inzidenzen sind beschrieben, da eine Abhängigkeit von der immunologischen Übereinstimmung zwischen Spender und Empfänger besteht. Die akute cutane Graft-versus-Host Erkrankung beginnt als vorerst umschriebenes makulopapulöses Erythem. Es treten Palmar- oder Plantarerytheme auf und auch die Mundhöhle kann betroffen sein. In der Folge kann sich das Erythem über die gesamte Körperoberfläche homogen oder inhomogen ausbreiten. Der schwere Hautbefall zeichnet sich durch das Auftreten von Bullae, epidermalen Nekrosen bis hin zu Denudationen aus, die vom Aspekt her wie höhergradige Verbrennungen imponieren können. Anorexie, Übelkeit, Erbrechen und starke, teils blutige Durchfälle weisen auf einen Befall des Gastrointestinaltraktes hin, der meist zeitgleich oder nach einer kutanen Manifestation auftritt. Makroskopisch reicht das Bild vom leichten Mucosaerythem und Ödem bis zur ulcerösen Enterokolitis mit Denudationen. In der Folge besteht die Gefahr eines paralytischen Ileus und der Perforation. Typisch für einen Leberbefall ist der schmerzfreie Ikterus. Weitere unspezifische Symptome können der Aszites und die Hepatomegalie sein. Paraklinisch kann es zu einem Bilirubinanstieg und einer erhöhten alkalischen Phosphatase im Serum kommen. Zu einem abgewandelten Bild kann es insbesondere nach Konditionierung mit RIC kommen. Hier wurden Verläufe mit singulärem Befall der Leber oder des Gastrointestinaltraktes beschrieben (27).

### 1.2.2 Die Klassifikation der akuten GvHD

Die Einteilung der akuten GvHD erfolgt nach Glucksberg et al. in erweiterter Form (28). Der Befall von Haut, Leber und Gastrointestinaltrakt, jeweils in vier Stadien eingeteilt, wird zusammengefasst, und daraus ergeben sich die Schweregrade I°-IV°. Dabei richten sich die Stadien bei der Haut nach befallener Körperoberfläche (Stadium 1: <25%, Stadium 2: 25-50%, Stadium 3: generalisiertes Erythem, Stadium 4: Bullae), bei der Leber nach der Höhe des konjugierten Bilirubins im Serum (Stadium 1: 34-51 mmol/l, Stadium 2: 52-103 mmol/l, Stadium 3: 104-256 mmol/l, Stadium 4: >256 mmol/l) und beim Gastrointestinaltrakt nach dem Ausmaß der Diarrhoe (Stadium 1: >500 ml/d, Stadium 2: >1000 ml/d, Stadium 3: >1500 ml/d, Stadium 4: >2000 ml/d, Ileus, gastrointestinale Blutung) (**Tab. 1**).

**Tab. 1: Organspezifisches Grading der aGvHD**

Stadium	Haut	Leber	Magen-Darm Trakt
0	Kein Exanthem	Bilirubin <34 mmol/l	< 500 ml Diarrhöe/Tag
+	Makulopapulöses Exanthem < 25% KO	Bilirubin 34-51 mmol/l	> 500 ml Diarrhöe/Tag
++	Exanthem 25-50% der KO	Bilirubin 52-103 mmol/l	>1000 ml Diarrhöe/Tag
+++	Generalisierte Erythrodermie	Bilirubin 104-256 mmol/l	>1500 ml Diarrhöe/Tag
++++	Erythrodermie mit Blasenbildung und Desquamation	Bilirubin > 256 mmol/l	>2000 ml/Tag oder schwere abdominelle Schmerzen mit oder ohne Ileus, Hämatochezie

**Abkürzungen: KO=Körperoberfläche**

Die einzelnen Organstadien finden sodann Eingang in die Ermittlung des Schweregrades (Grad I: Haut 1-2, Leber 0, Gastrointestinaltrakt 0; Grad II: Haut 1-3, Leber 1 und/oder Gastrointestinaltrakt 1; Grad III: Haut 2-3, Leber 2-4 und/oder Gastrointestinaltrakt 2-3; Grad IV: Haut 2-4, Leber 2-4 und/oder Gastrointestinaltrakt 2-4) (**Tab. 2**).

**Tab. 2: Gesamt-Grading der aGvHD**

Grad	Grad der Organbeteiligung
I	Exanthem + bis ++, keine Beteiligung von Leber oder Darm, keine Verschlechterung des klinischen Zustandes
II	Exanthem + bis +++, Beteiligung von Leber + und/oder Darm +, leichte Verschlechterung des klinischen Zustandes
III	Exanthem ++ bis +++, Beteiligung von Leber + bis ++++ und / oder von Darm ++ bis +++
IV	wie Grad III mit Organbeteiligung ++ bis ++++ und massiver Verschlechterung des klinischen Zustandes

### 1.2.3 Diagnostik und Histologie

Erschwerend für die Diagnosestellung sind Differentialdiagnosen wie das Arzneimittelexanthem, virale Infektionen mit CMV, Adenoviren, HHV6 oder Parvovirus B19 und das Bild einer viralen Hepatitis. Die Histologie ist in vielen Fällen diagnosestellend. Histopathologisch finden sich als allgemeine Merkmale die Apoptose und eine mässige lymphozytäre Infiltration.

Im Hautpräparat finden sich zu einem frühen Zeitpunkt der Erkrankung eine Vakuolisierung von epidermalen Basalzellen sowie eine perivaskuläre Ödembildung in der Dermis. Mit fortschreitender Erkrankung finden sich epidermal spongiforme Veränderungen neben apoptotischen Keratinozyten mit inselförmig angeordneten Lymphozytenverbänden. Bei einem Vollbild des Hautbefalls kann es neben der Ausbildung von Bullae zum vollständigen Verlust

der Epidermis kommen. Auch die lichenoiden Reaktion mit reichlich eosinophilen apoptotischen Zellen ist jedoch unspezifisch und kann auch als Folge einer Bestrahlung oder Chemotherapie sowie bei Erkrankungen wie dem Lichen ruber planus, Erythema multiforme oder dem Lupus erythematoses auftreten. Bei der histologischen Befundung und der Einordnung des histologischen Befundes ist daher der Zeitpunkt der Probengewinnung zu berücksichtigen. So lassen sich Einflüsse durch Bestrahlung oder Chemotherapie durch Probengewinnung zu einem späteren Zeitpunkt oder Serienbiopsien ausschließen. Dies steht jedoch im Gegensatz zur Strategie der möglichst frühen Diagnosestellung und der damit verbundenen effektiveren Therapiemöglichkeit der akuten Graft-versus-Host Erkrankung. Bei Befall des Gastrointestinaltraktes finden sich anfänglich vereinzelte apoptotische Zellen in den Krypten. Mit fortschreitender Erkrankung kommt es zur massenhaften Ansammlung von apoptotischen Zellen in den Krypten, die man dann auch als *exploding crypts* bezeichnet. Nach dem Kryptenverlust kommt es sodann zum vollständigen Untergang des Epithels mit allen Folgen seiner nicht mehr existierenden Barrierefunktion.

Das histologische Bild des Leberbefalls zeichnet sich im Anfangsstadium durch diffuse lymphozytäre Infiltrate des Leberazinus sowie Läsionen der kleinen und kleinsten Gallengänge aus. Im weiteren Verlauf kommt es zur Zerstörung der Gallengänge mit hepatozellulärer Cholestase und fettiger Degeneration des Leberparenchyms. Auf den Untergang von Hepatozyten und die inflammatorische portale Invasion von Plasmazellen, eosinophilen und neutrophilen Granulozyten folgt der zunehmende fibrotische Umbau der Portalfelder. Auch hier handelt es sich jedoch um unspezifische Veränderungen, die durch gelegentlich auftretende Begleiterkrankungen wie Hepatitis C oder Arzneimittelwirkungen (z. B. durch Cyclosporin) bedingt sein können (27).

### 1.2.4 Pathophysiologie

Die Ursachen der akuten GvHD liegen in der Aktivierung von immunologischen Mechanismen auf Zell- und Mediatorebene. Eine zentrale Rolle spielen hier die Oberflächenantigene auf kernhaltigen Zellen, die MHC-Proteine. Die genetische

Übereinstimmung im Bezug auf diese MHC-Proteine zwischen Spender und Empfänger, aber auch die Übereinstimmung im Bezug auf den *minor histocompatibility complex* (mHag) sind von entscheidender Bedeutung.

Vogelsang et al. führen für den Ablauf der akuten GvHD ein 3-Phasen Modell an. In Phase I kommt es zu einer destruierenden Wirkung von Chemotherapeutika und TBI auf die gastrointestinale Barriere. Es kommt zu einer Permeabilitätssteigerung, die zu einem Übertritt von LPS in den Organismus führt; Makrophagen werden durch LPS zu einer massiven Produktion inflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-18 angeregt.

Die inflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-12 haben ihrerseits eine direkt schädigende Wirkung auf die gastrointestinale Barriere; so ist für TNF- $\alpha$  zum einen eine direkte Wirkung auf tight-junctions und zum anderen eine Aktivierung der interferonabhängigen Apoptose von Mucosa-Zellen über Fas/Fas-L-Aktivierung nachgewiesen. Desweiteren führt TNF- $\alpha$  zu einer vermehrten Exprimierung von MHC-Antigenen auf Empfängerzellen und damit zu einer Aktivierung von T-Zellen des Spenders.

In einer Phase II kommt es nun zur weiteren Aktivierung und Multiplikation von T-Zellen des Spenders. Die APC im Empfängerorganismus bieten nun über den MHC spenderfremde Peptide an. Durch diese werden T-Zellen des Spenders aktiviert und Th-1 Zellen beginnen mit der Synthese von IL-2 und gesteigerter Exprimierung von IL-2-Rezeptoren. Über die IL-2-Kaskade kommt es zu einer Vermehrung von alloreaktiven T-Zellen, die sich schließlich zu Effektorzellen differenzieren können. Die Aktivierung von T-Zellen des Spenders findet also über zwei Wege statt: die Komplexbildung aus MHC-Oberflächenantigenen des Empfängers, Allopeptid und T-Zell-Rezeptor oder/und über einen direkten Zell-Zell-Kontakt zwischen T-Zellen und Antigen-präsentierenden Zellen. Neben den beschriebenen Mechanismen spielt eine Vielzahl von Co-Faktoren eine Rolle. So ist das von B-Zellen und APC synthetisierte IL-12 im murinen Modell an der Phänotypisierung von Th-Zellen zu Th1-Zellen und damit an der Entstehung eines GvH-Mechanismus beteiligt (29).

Als dritte Phase wird von Vogelsang et al. eine Effektor-Phase beschrieben, in der ein fortschreitender Zell- und Gewebeuntergang über aktivierte T-Zellen, Makrophagen und NK-Zellen stattfindet. Dabei spielen sowohl Fas/Fas-L

abhängige als auch Perforin/Granzym abhängige Destruktionsmechanismen eine Rolle (30).

Bei der kutanen Manifestation der akuten GvHD ist endothelial synthetisierte Hyaluronsäure ein Faktor im Migrations- und Bindungsgeschehen von Lymphozyten. So kann ein durch Endothelzellen nach intraluminal gerichteter Komplex aus Oberflächenprotein und Hyaluronsäure (CD44-HA) von zirkulierenden Lymphozyten als strömungsresistente Bindungsstelle genutzt werden (31).

### 1.2.5 Prophylaxe und Therapie

Eine effiziente Prophylaxe der akuten GvHD ist wichtiger Bestandteil der Transplantationsprotokolle. Eine RIC hat deutlich weniger toxische Effekte auf den Körper und die verschiedenen Gewebe. Damit liegt eine vergleichsweise geringere Organtoxizität als bei konventionellen Konditionierungsregimen vor; Badros et al. zeigten eine verbesserte Prognose nach nichtmyeloablativer Konditionierung bei Patienten mit Multiplem Myelom (32). Die Verringerung der T-Zell-Zahl im Graft (T-Zell-Depletion ex in vitro T-Zell-Depletion) führt ebenfalls zu einer niedrigeren Inzidenz und Ausprägung der akuten GvHD (21). Leider führte die Reduktion von T-Zellen im Graft jedoch zu schweren Komplikationen in der Posttransplantationsphase in Form von opportunistischen Infektionen, Engraftmentversagen, erhöhter Rezidiv- und Mortalitätsrate, sodass sich die Prognose mit und ohne T-Zell-Depletion angleicht (33). Als zusätzliche prophylaktische Maßnahmen wurde von einigen Autoren die Schaffung einer keimarmen Atmosphäre im Patientenzimmer sowie die Darmdekontamination angeführt (34).

Zur medikamentösen Prophylaxe haben sich Cyclosporin A oder Tacrolimus in Kombination mit Methotrexat als wirksam erwiesen (35). Anstatt mit Methotrexat kann Cyclosporin A auch mit Mycophenolat Mofetil kombiniert werden. Die Therapie der akuten GvHD basiert als *first-line* Therapie im Wesentlichen auf der Behandlung mit Glucokortikoiden. Das Anti-Thymozytenglobulin (ATG) wirkt als polyklonales Immunglobulin im Sinne einer T-Zelldepletion in vivo. Als

Bestandteil der Konditionierung hat ATG aufgrund seiner Halbwertszeit auch eine depletierende Wirkung auf Spender-T-Zellen und ist damit Teil einer GvHD-Prophylaxe. Nachteile liegen in der Verzögerung der Immunrestitution und einer nachteiligen Wirkung auf den GvL-Effekt (**Tab. 3**).

Eine große therapeutische Herausforderung stellt nach wie vor der Patient mit einer glukokortikoidresistenten akuten GvHD dar. Wege zur Therapie liegen hier in der Blockade der Signaltransduktion zwischen IL-2 und seinem Rezeptor, der selektiv auf aktivierten T-Zellen exprimiert ist. Als vielversprechend galt hier der monoklonale CD25-Antikörper Daclizumab, der sich jedoch in einer Phase-III-Studie als first-line Therapie gegenüber der Standardtherapie mit Glukokortikoiden bei klinisch manifester akuter GvHD im Bezug auf die Überlebensrate als signifikant nachteilig erwies (36).

Der Wirkstoff Denileukin difitox macht sich neben der Bindung an den IL-2-Rezeptor die zytotoxische Wirkung des Diphtherietoxins zunutze, welches über eine Internalisierung in die T-Zelle nach Bindung an den IL-2-Rezeptor zum Zelltod führt. Für Denileukin difitox konnten gute Ergebnisse in einer Phase-I-Studie gezeigt werden (37).

Bolanos-Maede et al. konnten in einer Phase-I-Studie mit Pentostatin zeigen, dass bei einer Dosierung von 0,5mg bis 3mg/m<sup>2</sup> täglich für 3 Tage bei 22 ausgewerteten Patienten eine komplette Ansprechrate bei 64% (14 Patienten) gegenüber einer fortschreitenden Symptomatik bei 13% (3 Patienten) lag (38). Pentostatin ist ein Nukleosidanalogen, das durch die Hemmung der Adenosindeaminase den ATP-Metabolismus von T-Zellen hemmt, so zu einer Akkumulation von dATP in der Zelle und letztendlich zur Apoptose führt.

Auch auf Mediatorebene bestehen Angriffspunkte zur Therapie der glukokortikoidresistenten akuten GvHD. So kann der pathogenetisch bedeutsame Mediator TNF- $\alpha$  durch ein chimeres Protein aus dem löslichen TNF- $\alpha$ -Rezeptor und Untereinheiten des Fc-Rezeptors gehemmt werden. Für dieses Molekül, Etanercept, in Kombination mit Daclizumab konnte bei Patienten mit einer therapierefraktären akuten GvHD eine Ansprechrate von 67% gezeigt werden. Die 2-Jahres-Überlebensrate betrug jedoch lediglich 13% (39). Die nicht selektive Hemmung des TNF- $\alpha$  betrifft alle TNF- $\alpha$ -positiven Zellen und führt somit zu

einem exorbitant hohen Anstieg an Infektionskrankheiten und dadurch bedingter hoher Mortalität.

Mycofenolat mofetil ist sowohl im Bereich der Prophylaxe als auch der Therapie der akuten und chronischen glucokortikoidresistenten GvHD wirksam. Als Wirkstoff in Form der Mycofenolsäure hemmt es die de novo Purin-Synthese und damit letztendlich auch den lymphozytären Zellzyklus. Ansprechraten von 42% stehen jedoch auch hier einer relativ geringen 2-Jahres-Überlebensrate von 16% gegenüber (37).

Am murinen Modell konnten Sun et al. den Einfluss von Bortezomib auf den Verlauf einer schweren akuten GvHD zeigen. Bei Bortezomib handelt es sich um ein Borsäuredipeptid, das die Proteasomen hemmt. Diese stehen als zentrale Enzyme für den nicht-lysosomalen intrazellulären Proteinabbau im Zuge des ATP-abhängigen Ubiquitin-Konjugat-Weges. Neben ihrer Rolle beim Abbau falsch gefalteter und kurzlebiger Proteine sind sie an der Regulation des Zellzyklus und der Infektabwehr beteiligt. So prozessieren Proteasomen Peptide für den MHC-I-Komplex, die zur Aktivierung auch von T-Zellen führen können (40). Neben seiner anti-Tumor-Aktivität und der Nutzung in der Therapie des multiplen Myeloms (MM) konnte gezeigt werden, dass Bortezomib im murinen Modell zum einen in vitro die Proliferation von alloreaktiven T-Zellen hemmt und eine selektive Apoptose einleitet. Zum anderen gelang der Nachweis, dass die Applikation von Bortezomib ab Tag 0 bis Tag +3 nach Transplantation und Beimengung einer T-Zell-Quelle (Milzzellen) bei schwerer akuter GvHD statistisch signifikant lebensverlängernd wirkte. Bei Inkaufnahme eines geringeren T-Zell-Engraftmens fand sich eine höhere Apoptoserate für alloreaktive T-Zellen und eine geringere Menge an TNF- $\alpha$  nach Applikation von Bortezomib. Bei Mäusen, die eine Tumorlast aufwiesen und lediglich mit Bortezomib in GvHD-wirksamer Dosierung behandelt wurden, zeigte sich keinerlei signifikante Verringerung der Tumorlast. Bei der Vergleichsgruppe, die eine Therapie in Form von Knochenmarktransplantation, T-Zellquelle und Bortezomib erhielt, zeigte sich, dass die Wahrscheinlichkeit, entweder am Tumor oder der akuten GvHD zu versterben, von der Zellzahl an applizierten T-Zellen abhing. Vor dem Hintergrund, dass die Therapie durch Knochenmarktransplantation ohne Applikation einer T-Zellquelle, jedoch mit

einer GvHD-wirksamen Dosierung von Bortezomib zu einer moderat erhöhten Überlebensrate führte, wurde eine Hemmung eines GvL-Effektes durch Bortezomib im murinen Modell ausgeschlossen (41).

Nach einer allogenen Stammzelltransplantation können Patienten, die an einer steroidrefraktären akuten GvHD Grad II bis VI erkrankt sind, von einer Therapie mit dem murinen CD3-Antikörper (OKT-3) in Kombination mit hochdosiertem Methylprednisolon profitieren. Die Kombination des Antikörpers mit hochdosiertem Steroid ist der alleinigen Behandlung mit hochdosiertem Steroid im Bezug auf die Ansprechrate nach 100 Tagen Behandlungsdauer sowie infektiöser Komplikationen und der Überlebensrate nach einem Jahr tendenziell überlegen (42).

**Tab.3: Wirkstoffe zur Prophylaxe und Therapie der aGvHD**

Medikament	Wirkmechanismus	Applikation	Eliminierung	Nebenwirkungen
Glukokortikoide	Supprimierung inflammatorischer Zytokine (TNF-alpha, IL-2)	frühzeitig nach Transplantation, bedarfsgerecht	vornehmlich hepatisch	Hyperglykämie, Osteoporose, Katarakt, Neuropathien, Myopathien
MTX	Antimetabolit, mögliche Hemmung von T-Zellen	vor Tag +14 in Kombination mit weiteren Immunsuppressiva	hepatisch und renal	reno-, hepato- und gastrotoxisch
CsA	IL-2-Suppressor, Hemmung der Ca <sup>++</sup> -abhängigen Signaltransduktion über den TCR	vor Transplantation in Kombination mit weiteren Immunsuppressiva bis d +90 bis d +180	hepatisch und renal	Leber- und Nierenversagen, Hypertonus, Hyperglykämie, Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, Gingivahyperplasie, Hirsutismus
FK506	IL-2-Suppressor, Hemmung der Ca <sup>++</sup> -abhängigen Signaltransduktion über den TCR	vor Transplantation in Kombination mit weiteren Immunsuppressiva (CsA)	vornehmlich hepatisch	Leber- und Nierenversagen, Hypertonus, Hyperglykämie, Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, Gingivahyperplasie, Hirsutismus
MMF	Inhibitor der de novo Purin-Synthese		hepatisch und renal	abdominelle Beschwerden, Übelkeit, Erbrechen, Diarrhoe, Neutropenie
ATG	polyklonales Immunglobulin gegen T-Zellen	als Prophylaxe im Rahmen der Konditionierung oder Therapie der aGvHD	HWZ (Plasma) 2-3 Tage	Anaphylaxie, Serum-Krankheit

**Abkürzungen: MTX=Methotrexat, CSA=Cyclosporin A, FK506=Tacrolimus, MMF=Mycofenolat mofetil, ATG=Antithymozytenglobulin, HWZ=Halbwertszeit**

### 1.3 Die chronische Graft-versus-Host Erkrankung

#### 1.3.1 Klinik

Die chronische GvHD stellt sich als ein kollagenoseähnliches Krankheitsbild dar. Die kumulative Inzidenz über drei Jahre nach peripherer allogener Stammzelltransplantation unter HLA-identischen Verwandten liegt bei bis zu 65% (43). Ob die Inzidenz nach peripherer allogener Stammzelltransplantation für die chronische GvHD höher liegt als nach konventioneller Stammzelltransplantation wird nach wie vor kontrovers diskutiert. Flowers et al. konnten in der kumulativen Inzidenz der chronischen GvHD in Form der *extensive disease* bei 63% (periphere allogene Stammzelltransplantation) vs. 52% (konventionelle Stammzelltransplantation) und  $p = 0,33$  keine signifikanten Unterschiede zeigen (44).

