

Charité Centrum 14 für Tumormedizin
Medizinische Klinik III, Hämatologie, Onkologie und Transfusionsmedizin
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. E. Thiel, Campus Benjamin Franklin

Habilitationsschrift

Untersuchungen des hämatopoetischen Chimärismus nach der allogenen Stammzelltransplantation und Konditionierung mit reduzierter Intensität

zur Erlangung der venia legendi
für das Fach
Innere Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Dr. med. Igor Wolfgang Blau
geb. am 21. Mai 1960 in Moskau

eingereicht im Januar 2007

Dekan: Prof. Dr. M. Paul

1. Gutachter: Prof. Dr. R. Haas (Düsseldorf)

2. Gutachter: Prof. Dr. M. Freund (Rostock)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1. Die Hämatopoese: Entwicklung der Anschauungen, Bedeutung der Stammzelltheorie, Charakterisierung hämatopoetischer Stammzellen	6
1.2. Die Transplantation hämatopoetischer Stammzellen – Etappen in der Entwicklung und gegenwärtiger Stand	8
1.3. Die Bedeutung des HLA-Systems für die allogene Transplantation hämatopoetischer Stammzellen. Spenderauswahl	11
1.4. Die konventionelle Konditionierung und die Konditionierung mit reduzierter Intensität. Varianten, Indikationen, Verlauf und Komplikationen, Ergebnisse	15
1.5. Der hämatopoetische Chimärismus	19
1.5.1. Die Bestimmung der minimalen residuellen Erkrankung als Monitoring des Chimärismus nach HSCT	22
1.6. Komplikationen nach allogener Transplantation hämatopoetischer Zellen	23
1.6.1. Toxische Nebenwirkungen der Konditionierungstherapie	24
1.6.2. Infektiöse Komplikationen	25
1.6.3. Das Transplantatversagen, Rezidive der Grundkrankheit	27
1.6.4. Die Transplantat-gegen-Wirt Reaktion (GvHD)	28
1.7. Ziel der Arbeit	30
2. Material, Methoden und Patientencharakteristika	32
2.1. Patienten	32
2.1.1. Charakteristika der Patienten	32
2.1.1.1. Alter der Patienten	33
2.1.1.2. Malignitätsgrad der Erkrankungen	33
2.1.1.3. Zelltyp der Erkrankung	34
2.1.2. Transplantatcharakteristika	37
2.1.2.1. Transplantierte Zellen	37

2.1.3. Konditionierung	38
2.1.4. Prophylaxe und supportive Therapie	38
2.1.5. Gewinnung der Proben für den Chimärismus	39
2.2. Material	40
2.2.1. Chemikalien	40
2.2.2. Verbrauchsmaterialien	41
2.2.3. Technische Geräte	41
2.3. Methoden	42
2.3.1. Isolierung von Leukozyten	42
2.3.2. DNA-Extraktion	42
2.3.3. Bestimmung des DNA-Gehaltes	43
2.3.4. Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)	44
2.3.5. Agarose-Gelelektrophorese	46
2.3.6. Automatische Fluoreszenz-Fragment-Analyse	47
2.3.7. Chimärismus-Analyse	48
2.4. Statistische Methoden	49
3. Ergebnisse	51
3.1. Ergebnisse der Transplantation allogener Blutstammzellen nach Konditionierung mit reduzierter Intensität	51
3.1.1. Wiederherstellung der Zellularität im peripheren Blut (Engraftment)	51
3.1.2. Ergebnisse der Untersuchungen des Chimärismus	53
3.1.2.1. Ergebnisse der Untersuchungen des Chimärismus an Tag 30	53
3.1.2.1.1. Patienten mit einem Spender-Chimärismus von 100% an Tag 30	53
3.1.2.1.2. Patienten mit einem Spenderzell-Anteil von 95% an Tag 30	56
3.1.2.1.3. Patienten mit einem Spenderzell-Anteil < 95 % an Tag 30	57
3.1.2.2. Ergebnisse der Untersuchungen des Chimärismus an Tag 60	59

3.1.2.2.1. Patienten mit einem Spender-Chimärismus von 100% an Tag 60	59
3.1.2.2.2. Patienten mit einem gemischten Chimärismus an Tag 60	60
3.1.2.3. Ergebnisse der Untersuchungen des Chimärismus an Tag 100 und später	61
3.1.3. Inzidenz und Schwere der Komplikationen	61
3.1.3.1. Toxische Komplikationen	61
3.1.3.2. Akute und chronische GvHD	62
3.1.3.3. Rezidive und Transplantatversagen, Sekundärneoplasien	64
3.1.3.4. Überleben, Therapie bedingte Mortalität, Frühodesfälle	66
3.2. Ergebnisse der Transplantation allogener Blutstammzellen nach konventioneller Konditionierung	67
3.2.1. Wiederherstellung der Zellularität im peripheren Blut (Engraftment)	67
3.2.2. Ergebnisse der Untersuchungen des Chimärismus	68
3.2.3. Inzidenz und Schwere der Komplikationen	71
3.2.3.1. Toxische Komplikationen	71
3.2.3.2. Akute und chronische GvHD	73
3.2.3.3. Rezidive und Transplantatversagen	75
3.2.3.4. Überleben, Therapie bedingte Mortalität, Frühodesfälle	76
3.3. Statistische Analyse und Vergleich beider Gruppen	76
4. Diskussion	83
5. Zusammenfassung und Schlußfolgerungen	93
6. Literaturverzeichnis	95

Abkürzungsverzeichnis

AML	Akute myeloische Leukämie
ALL	Akute lymphatische Leukämie
BC	Blastenkrise der CML
CC	Kompletter Chimärismus
CD	Cluster der Differenzierung
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CML	Chronische myeloische Leukämie
CP	Chronische Phase der CML
CR	Komplette Remission
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FISH	Fluoreszenz in-situ Hybridisierung
G-CSF	Granulozyten stimulierender Faktor
GvHD	Graft-versus-Host Erkrankung
Gy	Gray
HLA	Humane leukozytäre Antigene
HSCT	Transplantation hämatopoetischer Stammzellen
HvG/HvL	Host-versus-Graft/Leukämie
KM	Knochenmark
MC	Gemischter Chimärismus
MNC	Mononukleäre Zellen
MRD	Transplantat vom verwandten Spender
MUD	Transplantat vom nicht verwandten Spender
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
OMF	Osteomyelofibrose
PB	Peripheres Blut
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PR	Partielle Remission
RIC	Konditionierung mit reduzierter Intensität
STR	Short Tandem Repeat (DNA-Fragment)
VOD	Venenverschlusskrankheit

1. Einleitung

1.1. Die Hämatopoese: Entwicklung der Anschauungen, Bedeutung der Stammzelltheorie, Charakterisierung hämatopoetischer Stammzellen

Blut und blutbildendes System sind als Gewebe untersucht und beschrieben und ihre Pathologie ist seit Virchow (Virchow, 1845) analysiert und zunehmend verstanden. Der Grund für diese frühen und tiefen Kenntnisse ist in der Verfügbarkeit des Gewebes zu suchen. Die blutbildenden Zellen können als Modell für Untersuchungen von proliferativen und Differenzierungs-Prozessen dienen, chromosomale Analysen am menschlichen Genom erfolgten primär an Blutzellen, Tumormarkergene wurden an Blutzellen erstbeschrieben (Nowell, 1960; Bloomfield, 1987). Heute diskutiert man die Potenz der Stammzellen der Hämatopoese: Die Plastizität dieser Zellen ermöglicht eine Differenzierung in verschiedenste Gewebe (Pauwelyn, Verfaillie, 2006).

Der Russe Maximow bestimmte in einer Vorlesung am Virchowschen Lehrstuhl in der Charité 1909 die blutbildende Stammzelle als kleine lymphozytenähnliche Zelle (Maximow, 1909). Schilling konnte in Rostock noch vor 1914 mit Hilfe der Färbung nach Pappenheim die Formel der Blutzellen, das Differentialblutbild beschreiben (Schilling, 1913). 1926 wurde erstmals die Knochenmarkpunktion am Sternum zur Diagnostik durch Arinkin in Leningrad in die klinische Praxis eingeführt und ist seither allgemein verbreitet und Grundlage der hämatologischen Diagnostik (Arinkin, 1929).

Mit der Entwicklung funktioneller Methoden in der experimentellen Hämatologie gelang der Nachweis der hämatopoetischen Stammzelle. Seit Mitte der 60er Jahre hat sich die Erforschung der Stammzellen durch die Entwicklung der in vitro Kulturmethode, die heute ebenso Grundlage der Stammzellforschung sind, beschleunigt (Pike, Robinson, 1971). Über die erste experimentelle Methode zum quantitativen und qualitativen Nachweis von murinen pluripotenten Stammzellen berichteten 1961 Till und McCulloch (Till, McCulloch, 1961). Hierbei werden letal bestrahlten Mäusen intravenös Knochenmarkzellen infundiert und es entstehen nach 10 Tagen in der Milz Kolonien aus vorwiegend erythrozytären und granulozytären Elementen. Werden diese Kolonien entnommen, suspendiert und erneut letal bestrahlten Mäusen infundiert, ist das gleiche Phänomen zu beobachten und nach einer gewissen Zeit kommt es zu einer vollständigen Rekonstruktion des hämatopoetischen

Systems. Die murinen pluripotenten Stammzellen werden aufgrund ihrer Eigenschaft, in der Milz Kolonien zu bilden, als CFU-S (colony forming unit - splen) bezeichnet.

1976 entwickelte Dexter zunächst im murinen und später im humanen System eine Langzeitknochenmarkzellkultur. Es handelt sich um eine in vitro Modellierung der Blutbildung (Dexter, Testa, 1976). 1979 berichteten Fauser und Messner erstmals über eine Kultivierungstechnik, bei der Kolonien mit megakaryozytären, erythroiden, granulozytären und später auch T-lymphozytären Elementen simultan nachgewiesen wurden (CFU-GEMM – colony forming unit granulocyte, erythrocyte, megakaryocyte, monocyte). Unter 100 mononukleären Knochenmarkzellen kann etwa eine CFU-GEMM nachgewiesen werden (Fauser, Messner, 1979).

Nach der Erstbeschreibung eines Kulturverfahrens zum Nachweis von murinen multipotenten Progenitorzellen (CFU-GM) in halbflüssigem Medium 1965, adaptierten Pike und Robinson 1970 das Agar-Bilayersystem an menschliche granulozytäre Stammzellen (Pike, Robinson, 1971). In Abhängigkeit vom Vorhandensein von Wachstumsfaktoren können im Agarsystem in seinen Modifikationen als Zweischicht- oder Einschichtsystem oder als System „flüssiges Medium – Agarschicht/Tropfen“, bzw. in Systemen, in denen Agar durch Methylcellulose ersetzt wird, verschiedene Zellen der normalen Hämatopoese kultiviert werden (Afanasjew et al., 1981).

Die Aufklärung der normalen Hämatopoese und der Regulation der Blutbildung steht im engen Zusammenhang mit den etablierten klonalen und nicht klonalen Kulturtechniken. Die klinische Anwendung der Kultivierung von blutbildenden Zellen aus dem Knochenmark oder aus dem peripheren Blut von Patienten ist nicht nur Grundlage für die Beurteilung der Prognose und die Behandlung hämatologischer Erkrankungen, sondern bei der Kultivierung von Zellen aus Transplantaten wesentliches Kriterium zur Einschätzung der Qualität und der Zahl der Stammzellen in diesen Präparaten.

Gleichzeitig bilden die vielfältigen Kulturmethoden Modelle für die Übertragung von hämatopoetischen Stammzellen und sind damit experimentelle Voraussetzung für die unterschiedlichen Modifikationen der Stammzell-Transplantation.

Neben Kulturmethoden dienen immunologische Methoden der Beschreibung der Stammzellen. Das Oberflächenantigen CD 34 hat sich als Marker für unreife hämatopoetische Zellen und damit als Stammzellmarker durchgesetzt. Es findet sich jedoch ebenso auf Progenitorzellen der Granulopoese und auf leukämischen Blasten (Bender et al., 1991). Ein

anderer Marker konnte bisher nicht bestimmt werden. Einige Autoren verweisen darauf, dass *die* hämatopoetischen Stammzellen zu einer mononukleären Zellpopulation zählen, die CD 34 und CD 38 negativ sind (Preffer et al., 2002). Andererseits ist allgemein anerkannt, dass die Zahl der CD 34 positiven Zellen bei der Transplantation hämatopoetischer Stammzellen am besten mit dem klinischen Verlauf nach Transplantation, insbesondere mit der Potenz zur Wiederherstellung der Blutbildung korreliert. Man bezeichnet daher das CD 34 Antigen, dessen Funktion jedoch nach wie vor unklar ist, als „Surrogat-Marker“ (CD34-cells).

Von Bedeutung bei der Einschätzung der Transplantatfunktion ist der Anteil immunologisch aktiver lymphatischer Zellen, die den weitaus größten Teil der mononukleären Zellen ausmachen (im Knochenmark und Leukapherisat $\geq 99\%$). Es handelt sich fast ausschließlich um T-Zellen. Die Beschreibung des Transplantates nach immunphänotypischen Merkmalen entspricht der internationalen CD Klassifikation (Knapp et al., 1989).

1.2. Die Transplantation hämatopoetischer Stammzellen – Etappen in der Entwicklung und gegenwärtiger Stand

Die allogene Transplantation hämatopoetischer Stammzellen von verwandten und nicht verwandten Spendern ist eine etablierte Methode der Behandlung verschiedener Erkrankungen des blutbildenden Systems. Das Prinzip der Therapie eines pathologischen Zustandes durch Ersatz des erkrankten Organs oder Gewebes hat bei Blutzellen und beim blutbildenden Organ, dem Knochenmark, schon seit langem Eingang in die klinische Praxis gefunden. Die Beschreibung der Blutgruppen durch Landsteiner 1900 (Landsteiner, 1901) legte die Grundlage für die erfolgreiche Substitution der roten Blutkörperchen, sei es bei Verlust durch starke Blutungen oder aufgrund ihrer verminderten Bildung. Die Thrombapherese ist heute die Grundlage für die Gewinnung der Blutplättchen von gesunden Spendern für Patienten, die einen Mangel daran haben und unweigerlich verbluten müssten.

Die Entwicklung der Polychemotherapie seit den sechziger Jahren des vorigen Jahrhunderts führte zu großen Erfolgen der Behandlung bei Leukämien und Lymphomen. Mehr als 90% der an akuter lymphatischer Leukämie erkrankten Kinder werden heute geheilt (Creutzig et al., 2005) ebenso wie Patienten, bei denen ein Morbus Hodgkin diagnostiziert werden muß (Schellong et al., 2005). Diese Ergebnisse werden nicht mit der Behandlung bei allen Tumorerkrankungen des hämatopoetischen Systems erreicht. Von erwachsenen, unter 60

Jahre alten Patienten, bei denen eine akute myeloische Leukämie diagnostiziert wurde, leben nach 3 Jahren 40 % nach intensiver Chemotherapie (Kern, Estey, 2006).

Seit in den siebziger Jahren die Knochenmarktransplantation in die klinische Praxis der Behandlung bei hämatologischen Erkrankungen Einzug hielt, ist die Zahl der transplantierten Patienten exponentiell gewachsen. In Europa wurden im Jahr 2003 etwa 20.000 Patienten transplantiert (Gratwohl et al., 2003). War man zunächst überzeugt, mit der Übertragung des Knochenmarks das notwendige biologische Prinzip für die Regeneration der Blutbildung in den Händen zu halten, weiß man heute, dass die übertragenen blutbildenden Stammzellen allein eine lebenslange Hämatopoese gewährleisten. Diese Stammzellen können sowohl im entnommenen und transplantierten Knochenmark enthalten sein, als auch aus dem peripheren oder dem Nabelschnurvenen-Blut gewonnen werden.

Bereits in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts gab es Bemühungen, Patienten mit Anämien mit Hilfe der Übertragung hämatopoetischer Zellen zu heilen (Josefson, 1934; Morrison, Samwick, 1940). Letztlich hat die Entwicklung der Atomwaffen und der entstehenden Nuklearindustrie in den 50er Jahren, nach Ende des 2. Weltkrieges die Forschungen deutlich beschleunigt. 1957 schrieb Thomas in einem Artikel, dass die Entwicklung der HSCT den Menschen „will be preparing for the atomic disaster of tomorrow, and it is high time that one did“ (Thomas et al., 1957). Es waren fast zwei Jahrzehnte intensiver Forschungstätigkeit erforderlich, bis von der ersten, langfristig erfolgreichen Transplantation gesunder hämatopoetischer Stammzellen nach vollständiger Zerstörung des blutbildenden Systems eines Patienten 1972 in *Lancet* berichtet werden konnte (Thomas et al., 1972). Ein 10jähriges Mädchen war an schwerer aplastischer Anämie erkrankt und erhielt nach Konditionierung mit einer einzeitigen Ganzkörperbestrahlung von 10 Gray das zeitgleich entnommene Knochenmark ihrer Zwillingschwester. Es kam zu einer Regeneration der Blutbildung nach etwa drei Wochen und die Patientin war geheilt. Diese erste erfolgreiche allogene (richtiger: syngene) Knochenmarktransplantation war Ergebnis einer jahrelangen Forschungsarbeit und von tierexperimenteller Untersuchungen an Hunden und Mäusen (Storb et al., 1971). Die Arbeiten des Nobelpreisträgers für Medizin und Physiologie von 1990, Donald Thomas und seiner Gruppe in Seattle am Fred Hutchinson Cancer Center waren Grundlage für die Entwicklung der HSCT ebenso wie neuere Impulse, die nach wie vor aus dem weltweit größten Transplantationszentrum kommen.

Auf der Grundlage der besseren Kenntnis der Histokompatibilität von Geweben mit der Entdeckung und Erforschung des HLA-Systems und der Entwicklung der

Nierentransplantation machte in der Folgezeit auch die allogene Knochenmarktransplantation rasche Fortschritte und bereits 1973 wurden erste klinische Daten zur Transplantation von Knochenmark von nicht verwandten HLA-kompatiblen Spendern veröffentlicht (Speck et al., 1973).

Unabhängig davon etablierte sich ebenso die autologe Knochenmarktransplantation bei Patienten, für die kein allogener Spender zur Verfügung stand und von denen gesunde Knochenmarkzellen asserviert werden konnten.

Zu einem Meilenstein in der Entwicklung der Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen wurde die Entdeckung, aus dem Blut Stammzellen in ausreichender Qualität und Quantität gewinnen zu können, um erfolgreich die Blutbildung bei Patienten nach myeloablativer Therapie in Gang zu setzen. Bereits seit den 60er und 70er Jahren forschten Ulmer Wissenschaftler an in vitro koloniebildenden Zellen aus dem peripheren Blut (Fliedner et al., 1976). Der Anteil dieser Zellen im Blut ist hundertfach geringer als im Knochenmark. Unter Normalbedingungen beim Gesunden ist die Zahl der Zellen, die mittels Apherese aus dem Blut gewonnen werden können zu gering, um die Blutbildung vollständig zu regenerieren. Die Beobachtung, dass bei jedem Anstieg der Leukozyten - beispielsweise im Rahmen einer Infektion – es zu einer vermehrten Ausschwemmung von Knochenmarkstammzellen in den peripheren Blutkreislauf kommt, wirkte sich revolutionierend auf die Entwicklung der HSCT aus. Bis zu 5% aller mononukleären Zellen des Blutes sind Stammzellen in dem Fall, wenn die Blutbildung nach einer konventionellen Chemotherapie, die zu einer Knochenmarkaplasie geführt hat, regeneriert. Diese Mobilisierung der Stammzellen kann ergänzend durch exogen zugeführte hämatopoetische Wachstumsfaktoren wie G- oder GM-CSF erfolgen, wodurch eine natürliche Leukozytose simuliert wird. 1986 konnte Körbling (Körbling et al., 1986) erstmals von der erfolgreichen Anwendung der autologen peripheren Blutstammzelltransplantation am Patienten berichten und 1995 publizierte Schmitz erste klinische Daten über die erfolgreiche Transplantation von allogenen Stammzellen, die aus dem peripheren Blut eines Geschwister-Spenders mittels Apherese gewonnen wurden (Schmitz et al., 1995).

Heute hat die Transplantation peripherer Blutstammzellen fast überall die konventionelle Knochenmarkübertragung abgelöst, auch wenn für spezielle Indikationen an der Transplantation von Knochenmarkstammzellen festgehalten wird, so zur Behandlung der aplastischen Anämie bei Kindern (Willasch et al., 2006). Die bessere Kenntnis des Prozesses des Anwachsens des Transplantats und der differenzierten Regeneration von Granulo-,

Erythro-, Thrombo- und Lymphopoese haben zur Modifizierung der begleitenden Medikation und insbesondere der Konditionierung und Immunsuppression geführt. Die Entwicklung der heute „Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen“ (haematopoietic stem cell transplantation – HSCT) genannten Therapiemodalität verläuft dynamisch. Es gibt in den letzten Jahren eine große Zahl von Neuerungen und Variationen, immunmodulatorische und immuntherapeutische Aspekte der Übertragung nicht autologer Blutstammzellen in den Vordergrund treten.

Die Hauptindikation für die allogene Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen sind maligne hämatologische Erkrankungen, die schwere aplastische Anämie (SAA), angeborene Immundefizienzzustände (severe combined immunodeficiency syndrom - SCID) und einige seltene metabolische Erkrankungen. Aktuell werden Patienten mit akuter myeloischer Leukämie in erster Remission (Hochrisikopatienten: Patienten mit chromosomalen Aberrationen außer inv16, t(8;21) und t(15;17)), Patienten in nicht erster Remission (Kern, Estey, 2006), Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie in 1. Remission (Hochrisikopatienten, z.B. mit Philadelphia-Chromosom) und in nicht erster Remission transplantiert (Wassmann et al., 2006). Patienten über 55 Jahre mit myelodysplastischen Syndromen, bei denen die HSCT die primäre therapeutische Maßnahme ist (List et al., 2004), gehören zu Transplantationskandidaten ebenso wie Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie (Dreger et al., 2005), Multiplem Myelom (Lee et al., 2003) und anderen Lymphomen (Nagler et al., 2000, Khouri et al., 1999).

Immer wieder wurden Patienten mit refraktären hämatologischen Neoplasien wurden hochdosiert konditioniert und transplantiert, wobei jedoch die Ergebnisse enttäuschend sind (Bensinger et al., 1996). Eine Dosis reduzierte Konditionierung wird bei Patienten mit akuten Leukämien diskutiert (Stelljes et al., 2005). Die Erweiterung höher dosierter Konditionierungsprotokolle durch radioaktiv markierte monoklonale Antikörper, ist für Patienten mit Non-Hodgkin Lymphomen aktuell beschrieben (Fietz et al., 2006).

1.3. Die Bedeutung des HLA-Systems für die allogene Transplantation hämatopoetischer Stammzellen, Spenderauswahl

Der Anwendung von Stammzellen allogener Spender zum Ersatz der zuvor abladierten Hämatopoese des Patienten setzt die Kenntnis der immunologischen Verträglichkeit des transplantierten Gewebes und des Empfänger-Gewebes voraus. So wie die Beschreibung der

Blutgruppen durch Landsteiner die Voraussetzung für eine begründete Erythrozytensersatztherapie ist (Landsteiner, 1901), so ist die Kenntnis des Systems der leukozytären Antigene des Menschen (HLA) Grundlage für die Transplantation von Geweben und Organen, im speziellen der hämatopoetischen Stammzellen. Durch die HSCT erfolgt neben dem Ersatz von Leuko-, Thrombo- und Erythrozytopoese der komplette Austausch der Immunzellen. Damit wird ein neues Immunsystem im Patienten etabliert.

Mit der Erforschung des HLA-Systems als Garant der immunologischen Einheitlichkeit des Individuums und als verlässlicher Feind jeglicher fremder Antigene mussten die klinisch tätigen Hämatologen erkennen, dass nur bei Identität der HL-Antigen-Strukturen die Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen erfolgreich sein kann. Es muss eine beidseitige Übereinstimmung vorliegen: sowohl in Spender-Empfänger- als auch in Empfänger-Spender-Richtung (graft versus host und host versus graft, GvH und HvG). Als Dausset 1957 (Dausset, Brecy, 1957) und van Rood 1958 (van Rood et al., 1958) die serologische Typisierung von HL-Antigenen der Klasse I – A, B und C – und der Klasse II – DR – beschrieben, war nicht klar, von welcher hervorragender Bedeutung diese Eiweißmoleküle für die klinische Anwendung sein würden. Heute kennen wir 123 serologische HLA-A, 272 serologische HLA-B und 155 serologische HLA-DRB1 Allele (Sanchez-Mana, 2002). Die auf dem Chromosom 6 kodierten Gene des Major-Histokompatibilitätskomplexes (MHC) sind inzwischen sequenziert und zeigen eine – wie nicht anders zu erwarten – scheinbar unbegrenzte Vielfalt: allein 2001 wurde von mehr als 100 neuen individuellen Gensequenzen berichtet (ebd.). Erst 1974 konnten Zinkernagel und Doherty (Zinkernagel, Doherty, 1974) den Zusammenhang von MHC und T-Zellen aufzeigen, die sogenannte MHC-Restriktion der T-Zellantwort: Die Erkennung eines HL-Antigens als eigen belässt die T-Zelle in einem inaktiven Zustand; die Präsentation von Antigenen erfolgt durch die Antigen präsentierenden Zellen (wie z.B. Makrophagen) mit Hilfe des HLA-Komplexes. Bei molekulargenetischer Untersuchung erwies sich die Vielfältigkeit des MHC als unerschöpflich. Mit Hilfe hochauflösender Methoden, wie mittels Sequenz-spezifischer Primer (SSP) oder Sequenz-spezifischer Oligonucleotide (SSO), kann höher differenziert werden, so dass insbesondere in der Klasse II heute in DRB1, DRB3, DRB4, DRB5, DPB1 und DQB1 unterschieden wird (Olerup, Zetterquist, 1992). Es erscheint heute notwendig, die DNA des MHC zu sequenzieren (Kotsch et al., 1999). Der Stellenwert der gewonnenen Erkenntnisse für die Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen ist nicht bestimmt. Serologisch identische HLA-A2 von nicht verwandten Menschen können Unterschiede im Genom verbergen - die molekulargenetische Analyse des entsprechenden MHC-Lokus kann

ein A0201 ebenso zeigen wie ein A0202. Aussagen zur Immunogenität des HLA-A2 sind bisher nicht abzuleiten. Der Austausch einer Aminosäure kann bedeutsam oder aber ohne jede Folge für die Antigenität sein. Immunologisch bedeutsame Differenzen werden gegenwärtig durch die klinische Analyse einer großen Zahl von Transplantationen (z.B. aus Spenderdateien) determiniert. Spender-Empfängerpaare, mit genau dieser Differenz in Gruppen zusammengefasst, werden analysiert. Die Studien stehen für die meisten Disparitäten im molekulargenetischen Bereich aus. Gut beschrieben und untersucht ist die klinische Relevanz für den HLA-Klasse II Locus DRB1 (Fleischhauer et al., 2006), ebenso führten klinische Ergebnisse zur Berücksichtigung des HLA-DQB1 bei der Spenderauswahl (Horn et al., 2006). Praxisrelevanz erlangt haben Daten, die den bisher umstrittenen negativen Einfluß von Disparitäten im C-Lokus auf des Gesamtüberleben dokumentieren (Tiercy et al., 2004). Die gleichen Studien zeigen, dass mit den Antigenen, die der MHC kodiert, allein keine ausreichende Erklärung für das Auftreten von immunologischen Konflikten in GvH und HvG Richtung gegeben werden kann. Entsprechend werden weitere immunologisch relevante Epitope auf der Zelloberfläche gesucht. Nachgewiesen wurde inzwischen, dass bei Mismatches im Minor-Histokompatibilitätskomplex Immunkonflikte zwischen Transplantat und Empfänger auftreten können (Vogt et al., 2002). Von besonderem Interesse sind erste Publikationen zur Bedeutung des KIR-Komplexes (killer cell inhibitor receptor) (Hsu et al., 2005). Kommt es mittels KIR-Ligand zu einer KI-Rezeptor-Aktivierung, sind die NK-Zellen inhibiert und es gibt keine GvH- oder HvG-Reaktion (ebd.). Nach HSCT sind über einen Zeitraum von Wochen bis Monaten die Lymphozyten des Spenders mit einem Anteil von 50 bis 100% durch NK-Zellen präsentiert (Mattson et al., 2001).

Die Ergebnisse, die durch die Verfeinerung der Methoden der Differenzierung der Antigene und ihrer Gen-Loci erlangt werden, zwingen regelmäßig zu einer Abgleichung der Daten mit den Erfordernissen und Erfahrungen der klinischen Anwendung. Ohne diesen stetigen Vergleich käme es zur Anhäufung eines Datenberges ohne praktische Relevanz.

Die Deutsche Gesellschaft für Immungenetik (DGI) hat 1999 und 2001 Empfehlungen für die Auswahl von Spendern hämatopoetischer Stammzellen nach den Ergebnissen der HLA-Typisierung veröffentlicht (Ottinger et al., 2001). Zunächst werden der Patient und alle Angehörige ersten Grades typisiert. Neben der Suche nach einem geeigneten Familienspender erfolgt dabei gleichzeitig eine biologische Bestätigung der Untersuchungsergebnisse durch die HLA-Testung über verschiedene Generationen (Eltern, Kinder, Geschwister). Da zum heutigen Zeitpunkt weltweit rund 8.000.000 freiwillige Spender in den Dateien registriert

sind, hat man sich 2001 in Deutschland darauf geeinigt, nur in Ausnahmefällen eine *erweiterte* Familienspendersuche zu beginnen. Werden im engen Familienkreis keine HLA-kompatiblen Spender gefunden, erfolgt eine erste Anfrage bei einem internationalen Spenderregister (z.B. Bone Marrow Donors Worldwide – BMDW, Leiden, Niederlande), wo die Spenderdaten aller Landesregister einfließen. Diese sogenannte vorläufige Suche (preliminary search) gibt Auskunft über die Wahrscheinlichkeit des Auffindens eines Spenders: Wieviele Spender mit den HLA-A,-B und –DR identischen Allelen sind weltweit bereits registriert? Sind identische Spender bereits registriert, erscheint die Suche sinnvoll und die transplantierende Klinik nimmt (Transplantationszentrum) als suchende Einheit (Suchzentrum – nicht zwingend eine Einrichtung) Kontakt mit dem Zentralen Knochenmarkspender-Register Deutschland (ZKRD) in Ulm auf. Das ZKRD startet auf schriftliche Anfrage die Suche (search). Diese beginnt regelmäßig mit einer HLA-Retypisierung des Patienten mittels hochauflösender molekularbiologischer Methoden (SSP, SSO, Sequenzierung) (Olerup, Zetterquist, 1992). Das ZKRD kontaktiert die Dateien, die HLA-identische Spender an das internationale Register (z.B. in Leiden) gemeldet haben. Die Dateien kontaktieren nun den Spender, der bei vorliegendem Einverständnis und nach internistischer Untersuchung (Ausschluß kardialer, autoimmuner, chronisch-infektiöser, maligner Erkrankungen) bestätigend HLA-typisiert wird (confirmatory typing – CT).

Bei unauffälligen Befunden und molekulargenetischer Übereinstimmung im MHC holt (nach Terminvereinbarung) ein Vertreter des Transplantationszentrums die Knochenmark- oder mobilisierten Stammzellen aus dem peripheren Blut vom entnehmenden Zentrum (Entnahmezentrum; Klinik, die im Auftrag der Spenderdatei das Transplantat entnimmt) ab. Die Entnahme erfolgt zum Zeitpunkt des Abschlusses der Konditionierung des Patienten; die Transportzeit darf 72 Stunden nicht überschreiten; die Zellen werden frisch transplantiert.