Das Auftreten einer GvHD einem festen zeitlichen Rahmen zuzuordnen erscheint problematisch. Der klassische Beginn der chronischen GvHD liegt um den Tag + 100. Die Manifestation der chronischen GvHD an der Haut lässt sich in zwei schon vom Aspekt her unterschiedliche Muster einteilen. Zum einen findet sich die lichenoide Form, die häufig im distalen Bereich der Extremitäten einsetzt. Es handelt sich hier um ein regionales Exanthem mit Papeln, das dem Bild des Ruber lichen planus ähnelt. In der Folge einer verminderten Schweißsekretion kann es zu Hauttrockenheit und Juckreiz kommen. Zum anderen findet sich die sklerodermatöse Form mit skleröser Dermis und atrophischer Epidermis sowie gelegentlich Dyspigmentierungen. Schwere Formen können mit Nageldystrophien, Alopezie und Hautulcerationen einhergehen.

Auch bei der chronischen GvHD ist der singuläre Befall der Leber ohne Mitbeteiligung der Haut eher selten. Klinische Symptome sind als Folge eines Befalls der kleinen Gallengänge eine intrahepatische Cholestase mit Ikterus und laborchemisch erhöhter alkalischer Phosphatase. Von der biliären Zirrhose ist eine Unterscheidung häufig nur durch eine Leberbiopsie gegeben.

Die klinischen Symptome einer sich gastrointestinal manifestierenden chronischen GvHD sind unspezifisch. So können Übelkeit, Erbrechen, ubiquitäre

abdominelle Beschwerden, Malabsorption und Gewichtsverlust bis zur Anorexie auftreten. Verglichen mit der akuten GvHD kann sich die chronische Form an einer größeren Anzahl von Organsystemen manifestieren. Die Mundhöhle, die Augen oder die Atemwege können in Form eines Sicca-Syndroms betroffen sein.

### 1.3.2 Die Klassifikation der chronischen GvHD

Eine Einteilung der chronischen GvHD kann nach verschiedenen Gesichtspunkten erfolgen. Nach dem Zeitpunkt des Auftretens werden vier Grade unterschieden. Die *progressive disease* geht aus einer akuten GvHD hervor und ist mit einer schlechten Prognose verbunden. Die *quiescent disease* tritt nach einer akuten GvHD und einem beschwerdefreien Intervall auf. Mit einer guten Prognose geht die *de novo disease* ohne vorangegangene akute GvHD einher. Als *explosive disease* wird eine kombinierte Form der akuten und chronischen GvHD mit Multiorganbefall bezeichnet, die mit einer äußerst schlechten Prognose einhergeht (45).

Nach dem Ausmaß der Erkrankung können eine *limited disease* von einer *extensive disease* unterschieden werden. Erstere zeichnet sich durch einen lokalen Hautbefall mit oder ohne Leberbefall aus und erfordert im Allgemeinen keinerlei therapeutische Maßnahmen. Bei der *extensive disease* liegt ein genereller Hautbefall oder ein lokaler Hautbefall in Kombination mit einem Augen-, Mund-, Leber- oder Befall des Gastrointestinaltraktes vor (46) (**Tab. 4**).

**Tab. 4: Seattle Klassifikation der cGvHD**

<b>Limited</b>	Lokalisierter Hautbefall und/oder
	Eingeschränkte Leberfunktion aufgrund cGvHD
<b>Extensive</b>	Generalisierter Hautbefall
	Lokalisierter Hautbefall und/oder eingeschränkte Leberfunktion aufgrund cGvHD mit
	- Positive Histologie: chronisch aggressive Hepatitis, Leberzirrhose und/oder
	- Augenbefall (Schirmer-Test < 5 mm) und/oder
	- Positive Histologie: Speicheldrüsen und/oder Mundschleimhaut und/oder
- sonstiger Organbefall	

Nach der Manifestationsform lässt sich der Hautbefall in ein lichenoides und ein sklerodermatöses Befallsmuster einteilen.

Eine weitere Klassifizierungsmöglichkeit mit Risikokategorien ergibt sich aus den drei Variablen *extensive disease* mit einem Hautbefall > 50% BSA, einer Thrombozytenzahl < 100.000/ $\mu$ l und *progressive disease* (47).

### 1.3.2 Diagnostik und Histologie

Auch die chronische GvHD ist im Wesentlichen in der Diagnosestellung auf den erfahrenen Untersucher angewiesen und somit auf die richtige Interpretation des klinischen Bildes. Der histopathologische Befund einer Haut-, Lippen-, oder Leberbiopsie kann richtungsweisend sein. Unspezifische Laborparameter wie die alkalische Phosphatase, die Transaminasen und Bilirubin können eine hepatische Komponente anzeigen. Ein positiver Schirmer-Test kann auf eine oculäre Symptomatik auch im Sinne eines Sicca-Syndroms hinweisen.

Die lichenoidale Form der chronischen GvHD zeichnet sich durch eine epidermale Hyperplasie mit lymphozytären bandförmigen Infiltrationen im Bereich der dermo-epidermalen *tight-junctions*, also der oberflächlichen Dermis aus. Die Infiltrate enthalten Makrophagen, Plasmazellen, vereinzelt eosinophile Granulozyten und apoptotische Keratinozyten. Die Ausdehnung reicht über die

tiefen Schichten der Dermis zuweilen bis in das subkutane Fettgewebe hinein. Als Folge des Zellunterganges in der Basalzell-Schicht können Melanophagen im stratum papillare auftreten.

Als wesentliches Kriterium der sklerodermatösen Form gelten Kollagenablagerungen zwischen dem stratum reticulare und der Subkutis. Es kommt zu einem Verlust der retikulären Strukturen mit einer Atrophie der darüber liegenden Epidermis. Auch die Hautanhangsgebilde sind von Atrophie und Fibrose betroffen. Ein charakteristisches Bild für die sklerodermatöse Form der chronischen GvHD bietet der Untergang von merokrinen Drüsen.

Eine frühe Manifestation der chronischen GvHD der Leber zeichnet sich durch eine Infiltration der Portalfelder mit Lymphozyten inklusive Plasmazellen sowie eine ausgeprägte Destruktion der interlobulären Gallengänge aus. Die Infiltration mit inflammatorischen Zellen ist in dieser frühen Phase häufig ausgeprägter als bei der hepatischen akuten GvHD. Im Spätstadium kommt es nun zu einer zunehmenden Fibrosierung mit fortschreitender Rarefizierung der Gallengänge. Im Gegensatz zur primären biliären Zirrhose mündet die chronische GvHD nur selten in ein Vollbild der Leberzirrhose.

Die histopathologischen Veränderungen im Bereich des Gastrointestinaltraktes sind unspezifisch. Neben einer Fibrosierung der Submucosa und Lymphozyten- und Plasmazellinfiltrationen der lamina propria sind Ulcerationen im Gegensatz zur akuten GvHD eher selten. Es finden sich weiterhin fokale Atrophien der Mucosa und vereinzelt apoptotische Zellen innerhalb des Kryptenepithels. Strikturen oder Stenosen in Folge eines fibrotischen Umbaus sind selten.

Im Zuge der Infiltration der Speichel- und Tränendrüsen durch Lymphozyten mit fortschreitender Fibrosierung kann es zur letztendlichen Destruktion der Drüse kommen, welches als Sicca-Syndrom bezeichnet wird.

Bei pulmonaler Manifestation der chronischen GvHD zeigt sich das histologische Bild einer Bronchiolitis obliterans mit den typischen fibrosierenden Granulationen, die das Lumen der Bronchioli erheblich verringern können (27).

### 1.3.3 Pathophysiologie

Die pathophysiologischen bzw. immunologischen Vorgänge, die der chronischen GvHD zugrunde liegen, sind heute noch weitgehend unklar. Einerseits wird der chronischen GvHD eine eigene Krankheitsentität abgesprochen, und sie wird als akute GvHD im Spät- oder Endstadium mit einem vermehrten Anteil an Th-2 Zellen angesehen (48). Ein weiterer Erklärungsansatz geht von der chronischen GvHD als Autoimmunerkrankung aus. Dabei spielt der Thymus als Ort der T-Zell-Konditionierung eine entscheidende Rolle. So kommt es nach Abwanderung von unreifen T-Vorläuferzellen aus dem Knochenmark in den Thymus dort zu einer Reifungsphase, an deren Ende ein Selektionsprozess gestellt ist. Zeigen T-Zellen eine vermehrte Affinität zu körpereigenen Peptiden, so wird der programmierte Zelltod (Apoptose) eingeleitet. Dieser Vorgang wird als negative Selektion bezeichnet. Positiv selektioniert werden diejenigen  $CD4^+$ - oder  $CD8^+$ -Zellen, die lediglich eine geringe oder keine Affinität gegenüber körpereigenen Peptiden zeigen. Diese Zellen siedeln sich in den peripheren lymphatischen Organen an. Anhand ihres Cytokinmusters lassen sich  $CD4^+$ -Zellen in Th1-Zellen (IL-2, IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ ) und Th2-Zellen (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) unterteilen. An der Induktion der zellulären Immunantwort sind Th1-Zellen beteiligt, wohingegen an der Induktion der humoralen Abwehr Th2-Zellen beteiligt sind (49). Durch eine Schädigung des Thymus kommt es zu einer insuffizienten negativen Selektion von autoreaktiven  $CD4^+$ -T-Zellen, die insbesondere in Form von Th2-Zellen wiederum B-Zellen zur Synthese von Autoantikörpern stimulieren könnten (50).

Im Tierversuch erfolgte die Induktion einer Graft-versus-Host-ähnlichen Symptomatik bei weiblichen Lewis Ratten (RT1). Nach myeloablativer Bestrahlung wurde den Tieren Knochenmark von weiblichen ACI (RT1a) Ratten übertragen. Nach 6 und 12 Monaten konnten bei den Tieren Symptome wie Haarausfall, eine Veränderung im Hautfaltenrelief, Sjögren-Syndrom, chronische Hepatitis, ein Anstieg der anti-nucleären Antikörper (ANA) und Dacryosialodinitis beobachtet werden (51). Am gleichen Modell fanden sich Hinweise auf eine geminderte Immunkompetenz der Tiere im Bezug auf die

zelluläre und humorale Immunantwort, die möglicherweise auf einem Thymus-Defekt beruhen könnte (52).

An einem anderen Modell mit Hybriden der Maus (immunkompetent, CS7BL/6XDBA/2, F1 Hybrid {H2b/d}) wurde durch parenterale Applikation von Nierenzellen eines homozygoten Stammes (DBA/2 {H2d}) eine lupusähnliche chronische GvHD induziert (53). Es zeigten sich neben erhöhten Antikörperspiegeln und einer B-Zell-Hyperreagibilität verminderte IL-2 und IFN- $\gamma$ -Spiegel, die als eine inadäquate Th1-Zell-Antwort und damit einhergehende gesteigerte Aktivität von B-Zellen interpretiert wurden (54, 55). Am gleichen Modell konnten Rus et al. zeigen, dass eine gesteigerte Aktivität von Th2-Zellen bei supprimierter Aktivität von CD8<sup>+</sup>-zytotoxischen-T-Zellen des Spenderorganismus eine gesteigerte B-Zell-Aktivität zur Folge hat, die in Form von autoreaktiven B-Zellen zu einem Autoimmunmechanismus führen kann (56). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass eine geringe Aktivität von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zu einer verminderten Elimination von autoreaktiven B-Zellen führen kann (57).

Da mehrere Zellpopulationen - bestehend aus T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen, NK-Zellen und APC - von entscheidender Bedeutung für die Entstehung einer chronischen GvHD sind, ist gleichermaßen auf die Bedeutung von Zytokinen hinzuweisen (58). So führten im Tierversuch sowohl TGF- $\beta$ 1 als auch MCP-1 und das Zytokin *regulated-on-activation-normal-t-expressed-and-secreted* (RANTES) zu einer überschießenden Kollagensynthese im Bereich der Dermis, die einer sklerodermatösen chronischen GvHD ähnlich war (59, 60). Auch unter dem Aspekt alternativer Therapieformen ist die Rolle des von Makrophagen, Osteoklasten, Osteoblasten, Kupferzellen und Keratinozyten synthetisierten IL-18 von Interesse. Im Tierversuch konnte die Ausbildung einer chronischen GvHD durch Applikation von IL-18 verhindert werden (61).

### 1.3.4 Therapie der chronischen GvHD

Die Therapie der chronischen GvHD hängt neben einem suffizienten medikamentösen Therapieprotokoll aufgrund des Multiorganbefalles auch von einer engen multidisziplinären medizinischen Betreuung ab.

Als Therapie der ersten Wahl hat sich die Kombination Prednisolon und Cyclosporin A bewährt. Für Patienten mit *extensive disease* in Verbindung mit einer Thrombozytopenie sind alternierende Therapieschemata mit einer besseren Prognose und geringeren glucokortikoidbedingten Nebenwirkungen verbunden. Hier werden Prednisolon und Cyclosporin-A im täglichen Wechsel gegeben. Dabei wird Prednisolon initial in einer Dosierung von 1 mg/kg KG verabreicht. Bei Cyclosporin A empfiehlt sich eine Dosierung von 6 mg/kg KG, aufgeteilt in zwei Tagesdosen (62, 63).

In einer retrospektiven Analyse untersuchten Stewart et al. die Dauer der immunsuppressiven Behandlung bei 751 Patienten mit maligner hämatologischer Grunderkrankung. Bei 30% der Patienten lag mindestens ein *mismatch* vor und ca. 50% hatten nicht verwandte Spender. Das *follow-up* lag bei 7 Jahren. Die kumulative Inzidenz für Patienten mit abgeklungener chronischer GvHD und daraufhin eingestellter Glukokortikoidtherapie lag bei 50%. Für 274 Patienten ohne Rezidiv der malignen Grunderkrankung dauerte die Therapie mit Glukokortikoiden im Mittel 23 Monate. Die geschätzte Überlebensrate nach 7 Jahren lag bei 47% (64).

Ein große therapeutische Herausforderung stellt nach wie vor die steroidrefraktäre chronische GvHD nach allogener Stammzelltransplantation dar. Ist innerhalb eines Monats kein oder nur ein unbefriedigendes Therapieergebnis unter Steroidgabe zu verzeichnen oder nimmt das Ausmaß der Erkrankung sogar zu, ist auf eine Therapie der zweiten Wahl zurückzugreifen. Etablierte Therapieprotokolle liegen noch nicht vor. Es existieren jedoch vielversprechende Studien, die unterschiedliche Wirkstoffe, Wirkstoffkombinationen und Verfahrensweisen aufzeigen. Couriel et al. konnten in einer Phase-II Studie die Wirksamkeit von Sirolimus in Kombination mit Tacrolimus und Prednisolon insbesondere bei der sklerodermatösen Form der chronischen GvHD nachweisen (65). Bei Sirolimus handelt es sich um ein Antibiotikum aus der Makrolid-

Gruppe, das eine gute immunsuppressive und antimykotische sowie eine antitumoröse Wirkung besitzt. Strukturverwandt mit Tacrolimus hemmt Sirolimus jedoch nicht die Zytokinproduktion, sondern es erfolgt über Bindung an das Fc-Bindungsprotein eine Hemmung der eigentlichen Zytokin-Antwort im Sinne einer IL-2 vermittelten T-Zell-Proliferation. So wird der Zellzyklus in der Phase G1 arretiert (66).

Auf der Suche nach Wirkstoffen mit immunsuppressiven Eigenschaften hat man das wegen teratogener Nebenwirkungen vom Markt genommene Thalidomid wiederentdeckt. War eine immunsuppressive Eigenschaft bereits in den 60er Jahren bekannt, fand das ursprünglich als Schlafmittel eingesetzte Sedativum Thalidomid erstmals Ende der 80er Jahre wieder Eingang in die Therapie des Erythema nodosum leprosum (67, 68). Auch in der onkologischen Therapie gewinnt Thalidomid an Bedeutung – insbesondere bei der Therapie des Multiplen Myeloms, wobei eine Wirksamkeit hier mutmaßlich angiogenesehemmenden Eigenschaften zugeschrieben wird (69).

Der autoimmunmodulatorische Mechanismus von Thalidomid ist jedoch noch unklar. Es zeigten sich inhibitorische Eigenschaften im bezug auf bestimmte Chemokine und Zytokine, wie z. B. TGF- $\beta$  und TNF- $\alpha$ . Weiterhin konnte ein Einfluss auf die leukozytäre Chemotaxis und die IgM-Produktion von B-Zellen nachgewiesen werden. Bei freiwilligen Probanden konnte nach Einnahme von Thalidomid eine IL-2 vermittelte Verschiebung der CD4/CD8-Relation zu Gunsten der CD8<sup>+</sup>-Zellen ermittelt werden, die mit einer vermehrten Produktion von IFN- $\gamma$  und Aktivierung von CTL durch APC einherging (70, 71, 72).

Vielversprechende Ergebnisse aus dem Tierversuch, die unter anderem eine Dosis-Wirkungsbeziehung aufzeigten, konnten in klinischen Phase-II-Studien nicht ganz so einheitlich reproduziert werden. So finden sich bei einem Patientengut mit steroidrefraktärer chronischer GvHD und Thalidomid als Therapie der zweiten Wahl Ansprechraten zwischen 20%-80%. Problematisch sind die Nebenwirkungen von Thalidomid, die zu einer hohen Rate an Studienabbrüchen führten. Neben einer ausgeprägten sedierenden Wirkung wurden Polyneuropathien, Obstipation, Hautreaktionen und Neutropenien beschrieben. Die im Tierversuch beschriebene Dosiswirkungsbeziehung ließ sich zudem nicht signifikant reproduzieren (73, 74, 75, 76).

Gute Behandlungserfolge durch extrakorporale Photopherese (ECP) als Therapie der zweiten Wahl, insbesondere der sklerodermatösen Form der chronischen GvHD, konnten Sniecinski et al. vorweisen. Es zeigten sich neben einem stark gebesserten Hautbefund auch eine Wirksamkeit bei gastrointestinaler Manifestation (77). Der ECP wird ein Einfluss sowohl auf die an dem Pathomechanismus der chronischen GvHD beteiligten Zellen, wie zytotoxische T-Zellen, Monocyten, dendritische Zellen, aber auch auf die Zytokinproduktion zugesprochen. So konnten neben einer Normalisierung der Th2-Zell-Zahl als Langzeiteffekt ein Anstieg der CD3<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup>-NK-Zellen und einem erhöhten Serumspiegel von CTG- $\beta$  auch eine Abnahme dendritischer Zellen (CD80<sup>+</sup> und CD123<sup>+</sup>) und damit der Alloantigenpräsentation festgestellt werden (78, 79). Bei isoliertem Hautbefall fanden sich Hinweise auf die Wirksamkeit von A1-UV-Licht nach Konditionierung mit 8-Methoxypsoralen (80).

Es finden sich Hinweise, dass auch der Anti-CD20-Antikörper Rituximab eine effektive Therapie der steroidresistenten chronischen GvHD sein kann. Rituximab war der erste Antikörper, der 1997 von der FDA zur Behandlung von non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) freigegeben wurde. Es handelt sich um einen monoklonalen Antikörper, der aus einem humanen Gamma-1-kappa-Antikörper besteht, dessen variable Regionen von einem murinen Anti-CD20-Antikörper stammen. Somit handelt es sich um einen chimären Antikörper, der gegen das Oberflächenprotein CD20 gerichtet ist, das sich ausschließlich auf Zellen der B-Zellreihe und hier auf Prä-B-Zellen und reiferen B-Zellen findet. Auf Antikörper produzierenden Plasmazellen ist CD 20 nicht exprimiert (81). Die Funktion von CD20 bleibt bis heute unklar. Es finden sich jedoch Hinweise, dass das Protein eine Rolle bei der Regulierung von Calcium gesteuerten transmembranen Kanälen spielt, die wiederum Einfluss auf den Zellzyklus haben (82).

Die Einführung von Rituximab gilt heute als Meilenstein in der modernen Therapie von NHL, also malignen hämatologischen Erkrankungen, denen eine autonome Proliferation von B-Lymphozyten zugrunde liegt (83, 84). So steht eine weitere Therapiekomponente für die folliculären Lymphome, die aggressiven Lymphome, die B-CLL, das Mantelzell-Lymphom und den M. Waldenström zur Verfügung. Auch in der Therapie nicht maligner Erkrankungen wie der ITP oder

Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis spielt Rituximab heute eine wichtige Rolle (85).

Der Wirkmechanismus von Rituximab, über den es zu einem Abbau maligner Zellen kommt, ist nach wie vor nicht vollständig geklärt. Zwei Komponenten können jedoch unterschieden werden: Über die antikörperabhängige zellvermittelte Cytotoxizität (ADCC) findet eine Aktivierung von Effektorzellen über die Bindung von FcR an die Fc-Einheit des monoklonalen Antikörpers statt, wobei es sich bei den entsprechenden Effektorzellen um NK-Zellen oder cytotoxische T-Zellen (CTL) handeln kann (86). Als zweite, jedoch schwächere Komponente wird die komplementabhängige Cytolyse (CDC) beschrieben. Ein weiterer positiver Aspekt: Es finden sich Hinweise, dass die Therapie mit Rituximab sensibilisierende Wirkung auf Tumorzellen gegenüber einer Chemotherapie hat und somit die Wirksamkeit von Chemotherapeutika augmentieren kann (87). Über die Therapie einer malignen Grunderkrankung hinaus fanden sich ebenfalls Hinweise einer Wirksamkeit von Rituximab bei Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis (RA) oder dem systemischen Lupus erythematodes (SLE) (88).

In einer retrospektiv angelegten Fallanalyse [n=8] von an steroidrefraktärer chronischer GvHD erkrankten Patienten konnten Ratanatharathorn et al. bei 4 Patienten ein klinisches Ansprechen vermerken (89). Die gleiche Gruppe konnte an einem singulären Fall von immunvermittelter Thrombozytopenie bei einem Patienten mit chronischer GvHD durch wöchentliche Gabe von 375 mg/m<sup>2</sup> über vier Wochen einen Rückgang der B-Zellen (CD19+) und damit einhergehend sich normalisierende Thrombozytenzahlen sowie eine rückläufige Symptomatik der chronischer GvHD ermitteln (90). In einer prospektiv geführten Untersuchung [n=20] unter Patienten mit steroidrefraktärer chronischer GvHD konnte bei 7 Patienten nach 16 Monaten eine klinische Besserung der Symptomatik festgestellt werden. Bei 6 Patienten konnte kein Ansprechen auf die Rituximab-Therapie festgestellt werden und weitere 3 Patienten litten unter einer progressiven Symptomatik. Bei 68% der Patienten konnte eine mindestens 50%ige Reduktion der steroidalen Begleittherapie erfolgen, und die besten Ergebnisse waren bei Patienten mit kutanem oder muskuloskeletalem Befall zu verzeichnen (91).

Es mehren sich die Hinweise, dass eine Therapie mit Rituximab Neutropenien verursachen kann und im autologen Setting ein Einfluss auf das Engraftment bestehen kann. Hierbei kann es sich um late-onset Neutropenien handeln, die nach abgeschlossenem Engraftment auftreten und in einen Zusammenhang mit einer vorangegangenen Rituximab-Therapie gebracht werden können. Über schwere Neutropenien wurde im Zusammenhang der Therapie von Non-Hodgkin-Lymphomen und der CLL berichtet (92). Chaiwatanatorn et al. untersuchten die late-onset Neutropenie bei mit Rituximab therapierten Patienten, welche an Non-Hodgkin-Lymphomen erkrankt waren. Als late-onset wurde eine Neutropenie bezeichnet, welche vier Wochen nach abgeschlossenem Engraftment auftrat. Von 53 Patienten entwickelten 8 Patienten eine late-onset Neutropenie. Diese stellte sich im Median von 4 Monaten nach letzter Rituximabtherapie ein (93). Bei Non-Hodgkin-Patienten, welche innerhalb von 6 Monaten vor einer autologen peripheren Stammzelltransplantation Rituximab erhalten hatten, fanden sich signifikant längere Intervalle des neutrophilen Engraftments als bei einer Vergleichsgruppe ohne Rituximabtherapie (94). Auch die Therapie mit Rituximab nach einer autologen peripheren Stammzelltransplantation kann mit schweren neutropenen Phasen und late-onset Neutropenien einhergehen (95, 96).

### 1.4 Risikofaktoren der Graft-versus-Host Erkrankung

Der wichtigste Risikofaktor für eine akute GvHD ist das Ausmaß der HLA-Disparität zwischen Spender und Empfänger. Dabei sind nicht nur Disparitäten in bezug auf den MHC sondern auch auf den *minor-histocompatibility-complex* (mHC) von Bedeutung (97). Auch die Transplantationsmethode kann die Wahrscheinlichkeit eines Auftretens einer akuten GvHD beeinflussen. So finden sich zumindest in einer Metaanalyse Hinweise, dass die periphere Stammzelltransplantation gegenüber der konventionellen Knochenmarktransplantation mit einem höheren Risiko für eine akute und chronische GvHD behaftet ist (98). Myeloablative Konditionierungsregime mit Chemotherapie und TBI sind ebenfalls mit einem erhöhten Risiko verbunden (99). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die Menge an transplantierten CD34<sup>+</sup>-Zellen Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit hat, an einer akuten GvHD zu erkranken; eine hohe Anzahl an transplantierten CD34<sup>+</sup>-Zellen korreliert mit einem höheren Risiko für eine akute GvHD (100). Eine weitere Risikokonstellation ist ein weiblicher Spender mit mehrfacher Gravidität in der Anamnese für einen männlicher Empfänger (101). Die T-Zell-Zahl im Graft spielt eine wichtige Rolle. Sie beeinflusst sowohl den GvL-Effekt als auch das Risiko an einer akuten GvHD zu erkranken proportional (102).

Trotz intensiver therapeutischer Bemühungen bleibt die Inzidenz der chronischen GvHD nach peripherer Stammzelltransplantation in Abhängigkeit von bestimmten Risikofaktoren hoch. Auch bei der chronischen GvHD kann ein Grund ein zunehmendes Durchschnittsalter des Empfängerpools sein, da das relative Risiko, an chronischer GvHD zu erkranken, mit dem Alter des Empfängers zunimmt (103, 104). In jedem Fall jedoch spielen auch bei der chronischen GvHD die HLA-Disparitäten die wichtigste Rolle (97). Eine vorausgegangene akute GvHD Grad II-IV erhöht das Risiko einer chronischen GvHD. Wie auch bei der akuten GvHD geht die Konstellation weiblicher Spender für männlichen Empfänger und die periphere Stammzelltransplantation mit zu hohen CD34<sup>+</sup>-Zellzahlen mit einem erhöhten Risiko für ein Auftreten der chronischen GvHD einher. Weiterhin sind Prozeduren wie die Donor-Lymphozyten-Transfusion (DLI) mit einem erhöhten

Risiko behaftet (105, 100). Kontrovers diskutiert werden nach wie vor Risikofaktoren wie die CMV-Seropositivität oder -Reaktivierung des Empfängers, eine Splenektomie, ethnische Unterschiede basierend auf HLA-Disparitäten zwischen Spender und Empfänger und die über die Transplantation hinausreichende Stimulierung mit Wachstumsfaktoren (106, 107).

### 1.5 Komplikationen der Graft-versus-Host Erkrankung

Die Manifestation der GvHD an Haut- und Schleimhaut führt zu einer Beeinträchtigung einer wichtigen immunologischen Barriere zwischen Umwelt und Organismus. Insbesondere vor dem Hintergrund, dass Haut- und Schleimhäute zum Zeitpunkt der Transplantation bereits starken Noxen im Verlauf der Konditionierung ausgesetzt waren und in Folge der Immunsuppression können auch Keime der physiologischen Haut- und Darmflora schwerste septische Krankheitsbilder hervorrufen. Auch resorptive Funktionen der enteralen Schleimhaut sind gestört, sodass in der Folge schwere Diarrhöen mit Malabsorptionssyndromen auftreten können.

Da sich ein effektives Immunsystem erst nach ein bis zwei Jahren nach Transplantation entwickelt hat wirkt die GvHD bei Neutropenie als weiterer schwächender Faktor. In der frühen Post-Transplantationsphase bis Tag +30 stehen vor allem Infektionen durch grampositive Erreger, Respiratorische- und Enteroviren sowie invasive Pilzkrankungen im Vordergrund. Infektiöse Komplikationen in der frühen Posttransplantationsphase im Bereich der Lunge treten bei bis zu 10% der Patienten nach allogener Knochenmarktransplantation als durch *Aspergillus Species* verursachte Pneumonien auf. Neben dem nicht abgeschlossenen Engraftment können hohe Einstiegsdosierungen einer GvHD-Therapie in Form von Glukokortikoiden für eine prolongierte Immunsupprimierung mitverantwortlich sein. Bakterielle Pneumonien treten in dieser Phase häufig auf (108). Fataler und therapeutisch schwer beherrschbar sind invasive und generalisierte Pilzinfektionen, die septische Verläufe nehmen können (109).

Die Graft-versus-Host Erkrankung der Leber ist differentialdiagnostisch von einer *veno-occlusive disease* (VOD) zu unterscheiden (110). Durch Schädigung des sinusoidalen Epithels kommt es zu einem fibrotischen Umbau vor allem der venösen intrahepatischen Strombahn, der zum Gefäßverschluss und damit zu einem Anstieg des hepatischen Strömungswiderstandes führt. Im Zuge der VOD kann es zum Multiorganversagen kommen.

In der mittleren und späten Posttransplantationsphase ab Tag +30 sind die akute und chronische Graft-versus-Host Erkrankung und insbesondere deren Therapie

als weitere immunkompromittierende Faktoren anzusehen. Gefürchtete Komplikationen sind invasive Pilzinfektionen wie die angioinvasive Aspergillose und virale Infektionen. In Abhängigkeit vom Serostatus des Empfängers und des Spenders kann es zu CMV-Reaktivierungen kommen. Dabei gelten Progenitorzellen als latentes Erregerreservoir, sodass nur in wenigen Fällen eine tatsächliche Neuinfektion des Patienten vorliegt. Vielmehr begünstigt die Immunkompromittierung eine Reaktivierung. Häufig treten CMV-Reaktivierungen in Form einer Myelosuppression auf. Die durch CMV verursachte Pneumonie ist Dank neuerer antiviraler Wirkstoffe seltener geworden. Enright et al. konnten 1993 noch bei 15% der Patienten in dieser Phase eine durch CMV verursachte Pneumonie feststellen (111). Selten kann sich eine CMV-Reaktivierungen als Gasroenteritis manifestieren.

In der späten Posttransplantationsphase spielen neben den genannten Erregern Adeno-, Varicella-, RS- und Parainfluenzaviren eine Rolle. Für die nicht infektiösen pulmonalen Komplikationen wie Bronchiolitis obliterans, Lungenfibrose und Idiopathische Pneumonie auch zusammengefasst unter dem Begriff LONIPC, ist der herausragende Risikofaktor die im Ausprägungsgrad als *extensive* einzustufende chronische GvHD. In Verbindung mit einer LONIPC liegt die Sterblichkeitsrate bei 50% (112).

### 1.6 Der Graft-versus-Leukämie Effekt

Der GvL-Effekt stellt eine immunvermittelte Reaktion insbesondere nach allogener Transplantation dar, die zu einer Dezimierung leukämischer Zellen im Empfängerorganismus führt. Einiges weist daraufhin, dass der Immunmechanismus in engem Zusammenhang zur GvHD steht; von einigen Autoren wird er jedoch heute als eigenständiger Vorgang betrachtet. So fanden sich bei syngenetisch transplantierten Patienten, welche nicht an GvHD erkrankt waren, eine höhere Rezidivrate als bei Patienten, welche an einer GvHD erkrankt waren (113). Hierbei ist der Ausprägungsgrad der GvHD von Bedeutung, da eine höhergradige GvHD mit schweren Komplikationen verbunden ist. Erhöhte Rezidivraten nach T-Zell-Depletion und das Erreichen einer Remission durch DLI legen eine zentrale Rolle von Spender-T-Lymphozyten bei der Entwicklung eines GvL-Effektes nahe.

Für die CML konnte der effektivste GvL-Effekt nach DLI für die zytogenetisch oder molekular nachweisbare Erkrankung gezeigt werden. Eine komplette Remission trat bei 80% der Patienten mit zytogenetisch nachweisbarem Rezidiv ein. Für Patienten mit hämatologisch manifestem Rezidiv lag die Remissionsrate bei 77% und bei Patienten mit CML in der Transformationsphase bei 36% .

Unter Patienten mit AML oder dem myelodysplastischen Syndrom, die entweder keine Chemotherapie erhalten hatten oder als Non-Responder eingestuft wurden fand sich eine komplette Remission bei 26% der Patienten. Geringere Ansprechraten gelten für Patienten mit ALL. Die 2-Jahres-Überlebensrate nach konsolidierender Therapie oder Rezidivbehandlung durch DLI betrug 13%. Gute initiale Remissionsraten von 52% konnten für das Multiple Myelom ermittelt werden. Diese waren jedoch nur von kurzer Dauer (114). Horowitz et al. untersuchten durch eine Analyse von 2254 Patienten nach allogener Knochenmarktransplantation den Zusammenhang zwischen T-Zell-Depletion, der GvHD und dem relativen Risiko für ein Rezidiv. Es wurden Patienten mit ALL in der 1. Remission, Patienten mit AML in der 1. Remission und Patienten, die an CML in der chronischen Phase erkrankt waren ausgewertet. Einschlusskriterien waren weiterhin eine Transplantation zwischen HLA-identischen Verwandten

oder zwischen syngenetischen Zwillingen sowie depletiertes und nicht depletiertes Knochenmark. Für eine Referenzgruppe, die eine allogene Knochenmarktransplantation ohne T-Zell-Depletion erhalten hatte und weder an akuter noch an chronischer GvHD erkrankt war ergab sich eine 3-Jahres-Rezidiv-Wahrscheinlichkeit von 25%. Bei fünf Vergleichsgruppen, die jeweils entweder ausschließlich an akuter GvHD, an chronischer GvHD, aus syngenen Zwillingen bestehend oder T-Zell-depletiertes Knochenmark erhalten hatten, ergab sich die höchste 3-Jahres-Rezidiv-Wahrscheinlichkeit für syngene Zwillinge (46%). Das relative Risiko für ein Rezidiv lag im Vergleich mit der Referenzgruppe bei Patienten, die sowohl an akuter als auch an chronischer GvHD erkrankten mit 0,33 ( $p=0.0001$ ) am niedrigsten. Des Weiteren konnte die Gruppe eine umgekehrt proportionale Beziehung zwischen klinischem Ausprägungsgrad der GvHD und dem relativen Risiko für ein Rezidiv zeigen. Zudem ergab sich für CML-Patienten, die depletiertes Knochenmark erhalten hatten und an einer GvHD erkrankt waren ein höheres relatives Risiko für ein Rezidiv (4,45,  $p=0,003$ ) als für die Referenzgruppe. Damit konnte ein antileukämischer Effekt gezeigt werden, der sowohl in enger Korrelation zur GvHD zum anderen jedoch auch unabhängig von der GvHD auftritt (115, 116).

Insbesondere für die Behandlung maligner Erkrankungen des hämatopoetischen Systems wäre nicht nur der Nachweis, dass es sich beim GvL-Effekt um einen von der GvHD abzugrenzenden Vorgang handelt, sondern auch seine mögliche Beeinflussbarkeit oder Augmentation von großer Bedeutung. Kann schon die DLI an sich als direkte Einflussnahme auf den GvL-Effekt verstanden werden, so finden sich weitere Hinweise, dass die Anzahl der *mismatches* zwischen Spender und Empfänger, aber auch die zugrundeliegende maligne Erkrankung Einfluss auf die Ausprägung des GvL-Effektes haben können.

Eine wichtige Rolle im Verlauf des GvL-Effektes spielen  $CD4^+$  und  $CD8^+$ -T-Zellen, aber auch NK-Zellen wird einige Bedeutung bei der Eliminierung von leukämischen Zellen beigemessen. Die Aktivierung von  $CD4^+$ -T-Zellen und  $CD8^+$ -T-Zellen kann direkt über ein mHag, das jeweils entweder über MHC-I oder über MHC-II präsentiert wird geschehen. Bei einem mHag handelt es sich um endogene Peptide, die nach proteosomaler Prozessierung aufgrund des genetischen Polymorphismus über den TCR von Donor-T-Zellen erkannt werden.

Für den GvL-Effekt können nun mHag verantwortlich sein, die entweder tumorzellspezifisch oder auf allen hämatopoetischen Zellen auftreten. Naheliegend ist weiterhin, dass die mHag ubiquitär, also auch auf Endothelzellen auftreten und damit Ursache der GvHD sein können. Eine bestimmte Klasse der mHag sind ausschließlich auf dem Y-Chromosom lokalisiert und werden als H-Y Antigene bezeichnet. Das UTY-Epitop wird zu diesen H-Y Antigenen gerechnet und liegt bei leukämischen Lymphoblasten überexprimiert vor. Diese Überexprimierung führt zu einer schwachen selektiven T-Zell-Antwort im Sinne einer GvL-Reaktion. In vitro ist es gelungen, durch retroviralen Transfer des entsprechenden TCR auf T-Zellen einen GvL-Effekt zu augmentieren (117). Unabhängig von mHag konnte auch für WT-1 und Prokinase-3 eine Überexprimierung in leukämischen Zellen und die Einleitung einer T-zellgesteuerten GvL-Reaktion gezeigt werden. Weitere Möglichkeiten einer Triggerung der GvL-Reaktion können durch die virale Infektion einer Zelle (EBV-Infektion), chromosomalen Mutation in Form von Deletion oder Translokation erfolgen (118).

Die Eliminierung von Tumorzellen kann nun durch  $CD4^+$ -T-Zellen, durch  $CD8^+$ -T-Zellen, durch CTL des Spenders selbst oder auch durch aktivierte NK-Zellen des Spenders erfolgen. Eine wesentliche Rolle spielt hier die Apoptose, die über unterschiedliche Mechanismen eingeleitet werden kann. T-Zellen und NK-Zellen können über TNF gesteuerte Rezeptoren den programmierten Zelltod einleiten. Dabei handelt es sich um transmembrane Proteine wie Fas/FasL oder TRAIL/TRAIL-R. Durch Exozytose kann Perforin/Granzym in den interzellulärraum abgegeben werden. Galt Perforin lange Zeit als "Wegbereiter" für Granzym, kann im murinen Modell Perforin unabhängige Aktivität von Granzym gezeigt werden. So gelangt Granzym nach Bindung an den MPL-Rezeptor durch Endozytose in den Intrazellulärraum der Zielzelle (119). Speziell NK-Zellen werden über eine verminderte Expression von MHC-I auf Tumorzellen aktiviert und könnten so in gewisser Hinsicht eine verminderte Antigen-Präsentation gegenüber  $CD8^+$ -T-Zellen kompensieren. Die Aktivierung von NK-Zellen auf diesem Wege geschieht über eine fehlende Besetzung von KIR, die als Liganden MHC-I-Moleküle haben. Somit trägt der GvL-Effekt zur Verringerung der Tumorlast bei und wird im Zuge der RIC genutzt.

### 1.7 Fragestellung

Die vorliegende Arbeit untersucht den Einfluss einer Rituximab-Therapie vor einer Transplantation auf die Ergebnisse nach allogener peripherer Stammzelltransplantation. Dabei wurde der retrospektive Vergleich zweier Patientengruppen gewählt, von denen eine nicht mit dem Anti-CD20-Antikörper vorbehandelt worden war. Folgende Fragestellungen stehen im Vordergrund:

- Kann eine Therapie mit Rituximab vor einer allogenen Stammzelltransplantation das leukozytäre oder thrombozytäre Engraftment beeinflussen?
- Beeinflusst die Therapie mit Rituximab vor einer allogenen Stammzelltransplantation die Inzidenz oder die Ausprägung der akuten oder chronischen GvHD?
- Beeinflusst eine Therapie mit Rituximab vor einer allogenen Stammzelltransplantation das ereignisfreie Intervall und das Gesamtüberleben nach allogener Stammzelltransplantation?

## 2. Patienten und Methoden

### 2.1 Patienten

In einem Zeitraum zwischen April 1999 und Dezember 2005 wurden 32 Patienten mit einer B-Zell-Neoplasie und 2 Patienten mit einem T-Zell-Lymphom mit einer allogenen peripheren Stammzelltransplantation behandelt. Die Daten von 27 männlichen (79,4%) und 7 weiblichen (20,6%) Patienten konnten ausgewertet werden. Das Alter der Patienten lag zum Zeitpunkt der allogenen Transplantation bei 46 Jahren (Median). Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose lag das Alter der Männer bei 44,3 Jahren (Median, Intervall 23-65) und das der Frauen bei 47,7 Jahren (Median, Intervall 41-53).

Bei 17 der 34 Patienten (49%) lag ein Non-Hodgin-Lymphom als eine refraktäre Erkrankung oder als Rezidiv vor. Davon waren 3 Patienten an einem Mantelzell-Lymphom erkrankt. An einer ALL waren 8 Patienten (23,5%) erkrankt. Bei 3 von 8 Patienten mit ALL konnte das Philadelphia-Chromosom nachgewiesen werden. An einer therapierefraktären CLL waren 6 Patienten (17,7%) erkrankt. Bei 2 Patienten (5,9%) lag ein multiples Myelom vor. Ein 56-jähriger Patient (2,9%) litt an einer Haarzell-Leukämie.

Von den NHL-Patienten wurden 9 Fälle als *high-grade* B-Zell Lymphome, 3 Fälle als indolente B-Zell Lymphome und 2 Fälle als *high-grade* T-Zell Lymphome klassifiziert. Zum Zeitpunkt der allogenen Transplantation befanden sich 5 Patienten (14,7%) in der 1. kompletten Remission (CR), 9 Patienten (26,5%) in der 2. CR und 2 Patienten in der 3. oder einer höheren kompletten Remission. In 1. bis 3. partieller Remission (PR) befanden sich 13 Patienten (38,2%) und bei 5 Patienten (14,7%) konnte ein Rezidiv oder eine in Progression befindliche Erkrankung (PD) festgestellt werden. Die Gesamtgruppe war im Median mit 7 Zyklen Chemotherapie (Intervall 2-37) nach 3 unterschiedlichen Protokollen (Median, Intervall 1-10) vorbehandelt worden.

Bei 12 Patienten (35,3%) fand sich in der Anamnese eine Vorbehandlung in Form einer myoablative Chemotherapie. Daraufhin erfolgte bei 9 Patienten eine autologe und bei 3 Patienten eine allogene Transplantation.

Für alle in die Untersuchung eingeschlossene Patienten bestand ein hohes Risiko für ein Rezidiv und ein kurativer Ansatz durch konventionelle Chemotherapie oder durch eine autologe Transplantation bestand nicht.

### 2.2 Auswertung

Die Datenerhebung erfolgte als retrospektive Auswertung der klinischen Dokumentation in Form von standardisierten Untersuchungsbögen der ambulanten Nachsorge und Auswertung von Krankenakten über stationäre Aufenthalte. Desweiteren wurden Begleitpapiere des Transplantates ausgewertet.

<b>Stammdaten</b>	Geschlecht Patient
	Alter Patient
	Grunderkrankung
	Datum der Erstdiagnose
	CMV-Status Patient
	Geschlecht Spender
	CMV-Status Spender
	Verwandtschaftsgrad zwischen Spender und Empfänger
	Ggf. Zweit-Transplantation
	Follow-Up
	Ggf. Todesursache
	Ggf. Datum des Todes

**Tab. 5: Stammdaten I**

Die Art der Konditionierung wurde auch im Hinblick auf eine RIC erfasst. Aufgenommen wurden die Anzahl aus der Anamnese eruierbarer Vorbehandlungsregime nebst Anzahl der Zyklen sowie die Art der Konditionierung vor der allogenen Transplantation.