Bei der Auswahl der gesunden Spender zur allogenen Stammzelltransplantation hämatopoetischer Zellen werden neben den Merkmalen der Gewebetypisierung noch weitere Kriterien hinzugezogen. Die Spender sollten möglichst jung sein, jedoch über 18 Jahre, um über ein ausreichendes Stammzellpotential zu verfügen. Trotzdem scheinen auch Zellen älterer Spender – in der Literatur finden sich Berichte von Entnahmen bei über 70jährigen Spendern – über eine ausreichende Stammzellkapazität zu verfügen (Blau et al., 2006). Spender sollten gleichgeschlechtlich oder männlich sein. Jede Schwangerschaft führt bei der werdenden Mutter zu einem Fremdantigenkontakt und kann damit gegen HL-Antigene des Vaters sensibilisieren. Vorgezogen werden Spender, die keine Zytomegalievirusinfektion

(CMV) in ihrer Anamnese haben, das heißt bei denen CMV-IgG und -IgM negativ sind. CMV persistiert wie jedes Herpesvirus lebenslang in Zellen der Hämatopoese und führt zu schwerwiegenden Komplikationen im Verlauf der Transplantation und anschließend zu einem langwierig immundefizienten Status (Ljungman et al., 1998).

1.4. Die konventionelle Konditionierung und die Konditionierung mit reduzierter Intensität. Varianten, Indikationen, Verlauf und Komplikationen, Ergebnisse

Das Ziel der konventionellen Konditionierung, die direkt vor der Transplantation appliziert wird, ist die Eradikation der verbliebenen Hämatopoese des Empfängers, möglicher verbliebener maligner Zellen und eine ausreichende Suppression des Immunsystems des Empfängers, um das Anwachsen des Transplantates zu ermöglichen. Zwei von der Seattler Gruppe Anfang der siebziger Jahre etablierte Konditionierungsprotokolle werden verwandt: 1. die Ganzkörperbestrahlung (total body irradiation – TBI mit 10 Gy) und Cyclophosphamid 60mg/kg Körpergewicht an zwei Tagen (Thomas et al., 1975), 2. Busulfan (BU) und Cyclophosphamid (CY) werden kombiniert: 4 mg/kg BU jeweils an 4 aufeinanderfolgenden Tagen und anschließenden 50mg/kg CY (Santos et al., 1975), 60 mg/kg CY (Tutschka et al., 1987).

Empfohlen werden andere Zytostatika in Kombination mit TBI oder BU: Vepesid (Blume et al., 1987), Cytosin Arabinosid und Melphalan (van Besien et al., 2005).

Bei Patienten mit nicht malignen hämatologischen Erkrankungen, wie beispielsweise der schweren aplastischen Anämie (SAA), ist das Hauptziel der Konditionierung die Suppression der Empfängerimmunität als Voraussetzung für das Anwachsen der Spenderhämatopoese: CY 50mg/kg jeweils an vier aufeinanderfolgenden Tagen in Kombination mit Antithymozytenglobulin (ATG) (Storb et al., 1987). Für Patienten mit metabolischen Erkrankungen wird die Kombination BU/CY gewählt (Shaw et al., 1986).

In den 90er Jahren wurden Strahlen- und Chemotherapiedosen erhöht, um eine bessere Eradikation der malignen Grunderkrankung des Patienten zu erreichen (Clift et al., 1971). In zwei randomisierten Studien aus Seattle wurde gezeigt, dass die Erhöhung der Strahlendosis auf 15,75 Gy zu weniger Rezidiven führt und gleichzeitig aufgrund der hohen Toxizität mehr Früh Todesfälle beobachtet wurden (Clift et al., 1985). Bunjes koppelte radioaktives Rhenium an den monoklonalen Antikörper gegen CD 66 mit dem Ziel der Erhöhung der Strahlendosis

(Bunjes et al., 2002). Fietz publizierte 2006 erstmals eine Konditionierung, bei der der Isotopen markierte Antikörper CD 20 (Zevalin[®]) appliziert wurde (Fietz et al., 2006). Diese Varianten einer Strahlentherapie sind besser tolerabel und einige therapierefraktäre Patienten profitieren von der Behandlung.

Das Ziel, die verbleibenden Tumorzellen zu eliminieren ohne andere Organsysteme vital bedrohlich zu schädigen, kann durch das *Transplantat* erreicht werden. Unterschiedliche Gruppen untersuchten den Transplantat gegen Leukämie (Graft versus Leukemia - GvL) oder auch Transplantat gegen Tumor genannten Effekt (GvT) im Rahmen der GvH Reaktion. Dabei wurde zunächst tierexperimentell der Ansatz verfolgt, die konditionierende Chemo- und Strahlentherapiedosis möglichst niedrig zu halten; so niedrig, dass der suppressive Effekt auf das Empfängerimmunsystem erhalten bleibt und gleichzeitig die Toxizität der Konditionierung maximal gesenkt wird (McSweeney, Storb 1999). Die Kombination aus Immunsuppression mit Mycophenolat Mofetil und einer minimalisierten Ganzkörperbestrahlung mit 2 Gy ist im Tierexperiment eine erfolgreiche Konditionierung, die zum Anwachsen der caninen Stammzellen und zu einem kompletten Chimärismus im Verlauf führt (Storb et al., 1999). Andere Transplantationsgruppen modifizierten die Busulfan-Dosis (Slavin et al., 1998), reduzierten die Strahlendosis (Sandmaier et al., 2000), führten Fludarabin in die Konditionierung ein (Slavin et al., 1998; Carella et al., 2000) oder applizierten neue Formulierungen bekannter Präparate (intravenöses liposomales Busulfan) (Hassan et al., 1998). Damit wurden unterschiedliche Wege einer dosisreduzierten und verträglicheren Konditionierung beschritten. Neben streng nur immunologisch wirksamen und sicher *nicht myeloablativen* Konditionierungen gibt es Protokolle, die neuere *myeloablativ* Zytostatika zum Einsatz bringen. Die Transplantation allogener Stammzellen nach modifizierten nicht myeloablativen und myeloablativen Konditionierungen wird heute als Transplantation mit „reduced intensity conditioning“ (RIC) bezeichnet. Handelt es sich um myeloablativ Regimes, scheint es sinnvoll, den Begriff der Konditionierung mit reduzierter Toxizität zu etablieren (reduced toxicity conditioning).

Die wichtigste Folge dieser Entwicklung ist, dass die allogene Transplantation, deren Ziel die Kuration des Patienten ist, die Heilung von der Erkrankung, die vollständige Liquidation des malignen Zellklones, nun bei Patienten, die bisher nicht für die allogene Transplantation in Frage kamen, als Therapie angewandt wird (Banna et al., 2004; Shimoni et al., 2005). Durch die deutlich reduzierte Toxizität der RIC-Regimes, die sich in einer niedrigen Frühmortalitätsrate dokumentiert, können ältere Patienten über 55 Jahre, Patienten mit Begleiterkrankungen oder

Patienten nach multiplen Vortherapien transplantiert werden (Chakraverty et al., 2002). Patienten, deren Erkrankungen nicht heilbar waren, werden kurabel: Patienten mit chronischen lymphoproliferativen Erkrankungen wie der chronischen lymphatischen Leukämie, mit indolenten Lymphomen, mit Multiplen Myelom. Für andere Patientengruppen kann die RIC im Sinne einer Konsolidierung genutzt werden: bei hoch malignen Erkrankungen wie akuten Leukämien und aggressiven Non-Hodgkin- und Hodgkin-Lymphomen. Neue Optionen ergeben sich für Patienten, bei denen es bisher kaum Möglichkeiten einer über eine Symptombehandlung hinausgehenden Therapie gab: Myelodysplastische Syndrome in der Primärtherapie, Thallasämien und aplastische Anämien (Ho et al., 2004). Das bedeutet eine erhebliche Ausweitung der Therapieindikationen und der Patientenzahlen.

Die Etablierung der niedrigtoxischen Konditionierungen wurde durch einige neue Chemotherapeutika und Immunsuppressiva vorangetrieben. Fludarabin ist wegen seiner immunsuppressiven und milden zytostatischen Wirkung Bestandteil aller RIC-Protokolle seit 1998 (Khouri et al., 1998), unabhängig davon, ob es sich um myeloablative oder nichtmyeloablative Konditionierungen handelt (Slavin et al., 1998; Keating et al., 2001; Ho et al., 2004; Malladi et al., 2004; Schetelig et al., 2004). Neben seiner Aktivität gegen lymphoide Neoplasien (Keating et al., 1990), sind das günstige Toxizitätsprofil sowie seine immunsuppressiven Charakteristika, insbesondere die Anti-T-Zell Aktivität, hervorzuheben (Keating et al., 2001). Zusätzlich kommen neue, in der konventionellen Konditionierung nicht etablierte Alkylanzien zur Anwendung. Treosulfan (L-threitol-1,4-bis-methanesulfonate; Dihydroxybusulfan) ist ein bifunktionales alkylierendes Agens, das in der Therapie des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms etabliert ist (Masding et al., 1990; Gropp et al., 1998). Gut dokumentiert ist seine Aktivität gegen verschiedene solide Tumorerkrankungen, so das Aderhautmelanom (Keilholz et al., 2004). Die Hämatotoxizität der eskalierten Behandlung limitiert den konventionellen Einsatz (Harstrick et al., 1996). In vivo konnte eine antileukämische Wirksamkeit von Treosulfan demonstriert werden, wobei diese in equitoxischen Dosen vergleichbar mit Cyclophosphamid und Busulfan ist (Meinhardt et al., 2002; Topaly et al., 2002; Fichtner et al., 2003). Aktuelle Untersuchungen zeigen die hohe Effektivität von Treosulfan: gegen lymphatische und myeloische Zellen von akuten Leukämien wie auch gegen Myelomzell-Linien vom Menschen (Borgmann et al., 2000; Meinhardt et al., 2002;). Zudem ist die myeloablative Potenz von Treosulfan nachgewiesen (Westerhof et al., 2000). Bei Untersuchungen mit Einmalgaben und mit einer Aufspaltung der Dosis auf drei Gaben konnte die myeloablative Stammzelltoxizität mit der repetitiven Dosis

korreliert werden (Ploemacher et al., 2000; Scheulen et al., 2000). Aktuelle Publikationen zur Anwendung der eskalierten Therapiedosis vor autologer Transplantation bestätigen die Annahme einer niedrigen oder zu vernachlässigenden nicht hämatologischen Toxizität (Scheulen et al., 2000). Treosulfan wurde in zwei Protokollen vor autologer Stammzelltransplantation in bis zur fünffachen der konventionellen Dosis eskaliert; erst jetzt traten die Dosis limitierende Mucositis, Diarrhoe, Hautläsionen und Azidose auf (Baynes et al., 2000; Scheulen et al., 2000). Schwere Lebertoxizität, wie die Venenverschlußkrankheit (VOD), Nephrotoxizität, Neurotoxizität oder pulmonale Schädigungen wie bei anderen hochdosiert angewandten Zytostatika und alkylierenden Substanzen wie Busulfan, wurden in keiner der publizierten Studien mit hochdosiertem Treosulfan beobachtet (Casper et al., 2004). Die in der Konditionierung vor allogener Transplantation verwandte Treosulfandosis ist mit 36 bis 42 g/m² auf das vier- bis fünffache der konventionellen Dosis gesteigert, um maximal den antineoplastischen Effekt bei transplantationsbedingter Umgehung des stammzelltoxischen Effektes auszunutzen, bei minimalen nichthämatologischen Nebenwirkungen (Casper et al., 2004, Blau et al., 2006).

Wegen dieses Profils empfiehlt sich Treosulfan in alternativen Konditionierungsprotokollen und kann als typischer Vertreter der Transplantation nach RIC betrachtet werden.

Die Effektivität neuer Immunsuppressiva oder modifiziert dosierter Medikamente unterstützte die Etablierung der RIC. Ihr Einsatz wurde zum festen Bestandteil der Therapie und Prophylaxe der GvHD im Rahmen dieser Protokolle. Als solche finden gegenwärtig Mycophenolat Mofetil (Basara et al., 2000), Rapamycin (Benito et al., 2001) und Interleukin-2-Rezeptor (CD 25) - Antagonisten (monoklonale Antikörper Basiliximab und Daclizumab) Anwendung (Willenbacher et al., 2001; Schmidt-Hieber et al., 2005). Besonders Mycophenolat Mofetil ist in einer 2 g/d Dosierung von 2 g/d intravenös und äquivalent peroral etabliert (Kiehl et al., 2000). Nach Erkenntnis der besonderen Rolle der T-Zellen bei der Entwicklung der GvH- und HvG-Reaktionen (Zeis et al., 2001) wurden unterschiedliche Strategien zur Depletion von T-Zellen mit späterer Reinfusion von T-Zellen verschiedener Subpopulationen verfolgt (Meyer et al., 2006). Geprüft wird in Studien die Frage, ob die sequenziellen Infusionen von Spenderlymphozyten (Donor Lymphocyte Infusion – DLI) nach primärer Transplantation von CD 34 positiven selektionierten Stammzellen einen Einfluß auf die Transplantationsergebnisse haben. Der Einsatz von Antithymozytenglobulin (ATG) bei nicht verwandten Spendern (Basara et al., 2005) ist unbestritten und befindet sich bei der familiären Transplantation nach RIC in der Testung. Ungeklärt ist die Frage der effektiven

Dosis des ATG und der Auswahl des Präparates (vom Kaninchen oder vom Pferd gewonnen) (Casper et al., 2004).

1.5. Der hämatopoetische Chimärismus

Der Nachweis des Therapieerfolges, des Gelingens der Transplantation erfolgt über das Monitoring der Spenderhämatopoese. Zellen des Spenders besiedeln das Knochenmark des Patienten und proliferieren. Im Blut sind reife Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten nach einigen Tagen zu finden.

Der Begriff *Chimäre* entstammt der griechischen Mythologie. Die Chimäre war ein Mischwesen aus der Halbfrau Echidna und dem hunderköpfigen Schlangwesen Typhon. Sie bestand aus dem Kopf eines Löwen, dem Körper einer Ziege und dem Schwanz eines Drachens. In der Medizin wird der 1907 von Winkler eingeführte Begriff für einen Organismus verwandt, der Zellpopulationen von anderen Individuen der gleichen oder einer anderen Art enthält (McCann, Lawler, 1993). Ein Spontanchimärismus tritt bei zweieiigen Zwillingen auf, bei denen in der Embryonalphase ein Austausch hämatopoetischer Zellen erfolgt ist – es handelt sich um Blutchimären (*Blutgruppenchimären*) (Tippet, 1983). Im Bereich der Transplantationsmedizin wurde der Begriff 1956 zur Beschreibung von bestrahlten Mäusen, die allogene hämatopoetische Stammzellen erhalten hatten, eingeführt (Ford et al., 1956). Der Begriff des *gemischten* (mixed, MC) Chimärismus beschreibt eine Situation in der nach Transplantation sowohl Spender- als auch Empfängerhämatopoese nachweisbar sind; er wurde 1972 von Santos erstmals verwandt (Santos et al., 1972). Dem gegenüber spricht man von komplettem Spenderchimärismus (CC oder DC), wenn nur Zellen der Spenderblutbildung nachgewiesen werden können.

Es gibt eine Reihe von Möglichkeiten des Nachweises des Herkunftsorganismus der Blutzellen. Eine schon frühzeitig angewandte Methode zur Chimärismusbestimmung ist die Zytogenetik. Unproblematisch ist sie bei unterschiedlichem Geschlecht von Spender und Empfänger anzuwenden (Santos et al., 1972). Nach allogener Transplantation von Patienten mit akuter Leukämie, die durch chromosomale Marker charakterisiert sind, gelingt die Detektion eines MC mittels klassischer Zytogenetik (Hart et al., 1971). Heute ist die konventionelle Zytogenetik durch die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) ergänzt. Die Methoden sind immer dann anwendbar, wenn eine chromosomale Differenz zwischen Spender- und Empfängerhämatopoese vorliegt (Lapointe et al., 1996).

Petz verwandte zur Chimärismusanalyse die Bestimmung von Immunglobulinallotypen. Diese Methode hat sich nicht durchgesetzt (Petz et al., 1987).