<b>Vorbehandlung/Konditionierung</b>	Anzahl Regime Vorbehandlung
	Anzahl Zyklen Vorbehandlung
	Art der Konditionierung
	ATG

**Tab. 6: Vorbehandlung**

Der Remissionsstatus wurde als erste oder höhere komplette Remission (CR), progrediente Erkrankung (PD), partielle Remission (PR) und Rezidiv (REL) ermittelt.

<b>Status zum Zeitpunkt der Transplantation / nach Transplantation</b>	Remissionsstatus zum Zeitpunkt der Transplantation
	Remissionsstatus nach Transplantation
	Remissionsstatus Follow-Up
	Rezidiv nach Transplantation
	Anzahl DLI
<b>DLI</b>	

**Tab. 7: Remissionsstatus**

Als Tag des leukozytären Engraftments wurde der erste von drei aufeinanderfolgenden Tagen, an denen die absolute Leukozytenzahl 1,0 Zellen/nl erreichte, definiert. Zur Dokumentation des thrombozytären Engraftments wurde der jeweilige Tag erfasst, an dem die Thrombozytenzahl 20/nl, 50/nl und 100/nl transfusionsunabhängig erreichte. Die Anzahl an im Transplantat enthaltenen

## Patienten und Methoden

---

CD34<sup>+</sup>-Zellen wurde vom entnehmenden Zentrum durchflusszytometrisch bestimmt.

<b>Engraftment</b>  <b>Transplantat</b>	Leukozytär: Tag 1 von 3 für 1,0 Zellen/nl
	Thrombozytär: Tag 1 von 3 für 20/50/100 Thrombozyten/nl, transfusionsunabhängig
	CD34 <sup>+</sup> -Zellzahl: 10 <sup>6</sup> /kg

**Tab. 8: Engraftment**

Die akute GvHD wurde nach Glucksberg et al. in erweiterter Form eingeteilt (29). Als Endpunkt der akuten GvHD wurde die Einstellung der therapeutischen Steroidgabe mit nachfolgend symptomfreien ambulanten Kontrollen gewertet.

<b>Akute GvHD</b>	Organmanifestation
	Ausprägungsgrad
	Erstdiagnose
	Endpunkt

**Tab. 9: akute GvHD**

Die Einteilung der chronischen GvHD erfolgte nach dem Zeitpunkt des Auftretens und den Kriterien der Seattle-Klassifikation (46, 47).

<b>Chronische GvHD</b>	Organmanifestation
	Ausprägungsgrad
	Intervall zwischen Transplantation und Erstdiagnose
	Thrombozytopenie mit chronischer GvHD

**Tab. 10: chronische GvHD**

Da nur wenige Informationen über die Langzeitwirkungen von Rituximab vorliegen und der Antikörper *in vivo* eine sehr lange Halbwertszeit hat, wurde ein Patient mit einem Intervall von 1490 Tagen zwischen letzter Rituximab-Dosis und Transplantation in die Analyse eingeschlossen.

**Tab. 11: Rituximab**

<b>Rituximab</b>	Kumulative Dosis
	Behandlungsintervall
	Intervall letzte Dosis Transplantationsdatum

Als ereignisfreies Intervall wurde der Zeitraum zwischen Transplantation und Rezidiv oder der Zeitraum zwischen Transplantation und Ende des *follow-up* definiert. Als Gesamtüberlebensrate wurde das Intervall zwischen Transplantation und Tod bzw. Ende des follow-up gewertet. Die Überlebensraten wurden anhand des log-rank-Testes und nach Kaplan-Meyer ermittelt.

### **2.3. Datenverarbeitung**

Die Datenverarbeitung erfolgte unter Nutzung der Software MS-Excel (Microsoft, München, Deutschland) sowie des Statistik-Programms WinSTAT (R. Fitch Software, Bad Krozingen, Deutschland). Dort, wo es erforderlich erschien, ist der jeweilige statistische Test im Text benannt und aufgeführt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Stammdaten

In der mit Rituximab vorbehandelten Gruppe (n=19, 55,9%) fanden sich 16 (84,2%) männliche Patienten. Im Vergleich zur nicht mit Rituximab vorbehandelten Patientengruppe (n=15) mit 11 männlichen Patienten (73,3%) gilt  $p=0,92$ . Der Median des Alters ergab für die mit Rituximab vorbehandelten Patienten 42,2 Jahre vs. 46,4 Jahre in der Gruppe ohne Rituximabtherapie ( $p=0,65$ ) (Tab. 12).

Tab. 12: Stammdaten II

Parameter	Rituximab (n=19)	Kein Rituximab (n=15)	p-Wert	Test
Geschlecht männlich	16 (84,2%)	11 (73,3%)	0,36	Fishers exakter Test
Alter	42,2 (23,2-65,2)	46,4 (22,1-67,3)	0,65	U-Test (Mann-Whitney)
High-grade Malignität	12 (63,2%)	10 (66,7%)	0,56	Fishers exakter Test

Eine stattgehabte Exposition gegenüber CMV konnte bei 25 Patienten (73,5%) und 17 Spendern (50%) festgestellt werden. Signifikante Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen fanden sich im bezug auf den CMV-Status zwischen Spender und Empfänger bei negativem Spender und positivem Empfänger ( $p=0,02$ ) (Tab. 13).

Tab. 13: CMV-Status

Parameter	Rituximab (n=19)	Kein Rituximab (n=15)	p-Wert	Test
CMV-Positivität (Patient)	15 (79,0%)	10 (66,7%)	0,34	Fishers exakter Test
CMV-Positivität (Donor)	9 (47,4%)	8 (53,3%)	0,50	Fishers exakter Test
CMVneg → CMVpos (Empfänger)	9 (47,4%)	2 (13,3%)	0,02	Fishers exakter Test

### 3.2 Die Vorbehandlung

Die nicht mit Rituximab vorbehandelten Patienten wurden mit 3 (Median, Intervall 1-5) unterschiedlichen Vortherapien und 8 Zyklen (Median, Intervall 2-21) behandelt. Die mit Rituximab behandelten Patienten wurden mit 3 (Median, Intervall 2-10) unterschiedlichen Vortherapien und 8 Zyklen (Median, Intervall 4-37) behandelt. Im Bezug auf die Vorbehandlung bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen (**Tab. 14**).

**Tab. 14: Vorbehandlung**

Parameter	Rituximab (n=19)	Kein Rituximab (n=15)	p-Wert	Test
CTX Schemata	3 (2-10)	3 (1-5)	0,29	U-Test (Mann-Whitney)
CTX Zyklen	8 (4-37)	7 (2-21)	0,35	T-Test (unabhängig)

### 3.3 Die Konditionierung

Die Konditionierung erfolgte bei 8 Patienten (23,5%) myoablativ und bei 26 Patienten (76,5%) als RIC. Als myoablatives Regimen fand die Kombination aus 16 mg/kg Busulfan und 120 mg/kg Cyclophosphamid bei 7 Patienten (20,6%) und eine Kombination aus Bestrahlung (TBI mit 12 Gy) und 120 mg/kg Cyclophosphamid bei 1 Patienten (2,9%) Anwendung. Die Konditionierung in Form einer RIC erfolgte bei 17 Patienten (50%) als Kombination mit 36 g/m<sup>2</sup> Treosulfan und 150 mg/m<sup>2</sup> Fludarabin, bei 5 Patienten (14,7%) mit 8 mg/kg Busulfan und 150mg/m<sup>2</sup> Fludarabin und bei 4 Patienten (11,4%) mit Bestrahlung (TBI 2 Gy) und 90 mg/m<sup>2</sup> Fludarabin. Der Anteil an mit RIC konditionierten Patienten an der Gruppe mit Rituximabtherapie betrug 68,4% (n=13). In der Gruppe ohne Rituximabtherapie wurden 86,7% (n=13) mit einer RIC behandelt. Die Vorbehandlung mit ATG erfolgte bei 11 Patienten (57,9%) in der Gruppe mit Rituximabtherapie vs. 12 Patienten (80,0%) in der Gruppe ohne Rituximabtherapie. Bei 9 Patienten in der mit Rituximab vorbehandelten Gruppe

erfolgte die Therapie mit ATG im Rahmen der RIC. Bei 10 Patienten in der Gruppe ohne Rituximabtherapie erfolgte die Therapie mit ATG im Rahmen der RIC. Die Indikation zu einer Vorbehandlung mit ATG bestand bei *mismatch* oder Vorliegen eines mud (*matched unrelated donor*). (**Tab. 15**).

**Tab. 15: Konditionierung**

Parameter	Rituximab (n=19)	Kein Rituximab (n=15)	p-Wert	Test
RIC	13 (68,4%)	13 (86,7%)	0,21	U-Test (Mann-Whitney)
ATG	11 (57,9%)	12 (80,0%)	0,2	U-Test (Mann-Whitney)

### 3.4 Transplantation

Alle 34 Patienten wurden 16 Monate (Median, Intervall 1-124) nach Erstdiagnose allogren transplantiert. Für 13 Patienten stand ein verwandter Spender zur Verfügung. Davon zählten 8 Patienten (42,1%) zu der mit Rituximab vorbehandelten Gruppe und 5 Patienten (33,3%) zählten zu der Gruppe ohne Rituximabtherapie. In der Gruppe mit Rituximabtherapie befanden sich 11 Patienten (57,9%) mit nicht-verwandtem Spender. Zu der Gruppe ohne Rituximabtherapie zählten 10 Patienten (66,7%) mit nicht verwandtem Spender (**Tab. 16**).

**Tab. 16: Transplantation I**

Parameter	Rituximab (n=19)	Kein Rituximab (n=15)	p-Wert	Test
Zeit zw. ED und TX (Monate)	24,11 (2,9-123,5)	14,25 (0,95-67,02)	0,66	U-Test (Mann-Whitney)
mud mrd	11 (57,9%) 8 (42,1%)	10 (66,7%) 5 (33,3%)	0,23	McNemar-Test

Innerhalb der Gruppe von nicht-verwandten Spendern und Empfängern fand sich in 3 Fällen ein *major-mismatch*. In der Gruppe von verwandten Spendern und

Empfängern waren alle Fälle *fully matched*. Es wurden nur unprozessierte Stammzellen transplantiert, die nach einer Stimulation mit G-CSF gewonnen wurden. Die Patienten erhielten  $5,7 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup>-Zellen (Median, Intervall 0,9-13,9) pro KG Körpergewicht. Auch im Bezug auf den Remissionsstatus zum Zeitpunkt der Transplantation fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen (p=0,49). (**Tab. 17**). Drei männlichen Patienten wurden von weiblichen Spendern transplantiert.

**Tab. 17 : Transplantation II**

Parameter	Rituximab (n=19)	Kein Rituximab (n=15)	p-Wert	Test
Remissionsstatus zum Zeitpunkt der allogenen Transplantation	CR: 8 PR: 7 PD/REL: 4	CR: 8 PR: 6 PD/REL: 1	0,5	X <sup>2</sup> -Test
2. TX	8 (42,1%)	3(20,0%)	0,16	Fishers exakter Test
CD34 <sup>+</sup> -Zellen (10 <sup>6</sup> /kg)	5,3 (1,6-13,9)	6,4 (0,9-11,4)	0,7	U-Test (Mann-Whitney)

**Abkürzungen:** CR: komplette Remission, PD: Progression, PR: partielle Remission, REL: Relaps, TX: Transplantation

### 3.5 Therapie mit Donor-Lymphozyten-Transfusion

Bei 6 Patienten (17,7%) wurde nach der allogenen Stammzeltransplantation ein klinisches oder molekulargenetisches Rezidiv mittels DLI behandelt. Im Median erfolgten 3 Donor-Lymphozyten-Transfusionen (Intervall 1-5). Im Allgemeinen erfolgte die erste Transfusion mit  $5 \times 10^5$  Donor-Lymphozyten, die zweite mit  $5 \times 10^5$  Donor-Lymphozyten, die dritte mit  $5 \times 10^6$  und die vierte mit  $5 \times 10^7$  Donor-Lymphozyten.

### 3.6 Die Vorbehandlung mit Rituximab

Eine Vorbehandlung mit Rituximab erfolgte bei 19 Patienten (55,9%) mit 4 Dosen (Median, Intervall 1-10). Die applizierte Menge pro Dosis betrug 375 mg/m<sup>2</sup>, und

die kumulative Dosis lag bei 1500 mg/m<sup>2</sup> (Median, Intervall 375 mg/m<sup>2</sup>-3750 mg/m<sup>2</sup>). Das Intervall zwischen der letzten Applikation von Rituximab und der allogenen Stammzelltransplantation lag bei 5,9 Wochen (Median, Intervall 0,1-212,9) (Tab. 18).

**Tab. 18: Rituximab**

<b>Rituximab (n=19)</b>	Kumulative Dosis	1500 mg/m <sup>2</sup> (375 mg/m <sup>2</sup> - 3750 mg/m <sup>2</sup> )
	Intervall letzte Dosis bis TX	5,9 Wochen (0,1 – 212,9)

### 3.7 Die Supportive Therapie

Die Hämatopoese wurde in allen Fällen von Tag +1 bis zum leukozytären Engraftment mit G-CSF stimuliert. Ein Chinolon der dritten Generation (Ciprofloxacin oder Levofloxacin) wurde ab der Konditionierung bis zum Zeitpunkt des Engraftments zur antibakteriellen Prophylaxe eingesetzt. Eine antivirale Prophylaxe wurde mit Acyclovir 3 x 400 mg/d per os im Abstand von 8 Stunden ab Tag +1 vorgenommen. Bei komplikationslosem Verlauf wurde das Virustatikum ab Tag +30 abgesetzt. Als Antimykotikum wurde Itraconazol 2 x 200 mg/d per os ab Tag +1 bis mindestens Tag +75 zur Prophylaxe eingesetzt. Vor Transplantation im Zuge der Konditionierung wurde aufgrund einer möglichen Gefahr der Interaktion von Itraconazol mit der Konditionierungstherapie Fluconazol eingesetzt. Eine Pneumocystis jiroveci-Prophylaxe wurde vor der Konditionierung mit Cotrimoxazol 960 mg/d 3 x wöchentlich begonnen. Bei unerwünschten Nebenwirkungen von Cotrimoxazol wurde die Prophylaxe mit Pentamidine-Inhalationen mit 300 mg/Monat fortgesetzt. In Abhängigkeit vom zellulären Immunstatus des Patienten wurde die Pneumocystis jiroveci-Prophylaxe ab Tag +180 ausgesetzt.

### 3.8 GvHD-Prophylaxe

Die Prophylaxe der akuten GvHD erfolgte mit Cyclosporin A ab Tag -3 mit 3 mg/kg per infusionem bis auf einen Blutspiegel von 200-250 µg/l. Desweiteren erfolgte die Prophylaxe mit MTX an Tag +1 mit 15 mg/m<sup>2</sup>KOF und 10 mg/m<sup>2</sup>KOF an Tag +3 und +6 und in Abhängigkeit vom eingesetzten Konditionierungsprotokoll mit Mycofenolat Mofetil (MMF) ab Tag 0 mit 4 x 500 mg/d per os. Bei *matched related donor* wurde MMF ab Tag +28 abgesetzt. Bei nicht-verwandtem Spender wurde MMF ab Tag +42 über drei Stufen (1,5 mg/1,0 mg/0,5 mg Tagesdosis) à 14 Tage reduziert (120).

### 3.9 Engraftment

Nach 15 Tagen (Intervall 1-32) erreichten 32 Patienten (94,1%) den kritischen Wert für das leukozytäre Engraftment von 1,0 Zellen/nl. Bei mit Rituximab vorbehandelten Patienten wurde der Wert von 1,0 Zellen/nl signifikant früher erreicht als bei der Vergleichsgruppe ohne Rituximabtheapie (11,5 Tage [Intervall 1-32] versus 18 Tage [Intervall 12-31],  $p < 0,005$ , Mann-Whitney U-Test).

Das thrombozytäre Engraftment mit 20 Thrombozyten/nl wurde von 29 Patienten (85,3%) nach 17 Tagen (Intervall 1-54) nach allogener Transplantation erreicht. Der Wert von 50 Thrombozyten/nl wurde von 23 Patienten (67,7%) nach 25 Tagen erreicht. Bei 23 Patienten konnte der Wert von 100 Thrombozyten/nl nach 31 Tagen (Intervall 13-117) nach Transplantation ermittelt werden. Auch das thrombozytäre Engraftment fand in der mit Rituximab vorbehandelten Patientengruppe für alle drei oben genannten Werte signifikant früher statt (20PLT: 11,5 Tage [Intervall 1-28] versus 27 Tage [Intervall 11-54],  $p < 0,001$ ; 50PLT: 16,5 Tage [Intervall 11-37] versus 42 Tage [Intervall 22-70],  $p < 0,001$ ; 100PLT: 22,5 Tage [Intervall 13-52] versus 60 Tage [Intervall 25-117],  $p < 0,005$ ; Mann-Whitney U-Test) (**Tab. 19**).

## Ergebnisse

**Tab. 19: Leukozytäres und thrombozytäres Engraftement**

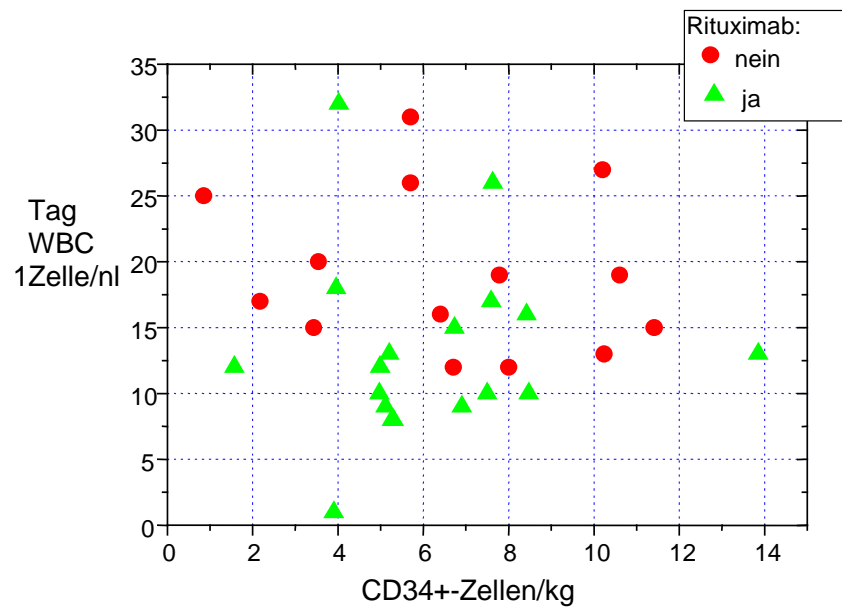
Parameter	Rituximab (n=19)	Kein Rituximab (n=15)	p-Wert	Test
WBC>1/nl (Tag)	12 (1-32)	18 (12-31)	<0,005	U-Test (Mann-Whitney)
PLT>20/nl (Tag)	11,5 (1-28)	27 (11-54)	<0,001	U-Test (Mann-Whitney)
PLT>50/nl (Tag)	16,5 (11-37)	42 (22-70)	<0,001	U-Test (Mann-Whitney)
PLT>100/nl (Tag)	22,5 (13-52)	60 (25-117)	<0,005	U-Test (Mann-Whitney)

**Abkürzungen: WBC: Leukozytenzahl, PLT: Thrombozytenzahl, NR: nicht erreicht**

## Ergebnisse

Die Beziehung zwischen dem Tag des leukozytären und thrombozytären Engraftments und transplantierte Zellzahl an CD34<sup>+</sup>-Zellen/kg ist in Punktdiagrammen aufgetragen (**Abb.1 + Abb. 2 a-c**). Hier wird deutlich, dass für Patienten mit einer Rituximabtherapie in der Vorbehandlung ein schnelleres Engraftment sowohl für Leukozyten als auch für Thrombozyten erfolgte.

**Abb. 1: Leukozytäres Engraftment in Tagen (Y-Achse) in Beziehung zur transplantierten CD34<sup>+</sup>-Zellzahl/kg (X-Achse). Auf der Y-Achse ist der erste von drei konsekutiven Tagen aufgetragen an dem die Leukozytenzahl > 1 Zelle/nl ( $\times 10^6$ ) beträgt**



## Ergebnisse

Abb. 2a: Thrombozytäres Engraftment in Tagen (Y-Achse) in Beziehung zur transplantierten CD34<sup>+</sup>-Zellzahl/kg (X-Achse). Auf der Y-Achse ist der erste von drei konsekutiven Tagen aufgetragen an dem die Thrombozytenzahl > 20 Zellen/nl ( $\times 10^6$ ) beträgt

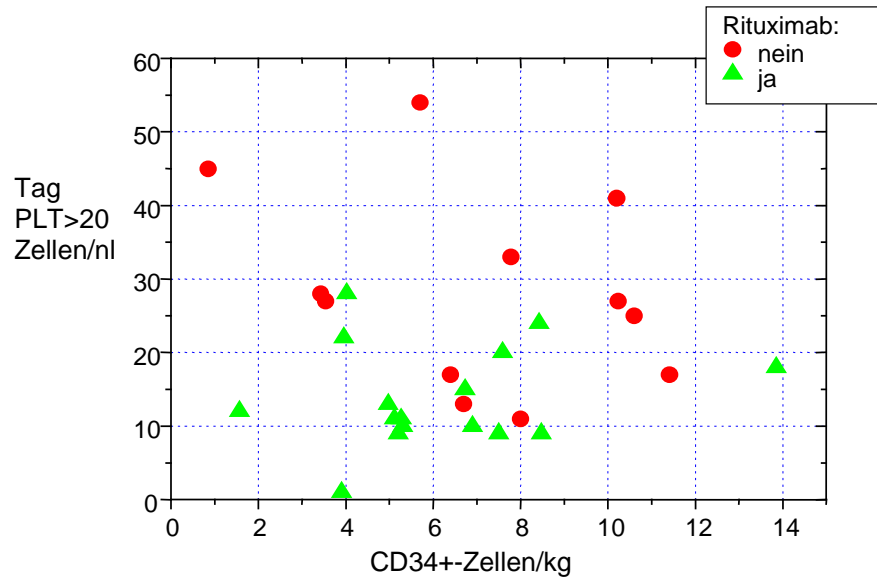
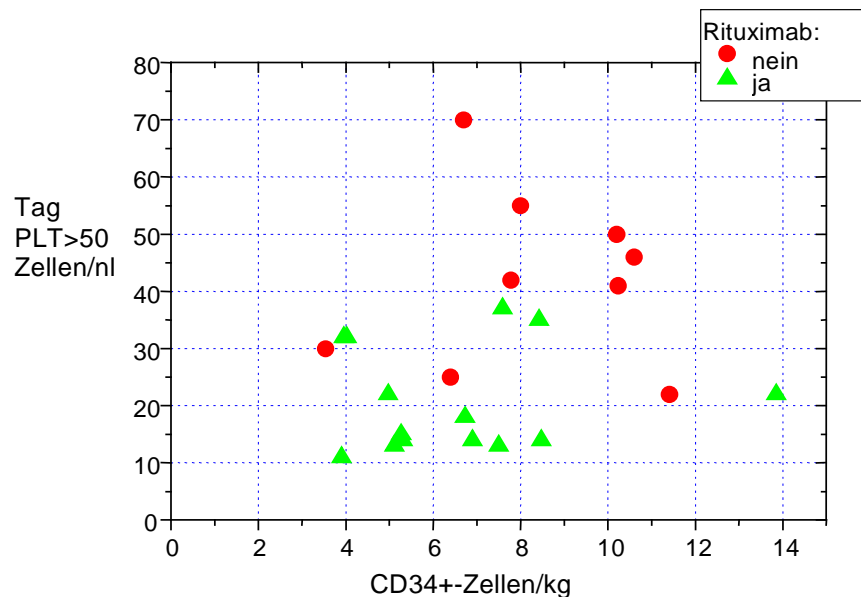
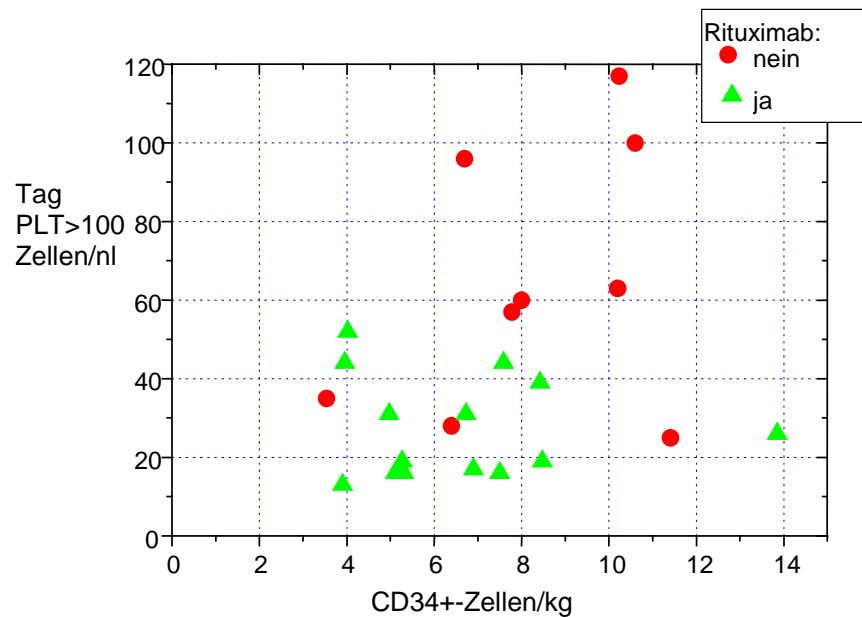


Abb. 2b: Thrombozytäres Engraftment in Tagen (Y-Achse) in Beziehung zur transplantierten CD34<sup>+</sup>-Zellzahl/kg (X-Achse). Auf der Y-Achse ist der erste von drei konsekutiven Tagen aufgetragen an dem die Thrombozytenzahl > 50 Zellen/nl ( $\times 10^6$ ) beträgt



## Ergebnisse

Abb. 2c: Thrombozytäres Engraftment in Tagen (Y-Achse) in Beziehung zur transplantierten CD34<sup>+</sup>-Zellzahl/kg (X-Achse). Auf der Y-Achse ist der erste von drei konsekutiven Tagen aufgetragen an dem die Thrombozytenzahl > 100 Zellen/nl ( $\times 10^6$ ) beträgt



### 3.10 Akute Graft-versus-Host Erkrankung

Die Gesamtinzidenz für die akute GvHD lag bei 52,9% (n=18/34). Ein signifikanter Wert zwischen den Vergleichsgruppen mit und ohne Rituximabtherapie ergab sich nicht (11/19 [57,9%] versus 7/15 [46,7%]; p=0,4). Die Manifestation der akuten GvHD an einzelnen Organsystemen stellte sich wie folgt dar:

#### Leber:

Insgesamt erkrankten 9 Patienten (26,5%) an akuter GvHD der Leber. Davon entfielen 6 Patienten (31,6%) auf die mit Rituximab vorbehandelte Gruppe und 3 Patienten (20%) auf die Gruppe ohne Rituximabtherapie (p=0,35). Das Stadium des Leberbefalls betrug in der mit Rituximab vorbehandelten Gruppe 2,5 (Median) gegenüber der Gruppe ohne Rituximabtherapie mit dem Stadium 2 (Median) (p=0,82).

#### Haut:

Insgesamt erkrankten 17 Patienten (50,0%) an akuter GvHD der Haut. Davon entfielen 10 Patienten (52,63%) auf die mit Rituximab vorbehandelte Gruppe und 7 Patienten (46,66%) auf die Patientengruppe ohne Rituximabtherapie (p=0,5). Das Stadium des Hautbefalls betrug in der mit Rituximab vorbehandelten Gruppe 2 (Median) gegenüber der Gruppe ohne Rituximabtherapie mit dem Stadium 3 (Median) (p=0,5).

#### Gastrointestinaltrakt:

Insgesamt erkrankten 14 Patienten (41,2%) an akuter GvHD des Gastrointestinaltraktes. Davon entfielen 8 Patienten (42,1%) auf die mit Rituximab vorbehandelte Patientengruppe und 6 Patienten (40%) auf die Gruppe ohne Rituximabtherapie (p=0,6). Das Stadium des gastrointestinalen Befalls betrug in der mit Rituximab vorbehandelten Gruppe 2 (Median) gegenüber Stadium 2,5 (Median) in der nicht mit Rituximab behandelten Patientengruppe (p=0,74).

## Ergebnisse

Ausprägungsgrad der akuten GvHD:

In der mit Rituximab vorbehandelten Patientengruppe fand sich der Ausprägungsgrad II (Median). Ein Patient erkrankte in dieser Gruppe an einer akuten GvHD Grad I. An einer akuten GvHD Grad II erkrankten 5 Patienten. Auf die Ausprägungsgrade III<sup>o</sup> und IV<sup>o</sup> entfielen jeweils 3 und 2 Patienten in dieser Gruppe. In der Patientengruppe ohne Rituximabtherapie fanden sich 2 Patienten mit dem Ausprägungsgrad II neben 4 Patienten dem Ausprägungsgrad III und einem Patienten mit einer akuten GvHD Grad IV. Die Werte der Vergleichsgruppen im Bezug auf den Ausprägungsgrad einer akuten GvHD lagen in einem nicht signifikanten Bereich ( $p=0,7$ ) (**Tab. 20**).

**Tab. 20: Akute Graft-versus-Host Erkrankung. Angegeben sind die Inzidenz (in %) Stadium (Median, Intervall) und Grad der Erkrankung.**

Parameter	Rituximab (n=19)	Kein Rituximab (n=15)	p-Wert	Test
Haut (Inzidenz)	10 (52,63%)	7 (46,66%)	0,5	Fishers exakter Test
Haut (Stadium)	2 (1-3)	3 (1-4)	0,5	X <sup>2</sup> -Test
Leber (Inzidenz)	6 (31,6%)	3 (20%)	0,35	Fishers exakter Test
Leber (Stadium)	2,5 (1-3)	2 (1-3)	0,82	X <sup>2</sup> -Test
GI-Trakt (Inzidenz)	8 (42,1%)	6 (40%)	0,6	Fishers exakter Test
GI-Trakt (Stadium)	2 (1-4)	2,5 (1-3)	0,74	X <sup>2</sup> -Test
Inzidenz	11 (57,9%)	7 (46,7%)	0,4	Fishers exakter Test
aGvHD (Ausprägung)	II <sup>o</sup> (I <sup>o</sup> -IV <sup>o</sup> )	III <sup>o</sup> (II <sup>o</sup> -IV <sup>o</sup> )	0,7	X <sup>2</sup> -Test

### 3.11 Chronische Graft-versus-Host Erkrankung

Die Gesamtinzidenz für die chronische GvHD lag bei 38,2% (n=13/34). Ein signifikanter Wert zwischen den Vergleichsgruppen mit und ohne Rituximabtherapie ergab sich nicht (9/19 [57,9%] versus 4/11 [46,7%]; p=0,5). Die organbezogene Inzidenz für die chronische GvHD stellte sich wie folgt dar:

#### Haut:

Insgesamt erkrankten 7 Patienten (20,6%) an chronischer GvHD der Haut. Davon entfielen 6 Patienten (31,6%) auf die mit Rituximab vorbehandelte Gruppe und 1 Patient (6,7%) auf die Patientengruppe ohne Rituximabtherapie (p=0,2). Der Hautbefall wurde in % des BSA (body surface area) ermittelt. Ausgegangen wurde von einem BSA des Erwachsenen von 1,73 m<sup>2</sup>. In der mit Rituximab vorbehandelten Gruppe fand sich 1 Patient mit einem kompletten Hautbefall, 2 Patienten mit ca. 50% Hautbefall, 1 Patient mit ca. 40% Hautbefall, 1 Patient mit ca. 20% Hautbefall und 1 Patient mit ca. 10% Hautbefall. Der Patient in der Gruppe ohne Rituximabtherapie wies einen Hautbefall von 20% auf.

#### Mundschleimhaut:

Insgesamt erkrankten 8 Patienten (23,53%) an chronischer GvHD der Mundschleimhaut. Davon entfielen 6 Patienten (31,6%) auf die mit Rituximab vorbehandelte Gruppe und 2 Patienten (13,3%) auf die Patientengruppe ohne Rituximabtherapie (p=0,41).

#### Gastrointestinaltrakt:

Insgesamt erkrankten 2 Patienten (5,88%) an chronischer GvHD des Gastrointestinaltraktes. Davon entfiel jeweils 1 Patienten (5,3%) auf die mit Rituximab vorbehandelte Patientengruppe und 1 Patient (6,7%) auf die Gruppe ohne Rituximabtherapie (p=0,89).

### Leber:

Insgesamt erkrankten 7 Patienten (20,6%) an chronischer GvHD der Leber. Davon entfielen 5 Patienten (26,3%) auf die mit Rituximab vorbehandelte Gruppe und 2 Patienten (13,3%) auf die Gruppe ohne Rituximabtherapie ( $p=0,54$ ).

### Augen:

Insgesamt erkrankten 4 Patienten (11,76%) an chronischer GvHD im Bereich der Augenschleimhäute. Davon entfielen 3 Patienten (15,8%) auf die mit Rituximab vorbehandelte Gruppe und 1 Patient (6,7%) auf die Gruppe ohne Rituximabtherapie ( $p=0,66$ ).

### Gelenke:

Insgesamt erkrankten 2 Patienten (5,88%) an chronischer GvHD im Bereich der Gelenke. Davon entfiel jeweils 1 Patient (5,3%) auf die mit Rituximab vorbehandelte Gruppe und 1 Patient (6,7%) auf die Gruppe ohne Rituximabtherapie ( $p=0,89$ ).

### Ausprägungsgrad der chronischen GvHD:

Insgesamt erkrankten 8 Patienten (23,5%) an einer *extensive disease* und 5 Patienten (14,7%) an einer *limited disease*. In der mit Rituximab vorbehandelten Patientengruppe erkrankten 3 Patienten (15,8%) an einer *limited disease* und 6 Patienten (31,6%) an einer *extensive disease*. In der Patientengruppe ohne Rituximabtherapie erkrankten 2 Patienten an der *limited disease* und weitere 2 Patienten an der *extensive disease*. Die Werte der Vergleichsgruppen im bezug auf den Ausprägungsgrad einer chronischen GvHD lagen in einem nicht signifikanten Bereich ( $p=0,79$ ) (**Tab. 21**).

## Ergebnisse

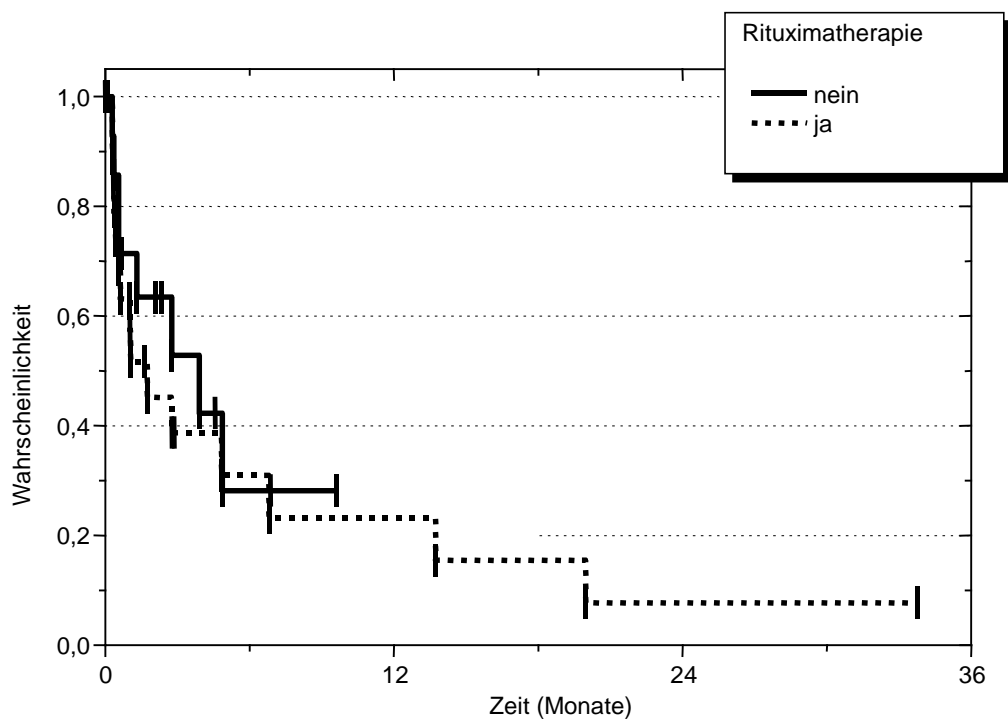
**Tab. 21: Chronische Graft-versus-Host Erkrankung; Anzahl der Patienten und die Inzidenz (in %).**

Parameter	Rituximab (n=19)	Kein Rituximab (n=15)	p- Wert	Test
Haut	6 (31,6%)	1 (6,7%)	0,20	Fishers exakter Test
Leber	5 (26,3%)	2 (13,3%)	0,54	Fishers exakter Test
GI-Trakt	1 (5,3%)	1 (6,7%)	0,89	Fishers exakter Test
Augen	3 (15,8%)	1 (6,7%)	0,66	Fishers exakter Test
Mundhöhle	6 (31,6%)	2 (13,3%)	0,41	Fishers exakter Test
Gelenke	1 (5,3%)	1 (6,7%)	0,89	Fishers exakter Test
Thrombozyten <100	3 (15,8%)	4 (26,7%)	0,16	Fishers exakter Test
cGVHD (Inzidenz)	9 (47,4%)	4 (26,7%)	0,50	Fishers exakter Test
Intervall zwischen TX und cGVHD (in Monaten)	9,9 (2,2-20,0)	5,1 (3,0-9,5)	0,22	U-Test (Mann-Whitney)
cGVHD (Ausprägung)	Limited: n=3 (15,8%) Extensive: n=6 (31,6%)	Limited: n=2 (13,3%) Extensive: n=2 (13,3%)	0,79	X <sup>2</sup> -Test

**Abkürzungen: TX: allogene Stammzelltransplantation**

Um eine graphische Darstellung der kumulativen Inzidenz der akuten oder chronischen GvHD zu erhalten wurde der Parameter *freedom from GvHD* mit dem Log-rank-Test ermittelt und nach Kaplan-Meier graphisch dargestellt. Als Endpunkte wurden die Erstdiagnose einer akuten oder chronischen GvHD, der letzte dokumentierte Status oder das Todesdatum festgelegt (**Abb. 5**). In der mit Rituximab vorbehandelten Patientengruppe trat eine akute oder chronische GvHD nach 2,2 Monaten (Median) auf. Bei der nicht mit Rituximab vorbehandelten Patientengruppe lag das Intervall zwischen Transplantation und akuter oder chronischer GvHD bei 1,1 Monaten (Median).

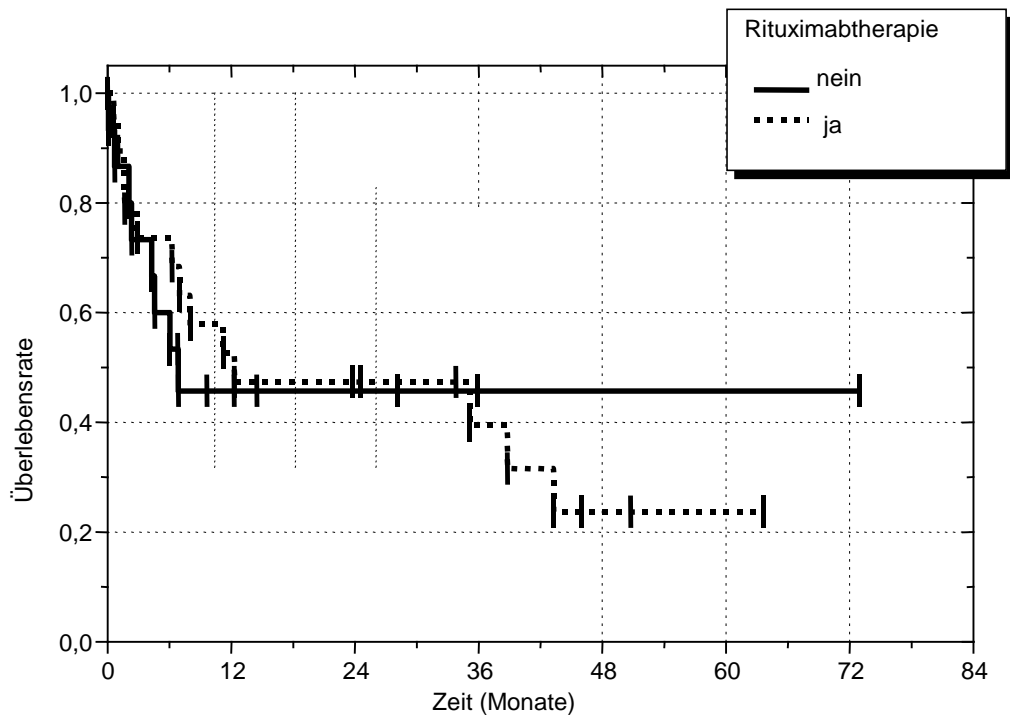
**Abb. 5: Wahrscheinlichkeit nicht an akuter oder chronischer GvHD zu erkranken (Y-Achse) aufgetragen auf den Beobachtungszeitraum (X-Achse) mit oder ohne Rituximabtherapie**



### 3.12 Überlebensrate und Prognose

Nach einer Beobachtungsdauer von 8,8 Monaten (Median, Intervall 0,1-72,9) betrug die Überlebensrate 38,2%. Ursächlich waren Infektionen (n=5, 14,7%), akute GvHD (n=2, 5,9%), chronische GvHD (n=3, 15,8%), Rezidiv der Grunderkrankung (n=6, 17,7%), durch EBV verursachte lymphoproliferative Erkrankungen (n=2, 2,9%) und jeweils 1 Patient verstarb an einer sekundären Neoplasie (2,9%), durch Multiorganversagen (2,9%) oder einer Gerinnungsstörung mit unstillbarer Blutung (2,9%). Eine Vorbehandlung mit Rituximab hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Gesamtüberlebensrate (Abb. 6).