Unbestritten erscheint die Methode, bei Nichtübereinstimmung der Blutgruppen von Spender und Empfänger den Blutgruppenchimärismus zur Beurteilung der Transplantatfunktion einzusetzen. Jedoch ist die Sensitivität dieser Untersuchung begrenzt und eine Aussage ist meist erst Monate nach Transplantation zu treffen (Petz et al., 1987; Frassoni et al., 1990).

1985 wurde die Restriktion von Fragmenten des linearen Polymorphismus (RFLP) mit einer Empfindlichkeit bis zu 5% an die Chimärismusanalyse adaptiert (Blazar et al., 1985). Die Sensitivität dieser Methode wird erhöht durch die Verwendung von Proben mit einer variablen Zahl von Tandem Repeats (VNTRs) auf etwa 1% (Min et al., 1988).

1995 wurden PCR Produkte mit Restriktionsenzymen auf FLPs untersucht (Socie et al., 1995), jedoch setzte sich auch diese Methode nicht durch. Mit einer Y-spezifischen PCR erreichte 1994 Petit eine Sensitivität von 0,01% (Petit et al., 1994).

Heute ist die PCR von VNTRs oder der sogenannten *short tandem repeats* (STR) Methode der Wahl. VNTRs und Minisatelliten sind repetitive DNA-Sequenzen mit einer Länge von 10-70 Basenpaaren (Jeffreys et al., 1988), während STRs und Microsatelliten eine Länge repetitiver DNA-Sequenzen von zwei bis fünf Basenpaaren haben (Weber et al., 1989). „Satelliten“ werden sie genannt, da sie sich außerhalb der eigentlichen DNA befinden und ein unterscheidbares Nucleotidmuster aufweisen. Von Craig-Holmes und Shaw wurden sie 1971 bereits *minor component* oder *satellite* genannt. Im Genom sind mehr als 50.000 Satelliten verteilt, meist in Heterochromatin-Regionen der Chromosomen (Craig-Holmes, Shaw, 1971). Ihre Funktion ist bis heute nicht geklärt. Sie sind polymorph und individuell hochspezifisch. Die VNTRs auf dem Chromosom 6, auf dem sich der MHC Komplex befindet, werden gegenwärtig hauptsächlich in der Diagnostik des Chimärismus herangezogen, unabhängig davon könnten andere VNTRs ebenso genutzt werden (Rothberg et al., 1997).

Die hohe Empfindlichkeit der Methode spielt heute eine besondere Rolle in der Bestimmung des frühen Chimärismus. Bereits nach einigen Tagen können Aussagen über das Engraftment getroffen werden, häufig bereits vor dem Erscheinen der ersten peripheren Blutzellen (Gleissner et al., 2001). Eine große Rolle spielt die Methode ebenso bei der Differentialdiagnose von Virusinfektion und HvG Reaktion. Einige Virusinfektionen (CMV, HHV 6 und 8, Parvo B 19) führen nach HSCT zu einer Transplantatinsuffizienz (Ljungman, 2002). Bereits geringste Mengen an Zellen mit ihrem genetischen Material reichen dann für

eine Chimärismusanalyse, die für eine Therapiestrategie Grundlage sein kann (Dubovsky et al., 1999; Bader et al., 2001).

Der Bestimmung des Chimärismus kommt nach HSCT mit RIC eine besondere Bedeutung zu, da nach RIC in einigen Fällen keine Aplasie beobachtet wird und deshalb eine eindeutige Abgrenzung von Spender- und regenerierender Empfänger-Hämatopoese nicht möglich ist. In publizierten Daten mit nicht myeloablativer Konditionierung im Tierexperiment wurde ein später gemischter Chimärismus beobachtet und erst langsam kam es zur Etablierung eines kompletten Chimärismus (Storb et al., 1999). In der Literatur über klinische Transplantationsergebnisse nach RIC wird ein verzögerter kompletter Chimärismus beobachtet (Sykes et al., 1999; Thiede et al., 1999). Andere Autoren verweisen auf die Bedeutung der Myeloablation für die Etablierung des kompletten Chimärismus (Bolinger et al., 2000). In jüngster Zeit erschienen eine Reihe Publikationen, die die Bedeutung der Chimärismusanalysen nach RIC deutlich werden lassen, so bei myeloproliferativen Syndromen (Kroeger et al., 2006) und bei niedrig malignen lymphatischen Erkrankungen (Sykes et al., 1999). Seine Rolle in der Rezidivbestimmung bei häufig extramedullär verlaufenden Erkrankungen (Multiples Myelom) ist eher begrenzt, da das extramedulläre Rezidiv nicht im Knochenmark oder peripheren Blut detektiert werden kann. Hilfreich und diagnostisch beweisend ist die Analyse zum Nachweis eines beginnenden Rezidivs einer hochmalignen Erkrankung wie der akuten myeloischen Leukämie oder eines transformierten myelodysplastischen Syndroms.

Nicht nur die Chimärismusanalysen des Gesamtknochenmarkes und peripheren Blutes sind Standardmethode nach HSCT und RIC, sondern auch die Bestimmung des Chimärismus von Subpopulationen gewinnt immer mehr an Bedeutung. Das Monitoring von verbliebenen Restzellen einer CLL mit Hilfe der Analyse innerhalb von selektierten CD 19 positiven Lymphozyten oder innerhalb der CD 34 positiven Zellfraktion bei sekundären myeloischen Leukämien ist keine Standardmethode. Was ein kompletter CD 34 Chimärismus ist, ist umstritten (Thiede et al., 2001). In der Literatur gibt es immer wieder Hinweise auf den Vorteil der Analyse des Chimärismus der Subpopulationen. Beschrieben wird die Korrelation zwischen einem gemischten T-Zell-Chimärismus und dem Auftreten einer GvHD (Socie et al., 1995).

1.5.1. Die Bestimmung der minimalen residuellen Erkrankung als Monitoring des Chimärismus nach HSCT

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung einer akuten Leukämie beträgt die Zahl der leukämischen Blasten mehr als 10^{12} . Mit dem Erreichen einer hämatologischen Remission werden im Knochenmark weniger als 5% Blasten gezählt; die normale Hämatopoese ist regeneriert. Dabei können noch immer absolut mehr als 10^{10} leukämische Zellen im Organismus des Patienten versteckt sein.

Von minimaler Resterkrankung (minimal residual disease – MRD) wird gesprochen, wenn Tumorzellen mit morphologischen Standardmethoden nicht nachgewiesen werden können, diese aber im Patienten zu erwarten sind. Unter den Methoden zum MRD-Nachweis, der nach der HSCT zur Beurteilung des Erfolges der Therapie, der Diagnosestellung eines Rezidives und der indirekten Einschätzung der Transplantatfunktion dient, haben molekulargenetische Analysen die größte Bedeutung erlangt.

Die konventionelle Zytogenetik ist eine Standardmethode zur Beurteilung der MRD nach HSCT. Die Diagnostik chromosomaler Veränderungen in malignen Zellen erlaubt eine Risikostratifikation der malignen Erkrankung (Bloomfield, 2003). Jedoch muss darauf verwiesen werden, dass die Sensitivität der Methode der morphologischen Analyse entspricht. Bei akuten Leukämien korreliert das Verschwinden einer Aberration meist mit der zytologisch diagnostizierten Remission. Der Nachweis eines aberranten Klonen trotz hämatologischer und knochenmarkzytologischer Remission belegt im Gegensatz dazu das Vorhandensein einer minimalen Resterkrankung. Therapie entscheidende Bedeutung hat die zytogenetische Analyse bei der Interferon- und Glivec®-Behandlung der chronischen myeloischen Leukämie, ebenso wie nach der allogenen HSCT (Baccarani et al., 2006).

In gleicher Indikation wird die konventionelle Zytogenetik durch die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) ergänzt (Hughes et al., 2006).

Immunologische Untersuchungsmethoden gehören ebenso zu den Standardverfahren der Beurteilung des Leukämieverlaufs, des Erfolges konventioneller Chemotherapien und der Hochdosistherapie mit HSCT (Langebrake et al., 2006). Die Sensitivität und Spezifität des Nachweises von Antigenstrukturen auf hämatopoetischen Zellen ist begrenzt. Die Kombination aus immunologischer Selektion der Zellen und molekulargenetischen Methoden zur Chimärismusedektion erscheint besonders sinnvoll (Mattson et al., 2001).

Molekulargenetische Methoden zur Bestimmung der MRD sind von besonderem diagnostischen Wert. Einerseits kann man über den Nachweis residueller leukämischer Gene, andererseits über Patienten-spezifische Gene zu einer Rezidivdiagnose gelangen (Bruggemann et al., 2006; Burmeister et al., 2006).

Das molekulargenetische Monitoring vor der Transplantation gilt der Auswahl der Patienten und ihrer Einordnung in Risikogruppen, der Nachweis von malignen Zellen nach Transplantation gilt der Entscheidungsfindung für weiterführende Immun- und/oder Chemotherapien, beispielsweise bei Patienten mit Myelodysplastischem Syndrom (Schmid et al., 2005). Das gilt für Translokationen bei Patienten mit akuten Leukämien ebenso wie für Patienten mit dem bcr-abl Transkripten bei chronischer myeloischer Leukämie (Maywald et al., 2006) oder akuter lymphatischer Leukämie (Gleissner et al., 2002; Wassmann et al., 2006). Für diese Patienten ist die Korrelation zwischen *molekulargenetischem Rezidiv* und klinisch relevantem, damit Therapie pflichtigen Wiederauftreten der Grundkrankheit in verschiedenen Untersuchungen gezeigt worden (Schmid et al., 2004).

1.6. Komplikationen nach allogener Transplantation hämatopoetischer Stammzellen

Patienten nach allogener Transplantation hämatopoetischer Stammzellen sind für lange Zeit - einige lebenslang - in einer Situation, die grundlegend ihre Gesundheit und damit die Lebensqualität beeinflusst. Die Folgen der vielfachen Chemotherapien der Patienten mit maligner Grundkrankheit, der Hochdosiskonditionierung und die Nebenwirkungen der langwierigen Immunsuppression bewirken eine Schwächung des Organismus und eine Störung vieler Organfunktionen (z.B. der Haut und ihrer Anhangsgewebe, der Geschlechtsorgane, des Verdauungssystems, des zentralen Nervensystems). Die entstandene immunologische Situation und das transplantierte neue Immunsystem bedingen bei den meisten Patienten den Zustand einer milden dauerhaften *Autoimmunerkrankung*. Die Krankheitsbilder, die unter diesen Bedingungen beobachtet werden, haben die Bezeichnung akute und chronische Graft-versus-Host Erkrankung (Transplantat-gegen-Wirt Erkrankung, GvH disease, GvHD).

1.6.1. Toxische Nebenwirkungen der Konditionierungstherapie

Die Folgen der myeloablativen Therapie konnten in den letzten Jahrzehnten abgemildert werden. Ein wichtiger Schritt zu besserer Verträglichkeit der TBI war die Einführung der Fraktionierung der Ganzkörperbestrahlung (Deeg et al., 1988). Akuten organotoxischen Reaktionen, wie beispielsweise der Cyclophosphamid-induzierten hämorrhagischen Zystitis, wird durch die Gabe von Mesna und durch andere prophylaktische Maßnahmen vorgebeugt, so dass sie nur noch selten auftreten. Kardiale Nebenwirkungen von Chemo- und Strahlentherapie, wie eine temporäre Herzinsuffizienz oder Herzrhythmusstörungen, werden beobachtet und können im Regelfall medikamentös beherrscht werden. Nur selten ist eine zeitweise Elektroimpulstherapie mit einem Schrittmacher, wie bei einem AV-Block III. Grades notwendig (Nakamae et al., 2004). Der akuten Entwicklung einer Lungenfibrose nach Strahlentherapie wird durch das Ausblenden der Lungen bei der TBI vorgebeugt, die maximal zulässige Lungendosis beträgt dabei 9 Gy; die Inzidenz einer Lungenfibrose nach TBI beträgt unter 1 % (Latini et al., 1991, Onozuka et al., 2005). Nierenfunktionsstörungen nach hochdosierten Chemotherapien sind nicht selten (Delgado et al., 2006), stellen jedoch keine Kontraindikation zur Transplantation dar. Eine Anpassung der Cyclophosphamiddosis bei einem Dialyse-Patienten z.B. ist nicht erforderlich (Bischoff et al., 1998). Die Häufigkeit einer Nierenersatztherapie nach myeloablativer Therapie erreicht 12 %, nach nichtmyeloablativer Konditionierung nur 3 %, wobei die Patienten signifikant älter und komorbider waren (Parikh et al., 2005). Die zeitweise Nierenersatztherapie bleibt ohne Einfluß auf das Gesamtüberleben der Patienten. Analysen zur Häufigkeit komplexer intensivtherapeutischer Maßnahmen mit maschineller Ventilation zeigten eine Inzidenz von maximal 15-40 %. Bei Multiorganversagen (Ersatztherapie von mehr als einem Organ) in Knochenmarkaplasie lag die Überlebenswahrscheinlichkeit vor fünf Jahren noch unter 3 %, hat jetzt allerdings 60 % bei pädiatrischen Patienten (Afessa et al., 2006; Kache et al., 2006) und 20% bei erwachsenen, nicht Katecholamin pflichtigen Patienten erreicht (Kex et al., 2006). Detaillierte Daten liegen für die Transplantation nach RIC noch nicht vor; die Inzidenz intensivmedizinischer Maßnahmen ist deutlich niedriger und die nicht Rezidiv bedingte unterschreitet 10% deutlich (Stelljes et al., 2005).

Eine besondere Komplikation nach Hochdosischemotherapie und insbesondere HSCT ist die Venenverschlusskrankheit der Leber (VOD – veno-occlusive disease). Nach Angaben einer großen retrospektiven Analyse der EBMT (Europäische Gesellschaft für Blut- und Knochenmarktransplantation) von 1998 liegt die Erkrankungshäufigkeit der VOD bei 5,3 %

nach allogener HSCT (Carreras et al., 1998). Andere Autoren geben eine höhere Krankheitsinzidenz an (Kröger et al., 2000). Pathophysiologisch handelt es sich um einen multifaktoriellen Prozess, dessen Ursache wahrscheinlich in einer Mikrothrombosierung der kleinen sublobulären Lebervenen zu suchen ist (Ho et al., 2004). Klinisch ist es ein dem Budd-Chiari-Syndrom analoger Zustand mit der symptomatologischen Triade: Schmerz im rechten Oberbauch, Ascites und Ikterus. Das klinische Bild entwickelt sich akut bis subakut. Risikofaktoren sind neben der Hochdosischemotherapie eine vorbestehende Lebererkrankung in der Anamnese und eine Transaminasenerhöhung vor Konditionierung (Carreras et al., 1993); andere Autoren konnten als Risikofaktor die langjährige Einnahme von Kontrazeptiva bei Frauen nachweisen (Wadleigh et al., 2003). Milde Formen der VOD sind therapeutisch beherrschbar, schwerere Formen haben eine schlechte Prognose. Therapieversuche mit Kortikoiden, Heparin, Prostaglandinen, N-Acetylcystein und Gewebsplasminogenaktivator und neuerdings Defibrotide sind publiziert (Corbacioglu et al., 2004), ihre Erfolgsaussichten begrenzt.

1.6.2. Infektiöse Komplikationen

In der panzytopenischen Phase direkt nach Transplantation sind bakterielle und mykotische Infektionen nicht selten und verlangen ein schnelles therapeutisches Handeln. Nach der Überwindung der Neutropeniephase bei fortbestehenden Defekten sowohl der humoralen als auch zellulären spezifischen Abwehr bleiben Infektionen eine häufige Komplikation (Viscoli et al., 1994). Nach allogener Transplantation hämatopoetischer Stammzellen entwickeln 70 % der Patienten dokumentierte Infektionen (Parody et al., 2006). Bodey bestätigt schon 1966 als wichtigsten Risikofaktor die Dauer und Ausprägung der Neutropenie und analysiert die Inzidenz der Infektionen (Bodey et al., 1966).