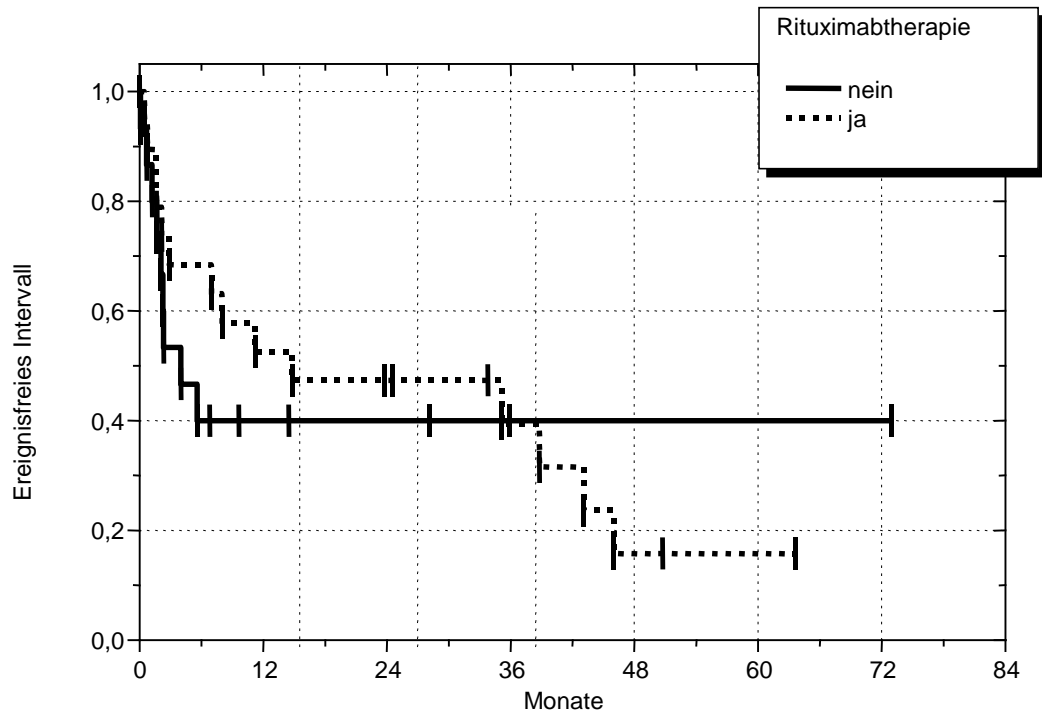
Abb. 6: Gesamtüberlebensrate in Monaten für Patienten mit (n=19) und ohne (n=15) Rituximabtherapie



## Ergebnisse

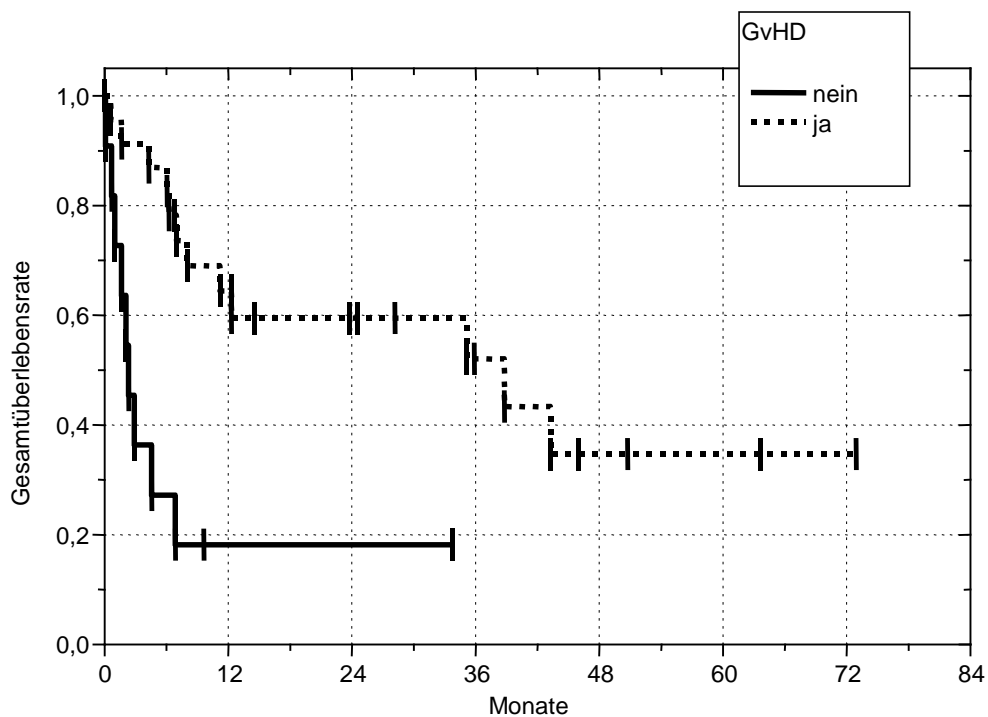
Ein signifikanter Einfluss einer vorangegangenen Rituximabtherapie auf das ereignisfreie Intervall, die Manifestation oder den Ausprägungsgrad einer GvHD, sowie das Gesamtüberleben konnte nicht gezeigt werden (**Abb.7**).

**Abb. 7: Ereignisfreies Intervall in Monaten für Patienten mit (n=19) und ohne (n=15) Rituximabtherapie**



Eine signifikant höhere Überlebensrate von 14,5 Monaten (Median, Intervall 0,6-72,9) konnte für Patienten gezeigt werden, die an einer Form der GvHD erkrankt waren gegenüber der Überlebensrate von 2,3 Monaten (Median, Intervall 0,1-33,8) für Patienten die nie an einer Form der GvHD erkrankt waren ( $p=0,001$ , log-rank-Test). Sowohl für Patienten, die an einer akuten GvHD erkrankt waren fand sich eine höhere Überlebensrate ( $p<0,02$ , log-rank-Test) als auch für Patienten, die an einer *limited* oder *extensive disease* der chronischen GvHD erkrankt waren fand sich eine höhere Überlebensrate ( $p<0,01$ , log-rank-Test) im Vergleich mit der Patientengruppe, die nicht an einer akuten oder chronischen GvHD erkrankt war (**Abb.8**).

**Abb. 8:** Gesamtüberlebensrate in Monaten für Patienten mit und ohne akuter oder chronischer GvHD



### 4. Diskussion

#### 4.1 Engraftment

In einem Zeitraum zwischen April 1999 und Dezember 2005 wurden 34 Patienten mit einer allogenen Stammzelltransplantation behandelt. Bei 19 Patienten erfolgte eine Therapie mit Rituximab vor der Transplantation. Im retrospektiven Vergleich mit 15 Patienten, welche keinerlei Therapie mit Rituximab vor der Transplantation erhalten hatten konnte ein signifikant schnelleres leukozytäres und thrombozytäres Engraftment für die mit Rituximab vorbehandelte Patientengruppe ermittelt werden. Bei mit Rituximab vorbehandelten Patienten wurde der Wert von 1,0 Zellen/nl signifikant früher erreicht als bei der Vergleichsgruppe ohne Rituximabtherapie (11,5 Tage [Intervall 1-32] versus 18 Tage [Intervall 12-31],  $p < 0,005$ , Mann-Whitney U-Test). Das thrombozytäre Engraftment erfolgte für die Werte 20, 50 und 100 Thrombozyten/nl nach 11,5 bzw. 16,5 und 22,5 Tagen in der Gruppe mit Rituximabtherapie im Vergleich zur Gruppe ohne Rituximabtherapie mit 27 bzw. 42 und 60 Tagen signifikant schneller ( $p < 0,001$ ). Der Unterschied konnte nicht auf einen differenten Progenitorzellgehalt der eingesetzten Transplantate zurückgeführt werden.

Die Studienlage zur Frage, ob durch Rituximab die Hämatopoese bzw. das Engraftment nach Stammzelltransplantation beeinflusst wird, ist nach wie vor kontrovers. Die Mehrzahl an Studien behandelt die Frage nach der Beeinflussung des Engraftments unter dem Aspekt der Rituximabtherapie im Zusammenhang mit einer autologen Stammzelltransplantation an einem sehr heterogenen Patientengut. So wurden bei folliculären Lymphomen I° im Stadium III-IV [n=35] nach Therapie mit Rituximab zwei Fälle von schwerer Neutropenie gemeldet (121). Bei acht Fällen, die sich sowohl aus autolog transplantierten Patienten als auch aus myeloablativ konditionierten bzw. nur chemotherapeutisch behandelten Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphomen oder CLL rekrutierten, fanden sich 8-23 Wochen nach Rituximabgabe *late-onset* Neutropenien, die Charakteristika von immunvermittelten Neutropenien aufwiesen (92). Dies erscheint umso erstaunlicher, da einige Autoren den erfolgreichen Einsatz des Antikörpers bei der Therapie der idiopathischen Immuno-thrombozytopenie sowie der

immunvermittelten Thrombozytopenie bei Lupus erythematoses und M. Crohn beschreiben (89). Auch Chaiwatanatorn et al. meldeten sieben Fälle von *late-onset* Neutropenien bei n=53 mit Rituximab behandelten Patienten, wobei lediglich ein Patient nach Stammzelltransplantation in die Studie einbezogen wurde (93). Cairoli et al. und Lemieux et al. beschrieben einen Anstieg der Inzidenz von Neutropenien bei Patienten, die vor und nach einer Transplantation mit Rituximab behandelt worden waren (95, 96). Papadaki et al. vermuten einen Zusammenhang zwischen T-Lymphozyten und dem Auftreten von Neutropenien nach Rituximabtherapie (122). Bis heute finden sich keine veröffentlichten Daten über einen Einfluss von Rituximab auf das Engraftment bei Patienten, bei denen nach Therapie mit dem monoklonalen Antikörper eine allogene Stammzelltransplantation erfolgte. Obgleich ein beschleunigtes leukozytäres Engraftment bei Patienten, die mit Rituximab vorbehandelt worden waren, festgestellt werden konnte, sind die hier vorgelegten Ergebnisse dennoch umso überraschender, da sowohl das leukozytäre als auch das thrombozytäre Engraftment bei Patienten mit einer Vorbehandlung mit Rituximab signifikant schneller erfolgte (123). Die Ursachen hierfür sind zum jetzigen Zeitpunkt noch unklar. Für ein verzögertes Engraftment finden sich hingegen in der Literatur eine Vielzahl von Ursachen. So werden unter anderem Schleimhautaffektionen nach Chemotherapie vor Transplantation, eine CMV-Seropositivität des Empfängers, eine genetische Disparität zwischen Spender und Empfänger sowie stattgehabte Transfusionen von Blut- und Blutprodukten vor Transplantation für ein verzögertes Engraftment verantwortlich gemacht (124-127). Zwischen den hier analysierten Vergleichsgruppen bestanden im Hinblick auf diese Parameter bis auf einen signifikanten Unterschied im Bezug auf den CMV-Status zwischen Spender und Empfänger bei negativem Spender und positivem Empfänger ( $p=0,02$ ) keine signifikanten Unterschiede. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Konstellation CMV-negativer Spender und CMV-positiver Empfänger bzw. der in absoluten Zahlen höhere Anteil an CMV-positiven Empfängern in der Patientengruppe mit Rituximabtherapie als ein das Engraftment verzögernder Faktor angesehen werden kann (128). Eine T-Zell-Depletion wurde nicht durchgeführt, und die Behandlung mit ATG innerhalb des Konditionierungsschemas wurde in beiden Gruppen gleich häufig vorgenommen.

Die durchschnittlich verabreichte Menge an CD34<sup>+</sup>-Zellen war in der Vergleichsgruppe ohne Rituximabtherapie höher als in der Gruppe mit Rituximabtherapie. Die RIC, die mit einer kürzeren Aplasie einhergeht, wurde in der Vergleichsgruppe ohne Rituximabtherapie häufiger eingesetzt. Dieses Intervall war in der Vergleichsgruppe der mit Rituximab vorbehandelten Patienten länger, jedoch nicht signifikant verlängert. So kann nicht ausgeschlossen werden, dass in dieser Gruppe mehr Blut- und Thrombozytenkonzentrate gegeben wurden. Hypothetisch kann das beschleunigte Engraftment nach allogener Stammzelltransplantation bei Patienten, die vor der Transplantation mit Rituximab behandelt wurden darauf hinweisen, dass die Therapie mit Rituximab den spender- oder empfangereigenen Pool an CD20<sup>+</sup>-Zellen in-vivo vermindert. Weiter könnte man nun davon ausgehen, dass CD20<sup>+</sup>-Zellen einen Einfluss sowohl auf das thrombozytäre als auch auf das leukozytäre Engraftment haben. Bis jetzt sind jedoch keinerlei inhibitorische Einflüsse von B-Zellen auf das Engraftment beschrieben. Ein Einfluss von CD20<sup>+</sup>-Zellen auf die zelluläre Immunantwort konnte durch die Therapie der immunvermittelten Thrombozytopenie nach allogener Stammzelltransplantation mit Rituximab gezeigt werden (85).

Weitere Hinweise könnte eine quantitative Auswertung der Anzahl an CD20<sup>+</sup>-Zellen im Zusammenhang mit dem Verlauf des Engraftments geben. Erstrebenswert wäre zudem ein prospektiv-randomisiertes Studiendesign mit z. B. Standardisierung der Therapieintervalle von Rituximab in einem grösseren Patientenkollektiv. Diesem Ansatz steht allerdings entgegen, dass Rituximab heute therapeutischer Standard in der Behandlung CD20<sup>+</sup> B-Zellneoplasien ist und eine Randomisierung ethisch nicht zu vertreten wäre.

### 4.2 Überlebensrate und Prognose

Nach 8,8 Monaten (Median, Intervall 0,1-72,9) konnte für das Gesamtkollektiv eine Überlebensrate von 38,2% ermittelt werden. Sowohl die Überlebensrate im ereignisfreien Intervall als auch die Gesamtüberlebensrate stehen im Einklang mit vergleichbaren Publikationen. Dies gilt insbesondere unter Berücksichtigung der

Zusammensetzung des hier untersuchten Patientenkollektivs, welches sich aus Patienten mit hohem Risikoprofil zusammensetzte. So wurden Patienten bis zum 67. Lebensjahr in die Analyse miteingeschlossen. Des Weiteren befanden sich lediglich 16 von 34 Patienten (47%) vor Transplantation im Stadium der kompletten Remission, und 12 von 34 Patienten (35,3%) waren nach einer Hoch-Dosis-Chemotherapie bereits entweder einer autologen oder einer allogenen Stammzelltransplantation unterzogen worden. Eine ausgedehnte Vorbehandlung mit im Median 8 Zyklen Chemotherapie in der Gruppe der mit Rituximab vorbehandelten Patienten und im Median 7 Zyklen in der Patientengruppe ohne Rituximab Vorbehandlung lässt einen Vergleich der Überlebensraten beider Gruppen zu.

Auch wenn der GvL-Effekt und die chronische GvHD für manche Autoren sich als in Entstehung und Ablauf zu unterscheidende Mechanismen darstellen, die nach einer Stammzelltransplantation auftreten können, ist auch in dieser Arbeit das Auftreten einer höhergradigen GvHD mit einer deutlich gebesserten Prognose korreliert (129, 113). Unter Annahme eines GvL-Effektes im Zuge einer GvHD legt das vorliegende Datenmaterial den Schluss nahe, dass eine Rituximabtherapie vor einer allogenen peripheren Stammzelltransplantation keinen Einfluß auf den GvL-Effekt hat.

Die besten Remissionsraten in Folge einer DLI konnten bei Patienten mit einer CML im Rezidiv nach Transplantation erreicht werden. Bei Patienten mit cytogenetischem Rezidiv betrug die Remissionsrate noch 80%. Ein zytogenetisches Rezidiv wurde mittels quantitativem PCR-Nachweis (polymerase chain reaction) von bcr/abl ermittelt. Bei Patienten mit einem hämatologisch manifesten Rezidiv fanden sich Remissionsraten bei 77% (114). Die Ergebnisse belegen die wesentliche Bedeutung dieser immunvermittelten Reaktion nach allogener Transplantation. Die DLI ist als Therapie des Rezidivs nach allogener Transplantation mit HLA-identischen verwandten Spendern, unter HLA-nicht identischen Familienmitgliedern oder mit HLA-identischen nicht verwandten Spendern erfolgreich (130).

Der Effekt einer DLI kann bis zu zwei Monate nach abgeschlossener Transfusion einsetzen. Die Entwicklung einer molekularen Remission kann bis zu zwei Jahre dauern. Verantwortlich für diese langsamen Prozesse kann die Donor-T-Zelle

sein, welche möglicherweise gegen eine Vorläuferzelle der leukämischen Zelle gerichtet ist. Die leukämische Zelle selbst jedoch eine Lebensdauer von mehreren Monaten aufweist (131).

Grundsätzlich ist bislang der Behandlungserfolg durch eine DLI einer myeloischen Leukämie grösser als bei einer lymphatischen Erkrankung (115). Eine immunsuppressive Therapie nach Stammzelltransplantation stellt einen den GvL-Effekt schwächenden Faktor dar. Olsson et al. verglichen retrospektiv 171 Patienten mit HLA-identischem verwandtem Spender, die mit einer GvHD-Prophylaxe in einer Dosierung von 1mg/KG i. v. CsA pro Tag über 6 Monate behandelt wurden mit einer Patientengruppe, welche 5-7,5mg/kg i. v. CsA über ein Jahr erhalten hatte. Beide Patientengruppen erhielten MTX in vergleichbaren Dosierungen. In der Low-dose-Gruppe fand sich eine höhere Wahrscheinlichkeit an einer aGvHD I-II° (70% vs. 53%,  $p < 0,01$ ) und an einer cGvHD (58% vs. 25%,  $p < 0,01$ ) zu erkranken. In der Low-dose-Gruppe fand sich jedoch eine geringere Rezidivwahrscheinlichkeit (31% vs. 54%,  $p < 0,01$ ) und ein längere rezidivfreie (56% vs. 38%,  $p = 0,04$ ) und Gesamtüberlebensrate (61% vs. 40%,  $p = 0,04$ ) (132). Hier sind weitere Untersuchungen mit modifizierten Nachbehandlungsregimen zur Vermeidung einer Immunsuppression sowie zur Augmentation des GvL-Effektes durch selektive Anreicherung bestimmter T-Zellen notwendig. Zu klären ist die Rolle bestimmter selektiv den GvL-Effekt verstärkender T-Zellen wie Gedächtnis-T-Zellen, Gamma/Delta-T-Zellen und regulierende T-Zellen (Tregs). Für regulatorische T-Zellen (Tregs) konnte eine wichtige Rolle bei der Steuerung autoimmunologischer Prozesse und bei der Transplantatabstossung gezeigt werden. Charakteristisch für diese T-Zelllinie ist die Expression von CD 4, CD 25 und dem Transkriptionsfaktor Foxp3.

### 4.3 Akute Graft-versus-Host Erkrankung

Eine akute Graft-versus-Host Erkrankung trat unter allen Patienten mit einer Inzidenz von 52,9% ( $n=18$ ) auf. Im Vergleich beider Gruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Sowohl im Bezug auf den Organbefall als auch im Bezug auf den Grad der Ausprägung fanden sich zwischen den beiden

Vergleichsgruppen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. In einer retrospektiven Analyse (n=17) der Inzidenz einer akuten Graft-versus-Host Erkrankung bei CLL-Patienten mit [n=10] versus ohne [n=7] Vorbehandlung mit Rituximab kamen Khouri et al. zu dem Ergebnis eines nicht signifikanten Trends für eine geringere Inzidenz der akuten GvHD bei mit Rituximab vorbehandelten Patienten von 20% versus 43% [p=0,4] in der Patientengruppe ohne Rituximab-Therapie (133). Zu beachten ist allerdings, dass hier die Applikation von Rituximab von Tag -13 bis Tag +8 als Teil der Konditionierung in Dosierungen von 375 mg/m<sup>2</sup> bei einer kumulativen Dosis von 1000 mg/m<sup>2</sup> erfolgte, in unserem Studiendesign das Intervall zwischen letzter Applikation von Rituximab und Transplantation bei 40 Tagen (Median) und die applizierte Dosis bei 375 mg/m<sup>2</sup> bzw. die kumulative Dosis bei 1500 mg/m<sup>2</sup> (Median) lag. Es finden sich in der Literatur Hinweise für eine lange Wirkdauer von Rituximab. Eine B-Zell-Depletion aufgrund einer Rituximabtherapie konnte für eine Dauer von 25 Monaten gezeigt werden (134). Bei einem Lupus-Patienten wurde eine B-Zell-depletierende Wirkung von Rituximab über 4 Jahre beschrieben (135). Im Serum eines Patienten mit einer rheumatologischen Erkrankung konnte noch 24 Monate nach Gabe der Antikörper nachgewiesen werden (136). Zu betonen ist jedoch, dass die hier ausgewerteten Daten im Gegensatz zu Khouri et al aus einem sehr heterogenen Patientenkollektiv stammen. Auch bei ALL-Patienten konnte eine nicht signifikant niedrigere Inzidenz für die akute Graft-versus-Host Erkrankung nach myeloablativer Konditionierung, allogener Stammzelltransplantation und Applikation von Rituximab um den Transplantationszeitpunkt herum gezeigt werden (137).

#### 4.4 Chronische Graft-versus-Host Erkrankung

Die chronische Graft-versus-Host Erkrankung trägt zu einem großen Teil zur Mortalität nach allogener peripherer Stammzelltransplantation bei, und die Suche nach neuen therapeutischen Ansätzen ist daher nur allzu gerechtfertigt. Nun mehren sich die Hinweise in der Literatur, dass sich eine Therapie mit dem anti-CD20-Antikörper Rituximab positiv auf das klinische Erscheinungsbild der

chronischen Graft-versus-Host Erkrankung auswirken könnte. In einer retrospektiv angelegten Fallanalyse [n=8] von an steroidrefraktärer chronischer GvHD erkrankten Patienten konnten Ratanatharathorn et al. bei 4 Patienten ein klinisches Ansprechen vermerken (89). Die gleiche Gruppe konnte an einem singulären Fall von immunvermittelter Thrombozytopenie bei einem Patienten mit cGvHD durch wöchentliche Gabe von 375 mg/m<sup>2</sup> über vier Wochen einen Rückgang der B-Zellen (CD19+) und damit einhergehend sich normalisierende Thrombozytenzahlen sowie eine rückläufige Symptomatik der chronischen GvHD ermitteln (90).

In einer prospektiv geführten Untersuchung [n=20] unter Patienten mit steroidrefraktärer cGvHD konnte bei 7 Patienten nach 16 Monaten eine klinische Besserung der Symptomatik festgestellt werden. Bei 6 Patienten konnte kein Ansprechen auf die Rituximab-Therapie festgestellt werden und weitere 3 Patienten litten unter einer progressiven Symptomatik. Bei 68% der Patienten konnte eine mindestens 50%ige Reduktion der steroidalen Begleittherapie erfolgen, und die besten Ergebnisse waren bei Patienten mit kutanem oder muskuloskeletalem Befall zu verzeichnen (91).

Im Rahmen der hier vorliegenden Analyse ergab sich für die chronische GvHD eine Inzidenz von 38,2% für alle Patienten nach 6,8 Monaten. Die Inzidenz in den Vergleichsgruppen unterschied sich nicht signifikant. Für die nicht mit Rituximab vorbehandelte Gruppe ergab sich jedoch ein nicht signifikanter Trend für einen früheren Erkrankungszeitpunkt. Auch im Befallsmuster der Organe oder den Schweregraden ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen. Zu beachten ist hier jedoch, dass sowohl bei Ratanatharathorn et al. als auch bei Cutler et al. die Therapie mit Rituximab nach der Transplantation erfolgte, und auch wenn die Unterstellung einer Dosis-Wirkungsbeziehung rein hypothetischer Natur wäre, wurden zumindest bei Cutler et al. bis zu drei Zyklen mit Rituximab verabreicht.

Für die Inzidenz einer cGvHD im Stadium *extensive disease* ergab die Auswertung des vorliegenden Datenmaterials einen nicht signifikanten Unterschied von 31,6% für die mit Rituximab vorbehandelte Gruppe versus 13,3% in der Vergleichsgruppe. Auch hier finden sich unter Studien, die eine Rituximabtherapie vor Transplantation eingeleitet haben, widersprüchliche

Ergebnisse. Darunter ergibt sich für die *extensive disease* eine nicht signifikanter Unterschied in der Inzidenz für die mit Rituximab vorbehandelte Gruppe von 34% mit gleichem Ergebnis für die Vergleichsgruppe oder eine Inzidenz für die *extensive disease* bei mit Rituximab vorbehandelten Patienten von 36% versus 81% in der Vergleichsgruppe (130, 137). Beide angeführten Untersuchungen führten jedoch die Therapie mit Rituximab über den Zeitpunkt der Transplantation hinaus fort. Erwähnenswert ist, dass die vorliegende Auswertung einen nicht signifikanten Trend für ein späteres Auftreten der chronischen GvHD in der mit Rituximab vorbehandelten Patientengruppe mit 5,1 Monaten (Median) versus 9,9 Monate (Median) liefert. Folgt man der Argumentation für eine Rolle der B-Zelle in der Entstehung der Graft-versus-Host Erkrankung, so könnte hier eine durch vorangegangene Therapie mit Rituximab verursachte B-Zelllücke angeführt werden. Die Hypothese einer T-Zell-Aktivierung durch B-Zellen wäre durchaus denkbar. Im Mausmodell konnte die Aktivierung von T-Zellen durch antigenpräsentierende B-Zellen gezeigt werden (138). Zweifellos wäre eine direkte Übertragung der Verhältnisse zwischen murinen und humanen Verhältnissen auch in diesem speziellen Fall nicht angebracht. Jedoch sollten auch alternative Mechanismen der interzellulären Kommunikation zwischen B- und T-Zelle wie die Aktivierung über die Fc-Untereinheit oder mögliche Cytokinmuster Gegenstand von weiteren Untersuchungen sein.

Da Rituximab ein fester Bestandteil der Therapie von B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen ist und nur ein vergleichsweise geringer Anteil an Erkrankten in der Folge eine allogene Stammzelltransplantation benötigt, konnte diese Analyse nur retrospektiv angelegt sein. Aus ethischen Gründen hätte sich ein prospektives Studiendesign verboten, da Rituximab einen substantiellen Beitrag zu einer verbesserten Prognose bei oben genanntem Patientengut darstellt.

Abschliessend können folgende Schlussfolgerungen aus dem hier ausgewerteten Datenmaterial gezogen werden:

1. Eine Therapie mit Rituximab vor einer allogenen Stammzelltransplantation führt im Gegensatz zu einer Rituximabtherapie im Zusammenhang mit einer autologen Stammzelltransplantation nicht zu verlängerten Zytopenien.
2. Eine Therapie mit Rituximab vor einer allogenen Stammzelltransplantation hat nach den hier ausgewerteten Daten einen positiven Einfluss auf das Engraftment.
3. Eine Therapie mit Rituximab vor einer allogenen Stammzelltransplantation hat keinen Einfluss auf die Manifestation einer akuten oder chronischen GvHD.
4. Eine Therapie mit Rituximab vor einer allogenen Stammzelltransplantation hat keinen Einfluss auf das ereignisfreie Intervall oder die Gesamtüberlebensrate nach Transplantation.
5. Der mit einer GvHD einhergehende GvL-Effekt ist auch nach einer Rituximabtherapie vor allogener Stammzelltransplantation für eine Heilung von entscheidender Bedeutung.

### 5. Zusammenfassung

Die Behandlung mit Rituximab bei Patienten mit CD20<sup>+</sup>-B-Zell Lymphomen ist therapeutischer Standard, auch vor einer allogenen Stammzelltransplantation. Bemerkenswert erscheint jedoch die Aussage in zwei Publikationen der Ann Arbor Gruppe, die dem monoklonalen Antikörper eine signifikante Wirksamkeit bei der Behandlung der therapierefraktären cGvHD und einer damit verbundenen Zytopenie zusprechen. Bis heute ist jedoch nicht eindeutig geklärt, ob die Therapie mit Rituximab vor einer allogenen Stammzelltransplantation einen Einfluss sowohl auf die cGvHD als auch auf den GvL-Effekt hat. Desweiteren steht Rituximab im Verdacht, das leukozytäre Engraftment nach einer peripheren Stammzelltransplantation negativ zu beeinflussen. Da ein zügiges leukozytäres Engraftment jedoch von großer Bedeutung für die Vermeidung von schweren Komplikationen durch Infektionen darstellt, muss die Therapie mit Rituximab vor einer Stammzelltransplantation kritisch hinterfragt werden. Im Hinblick auf einen Einfluss von Rituximab auf die Inzidenz und den Verlauf einer cGvHD und das Engraftment untersuchten wir das Datenmaterial von Patienten mit malignen B-Zell Lymphomen und Zustand nach Stammzelltransplantation. In einem retrospektiven Vergleich zweier Patientengruppen [n=26], von denen eine mit Rituximab vor allogener Transplantation behandelt worden war [n=17], konnten wir feststellen, dass in der mit Rituximab vorbehandelten Gruppe sowohl das leukozytäre als auch das thrombozytäre Engraftment schneller erfolgten (11 Tage [range 1-18] vs. 15 Tage [range 12-20], p=0,025) und für beide Gruppen in der Inzidenz und Ausprägung der akuten oder chronischen GvHD keine signifikanten Unterschiede bestanden (aGvHD: 58,8% vs. 55,6%, p=0,72 und cGvHD: 52,9% vs. 44,4%, p=0,5). Auch fanden sich keinerlei Hinweise auf eine negative Beeinflussung des GvL-Effektes durch eine signifikant höhere *relapse*-Rate in der mit Rituximab vorbehandelten Patientengruppe. Daher schließen wir, dass die Behandlung mit Rituximab vor einer allogenen peripheren Stammzelltransplantation im bezug auf die hier untersuchten Parameter nicht nur unbedenklich, sondern sowohl für das leukozytäre als auch für das thrombozytäre Engraftment förderlich sein kann.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Maximov A. Der Lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschiedenen Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und im postfetalen Leben der Säugetiere. *Folia Haematologica* 8, 1909.
2. Ford CE, Micklem HS, Ogden DA. Evidence for the existence of a lymphoid stem cell. *Lancet* 1: 621-622, 1968.
3. Barnes DWH, Loutit JF. What is the recovery factor in spleen? *Nucleonics* 12: 68–71, 1954.
4. Thomas ED, Lochte HL, Cannon JH, Sahler OD, Ferrebee JW. Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *J. Clin. Invest.* 38: 1709–1716, 1959.
5. Mathé G, Amiel JL, Schwarzenberg L, Catton A, Schneider M. Adoptive immunotherapy of acute leukemia: experimental and clinical results. *Cancer Res.* 25: 1525–1531, 1965.
6. McGovern JJ, Russel PS, Atkins L, Webster EW. Treatment of terminal leukemic relapse by total-body irradiation and intravenous infusion of stored autologous bone marrow obtained during remission. *N. Engl. J. Med.* 260: 675–683, 1959.
7. Storb R, Rudolph RH, Thomas ED. Marrow grafts between canine siblings matched by serotyping and mixed leukocyte culture. *J. Clin. Invest.* 50: 1272–1275, 1971.

8. Thomas ED, Buckner CD, Rudolph RH, Fefer A, Storb R, et al. Allogeneic marrow grafting for hematologic malignancy using HL-A matched donor-recipient sibling pairs. *Blood* 38: 267-287, 1971.
9. Fliedner TM, Cronkite EP, Killmann SA, Bond VP. Granulocytopoiesis. II. Emergence and pattern of labeling of neutrophilic granulocytes in humans. *Blood* 24: 683-700, 1964.
10. McCredie KB, Hersh EM, Freireich EJ. Cells capable of colony formation in the peripheral blood of man. *Science* 171 (968): 293-294, 1971.
11. McCredie B, Freireich EJ, Hersh EM, Curtis JE, Kaizer H. Early bone marrow recovery after chemotherapy following the transfusion of peripheral blood leukocytes in identical twins. *Proc.Am.Assoc.CancerRes.* 11, 1970.
12. Morstyn G, Campbell L, Duhrsen U, Souza LM, Alton NK, Villeval JL, Nicola NA, Boyd AW, Kannourakis G, Cebon J. Clinical studies with granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) in patients receiving cytotoxic chemotherapy. *Behring Institute Mitteilungen* 83: 234-239, 1988.
13. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *The Immune System. Molecular Biology of the Cell. Third Edition ed.* New York: Garland Publishing, Inc., pp. 1195-1254, 1994.
14. Ottinger H, Müller C, Goldmann S, et al.. Second German consensus on immunogenetic donor search for allotransplantation of hematopoietic stem cells. *Annals of Hematology* 80:706-714, 2001.
15. Terstappen LWMM, Huang S, Safford M. Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+ CD38- progenitor cells. *Blood* 77: 1218-1227, 1991.

16. Mayani H, Landsdorp PM. Thy-1 expression is linked to functional properties of primitive hematopoietic progenitor cells from human umbilical cord blood. *Blood* 83: 2410-2417, 1994.
17. Kröger N. Indikation zur allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation. In: Kröger N ZA, ed. *Allogene Stammzelltherapie - Grundlagen, Indikationen und Perspektiven*. Bremen: UNI-MED SCIENCE, pp. 42, 2004.
18. Yanada M, Matsuo K, Suzuki T, Naoe T. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation as part of postremission therapy improves survival for adult patients with high-risk acute lymphoblastic leukemia: a metaanalysis. *Cancer* 106: 2657-2663, 2006.
19. Dahlke J, Kroger N, Zabelina T, Ayuk F, Fehse N, Wolschke C, Waschke O, Schieder H, Renges H, Kruger W, Kruell A, Hinke A, Erttmann R, Kabisch H, Zander AR. Comparable results in patients with acute lymphoblastic leukemia after related and unrelated stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 37: 155-163, 2006.
20. Sorrow ML, Maris MB, Sandmaier BM, Storer BE, Stuart MJ, Hegenbart U, Agura E, Chauncey TR, Leis J, Pulsipher M, McSweeney P, Radich JP, Bredeson C, Bruno B, Langston A, Loken MR, Al-Ali H, Blume KG, Storb R, Maloney DG. Hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning for advanced chronic lymphocytic leukemia. *Journal Of Clinical Oncology* 23 (16): 3819-3829, 2005.
21. van Besien K, Loberiza FR Jr, Bajorunaite R, Armitage JO, Bashey A, Burns LJ, Freytes CO, Gibson J, Horowitz MM, Inwards DJ, Marks DI, Martino R, Maziarz RT, Molina A, Pavlovsky S, Pecora AL, Schouten HC, Shea TC, Lazarus HM, Rizzo JD, Vose JM. Comparison of autologous and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for follicular lymphoma. *Blood* 102 (10): 3521-3529, 2003.

22. Alyea F, Weller E, Schlossman R, Canning C, Mauch P, Ng A, Fisher D, Gribben J, Freeman A, Parikh B, Richardson P, Soiffer R, Ritz J, Anderson KC. Outcome after autologous and allogeneic stem cell transplantation for patients with multiple myeloma: impact of graft-versus-myeloma effect. *Bone Marrow Transplantation* 32: 1145-1151, 2003.
23. Kroger N, Schwerdtfeger R, Kiehl M, Sayer HG, Renges H, Zabelina T, Fehse B, Togel F, Wittkowsky G, Kuse R, Zander AR. Autologous stem cell transplantation followed by a dose-reduced allograft induces high complete remission rate in multiple myeloma. *Blood* 100 (3): 755-760, 2002.
24. Stone RM, Sekeres MA. Acute myeloid leukemia. *Hematology. The American Society Of Hematology Education Program*: 98-117, 2004.
25. Stone RM. Optimizing treatment of chronic myeloid leukemia: a rational approach. *The Oncologist* 9: 259-270, 2004.
26. Weisdorf D, Haake R, Blazar B, Miller W, McGlave P, Ramsay N, Kersey J, Filipovich A. Treatment of moderate/severe acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation: an analysis of clinical risk features and outcome. *Blood*. 75 (4): 1024-1030, 1990.
27. Berno Heymer. *Clinical and Diagnostic Pathology of Graft-versus-Host Disease*. Springer. S. 43-78, 2002.
28. Glucksberg H SR, Fefer A et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HLA-matched sibling donors. *Transplantation* 18: 295-304, 1974.

29. Via CS, Rus V, Gately MK, Finkelman FD. IL-12 stimulates the development of acute graft-versus-host disease in mice that normally would develop chronic, autoimmune graft-versus-host disease. *Journal of Immunology* 153: 4040-4047, 1994.
30. Vogelsang GB, Lee L, Bensen-Kennedy DM. Pathogenesis and treatment of graft-versus-host disease after bone marrow transplant. *Annual review of medicine: selected topics in clinical sciences* 54: 29-52, 2003.
31. Milinkovic M, Antin JH, Hergueter CA, Underhill CB, Sackstein R. CD44-hyaluronic acid interactions mediate shear-resistant binding of lymphocytes to dermal endothelium in acute cutaneous GVHD. *Blood*. 103(2):740-742, 2004.
32. Badros A, Barlogie B, Siegel E, Cottler-Fox M, Zangari M, Fassas A, Morris C, Anaissie E, Van Rhee F, Tricot G. Improved outcome of allogeneic transplantation in high-risk multiple myeloma patients after nonmyeloablative conditioning. *Journal of Clinical Oncology* 20: 1295-1303, 2002.
33. Martin PJ, Schoch G, Fisher L, Byers V, Anasetti C, Appelbaum FR, Beatty PG, Doney K, McDonald GB, Sanders JE. A retrospective analysis of therapy for acute graft-versus-host disease: initial treatment. *Blood* 77: 1821-1828, 1991.
34. Storb R, Prentice RL, Buckner CD, Clift RA, Appelbaum F, Deeg J, Doney K, Hansen JA, Mason M, Sanders JE, Singer J, Sullivan KM, Witherspoon RP, Thomas ED. Graft-versus-host disease and survival in patients with aplastic anemia treated by marrow grafts from HLA-identical siblings: beneficial effect of protective environment. *New England Journal of Medicine* 308: 302-307, 1983.

35. Lee SJ, Zahrieh D, et al. Effect of up-front daclizumab when combined with steroids for the treatment of acute graft-versus-host disease: results of a randomized trial. *Blood* 104: 1559-1564, 2004.
36. Nash RA, Antin JH, Karanes C, Fay JW, Avalos BR, Yeager AM, Przepiorka D, Davies S, Petersen FB, Bartels P, Buell D, Fitzsimmons W, Anasetti C, Storb R, Ratanatharathorn V. Phase 3 study comparing methotrexate and tacrolimus with methotrexate and cyclosporine for prophylaxis of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation from unrelated donors. *Blood* 6: 2062-2068, 2000.
37. Chen ARS. What is new in supportive care after pediatric bone marrow transplantation: graft-versus-host disease therapy. *American Society of Clinical Oncology* 6:568-571, 2006.
38. Bolaños-Meade J, Jacobsohn DA, Margolis J, Ogden A, Wientjes MG, Byrd JC, Lucas DM, Anders V, Phelps M, Grever MR, Vogelsang GB. Pentostatin in steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *J Clin Oncol* 23(12):2661-8, 2005.
39. Wolff D, Roessler V, Steiner B, Wilhelm S, Weirich V, Brenmoehl J, Leithaeuser M, Hofmeister N, Junghanss C, Casper J, Hartung G, Holler E, Freund M. Treatment of steroid-resistant acute graft-versus-host disease with daclizumab and etanercept. *Bone Marrow Transplant* 35(10):1003-10, 2005.
40. [www.biologie.uni-hamburg.de/lehre/bza/1pma/1pmae.htm](http://www.biologie.uni-hamburg.de/lehre/bza/1pma/1pmae.htm)
41. Sun K, Welniak LA, Panoskaltsis-Mortari A, O'Shaughnessy MJ, Liu H, Barao I, Riordan W, Sitcheran R, Wysocki C, Serody JS, Blazar BR, Sayers TJ, Murphy WJ. Inhibition of acute graft-versus-host disease with retention of graft-versus-tumor effects by the proteasome inhibitor bortezomib. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(21):8120-8125, 2004.

42. Knop S, Hebart H, Gratwohl A, Kliem C, Faul C, Holler E, Apperley J, Kolb HJ, Schaefer A, Niederwieser D, Einsele H. Treatment of steroid-resistant acute GVHD with OKT3 and high-dose steroids results in better disease control and lower incidence of infectious complications when compared to high-dose steroids alone: a randomized multicenter trial by the EBMT Chronic Leukemia Working Party. *Leukemia* 21:1830-1833, 2007.
43. Mohty M, Kuentz M, Michallet M, Bourhis JH, Milpied N, Sutton L, Jouet JP, Attal M, Bordigoni P, Cahn JY, Boiron JM, Blaise D; Société Française de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire (SFGM-TC). Chronic graft-versus-host disease after allogeneic blood stem cell transplantation: long-term results of a randomized study. *Blood* 100(9):3128-34, 2002.
44. Flowers ME, Parker PM, Johnston LJ, Matos AV, Storer B, Bensinger WI, Storb R, Appelbaum FR, Forman SJ, Blume KG, Martin PJ. Comparison of chronic graft-versus-host disease after transplantation of peripheral blood stem cells versus bone marrow in allogeneic recipients: long-term follow-up of a randomized trial. *Blood* 100(2):415-419, 2002.
45. Sullivan KM, Shulman HM, Storb R, Weiden PL, Witherspoon RP, McDonald GB, Schubert MM, Atkinson K, Thomas ED. Chronic graft-versus-host disease in 52 patients: adverse natural course and successful treatment with combination immunosuppression. *Blood* 57(2): 267-276, 1981.
46. Shulman HM, Sullivan KM, Weiden PL, McDonald GB, Striker GE, Sale GE, Hackman R, Tsoi MS, Storb R, Thomas ED. Chronic graft-versus-host syndrome in man. A long- term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. *American Journal of Medicine* 69: 204-217, 1980.
47. Akpek G ZM, Piantadosi S et al. Development of a prognostic model for grading chronic graft-versus-host disease. *Blood* 97: 1219-1226, 2001.

48. Kataoka Y, Iwasaki T, Kuroiwa T, Seto Y, Iwata N, Hashimoto N, Ogata A, Hamano T, Kakishita E. The role of donor T cells for target organ injuries in acute and chronic graft-versus-host disease. *Immunology* 103: 310-318, 2001.
49. De Witt D, Van Mechelen M, Zanin C, Doutrelepont JM, Velu T, Gérard C, Abramowicz D, Scheerlinck JP, De Baetselier P, Urbain J. Preferential activation of Th2 cells in chronic graft-versus-host reaction. *Journal of Immunology* 150: 361-366, 1993.
50. Weinberg K, Blazar BR, Wagner JE, Agura E, Hill BJ, Smogorzewska M, Koup RA, Betts MR, Collins RH, Douek DC. Factors affecting thymic function after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 97: 1458-1466, 2001.
51. Beschorner WE, Tutschka PJ, Santos GW. Chronic graft-versus-host disease in the rat radiation chimera, I: clinical features, hematology, histology and immunopathology in long-term chimeras. *Transplantation* 33: 393-399, 1982.
52. Beschorner WE, Tutschka PJ, Santos GW. Chronic graft-versus-host disease in the rat radiation chimera, III: immunology and immunopathology in rapidly induced models. *Transplantation* 35: 224-230, 1983.
53. Via CS, Shearer GM. T-cell interactions in autoimmunity: insights from a murine model of graft-versus-host disease. *Immunology Today* 9: 207-213, 1988.
54. Gleichmann E PS, Rolink AG, Radaszkiewicz T, Gleichmann H. Graft-versus-host reactions: clues to the etiopathology of a spectrum of immunologic diseases. *Immunology Today* 5: 324-332, 1984.
55. De Witt D VMM, Zanin C et al. Preferential activation of Th2 cells in chronic graft-versus-host reaction. *Journal of Immunology* 150: 361-366, 1993.

56. Rus V, Svetic A, Nguyen P, Gause WC, Via CS. Kinetics of Th1 and Th2 cytokine production during the early course of acute and chronic murine graft-versus-host disease. Regulatory role of donor CD8+ T cells. *Journal of Immunology* 155: 2396-2406, 1995.
57. Shustov A, Nguyen P, Finkelman F, Elkon KB, Via CS. Differential expression of Fas and Fas ligand in acute and chronic graft-versus-host disease: up-regulation of Fas and Fas ligand requires CD8+ T-cell activation and IFN-gamma production. *Journal of Immunology* 161: 2848-2855, 1998.
58. Pere, S. Cytokines and chemokines in autoimmune disease: an overview. New York: Academic/Plenum Publishers, p. 1-7, 2003.
59. Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annual Review of Immunology* 16: 137-161, 1998.
60. Zhang Y, McCormick L, Desai SR et al. Murine sclerodermatous graft-versus-host disease, a model for human scleroderma: cutaneous cytokines, chemokines and immune cell activation. *Journal of Immunology* 168: 3088-3098, 2002.
61. Okamoto I, Kohno K, Tanimoto T et al. IL-18 prevents the development of chronic graft-versus-host disease in mice. *Journal of Immunology* 164: 6067-6074, 2000.
62. Koc S, Leisenring W, Flowers ME, Anasetti C, Deeg HJ, Nash RA, Sanders JE, Witherspoon RP, Storb R, Appelbaum FR, Martin PJ. Therapy for chronic graft-versus-host disease: a randomized trial comparing cyclosporine plus prednisone versus prednisone alone. *Blood* 100(1):48-51, 2002.