Nach Einführung der selektiven Darmdekontamination (SDD), die heute standardmäßig mit einem Gyrasehemmer erfolgt (Krüger et al., 2001) – andere Autoren addieren Metronidazol zur totalen Darmdekontamination, TDD (Beelen et al., 1999) – sind primäre Infektionen mit Gram-negativen Keimen eher die Ausnahme. Im Vordergrund stehen Septikämien mit Gram-positiven Erregern wie *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* und α -hämolisierenden Streptokokken (Buchheidt et al., 1999). Wichtigste Eintrittspforte für diese Keime sind die defekten Schleimhäute, eine Folge von Chemo- und Strahlentherapie. Die Inzidenz von bakteriellen Infektionen nach RIC ist insbesondere wegen des Fehlens der

Schleimhautschädigung im Vergleich zur konventionellen Transplantation deutlich zurückgegangen (Martino et al., 2001).

Fungale Infektionen nach allogener HSCT treten bei 10 – 30 % der Patienten auf (Strasfeld et al., 2006); meist handelt es sich um endogene Infektionen durch *Candida* oder *Aspergillus* spezies, die die spezifische Prophylaxe mit oralem Amphotericin B und/oder Azolen durchbrechen (Blau, Fauser, 1996). Die verminderten Inzidenzen der mykotischen Infektionen nach RIC können Folge des weniger ausgeprägten frühen Immundefektes sein. Die konsequente systemische Prophylaxe hat zusätzliche positive Effekte. Aufgrund des lange Zeit bestehenden T-Zell-Defektes sind virale und protozoale (*Pneumocystis carinii*, *Toxoplasma gondii*) Infektionen gefürchtete Komplikationen vorrangig in der späten Phase nach allogener Transplantation. Hier gibt es keine Unterschiede zwischen den Patienten nach konventioneller Transplantation und RIC (Lim et al., 2006). Neben Viren der Herpesgruppe (Herpes simplex 1 und 2, Herpes zoster, Humane Herpesviridea 6 und 8, CMV), die neben bekannter klinischer Manifestation wie der Gürtelrose generalisierte Krankheitsbilder mit Virusseptikämien (Reusser et al., 1998), Pneumonien und Enzephalitiden hervorrufen, gegebenenfalls bei Befall der hämatopoetischen Zellen zu einer Transplantatinsuffizienz führen, spielen auch andere Viren eine Rolle, auch wenn sie deutlich seltener auftreten (Parvo B19, das Papilloma Virus BK als Auslöser einer schweren hämorrhagischen Zystitis, Adenoviren). Der Nachweis von Hepatitis-Viren beim Patienten galt als Kontraindikation für die allogene HSCT. In einer ostasiatischen Analyse von Patienten, bei denen oder bei deren Spendern Hepatitis B Virus Antigen nachgewiesen wurde, war die Applikation von Lamivudin vor der Transplantation die entscheidende Voraussetzung für das Überleben der Patienten (Lin et al., 2005). Auch für Hepatitis C Virus Träger gilt die Therapie des Patienten mit Lamivudin vor Transplantation mit dem Ziel der Absenkung der Viruslast unter die molekulargenetische Nachweisgrenze als Bedingung einer erfolgreichen Transplantation.

Die *Cytomegalievirusinfektion* ist mit einer Inzidenz von 60-70 % bei seropositivem Empfänger oder Spender die häufigste infektiöse Komplikation nach allogener Stammzelltransplantation, unabhängig von der Konditionierung (Einsele et al., 1999). Die Erkrankung tritt bei Patienten auf, deren zelluläre spezifische Abwehr gestört ist und deshalb nicht nur nach Transplantation unter Immunsuppression, sondern auch nach Therapien, die zu ausgeprägten T-Zell-Defekten, bzw. T-Zell-Depletionen führen, wie nach Fludarabin oder ATG (Atkinson et al., 1989; Krause et al., 1997; Grigg et al., 1998) oder bei AIDS-Patienten.

Nur in seltenen Fällen kommt es bereits in der Neutropenie nach allogener Transplantation hämatopoetischer Stammzellen zu einer Reaktivierung der CMV. In der Pathogenese der Infektion spielen CD34 + hämatopoetische Stammzellen und Granulozyten eine wesentliche Rolle (von Laer et al., 1995).

Die konsequente Prophylaxe und präemptive Therapie bei strengem diagnostischen Monitoring durch Nachweis des pp65 Antigens oder mittels Genomnachweis der Cytomegalieviren haben in den letzten zehn Jahren zu einer deutlichen Reduzierung vital bedrohlicher Komplikationen und Verläufe der Infektion geführt (Einsele et al., 1995). Eine effektive Prophylaxe erfolgt durch die Auswahl CMV-seronegativer Spender, CMV-seronegativer Blutspender oder leukozytendepletierter Blutprodukte (besonders bei seronegativen Patienten) und die Kontaktvermeidung in der akuten Behandlungsphase sowie in der Posttransplantationsphase.

Die Frühintervention mit Ganciclovir in einer Dosierung von 10 mg/kg KG täglich in zwei Einzeldosen ist aufgrund der vitalen Bedrohung durch eine fortgeschrittene CMV-Infektion Standard (Schuler, Ehninger, 1992; Prentice et al., 1994). Eine Alternative, z.B. bei Ganciclovir-resistenten Cytomegalie-Stämmen, stellt Foscarnet (Foscavir[®]) dar. Die Gabe von Hyperimmunglobulin hat nicht eindeutig zu einer Verbesserung der Therapieergebnisse geführt (Reed et al., 1988; Ljungmann et al., 1998).

Die Rolle der neuen antiviralen Substanzen Cidofovir, Lobucavir und Benzimidavir 1263W94 sowie die zusätzliche Therapie mit virusspezifischen CTL-Klonen bleibt zu prüfen (Hebart et al., 1998; Reusser et al., 1998).

1.6.3. Das Transplantatversagen, Rezidive der Grundkrankheit

Das Rezidiv der malignen Grundkrankheit ist der wichtigste Grund für das Therapieversagen und die Mortalität in der Behandlung von Patienten mit Leukämie. Die Erweiterung der Therapieoptionen mit der Einführung und besonders mit der Verbesserung der Supportivmaßnahmen der allogenen HSCT ebenso die RIC haben die Letalität deutlich gesenkt, die Gefahr des Rezidivs bleibt jedoch unverändert aktuell (Vela-Ojeda et al., 2004, Barrett et al., 2006). Die Rezidivrate nach allogener HCST und konventioneller Konditionierung liegt unter 20 %, wenn die Patienten in frühen Erkrankungsstadien transplantiert werden (Valcarcel et al., 2005), nach allogener HSCT und RIC können bis zu 50

% der Patienten ein Rezidiv entwickeln. Damit gewinnt die Indikationsstellung in Abhängigkeit vom Erkrankungsstadium und der Aggressivität der Erkrankung eine besondere Bedeutung. Werden Patienten mit akuten Leukämien, die ein hohes Rezidiv-Risiko haben, transplantiert, kann eine Überlebenswahrscheinlichkeit von drei Jahren von 50 % bei einem Rezidivrisiko von 25 % nach konventioneller Konditionierung erwartet werden; nach RIC lag die Überlebenswahrscheinlichkeit bei 30 % und die Rezidivverwartung bei 60 %. Patienten mit Hochrisiko- und fortgeschrittenen Erkrankungen können von der RIC nicht profitieren (Mengarelli et al., 2002).

1.6.4. Die Transplantat-gegen-Wirt Reaktion (GvHD)

Die GvHD, eine besondere Komplikation nach allogener HSCT, beruht auf der Erkennung fremder Histokompatibilitätsantigene des Empfängers durch alloreaktive T-Zellen des Spenders (Ferrara et al., 2005). Noch 1966 definierte Billingham 3 Voraussetzungen für die Entstehung einer GvHD: a) das Transplantat enthält immunkompetente Zellen, b) der Empfänger wird als fremd erkannt und c) der Empfänger kann das Transplantat nicht abstoßen. Kolb, Thiel und andere haben in frühen Arbeiten die Formen der GvHD tierexperimentell untersucht (Billingham, 1967; Kolb et al., 1978). Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Komplikationen, die nach RIC seltener oder weniger schwer verlaufend beobachtet werden, tritt die GvHD mit gleicher Inzidenz, typischerweise meist jedoch später auf (Aoudjhane et al., 2005; Perez-Simon et al., 2005).

Pathophysiologisch kann die GvHD in drei Phasen gegliedert werden: Die afferente Phase der Antigenerkennung und T-Zellaktivierung, die Phase der Amplifikation mit einem Zytokin-Sturm, einer klonalen T-Zell-Proliferation und -Differenzierung und die Effektorphase der Gewebszerstörung. Die Haupteffektorzellen scheinen Makrophagen und NK-Zellen zu sein, T-Zellen induzieren und unterhalten den Prozeß. Heute ist die Rolle der Zytokine in der Immunpathophysiologie der GvHD belegt (Ferrara et al., 2006).

Klinisch entwickelt sich eine GvHD bei rund 85 % der Patienten nach allogener HSCT in Abhängigkeit vom Spendertyp, der Disparität der HLA-Antigene, der GvHD-Prophylaxe, der Konditionierung, des Alters und Geschlechtes von Spender und Patient, der Seropositivität für CMV beim Empfänger und der Zahl der transplantierten CD 34 positiven Zellen (Ferrara et al., 2005).

Die akute GvHD ist seit 1974 definiert als Ereignis der ersten 100 Tage nach Transplantation. Sie betrifft in erster Linie die Haut, die Schleimhäute des Gastrointestinaltrums und die Leber. Die Betroffenheit der Organe wird in Stadien (Stages 0-4) eingeteilt, diese summieren sich zu Schweregraden (I-IV). Die moderate bis schwere GvHD (II-IV) hat bedeutenden Einfluß auf das Überleben. Eine Untersuchung aus Seattle bei transplantierten Patienten mit aplastischer Anämie zeigt ein neunzigprozentiges Überleben bei akuter GvHD \leq Grad I, ein über sechzigprozentiges Überleben bei Grad II-IV (Glucksberg et al., 1974).

Die nach dem Tag 100 auftretende chronische GvHD äußert sich ähnlich einer Autoimmunerkrankung. Neben Haut (von Hyperpigmentierung bis schwerer Sklerodermie) und Schleimhäuten des Intestinums (Malabsorptionssyndrom, chronische Durchfälle) sind Schleimhäute anderer Organe betroffen: der Bronchien und Lungen mit dem klinischen Bild einer Bronchiolitis obliterans mit organisierender Pneumonie (BOOP), der Konjunktiven (Sicca-Syndrom). Bekannt ist die chronische GvHD der Leber (Autoimmunhepatitis oder biliäre Zirrhose). Jüngst wurden Ergebnisse eines Forschungsprojektes des US-amerikanischen *National Institute of Health* zur Ätiologie, Pathogenese, Klassifikation, zu dem klinischen Erscheinungsbild und der Therapie der chronischen GvHD umfassend dargelegt (Pavletic et al., 2006). Umstritten ist eine GvHD des nicht immunogenen Hirngewebes möglicherweise als Ausdruck einer generalisierten Angiitis (Padovan et al., 1999). Die chronische GvHD teilt sich je nach klinischer Einschätzung des behandelnden Arztes in eine begrenzte (*limited*, bei Hautmanifestation bis 25 % der Haut betroffen) und eine ausgedehnte (*extensive*) Form.

Die chronische GvHD ist assoziiert mit fehlender Immunrestitution und einer damit verbundenen Neigung zu Infektionen, die ihrerseits wiederum die GvHD triggern (Couriel et al., 2006). Als Risikofaktoren der chronischen GvHD sind identifiziert: das Alter des Patienten, das weibliche Geschlecht des Spenders für den männlichen Empfänger, die akute GvHD und eine chronisch myeloische Leukämie als Grunderkrankung (Pavletic et al., 2006).

Die beste Prophylaxe der chronischen GvHD ist die Verhinderung der akuten GvHD, denn die spät auftretende GvHD bleibt Hauptursache der hohen Morbidität und therapieassoziierten Mortalität nach allogener HSCT.

1.7. Ziel der Arbeit

Die allogene Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen ist eine etablierte Behandlungsmodalität maligner und einiger nicht maligner hämatologischer Erkrankungen. In der vorliegenden Arbeit werden die Ergebnisse von 107 Transplantationen bei Patienten mit akuten Leukämien, chronischen Leukämien, malignen Lymphomen und aplastischen Anämien vorrangig aus den Jahren 2002-2005 an der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Transfusionsmedizin, Medizinischen Klinik III des Campus Benjamin Franklin der Charité, Universitätsmedizin Berlin dargestellt.

Seit 2002 spielte die allogene Transplantation nach Konditionierung mit reduzierter Intensität eine zunehmende Rolle. Die Etablierung dieser Therapiemodalität sowohl bei Transplantationen von verwandten als auch nicht verwandten Spendern vollzog sich im Rahmen verschiedener Protokolle. Im Mittelpunkt der vorliegenden Analyse steht der Vergleich der Patientenkollektive und Behandlungsergebnisse nach konventioneller Konditionierung und nach Konditionierung mit reduzierter Intensität. Grundlage sind die klinischen Daten und die Ergebnisse der molekulargenetischen Analyse des Spenderchimärismus.

Analysiert wurden

1. die Unterschiede der Patientencharakteristika in beiden Gruppen,
2. die Regeneration der Hämatopoese vorrangig anhand der Leukozyten- und Thrombozytenparameter im peripheren Blut der Patienten,
3. der hämatopoetische Chimärismus in Blut und Knochenmark an den Tagen 30, 60, 100 und 180 und weiterhin jährlich für die Beurteilung des Engraftments, des Transplantatversagens und des Rezidives der malignen Grundkrankheit,
4. die Art, Häufigkeit und Schwere sowie die Therapie bei den Komplikationen nach allogener Transplantation in beiden Gruppen und
5. die Frühmortalität bis Tag 100, die therapierelevante Sterblichkeit und die Rezidivwahrscheinlichkeit in der Gruppe der Patienten nach konventioneller und intensitätsreduzierter Konditionierung.

Die Analyse dient dem Nachweises der Therapieeffektivität und der klinischen Sicherheit der Anwendung der allogenen Transplantation nach Konditionierung mit reduzierter Intensität an der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Transfusionsmedizin am CBF der Charité, Universitätsmedizin Berlin.

Es werden folgende Fragen beantwortet:

1. Wird mit Hilfe molekulargenetischer Methoden zum Nachweis des hämatopoetischen Chimärismus die Funktion des Transplantates adäquat dokumentiert? Gibt es hierbei Unterschiede nach RIC und konventioneller Konditionierung?
2. Ist das molekulargenetische Monitoring des hämatopoetischen Chimärismus im Verlauf nach RIC und konventioneller Konditionierung notwendig für die Diagnostik von Rezidiv und Transplantatversagen und lassen sich prognostische Aussagen hinsichtlich der Überlebenswahrscheinlichkeit treffen?
3. Unterscheiden sich die Komplikationen nach RIC und nach konventioneller Konditionierung? Haben RIC und konventionelle Konditionierung Einfluss auf das Gesamtüberleben und die Rezidivhäufigkeit?
4. Für welche Patienten besteht eine Indikation zur HSCT unter Konditionierung mit reduzierter Intensität und für wen die Indikation mit konventioneller Konditionierung? Gibt es Altersgrenzen für die unterschiedlichen Konditionierungen?
5. Kann die allogene HSCT nach RIC als Standardtherapieverfahren genutzt werden? Ist die Analyse des hämatopoetischen Chimärismus Voraussetzung für eine erfolgreiche Behandlung der Patienten?

Die vorliegende Arbeit reflektiert die aktuelle Entwicklung der allogenen Transplantation hämatopoetischer Zellen und beurteilt den Stellenwert molekulargenetischer Methoden in der Prognosierung von Rezidiv und Überlebenswahrscheinlichkeit nach Transplantation.

2. Material, Methoden und Patientencharakteristika

2.1. Patienten

In der vorliegenden Analyse wurden 107 Patienten erfasst. Zwischen 1. Mai 2001 und 15. März 2006 erhielten 52 Patienten (24 Frauen und 28 Männer) der Medizinischen Klinik III - Hämatologie, Onkologie und Transfusionsmedizin - des Campus Benjamin Franklin der Charité Berlin eine allogene HSZT mit intensitätsreduzierter Konditionierung. Zwischen August 1996 und März 2006 wurden 55 Patienten nach konventioneller Konditionierung (16 Frauen und 39 Männer) transplantiert.