63. Sullivan KM, Witherspoon RP, Storb R, Deeg HJ, Dahlberg S, Sanders JE, Appelbaum FR, Doney KC, Weiden P, Anasetti C. Alternating-day cyclosporine and prednisone for treatment of high-risk chronic graft-versus-host disease. *Blood* 72:555-561, 1988.
64. Stewart BL, Storer B, Storek J, Deeg HJ, Storb R, Hansen JA, Appelbaum FR, Carpenter PA, Sanders JE, Kiem HP, Nash RA, Petersdorf EW, Moravec C, Morton AJ, Anasetti C, Flowers ME, Martin PJ. Duration of immunosuppressive treatment for chronic graft-versus-host disease. *Blood* 104(12):3501-3506, 2004.
65. Couriel DR, Saliba R, Escalon MP, Hsu Y, Ghosh S, Ippoliti C, Hicks K, Donato M, Giralt S, Khouri IF, Hosing C, de Lima MJ, Andersson B, Neumann J, Champlin R. Sirolimus in combination with tacrolimus and corticosteroids for the treatment of resistant chronic graft-versus-host disease. *British Journal of Haematology* 130: 409-417, 2005.
66. DR C. Special situations in the management of chronic graft-versus-host disease. *Blood and Marrow Transplantation Reviews* 12 (1): 12-14, 2002.
67. K H. Immunosuppression by thalidomid: implications for teratology. *Lancet* 1: 1136-1137, 1966.
68. Iyer CG, Languillon J, Ramanujam K et al. WHO co-ordinated short-term double blind trial with thalidomide in the treatment of acute lepra reactions in male lepromatous patients. *Bull. WHO* 45: 719-732, 1991.
69. Rajkumar SV. Current status of thalidomide in the treatment of cancer. *Oncology* 15: 867-874, 2001.
70. Sampaio EP, Kaplan G, Miranda A et al. The influence of thalidomide on the clinical and immunologic manifestation of erythema nodosum leprosum. *J. Infect. Dis.* 168: 408-414, 1993.

71. Hastings RC. Kellersberger Memorial Lecture: immunosuppressive/anti-inflammatory thalidomide analogues. *Ethiop. Med. J.* 18: 65-71, 1980.
72. Haslett PA, Corral LG, Albert M, Kaplan G. Thalidomide costimulates primary human T lymphocytes, preferentially inducing proliferation, cytokine production, and cytotoxic responses in the CD8+ subset. *Journal of Experimental Medicine* 187 (11): 1885-1892, 1998.
73. Vogelsang GB, Hess AD, Friedman KJ, Santos GW. Therapy of chronic graft-versus-host disease in a rat model. *Blood* 74: 507-511, 1989.
74. Vogelsang GB, Hess AD, Santos GW. Thalidomide for treatment of graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplantation* 3: 393-398, 1988.
75. Cole CH, Rogers PC, Pritchard S, Phillips G, Chan KW. Thalidomide in the management of chronic graft-versus-host disease in children following bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 14: 937-942, 1994.
76. Parker PM, Chao N, Nademanee A, O'Donnell MR, Schmidt GM, Snyder DS, Stein AS, Smith EP, Molina A, Stepan DE, Kashyap A, Planas I, Spielberger R, Somolo G, Margolin K, Zwingenberger K, Wilsman K, Negrin RS, Long GD, Niland JC, Blume KG, Forman SJ. Thalidomide as salvage therapy for chronic graft-versus-host disease. *Blood* 86: 3604-3609, 1995.
77. Smith EP, Sniecinski I, Dagens AC, Parker PM, Snyder DS, Stein AS, Nademanee A, O'Donnell MR, Molina A, Schmidt GM, Stepan DE, Kapoor N, Niland JC, Forman SJ. *Biol Blood Marrow Transplant* 4(1):27-37, 1998.
78. Gomes da Silva M, Neto L, Guimarães A, Machado A, Parreira A, Abecasis M. Long-term follow-up of lymphocyte populations and cellular cytokine production in patients with chronic graft-versus-host disease treated with extracorporeal photopheresis. *Haematologica* 90: 565-567, 2005.

79. Alcindor T, Gorgun G, Miller KB, Roberts TF, Sprague K, Schenkein DP, Foss FM. Immunomodulatory effects of extracorporeal photochemotherapy in patients with extensive chronic graft-versus-host disease. *Blood* 98: 1622-1625, 2001.
80. Pinton PC, Izzi T, Venturini M, Capezzer R, Zane C, Notarangelo LD. Prospects for ultraviolet A1 phototherapy as a treatment for chronic cutaneous graft-versus-host disease. *Haematologica* 88: 1169-1175, 2003.
81. Harada H, Huang N, Harada Y, Iwato K, Tanabe O, Tanaka H, Sakai A, Asaoku H, Kuramoto A. Phenotypic difference of normal plasma cells from mature myeloma cells. *Blood* 81 (10): 2658-2663, 1993.
82. Bubien JK. Transfection of the CD20 cell surface molecule into ectopic cell types generates a Ca<sup>2+</sup> conductance found constitutively in b lymphocytes. *The Journal of Cell Biology* 121 (5): 1121-1132, 1993.
83. Coiffier B, Briere J et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *New England Journal of Medicine* (346): 235-242, 2002.
84. Hiddemann W, Unterhalt M. Rituximab plus chemotherapy in follicular and mantle cell lymphomas. *Seminars of Oncology* 30: 16-20, 2003.
85. Raj K, Narayanan S, Augustson B, Ho A, Mehta P, Duncan N, Tauro S, Mahendra P, Craddock C, Mufti G. Rituximab is effective in the management of refractory autoimmune cytopenias occurring after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 35(3): 299-301, 2005.
86. Cartron G, Salles G, Solal-Celigny P, Bardos P, Colombat P, Watier H. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood* 99: 754-758, 2002.

87. Jazirehi AR et al. Cellular and molecular signal transduction pathways modulated by rituximab (rituxan, anti-CD20 mAb) in non-Hodgkin's lymphoma: implications in chemosensitization and therapeutic intervention. *Oncogene* 24: 2121-2143, 2005.
88. Eisenberg R et al. The therapeutic potential of anti-CD20. What do B cells do? *Clinical Immunology* 117: 207-213, 2005.
89. Ratanatharathorn V AL, Reynolds C, Silver S, Reddy P, Becker M, Ferrara JL, Uberti JP. Treatment of chronic graft-versus-host disease with anti-CD20 chimeric monoclonal antibody. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 9: 505-511, 2003.
90. Ratanatharathorn V CE, Reynolds C, Ayash LJ, Levine J, Yanik G, Silver SM, Ferrara JLM, Uberti JP. Anti-CD20 chimeric monoclonal antibody treatment of refractory immune-mediated thrombocytopenia in a patient with chronic graft-versus-host disease. *Annals of Internal Medicine* 133 (4): 275-279, 2000.
91. Cutler C MD, Kim HT, Treister N, Woo SB, Bienfang D, Klickstein LB, Levin J, Miller K, Reynolds C, Macdonell R, Pasek M, Lee SJ, Ho V, Soiffer R, Antin JH, Ritz J, Alyea E. Rituximab for steroid-refractory chronic graft-versus-host disease. *Blood* 108 (2): 756-762, 2006.
92. Voog E, Morschhauser F, Solal-Céligny P. Neutropenia in patients treated with Rituximab. *New England Journal of Medicine* 348 (26): 2691-2694, 2003.
93. Chaiwatanatorn K LN, Grigg A, Filshie R, Firkin F. Delayed-onset neutropenia associated with rituximab therapy. *British Journal Of Haematology* 121: 913-918, 2003.

94. Benekli M, Hahn T, Shafi F, Quereshi A, Alam AR, Czuczman MS, Bernstein ZP, Chanan-Khan AA, Becker JL, McCarthy Jr PL. Effect of Rituximab on peripheral blood stem cell mobiliation and engraftment kinetics in non-Hodgkin's lymphoma patients. *Bone Marrow Transplantation* 32: 139-143, 2003.
95. Cairoli R GG, Tedeschi A et al. High incidence of neutropenia in patients treated with rituximab after autologous stem cell transplantation. *Haematologica* 89: 361-363, 2004.
96. Lemieux B TS, Traulle C, Espinouse D, Thieblemont C, Bouafia F, Alhusein Q, Antal D, Salles G, Coiffier B. Rituximab-related late-onset neutropenia after autologous stem cell transplantation for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Bone Marrow Transplantation* 33: 921-923, 2004.
97. Kernan NA, Bartsch G, Ash RC, Beatty PG, Champlin R, Filipovich A, Gajewski J, Hansen JA, Henslee-Downey J, McCullough J. Analysis of 462 transplantations from unrelated donors facilitated by the National Marrow Donor Program. *New England Journal of Medicine*, 328:593-602, 1993.
98. Cutler C, Giri S, Jeyapalan S, Paniagua D, Viswanathan A, Antin JH: Acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic peripheral- blood stem-cell and bone marrow transplantation: a meta-analysis. *J Clin Oncol* 19:3685-3691, 2001.
99. Clift RA, Buckner CD, Appelbaum FR, Bearman SI, Petersen FB, Fisher LD, Anasetti C, Beatty P, Bensinger WI, Doney K: Allogeneic marrow transplantation in patients with acute myeloid leukemia in first remission: a randomized trial of two irradiation regimens. *Blood* 76:1867-1871, 1990.

100. Przepiorka D, Smith TL, Folloder J, Khouri I, Ueno NT, Mehra R, Korbling M, Huh YO, Giralt S, Gajewski J, Donato M, Cleary K, Claxton D, Braunschweig I, van Besien K, Andersson BS, Anderlini P, Champlin R: Risk factors for acute graft-versus-host disease after allogeneic blood stem cell transplantation. *Blood* 94:1465-1470, 1999.
101. Flowers ME, Pepe MS, Longton G, Doney KC, Monroe D, Witherspoon RP, Sullivan KM, Storb R: Previous donor pregnancy as a risk factor for acute graft versus-host disease in patients with aplastic anaemia treated by allogeneic marrow transplantation. *Br J Haematol* 74:492-496, 1990.
102. Champlin R, Ho W, Gajewski J, Feig S, Burnison M, Holley G, Greenberg P, Lee K, Schmid I, Giorgi I: Selective depletion of CD8+ T lymphocytes for prevention of graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 76:418-423, 1990.
103. Remberger M, Kumlien G, et al. Risk factors for moderate-to-severe chronic graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 8 (12): 674-682, 2002.
104. Przepiorka D, Anderlini P, et al. Chronic graft-versus-host disease after allogeneic blood stem cell transplantation. *Blood*: 1695-1699, 2001.
105. Atkinson K, Horowitz MM, Gale RP, et al. Risk factors for chronic graft-versus-host disease after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood* 75:2459-2464, 1990.
106. Bostrom L, Ringden O, Jacobsen N, Zwaan F, Nilsson BA. European multicenter study of chronic graft versus host disease: the role of cytomegalovirus serology in recipients and donors, acute graft-versus-host disease, and splenectomy. *Transplantation* 49:1100-1105, 1990.

107. Vogelsang GB. How I treat chronic graft-versus-host disease. *Blood* 97: 1196-1201, 2001
108. Marr KA, Carter RA, Boeckh M, Martin P, Corey L. Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: changes in epidemiology and risk factors. *Blood*. 100(13):4358-66, 2002.
109. Krüger W, Sobottka I, Stockschräder M, Mross K, Hoffknecht M, Rüssmann B, Horstmann M, Betker R, Zander A. Fatal outcome of disseminated candidosis after allogeneic bone marrow transplantation under treatment with liposomal and conventional amphotericin-B. A report of 4 cases with determination of the Mic values. *Scand J Infect Dis*. 28(3):313-6, 1996.
110. Essell JH, Thompson JM, Harman GS, Halvorson RD, Snyder MJ, Johnson RA, Rubinsak JR. Marked increase in veno-occlusive disease of the liver associated with Methotrexate use for graft-versus-host disease prophylaxis in patients receiving busulfan / cyclophosphamide. *Blood* 79 (10):2784-2788, 1992.
111. Enright H, Haake R, Weisdorf D, Ramsay N, McGlave P, Kersey J, Thomas W, McKenzie D, Miller W. Cytomegalovirus pneumonia after bone marrow transplantation. Risk factors and response to therapy. *Transplantation*. 55(6):1339-46, 1993.
112. Patriarca F, Skert C, Sperotto A, Damiani D, Cerno M, Geromin A, Zaja F, Stocchi R, Prosdocimo S, Fili' C, Fanin R. Incidence, outcome, and risk factors of late-onset noninfectious pulmonary complications after unrelated donor stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 33(7):751-8, 2004.
113. Gale RP, Horowitz M, Ash RC, Champlin RE, Goldman JM, Rimm AA, Ringden O, Stone JAV, Bortin MM. Identical twin bone marrow transplants for leukemia. *Annals of Internal Medicine* 120: 646-652, 1994.

114. Kolb HJ, Schmid C, Barrett AJ, Schendel DJ. Graft-versus-leukemia reactions in allogeneic chimeras. *Blood*. 103:767-776, 2004.
115. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb H-J, Rimm AA, Ringden O, Rozman C, Speck B, Truitt RL, Zwaan FE, Bortin MM. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 75: 555-562, 1991.
116. Kolb HJ, Goldman JM, Hertenstein B, Jacobsen N, Arcese W, Ljungman P, Ferrant A, Verdonk L, Niederwieser D, van Rhee F, Mittermuller J, de Witte T, Holler E, Ansari H. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood* 86: 2041-2050, 1995.
117. Ivanov R, Hol S, Aarts T, Hagenbeek A, Slager EH, Ebeling S. UTY-specific TCR-transfer generates potential graft-versus-leukaemia effector T cells. *British Journal of Haematology* 129: 392-402, 2005.
118. Bleakley M, Riddell SR. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nature Reviews Cancer* 4: 371-380, 2004.
119. Motyka B, Korbitt G, Pinkoski MJ, Heibein JA, Caputo A, Hobman M. Mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T-cell induced apoptosis. *Cell* 103: 491-500, 2000.
120. Kruger WH HR, Hertenstein B et al. Practices of infectious disease prevention and management during hematopoietic stem cell transplantation: a survey from the European group for blood and marrow transplantation. *J.Hematother.Stem Cell Res.* 10: 895-903, 2001.

121. Witzig TE VA, Habermann TM, Geyer S, Kurtin PJ, Friedenberg WR, White WL, Chalchal HI, Flynn PJ, Fitch TR, Welker DA. Rituximab therapy for patients with newly diagnosed, advanced-stage, follicular grade I non-Hodgkin's lymphoma: a phase II trial in the North Central Cancer Treatment Group. *Journal Of Clinical Onkology* 23 (6): 1103-1108, 2005.
122. Papadaki T SK, Stavroyianni N et al. Evidence for T-large granular lymphocyte-mediated neutropenia in Rituximab-treated lymphoma patients: report of two cases. *Leuk.Res* 26: 597-600, 2002.
123. Hoerr AL GF, Hidalgo J, Tiwari D, Blum KA, Mathews V, Adkins DR, Blum W, Devine S, Vij R, Goodnough LT, Dipersio JF, Khoury HJ. Effects of pretransplantation treatment with rituximab on outcomes of autologous stem-cell transplantation for non-Hodgkin's lymphoma. *Journal Of Clinical Onkology* 22 (22): 4561-4566, 2005.
124. Thiele J KH, Beelen DW et al. Relevance and dynamics of myelofibrosis regarding hematopoietic reconstitution after allogeneic bone marrow transplantation in chronic myelogenous leukemia-a single center experience on 160 patients. *Bone Marrow Transplantation* 26: 275-281, 2000.
125. Deeg HJ SK, casper J et al. Marrow transplantation from unrelated donors for patients with severe aplastic anemia who have failed immunosuppressive therapy. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 5: 243-252, 1999.
126. R C. T-cell depletion for allogeneic bone marrow transplantation: impact on graft-versus-host disease, engraftment, and graft-versus-leukemia. *J.Hematother.Stem Cell Res.* 2: 27-42, 1993.
127. Baron F SR. Allogeneic hematopoietic cell transplantation as treatment for hematological malignancies: a review. *Springer Semin. Immunopathol.* 26: 71-94, 2004.

128. Broers AE, van der Holt R, van Esser WJ, Gratama JW, Henzen-Logmans S, Kuenen-Boumeester V, Löwenberg B, Cornelissen JC. Increased transplant-related morbidity and mortality in CMV-seropositive patients despite highly effective prevention of CMV disease after allogeneic T-cell-depleted stem cell transplantation. *Blood* 95: 2240 – 2245, 2000.
129. Grigg A RD. Graft-versus-lymphoma effects: clinical review, policy proposals and immunobiology. *Journal of Blood and Marrow Transplantation* 10: 579-590, 2004.
130. Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM, et al. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood* 86: 2041-2050, 1995.
131. Kolb HJ. Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood* 112: 4371-4383, 2008.
132. Olsson R, Remberger M, Hassan Z, Omazic B, Mattsson J, Ringdén O. GVHD prophylaxis using low-dose cyclosporine improves survival in leukaemic recipients of HLA-identical sibling transplants. *Eur J Haematol.* 84(4):323-31, 2010.
133. Khouri IF LM, Saliba RM, Andersson B, Anderlini P, Couriel D, Hosing C, Giralt S, Korbling M, McMannis J, Keating MJ, Champlin RE. Nonablative allogeneic stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia: impact of rituximab on immunomodulation and survival. *Experimental Hematology* 32: 28-35, 2004.
134. Edwards JC, Szczepanski L, Szechinski J, Filipowicz-Sosnowska A, Emery P, Close DR, et al. Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 17;350(25):2572-81, 2004.

135. Leandro MJ, Cambridge G, Edwards JC, Ehrenstein MR, Isenberg DA. B-cell depletion in the treatment of patients with systemic lupus erythematosus: a longitudinal analysis of 24 patients. *Rheumatology (Oxford)* 44(12):1542-5, 2005.
136. Strand V, Balbir-Gurman A, Pavelka K, et al. Two-year improvements in physical function reflect sustained benefit in rheumatoid arthritis patients receiving a single course of rituximab and methotrexate. *EULAR* 2005.
137. Kebriaei P SR, Ma C, Ippoliti C, Couriel DR, de Lima M, Giralt S, Qazilbash MH, Gajewski JL, Ha CS, Champlin RE, Khouri IF. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation after rituximab-containing myeloablative preparative regimen for acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplantation* 38: 203-209, 2006.
138. Diaz-de-Durana Y MG, Bram RJ, Franco A. TACI-BLyS signaling via B-cell-dendritic cell cooperation is required for naive CD8+ T-cell priming in vivo. *Blood* 107 (2): 594-601, 2006.

## I. Anhang

### I.I Tabellen/Abbildungen

- Tab. 1:** Organspezifisches Grading der aGvHD
- Tab. 2:** Gesamt-Grading der aGvHD
- Tab. 3:** Wirkstoffe zur Prophylaxe und Therapie der aGvHD
- Tab. 4:** Seattle Klassifikation der cGvHD
- Tab. 5:** Stammdaten I
- Tab. 6:** Vorbehandlung
- Tab. 7:** Remissionsstatus
- Tab. 8:** Engraftment
- Tab. 9:** akute GvHD
- Tab. 10:** chronische GvHD
- Tab. 11:** Rituximab
- Tab. 12:** Stammdaten II
- Tab. 13:** CMV-Status
- Tab. 14:** Vorbehandlung
- Tab. 15:** Konditionierung
- Tab. 16:** Transplantation I
- Tab. 17:** Transplantation II
- Tab. 18 :** Rituximab
- Tab. 19:** Leukozytäres und thrombozytäres Engraftment
- Tab. 20:** Akute Graft-versus-Host Erkrankung
- Tab. 21:** Chronische Graft-versus-Host Erkrankung

- Abb. 1:** Leukozytäres Engraftment
- Abb. 2:** Thrombozytäres Engraftment I
- Abb. 3:** Thrombozytäres Engraftment II
- Abb. 4:** Thrombozytäres Engraftment III
- Abb. 5:** Wahrscheinlichkeit nicht an GvHD zu erkranken
- Abb. 6:** Gesamtüberlebensrate (Rituximab)
- Abb. 7:** Ereignisfreies Intervall
- Abb. 8:** Gesamtüberlebensrate (GvHD)

### I.II Abkürzungen

ADCC:	antibody dependent cell-mediated cytotoxicity
ALL:	acute lymphoblastic leukemia
AML:	acute myeloid leukemia
APC:	antigene presenting cells
ATG:	anti-thymocyte globuline
CD:	cluster of differentiation
CDC:	complement dependent cytotoxicity
CFU-GM:	colony forming units – granulocytes/macrophages
CLL:	chronic lymphocytic leukemia
CML:	chronic myeloid leukemia
CMV:	cytomegalovirus
CR:	complete remission
CTL:	cytotoxic T-lymphocytes
DLI:	donor lymphocyte infusion
EBV:	Epstein-Barr-virus
ECP:	extracorporeal photopheresis
G-CSF:	granulocytes – colony stimulating factor
GM-CSF:	granulocytes/monocytes – colony stimulating factor
GvHD:	graft-versus-host disease
GvL:	graft-versus-leukemia
HDC:	high-dose chemotherapy
HLA:	human leucocyte antigene
HvG:	host-versus-graft
IFN-:	interferon
IgM:	immunglobuline M
IL-:	interleukin
ITP:	idiopathic thrombocytopenic purpura
KIR:	killer Ig-like receptor
LPS:	lipopolysaccharide
MCP-	monocyte chemo-attractant protein

## Anhang

---

mHag:	minor histocompatibility antigene
MHC:	major histocompatibility complex
MPL-:	thrombopoietin receptor
NHL:	non-Hodgkin-lymphomas
NK:	natural killer cells
PD:	progressive disease
PR:	partial remission
RA:	rheumatoid arthritis
RIC:	reduced intensity chemotherapy
SLE:	systemic lupus erythematosus
TBI:	total body irradiation
TCR:	T cell receptor
TGF-:	transforming growth factor
Th-:	T helper cell
TNF- $\alpha$ :	tumor necrosis factor
WT-1:	Wilms tumour-1 protein

**I.IV Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Hamburg, den 11.06.2011

Patrick-Fabian Thomsen

### **I.V Danksagung**

Herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. W. Krüger für die Überlassung dieses Themas und die kritisch-anregenden Fragen und Anmerkungen. Gedankt sei auch den Schwestern der Poliklinik der Klinik C für ihr freundliches Entgegenkommen und ihre aufopfernde Arbeit am Patienten. Abschließend gilt ein herzlicher Dank meiner Frau Beata und meinen Eltern.