Ein Teil der Patienten wurde in multizentrischen klinischen Studien behandelt. Der Aufklärungsbogen und die Einverständniserklärung der Patienten sowie die Genehmigung der Studien durch die Ethik-Kommission lagen vor.

2.1.1. Charakteristika der Patienten

Die Patienten mit unterschiedlichen hämatologischen Erkrankungen wurden über einen Zeitraum von maximal 10 Jahren beobachtet. Die mittlere Beobachtungsdauer lag bei 634 Tagen (8-3462 Tage) bei allen Patienten; nach RIC betrug die mittlere Beobachtungszeit 570 Tage (25-1464) und 694 Tage (8-3462) bei den Patienten nach konventioneller Konditionierung. 42% (45/107) aller Patienten erhielten das Transplantat von einem Familienspender, bei 58% (62/107) der Patienten war der Spender des Transplantats nicht mit dem Empfänger verwandt. Die Charakteristika der Patienten und der Spender sind in den Tabellen 1 bis 5 dargestellt:

Tabelle 1: Allgemeine Charakteristika der Patienten

<i>Charakteristika der Patienten</i>	<i>Anzahl der Patienten</i>	
	<i>nach RIC</i>	<i>nach konventioneller Konditionierung</i>
Alter (Jahre):	53 (18 – 72)	40 (17 – 64)
18-21 (17)	1 (2%)	5 (9%)
21-55	25 (48%)	45 (82%)
>55	26 (50%)	5 (9%)

Geschlecht:		
männlich (m)	28 (54%)	39 (71%)
weiblich (w)	24 (46%)	16 (29%)
Diagnosen:		
Multiples Myelom (MM)	11 (21%)	1 (2%)
Akute myeloische Leukämie (AML)/MDS	24/1 (48%)	17 (31%)
Akute lymphatische Leukämie	0	17 (31%)
Chronische lymphatische Leukämie (CLL)	7 (13%)	1 (2%)
Non-Hodgkin Lymphom (NHL)	5 (10%)	5 (9%)
Hodgkin-Lymphom (HL)	1 (2%)	0
Myeloproliferative Syndrome (OMF/CML)	1/2 (6%)	9 (16%)
Aplastische Anämie	0	5 (9%)
Quelle der hämatopoetischen Stammzellen:		
peripheres Blut (PB)	47 (90%)	52 (94%)
Knochenmark (KM)	5 (10%)	3 (6%)
verwandter Spender (MRD)	25 (48%)	17 (31%)
Unverwandter Spender (MUD)	27 (52%)	38 (69%)
Gesamt	52 (100%)	55 (100%)

2.1.1.1. Alter der Patienten

50% (26/52) der Patienten nach RIC und 91% (50/55) der Patienten nach konventioneller Konditionierung waren jünger als 55 Jahre. Das mittlere Alter der Patienten nach RIC betrug 53,1 Jahre (18-72 Jahre). In der Gruppe nach konventioneller Konditionierung lag das mittlere Alter bei 40 Jahren (17-64), wobei nur 5 der 55 (9%) Patienten gleich oder älter als 55 Jahre waren.

2.1.1.2. Malignitätsgrad der Erkrankungen

Die Erkrankungen der Patienten wurden gemäß dem Malignitätsgrad in eine Gruppe niedrig maligner und eine Gruppe hoch maligner Krankheiten eingeteilt. Das Multiple Myelom, die chronische lymphatische Leukämie, das Hodgkin-Lymphom und die myeloproliferativen Syndrome in chronischer Phase wurden den weniger malignen Erkrankungen zugerechnet. Die akute myeloische Leukämie und das aggressive bzw. sehr aggressive Non-Hodgkin-Lymphom wurden zu den hoch malignen Krankheiten gerechnet. 42% (22/52) der Patienten

nach RIC und 29% (16/55) Patienten nach konventioneller Konditionierung litten unter einer weniger malignen oder benignen Erkrankung (5 Patienten mit Aplastischer Anämie) und 58% (30/52) der Patienten nach RIC unter einer hoch malignen Erkrankung, während es in der Gruppe nach konventioneller Konditionierung die große Mehrheit war, nämlich 71% (39/55).

2.1.1.3. Zelltyp der Erkrankung

Die Erkrankungen der Patienten wurden dem lymphatischen bzw. dem myeloischen Zelltyp zugeordnet. Zu den lymphatischen Krankheiten zählen die chronisch lymphatische Leukämie, das Multiple Myelom, das Non-Hodgkin- und das Hodgkin-Lymphom. Zellen der akuten myeloischen Leukämie und des Myelodysplastischen Syndroms sowie der myeloproliferativen Syndrome wie der Myelofibrose und sowie der chronischen myeloischen Leukämie sind myeloischen bzw. undeterminierten Ursprungs. Ebenso handelt es sich bei der Aplastischen Anämie um eine Stammzellerkrankung. Demnach hatten 46% (24/52) der Patienten nach RIC und 44% (24/55) der Patienten nach konventioneller Konditionierung eine lymphatische Erkrankung. Bei 54% (28/52) der Patienten nach RIC und 47% (26/55) der Patienten nach konventioneller Konditionierung war eine myeloische Erkrankung diagnostiziert worden.

Tabelle 2: Klinische Charakteristika der Patienten, die mit reduzierter Intensität konditioniert wurden (BC: Blastenkrise, CR: Komplette Remission, PR: Partielle Remission, *Stadium der Erkrankung zum Zeitpunkt der HSZT)

Nummer	Patient	Alter	Geschlecht	Diagnose	Stadium der Erkrankung*	Art der Transplantation
1	A.A.	56	W	OMF	BC	MRD
2	A.A.	51	W	AML	2.CR	MUD
3	A.N.	38	W	AML	PR	MUD
4	A.P.	57	M	CLL	PR	MUD
5	A.V.	55	M	CLL	Refraktär	MUD
6	B.H.	45	W	AML	Rezidiv	MRD
7	B.I.	57	W	AML	1.CR	MRD
8	B.R.	48	W	AML	1.CR	MRD
9	D.E.	55	W	AML	1.CR	MRD
10	D.I.	52	W	NHL	2.CR	MRD
11	D.N.	38	M	AML	Refraktär	MRD
12	F.J.	42	W	CML	CP	MUD
13	F.N.	55	M	MM	PR	MRD
14	G.S.	64	W	MM	Refraktär	MRD
15	H.B.	59	M	AML	Rezidiv	MUD

16	H.M.	51	W	AML	1.CR	MUD
17	H.M.	61	M	CLL	Refraktär	MUD
18	H.R.	37	M	CLL	PR	MUD
19	H.W.	57	M	AML	1.CR	MUD
20	K.B.	65	W	AML	PR	MRD
21	K.D.	65	M	AML	1.CR	MUD
22	K.H.	72	M	AML	PR	MUD
23	K.S.	68	W	AML	PR	MUD
24	K.V.	53	M	MM	PR	MUD
25	L.I.	59	W	AML	1.CR	MRD
26	M.K.	55	M	AML	PR	MRD
27	M.K.	64	M	AML	PR	MRD
28	O.I.	61	W	AML	1.CR	MUD
29	O.M.	59	W	AML	1.CR	MUD
30	P.H.	65	W	AML	2.CR	MUD
31	P.P.	59	M	MM	1.CR	MRD
32	R.A.	46	M	MM	PR	MRD
33	R.P.	61	M	MM	PR	MRD
34	R.R.	41	W	NHL	1.CR	MUD
35	S.B.	56	M	MM	PR	MUD
36	S.B.	53	M	CLL	PR	MRD
37	S.C.	37	M	MDS	RA	MUD
38	S.C.	40	M	MM	PR	MRD
39	S.J.	49	M	NHL	Rezidiv	MRD
40	S.K.	23	W	HL	Refraktär	MUD
41	S.K.	63	W	AML	PR	MUD
42	S.M.	61	M	MM	PR	MRD
43	S.M.	54	W	CLL	PR	MUD
44	S.R.	58	M	MM	PR	MRD
45	S.V.	37	M	NHL	PR	MRD
46	S.V.	42	M	CLL	PR	MUD
47	S.W.	66	M	CML	BC	MUD
48	S.W.	60	M	AML	1.CR	MUD
49	W.A.	63	W	AML	2.CR	MUD
50	W.B.	66	M	AML	PR	MRD
51	Z.D.	44	M	MM	PR	MRD
52	Z.L.	18	W	NHL	1.CR	MRD

Tabelle 3: Klinische Charakteristika der Patienten, die konventionell konditioniert wurden
(BC: Blastenkrise, CR: Komplette Remission, PR: Partielle Remission, *Stadium der
Erkrankung zum Zeitpunkt der HSZT)

Nummer	Patient	Alter	Geschlecht	Diagnose	Stadium der Erkrankung*	Art der Trans- Plantation
53	A.M.	47	M	AML	PR	MUD
54	B.C.	41	W	AML	2.CR	MRD
55	B.D.	53	M	AML	PR	MUD
56	B.E.	61	M	CML	CP	MRD
57	B.M.	55	W	ALL	PR	MUD

58	B.T.	19	M	ALL	2.CR	MUD
59	C.F.	29	W	CML	CP	MRD
60	D.G.	44	M	CML	CP	MUD
61	D.G.	50	W	AML	1.CR	MRD
62	D.H.	42	M	CML	CP	MUD
63	D.M.	26	M	AML	Refraktär	MRD
64	D.M.	21	M	AA	Refraktär	MRD
65	D.W.	58	M	ALL	1.CR	MRD
66	E.C.	45	W	ALL	1.CR	MUD
67	E.M.	42	M	AA	PR	MUD
68	F.A.	39	W	ALL	Refraktär	MUD
69	F.C.	33	M	ALL	1.CR	MUD
70	F.S.	22	M	ALL	1.CR	MUD
71	G.C.	40	M	ALL	2.CR	MUD
72	G.M.	22	M	ALL	1.CR	MUD
73	G.M.	39	M	NHL	1.CR	MRD
74	G.R.	29	M	AML	Refraktär	MUD
75	H.A.	17	M	AML	Refraktär	MUD
76	H.B.	45	W	AML	1.CR	MUD
77	H.G.	27	M	ALL	1.CR	MUD
78	H.H.	32	M	AML	PR	MUD
79	H.R.	53	W	CML	BC	MUD
80	J.C.	41	M	NHL	PR	MUD
81	K.B.	55	M	AML	2. CR	MRD
82	K.C.	25	M	AA	PR	MUD
83	K.J.	19	M	ALL	Refraktär	MRD
84	K.M.	51	M	ALL	1.CR	MUD
85	K.R.	38	M	MM	PR	MRD
86	K.S.	24	M	AML	1.CR	MRD
87	L.K.	44	M	ALL	1.CR	MRD
88	L.M.	56	W	AML	1.CR	MRD
89	M.R.	45	M	AML	1.CR	MRD
90	M.Y.	58	M	ALL	2.CR	MUD
91	N.C.	41	W	CML	CP	MRD
92	N.M.	51	M	NHL	Refraktär	MUD
93	N.R.	51	W	AML	2.CR	MUD
94	P.N.	41	M	NHL	Refraktär	MUD
95	P.R.	44	W	CML	CP	MUD
96	R.L.	64	M	ALL	1.CR	MUD
97	R.V.	27	W	AML	1.CR	MUD
98	S.M.	43	W	NHL	2.CR	MUD
99	S.R.	47	M	ALL	2.CR	MUD
100	S.U.	40	M	CML	CP	MUD
101	T.F.	32	M	AML	Rezidiv	MUD
102	T.J.	30	M	AA	PR	MRD
103	T.S.	54	W	CLL	PR	MRD
104	V.A.	18	M	AML	1.CR	MRD
105	V.A.	48	W	ALL	1.CR	MRD
106	W.C.	37	W	AA	PR	MUD
107	W.P.	44	M	CML	CP	MUD

Tabelle 4: Geschlecht der Spender, deren Zellen nach RIC oder konventioneller Konditionierung transplantiert wurden

Geschlecht Spender	Anzahl	
	nach RIC	nach konventioneller Konditionierung
Männlich	29 (56%)	32 (58%)
Weiblich	23 (44%)	23 (42%)
Gesamt	52 (100%)	55 (100%)

Tabelle 5: Verhältnis von Spendern und Patienten in der Transplantation nach RIC oder konventioneller Konditionierung

Geschlecht Spender	Anzahl	
	nach RIC	nach konventioneller Konditionierung
männlicher Spender - männlicher Patient	17 (33 %)	24 (45%)
männlicher Spender - weibliche Patientin	12 (23%)	8 (14%)
weibliche Spenderin - männlicher Patient	11 (21%)	15 (27%)
weibliche Spenderin – weibliche Patientin	12 (23%)	8 (14%)
Gesamt	52 (100%)	55 (100%)

2.1.2. Transplantatcharakteristika

2.1.2.1. Transplantierte Zellen

10 % (5/52) der Spender wurde Knochenmark zur Transplantation nach RIC entnommen, 90 % (47/52) der Spender unterzogen sich einer Leukapherese und spendeten periphere Blutstammzellen. 3 von 55 Patienten (5,5 %) erhielten Knochenmarkstammzellen nach konventioneller Konditionierung, 52 Patienten dieser Gruppe wurden mit peripheren Blutstammzellen transplantiert. Die Menge der transfundierten Zellen ist in den folgenden zwei Tabellen aufgelistet.

Tabelle 6 : Transplantatcharakteristikum nach RIC

Art der Zellen:	Mittlere Anzahl der transfundierten Zellen:	minimale - maximale Anzahl der transfundierten Zellen
MNC	$6,523 \times 10^8$ /kg KG Empfänger	$0,7 - 16,9 \times 10^8$ / kg
CD 34+	$5,96 \times 10^6$ /kg KG Empfänger	$2,2 - 15,5 \times 10^6$ / kg
CD 3+	$2,73 \times 10^8$ /kg KG Empfänger	$0,1 - 20,4 \times 10^8$ / kg

Tabelle 7: Transplantatcharakteristikum nach konventioneller Konditionierung

Art der Zellen:	Mittlere Anzahl der transfundierten Zellen:	minimale - maximale Anzahl der transfundierten Zellen
MNC	9,1 x 10 ⁸ /kg KG Empfänger	0,95 - 35,2 x 10 ⁸ / kg
CD 34+	6,5 x 10 ⁶ /kg KG Empfänger	2,12 – 15,1 x 10 ⁶ /kg
CD 3+	2,89 x 10 ⁸ /kg KG Empfänger	0,2 – 10,1 x 10 ⁸ / kg

2.1.3. Konditionierung

42 Patienten erhielten 12 g/m² KO Treosulfan (Ovastat[®]) in einem Liter Elektrolytlösung von Tag -6 bis Tag -4 jeweils über 120 Minuten intravenös (i.v.) und von Tag -6 bis Tag -2 jeden Tag 30 mg/m² KO Fludarabin (Fludara[®]) in 250 ml Elektrolytlösung i.v. über 30 Minuten. Den Patienten mit nicht-verwandten Spendern wurde zusätzlich 7,5 mg/kg KG Antithymozyten-Globulin (Thymoglobulin[®]) täglich von Tag -4 bis Tag -2 i.v. verabreicht. 10 Patienten wurden mit 2 Gy am Tag 0 einzeitig am ganzen Körper bestrahlt, davon erhielten 3 zusätzlich ATG in obiger Dosis bei Transplantation von Stammzellen vom unverwandten Spender. 55 Patienten wurden konventionell konditioniert. Die meisten (44/55) Patienten erhielten Cyclophosphamid 60mg/kg KG an zwei Tagen und wurden mit 12 Gy am ganzen Körper an drei Tagen bestrahlt. Vier Patienten wurden mit Busulfan 16 mg/kg KG auf vier Tage verteilt und Cyclophosphamid 60mg/kg KG an zwei Tagen konditioniert. Sechs Patienten bekamen eine Konditionierung mit 200mg/kg KG Cyclophosphamid auf vier Tage verteilt. Ein Patient erhielt eine Therapie nach Melphalan (200mg/m² an 2 Tagen) und Fludarabin (30mg/m² an 5 Tagen) in Kombination mit Zevalin[®] (90Y-Ibritumomab-Tiuxetan) (Fietz et al., 2006).

2.1.4. Prophylaxe und supportive Therapie

Die GvHD-Prophylaxe bestand aus zwei Dosen Cyclosporin A (Sandimmun optoral[®]) (5 mg/kg KG i.v.) pro Tag, beginnend an Tag -1 bis zur Regeneration. In dieser Zeit sollte ein Zieltalspiegel von 200-250 ng/ml Blut aufrechterhalten werden. Falls keine GvHD über Grad I auftrat, wurde die Cyclosporin A-Dosis nach der Regeneration wöchentlich um jeweils 10% reduziert.

Zusätzlich erhielten die Patienten ab Tag -6 täglich eine Infektionsprophylaxe bestehend aus Levofloxazin (Tavanic[®]), Pavidon-Jod (Betaisodona[®]-Antiseptikum) und Amphotericin B (AmphoMoronal[®] Suspension). Zur Prophylaxe gegen Herpes-Viren nahmen die Patienten Aciclovir (Zovirax[®]) und zum Schutz vor einer Pneumocystis carinii-Pneumonie Trimethoprim (Cotrim forte[®]) ein. Bei positivem IgG gegen CMV wurden den Patienten prophylaktisch Ganciclovir (Cymeven[®]) und Immunglobulin (Flebogamma[®]) verabreicht.

Des Weiteren erhielten die Patienten Tropisetron (Navoban[®]) zur Antiemese, Allopurinol (Zyloric[®]) als Nierenschutz, Omeprazol (Antra[®]) zum Schutz des Magens und Heparin zur Prophylaxe einer venookklusiven Erkrankung. Bis zur Regeneration wurde den Patienten täglich G-CSF subkutan appliziert. Zusätzlich erfolgte von Tag +7 bis Tag +20 die Einnahme von Folsäure (Folsan[®]).

2.1.5. Gewinnung der Proben für den Chimärismus

Für jede Chimärismus-Analyse wurden den Patienten 10 ml EDTA-Blut und/oder 2 ml Knochenmark entnommen. Um die STR-Profile zu bestimmen, war es notwendig, jeweils eine Blutprobe von Spender und Empfänger vor der Transplantation zu untersuchen. Die weiteren Chimärismus-Analysen fanden an den Tagen +30, +60, +100 und +150 statt, anschließend alle 6 Monate oder bei klinischer Indikationsstellung.

2.2. Material

Zur Bestimmung der hämatopoetische Chimärismus waren eine Reihe materieller Voraussetzungen zu erfüllen.

2.2.1. Chemikalien

Tabelle 8: Verwendete Chemikalien

Produkt	Hersteller
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe D
Ammonium-Persulfat (APS)	Pharmacia Biotech, Uppsala S
<i>Aqua dest.</i> (steril)	Braun, Melsungen D
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt D
CTTv Allelic Ladder	Promega, Madison USA
CTTv 10XPrimer Mix	Promega
Ethanol	Baker, Deventer NL
Ethidiumbromid	Invitrogen
Fluorescent Ladder	Promega
γ STR Allelic Ladder	Promega
γ STR 10XPrimer Mix	Promega
Gold Taq-polymerase Kit	Roche, Basel CH
Invisorb Spin Cell Mini Kit	Invitek, Berlin D
Lyse-Puffer	
Hergestellt aus:	
1000 ml Aqua Spüllösung	Delta Select, Pfullingen D
8,29 g Ammoniumchlorid	Merck
1,00 g Kaliumhydrogencarbonat	Merck
0,3 g Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck
Marker X 174 RF DANN	Invitrogen
PBS-Lösung	Biochrom, Berlin D
Rapid Gel (6,0%)	USB, Cleveland USA
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Pharmacia Biotech
TBE-Puffer	Invitrogen

2.2.2. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 9: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Einmalhandschuhe (keimarm)	Kimberly-Clark, Roswell USA
Gel Loader Tips	Eppendorf, Hamburg D
Lens Cleaning Paper	Kodak, Rochester USA
Multi-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Corbett, Sydney AUS
Multi-Reaktionsgefäße (1,7 ml)	Roth, Karlsruhe D
Parafilm	Pechiney, Chicago USA
Pipettenspitzen für Universalpipette (steril)	Biozym, Hess D
Standardzentrifugenröhrchen (50 ml, PP; steril)	Sarstedt, Nümbrecht D
Universalpipette (verstellbare Volumina)	Eppendorf

2.2.3. Technische Geräte

Tabelle 10: verwendete technische Geräte

Gerät	Hersteller
CellDyn 3700	Abbott, Wiesbaden D
DNA Fragment Analyser, Version 1.2	Pharmacia Biotech
Drucker LX-800	Epson, Meerbusch D
Gefrierschrank (-25°C)	Bosch, Stuttgart D
Gelkammer Gel-Horizon 58	Gibco-BRL, Eggenstein D
Gene Amp PCR System 2400	Perkin Elmer, Boston USA
Gene Amp PCR System 9600	Perkin Elmer
Gene Quant II Spectrophotometer	Pharmacia Biotech
Gene Print Fluorescent STR System	Promega
Kühlschrank (4°C)	Bosch
Mikrowelle	Moulinex, Radolfzell D
Minishaker MS1	IKA, Stauffen D
Minishaker REAX 2000	Heidolph, Schwabach D
Minizentrifuge	Tomy Seiko Co, Tokyo J

Polaroid Camera Reprostar II	Camag, Muttenz CH
Präzisionswaage	Sartorius, Göttingen D
Wärmebad	Köttermann, Uetze D
Zentrifuge (Megafuge 1.0)	Heraeus, Hanau D
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf
Zentrifuge 5403	Eppendorf

2.3. Methoden

2.3.1. Isolierung von Leukozyten

Prinzip:

Die zur Chimärismus-Analyse benötigte DNA wird aus Leukozyten gewonnen. Dazu müssen diese Zellen zunächst aus der Blut- bzw. Knochenmarkprobe isoliert werden.

Durchführung:

Im ersten Arbeitsschritt mussten die Erythrozyten in der Blut- bzw. Knochenmarkprobe aufgelöst werden. Dazu wurde das Material in ein Standardzentrifugenröhrchen überführt. Es wurde bis 50 ml mit Lyse-Puffer aufgefüllt und für 20 Minuten auf Eis gelegt. Anschließend wurde die Probe 5 Minuten bei 2.000 Umdrehungen pro Minute (U/min) zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurde der Behälter bis 50 ml mit PBS-Lösung aufgefüllt und der Zentrifugationsvorgang wiederholt. Danach wurde erneut der Überstand abgegossen. Das am Boden befindliche Zellmaterial wurde in PBS-Lösung aufgenommen. Anschließend wurde die vorhandene Anzahl der Leukozyten mit dem Cell Dyn 3700 bestimmt.

Um ausreichend DNA für die Chimärismus-Analysen zu erhalten, sollten ca. 2 Mio. Leukozyten in der zu untersuchenden Probe vorhanden sein.

2.3.2. DNA-Extraktion

Prinzip:

Um die DNA für die Chimärismus-Analysen zu erhalten, muss diese aus den Leukozyten gewonnen werden.

Durchführung:

Zur Extraktion der DNA aus den Leukozyten wurde das Invisorb Spin Cell Mini Kit verwendet. Dieses enthält:

Tabelle 11: Bestandteile des Invisorb Spin Cell Mini Kit

Reagenzien:
Binding Buffer HL
Carrier Suspension B
Elution Buffer D
Lysis Buffer D
Wash Buffer
Materialien:
1,5 ml Receiver Tubes
2,0 ml Receiver Tubes
Spin Filter

Im ersten Arbeitsschritt wurde das Untersuchungsmedium für 5 Minuten bei 3.000 U/min zentrifugiert, so dass sich die zellulären Bestandteile am Boden ansammelten. Der Überstand wurde abgegossen. Zum Auflösen der Zellen wurde die Probe anschließend mit 500 µl Lysis Buffer für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 10 µl Carrier Suspension B und 200 µl Binding Buffer HL wurde das Material in die 2,0 ml Receiver Tubes mit Spin Filter umgefüllt und dann bei 12.000 U/min für 3 Minuten zentrifugiert. Nun folgten zwei Waschvorgänge mit jeweils 550 µl Wash Buffer. Anschließend wurden in jede Probe 200 µl auf 70°C erwärmtes *Aqua dest.* pipettiert. In diesem wurde sie für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgte eine erneute Zentrifugation bei 10.000 U/min für 3 Minuten.

2.3.3. Bestimmung des DNA-Gehaltes

Prinzip:

Um eine optimale Amplifizierung zu gewährleisten, sollten 0.5-5 ng DNA pro PCR-Reaktion in der Probe vorhanden sein (Thiede et al., 2001).

Durchführung:

Der DNA-Gehalt der Probe wurde mit dem Gene Quant II Spectrophotometer bei einer Absorption von 320 nm bestimmt.

2.3.4. Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Prinzip:

Die PCR ist ein molekulargenetisches Verfahren, bei dem *in vitro* selektiv bestimmte DNA-Abschnitte amplifiziert werden. Hierzu werden DNA-Polymerasen verwendet, die einzelsträngige DNA in einen Doppelstrang umwandeln können, wenn ihnen ein Primer, d.h. ein kurzes doppelsträngiges DNA-Stück, angeboten wird. Es werden zwei Primer benötigt, die nach Denaturierung der DNA jeweils an einen DNA-Strang binden. Damit sind die Startpunkte für die DNA-Polymerase festgelegt. Bei Vorhandensein der vier Desoxynukleotid-Triphosphate und Magnesium kann diese DNA-Polymerase nun durch Verlängerung der Oligonukleotide eine Doppelstrang-DNA herstellen. Nach diesem ersten Amplifikationszyklus werden die neugebildeten DNA-Stränge durch Anheben der Temperatur auf 90°C erneut denaturiert und dienen dann wieder als Matrize für die DNA-Polymerase. Nach n Zyklen ist die Zahl der Ausgangsmatrizen konstant geblieben, während die Zahl der amplifizierten DNA-Abschnitte auf $x \cdot n$ (n = Anzahl der Zyklen) angestiegen ist (Dingermann, 1999).

Für die DNA-Synthese hat sich der Einsatz einer hitzestabilen DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) bewährt (Saiki et al., 1988). Dieses Enzym ist bei Temperaturen bis zu 95°C stabil und hat ein Temperaturoptimum zwischen 70 und 80°C (Chien et al., 1976, Kaledin et al., 1980).

Durchführung:

Vor der Quantifizierung sollte die DNA-Lösung für 30 Minuten in einem 60°C warmen Wasserbad erwärmt werden, um eine Homogenität des Materials zu erreichen (Thiede et al., 2001). Für die PCR wurden ein Gold Taq-polymerase Kit und ein Primer Kit verwendet.

Aus den Komponenten dieser Kits wurde nach PCR-Protokoll ein Reaktionsgemisch mit einem Volumen von 22,5 μ l hergestellt. Zu dem Reaktionsgemisch wurden 2,5 μ l DNA hinzupipettiert, so dass die PCR in einem Endvolumen von 25 μ l erfolgte.

Tabelle 12: PCR-Ansatz

Reagenz	Menge [μl]
10xPCR Gold Buffer	2,5
Primer Mix	2,5
MgCl ₂ Solution	1,5
dNTP	0,5
AmpliTaq Gold 5U/ μ l	0,2
Aqua dest.	15,3
	22,5
DNA	2,5
Gesamtvolumen	25

Für die PCR wurden zwei Primer-Kits verwendet (CTTv und γ STR), welche simultan jeweils 4 STR-Loci amplifizieren. Diese STR und ihre Lokalisation auf dem Chromosom sind in der folgenden Tabelle aufgelistet:

Tabelle 13: Amplifizierte STR-Loci und ihre Lokalisation

STR-Locus	Chromosomale Lokalisation
Primer-Kit CTTv	
CSF1PO	5q33.3-34
TPOX	2p25.1-pter
TH01	11p15.5
Vwa	12p15.5
Primer-Kit γSTR	
D16S539	16q24-qter
D7S820	7q11.21-22
D13S317	13q22-q31
D5S818	5q23.3-32

Nach Zentrifugation der PCR-Ansätze wurde die PCR mit dem Gene Amp. PCR System 9600 durchgeführt. In der folgenden Tabelle ist das PCR-Protokoll dargestellt:

Tabelle 14: PCR-Protokoll

Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Anzahl Zyklen
Inkubation	95	2	
Denaturierung	94	1	
Hybridisierung der Primer	60	1	10
DNA-Synthese	70	1,5	
Denaturierung	90	1	
Hybridisierung der Primer	60	1	22
DNA-Synthese	70	1,5	

2.3.5. Agarose-Gelelektrophorese

Prinzip:

Zur Untersuchung der PCR-Produkte wird eine Gelelektrophorese durchgeführt. Hierbei werden die in der PCR amplifizierten DNA-Abschnitte gemäß ihres Gewichtes in einem Agarose-Gel aufgetrennt.

Durchführung:

Im ersten Arbeitsschritt wurden 0,3 g Agarose mit 30 ml TBE-Puffer (0,5%) gemischt und in der Mikrowelle auf ca. 100°C erhitzt. Anschließend wurde abgewartet, bis die Lösung auf ca. 50°C abgekühlt war und klar und homogen erschien. Dann wurden 1,5 µl Ethidiumbromid hinzupipettiert und die Lösung in die vorbereitete Gelkammer gefüllt. Nach 20 Minuten war das Gel gefestigt und der Kamm konnte entfernt werden. Die Gel-Kammer wurde mit TBE-Puffer aufgefüllt bis das Agarose-Gel vollständig bedeckt war. Je 5 µl DNA und 2 µl Bromphenolblau wurden in die Taschen des Gels hineinpipettiert. Zusätzlich wurde in eine Geltasche 5 µl Marker X174 RF DNA eingebracht. Nun wurde die DNA bei 150 V und 30 mA über einen Zeitraum von ca. 20 Minuten aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Auswertung mit Hilfe eines UV-Lichtschirmes. Durch das UV-Licht wurde das Ethidiumbromid angeregt, so dass die DNA-Banden sichtbar wurden. Um die Ergebnisse zu dokumentieren, wurden die Banden mit der im Lichtschirm integrierten Polaroid-Kamera fotografiert.

2.3.6. Automatische Fluoreszenz-Fragment-Analyse

Prinzip:

Zur Analyse der amplifizierten PCR-Produkte werden diese zunächst gemäß ihrer Größe mit Hilfe der Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend erfolgt die Analyse mittels einer geeigneten Software.

Durchführung:

Im ersten Schritt wurde 6%iges Polyacrylamidgel hergestellt. Dieses bestand aus folgenden Komponenten.

Tabelle 15: Bestandteile des Polyacrylamidgels (6%)

75 µl	Rapid Gel
450 µl	Ammonium Persulfat (APS)
45 µl	Tetramethylethyldiamin (TEMED)

Nach dem das Gel zwischen zwei Glasplatten gegossen wurde, konnten diese mit Klammern fixiert und der Kamm eingesetzt werden. Anschließend benötigte das Gel ca. 1,5 Stunden zur Polymerisation. In der Zwischenzeit wurde ein 6%iger Boratpuffer hergestellt. Dieser bestand aus 120 ml TBE-Puffer, der bis zu einem Volumen von 2 Liter mit destilliertem Wasser aufgefüllt wurde. Nach Erstarren des Gels wurden die Glasplatten in die Elektrophoresekammer des Gene Print Fluorescent STR Systems eingesetzt. Beide Puffertanks wurden mit Boratpuffer gefüllt. Anschließend konnte der Kamm entfernt werden. Um die PCR-Produkte für die Gelfragment-Elektrophorese vorzubereiten, wurden jeweils 2 µl der Probe mit 4 µl Loading dye gemischt. Hierbei ist es nötig, nach jedem Arbeitsschritt die Handschuhe zu wechseln, um Kontaminationen zu vermeiden. Anschließend wurden die Produkte für 4 Minuten bei 95°C im Gene Amp PCR System 2400 denaturiert.

1,5 µl der so vorbereiteten PCR-Produkte wurden dann in die Taschen des Polyacrylamidgels eingebracht. Zusätzlich wurde jeweils eine Tasche mit den Oligonukleotiden CTTv bzw. γSTR als Marker gefüllt. Nun erfolgte die Auftrennung der Produkte über 2 Stunden mit 3.000 Volt bei 51°C.

2.3.7. Chimärismus-Analyse

Die Analyse des Chimärismus erfolgte mit Hilfe des DNA Fragment Analyser, Version 1.2. Für jede Probe wurde eine korrespondierende Fluoreszenzkurve dargestellt. Die Peaks (Spitzen) von Spender- bzw. Empfängerkurven wurden miteinander verglichen. Als informative Peaks bezeichnet man jene, die sich bei Spender und Empfänger jeweils unterschiedlich darstellen. Das Verhältnis von Spender- und Empfänger-Peaks in der Posttransplantationsperiode erlaubt einen Rückschluss auf die Quantität von Spenderzellen im Empfängerorganismus. Zur Berechnung dieses Verhältnisses können sowohl die Höhe der Peaks als auch die Fläche unter den Kurven herangezogen werden, wobei die zweite Möglichkeit zu bevorzugen ist (Thiede et al., 2001). In unserer Arbeit wurde das Computerprogramm Excel spreadsheet benutzt, das die Flächen unter den Kurven berechnete.

Nach Thiede (Thiede et al., 2001) unterscheidet man drei verschiedene Peak-Konstellationen, die jeweils eine leicht unterschiedliche Herangehensweise erfordern. Im Folgenden sind die drei Konstellationen und die dazugehörigen Formeln zur Berechnung des quantitativen Spender-Chimärismus dargestellt:

1. Konstellation: Empfänger und Spender sind homo- oder heterozygot und zeigen kein gemeinsames Allel.

Formel:

$$\text{Spenderzellen [\%]} = 100 \times \frac{(\text{Fläche C} + \text{Fläche D})}{(\text{Fläche A} + \text{Fläche B}) + (\text{Fläche C} + \text{Fläche D})}$$

2. Konstellation: Empfänger und Spender sind heterozygot und zeigen ein gemeinsames Allel.

Formel:

$$\text{Spenderzellen [\%]} = 100 \times \frac{\text{Fläche C}}{\text{Fläche A} + \text{Fläche C}}$$

3. Konstellation: Der Spender oder der Empfänger ist heterozygot und eines der Allele ist identisch mit dem homozygoten Muster des anderen Individuums:

Formel:

$$\text{Spenderzellen [\%]} = 100 \times \frac{\text{Fläche B}}{(\text{Fläche A} - \text{Fläche B}) / 2 + \text{Fläche B}}$$

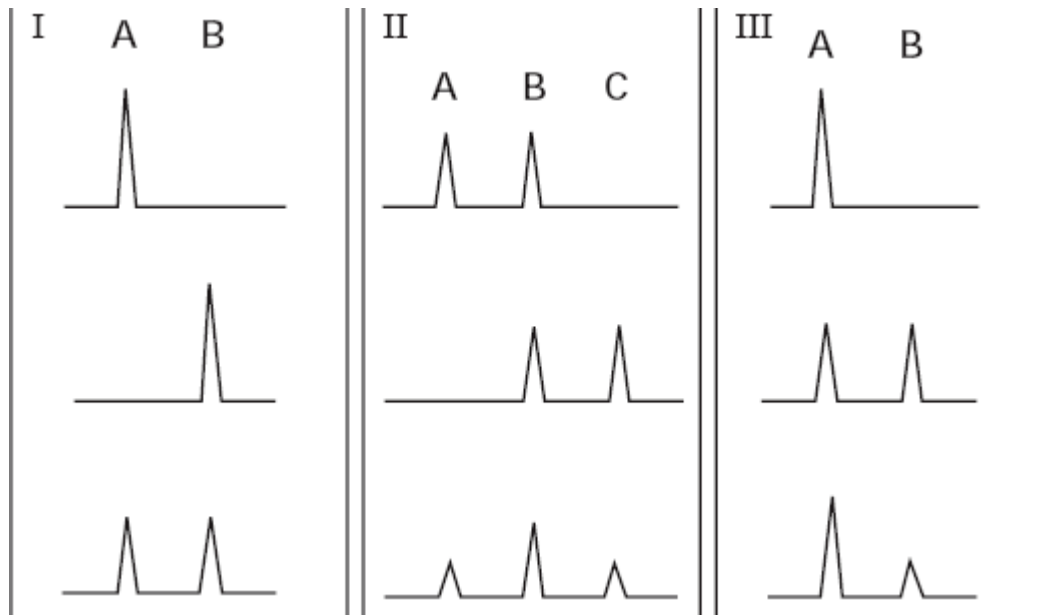


Abb.1: Schematische Darstellung von unterschiedlichen Spender-Empfänger-Konstellationen nach HSZT (Thiede et al. 2001)

Der Spender-Chimärismus wurde durch Berechnung der mittleren Werte beider STR Marker festgelegt.

2.4. Statistische Methoden

Bei allen statistischen Tests war das Signifikanzniveau 0.05 (zweiseitig). Aufgrund des explorativen Charakters der Analyse wurde keine Adjustierung für multiples Testen angewendet.

Der Chi-Quadrat-Test wurde verwendet, um zu überprüfen, ob die Altersgruppen signifikant bezüglich relevanter Prognosefaktoren oder der Therapie differierten.

Das Gesamt-Überleben und das Rezidiv freie Überleben wurde nach Kaplan Meier berechnet und im log-rank Test zwischen den Gruppen verglichen.

Der Einfluss verschiedener prognostischer Faktoren auf das Eintreten einer Progression oder des Todes wurde mit Hilfe der Cox Regression in einer multivariaten Analyse geprüft. Folgende Faktoren flossen in die Testung eines Einflusses auf das Gesamtüberleben und das Rezidiv freie Überleben in die Berechnungen ein: Alter, Geschlecht, Spenderalter, Spendergeschlecht, Transplantatquelle, konventionelle Konditionierung, RIC, Diagnose nach Malignitätsgrad, wobei akute Leukämien und hoch maligne Lymphome zusammengefaßt wurden sowie chronische Leukämien, niedrig maligne Lymphome und die aplastische Anämie, kompletter Chimärismus an Tag +30, +60, +100, +180 und zum letzten Kontakt, inkompletter Chimärismus an den selben Tagen, Auftreten einer akuten GvHD Grad II-IV, Auftreten einer chronischen GvHD (schwere Form).

Die Analyse des Gesamtüberlebens und des Rezidiv freien Überlebens erfolgte am Stichtag 15.03.2006. Zur deutlicheren Unterscheidung wurden die Diagramme als 3-Jahres-Kurven dargestellt.

Die statistischen Berechnungen wurden von Herrn Prof. Dr. Peter Martus, Direktor des Instituts für Biometrie und Klinische Epidemiologie der Charité, freundlich begleitet.

Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurde das Programm SPSS 13.0 für Windows XP 2006 verwendet.

3. Ergebnisse

Es wurden 107 Patienten in die Analyse eingeschlossen. Davon erhielten 55 Patienten eine allogene Transplantation hämatopoetischer Stammzellen nach konventioneller Konditionierung und 52 Patienten eine allogene Transplantation hämatopoetischer Stammzellen nach Konditionierung mit reduzierter Intensität. Die Analyse der Daten erfolgte in den 2 Gruppen. Der Beobachtungszeitraum endete am 15.03.2006 und beträgt im Mittlere 634 Tage (8 – 3464 Tage).

3.1. Ergebnisse der Transplantation allogener Blutstammzellen nach Konditionierung mit reduzierter Intensität

Von den 52 Patienten mit allogener Transplantation von HSC mit RIC im mittleren Alter von 53 Jahren (18 – 72 Jahre) waren 24 Frauen und 28 Männer. Der Beobachtungszeitraum endete am 15.03.2006 und betrug im Mittleren 570 Tage (25 – 1464 Tage). Fast alle (42/52) Patienten erhielten eine Konditionierung mit Treosulfan 12 g/m² an 3 aufeinander folgenden Tagen und Fludarabin 30 mg/m² an 5 aufeinander folgenden Tagen. 10 Patienten wurden mit Fludarabin und einamlig 2 Gy konditioniert.

Die 27 von 52 Patienten, die von unverwandten Spendern Stammzellen bekamen, erhielten zusätzlich ATG. Nur 5 Patienten wurden mit Knochenmarkstammzellen transplantiert. In einer Voranalyse konnten keine Unterschiede von Signifikanz für Engraftment und andere erhobene Parameter in der Gruppe der mit Stammzellen aus Knochenmark im Vergleich zu den Patienten, die Stammzellen aus peripherem Blut erhalten hatten, gefunden werden. Auf eine gesonderte Analyse wurde deshalb verzichtet. Bei 3 Patienten war die Transplantation die Therapie eines sekundären Transplantatversagens (Konditionierung mit 2 Gy und Fludarabin), bei 2 Patienten diente die 2. Transplantation konsolidierend einer Therapie eines Spätrezidivs nach primärer Transplantation mit konventioneller Konditionierung eines Mantelzelllymphoms (Konditionierung mit Treosulfan und Fludarabin).

3.1.1. Wiederherstellung der Zellularität im peripheren Blut (Engraftment)

Ein erfolgreiches primäres Engraftment ist erreicht, wenn die Leukozytenanzahl über $1,0 \times 10^9/l$ Blut angestiegen ist und die Anzahl der Thrombozyten mehr als $50 \times 10^9/l$ Blut beträgt.

Eine Voraussetzung ist, dass die Patienten für mindestens drei aufeinander folgende Tage keine Transfusion erhalten haben.

Alle 52 Patienten erreichten ein komplettes Engraftment. Die Leukozyten regenerierten durchschnittlich an Tag 15 (8 - 24), die Thrombozyten regenerierten durchschnittlich an Tag 18 (Tag 9 – 42). Der Patient 5 erreichte eine thrombozytäre Regeneration erst nach 168 Tagen und wurde aus der Analyse der mittleren Zeit des Engraftments ausgeschlossen.

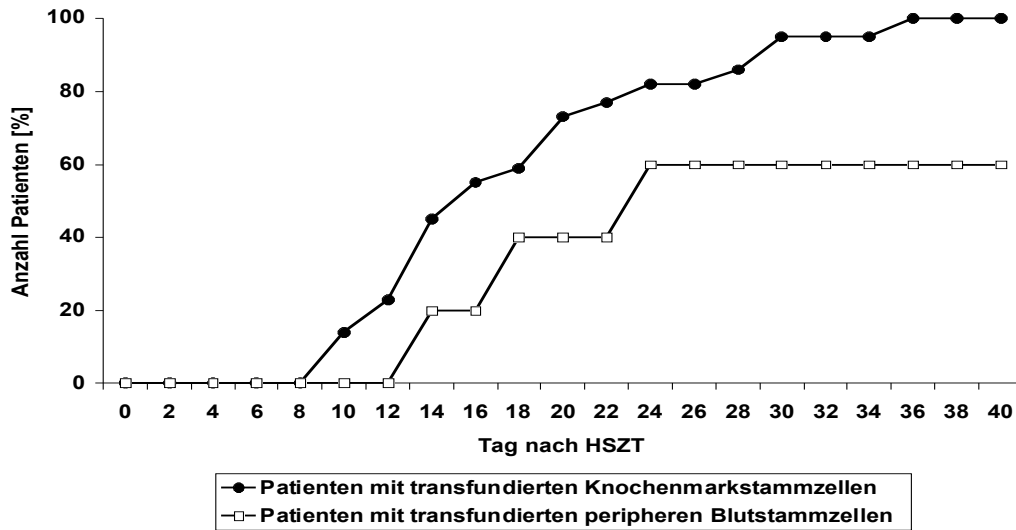


Abbildung 2: Engraftment der Thrombozyten

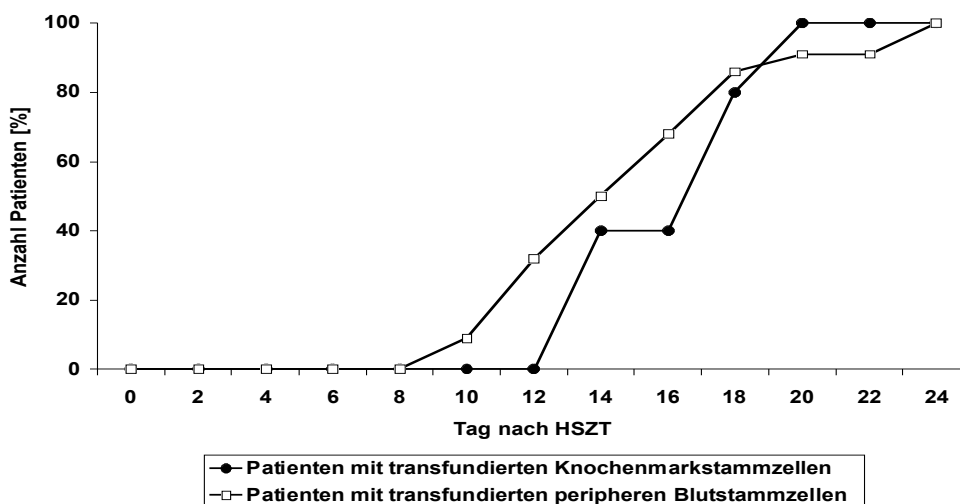


Abbildung 3: Engraftment der Leukozyten

3.1.2. Ergebnisse der Untersuchungen des Chimärismus

Zwischen November 2001 und März 2006 wurden 840 Chimärismus-Analysen bei Patienten nach allogener HSZT durchgeführt. Dazu erfolgten insgesamt 1884 Polymerase-Ketten-Reaktionen mit den Primer-Kits CTTv und γ STR. Bei allen Patienten und deren Spendern wurden vor der Transplantation peripheres Blut oder eine Knochenmarkprobe entnommen und analysiert, um ein Profil für die Gelfragment-Analyse zu erstellen. Die ersten Chimärismus-Analysen nach HSZT fanden im Mittel 30 Tage (20 bis 34 Tage) nach HSZT statt. Die darauf folgenden Analysen wurden an Tag +60, +100 und +150 und anschließend alle 6 Monate oder bei klinischer Indikationsstellung durchgeführt.

3.1.2.1. Ergebnisse der Untersuchungen des Chimärismus an Tag +30 nach Konditionierung mit reduzierter Intensität

Die Patienten wurden gemäß ihrer Chimärismus-Konstellation an Tag +30 in drei Gruppen eingeteilt. Bei zwei Patienten liegen erst ab dem Tag +300 verlässliche Chimärismus-Daten vor. Bis zu diesem Zeitpunkt hatten beide Patienten einen kompletten Spender-Chimärismus erreicht. Diese Patienten wurden in den nachfolgenden Untersuchungen nicht berücksichtigt. Insgesamt erfolgte die Analyse damit bei 50 Patienten.

3.1.2.1.1. Patienten mit einem Spender-Chimärismus von 100% an Tag +30

Bei 58% (29/50) der untersuchten Patienten ließ sich an Tag +30 sowohl im Knochenmark als auch im peripheren Blut ein Spender-Chimärismus von 100% (kompletter Chimärismus, CC) feststellen. Diese Patientengruppe umfasste 19 Frauen und 10 Männer. Bei 16 dieser Patienten war eine AML diagnostiziert worden, bei einem ein MDS (RA), bei 5 Patienten ein Multiples Myelom und bei 5 Patienten ein Non-Hodgkin-Lymphom. Je ein Patient wurde bei CML und fortgeschrittener CLL transplantiert. Einer Patientin waren Knochenmarkstammzellen transplantiert worden. Alle anderen Patienten dieser Gruppe hatten periphere Blutstammzellen erhalten.

Drei Patientinnen aus dieser Gruppe verstarben im Verlauf an infektiösen Komplikationen. Eine Patientin mit komplettem Spender-Chimärismus starb vor der darauffolgenden Analyse an einer Sepsis, eine weitere an einer EBV-Encephalitis. Bei einem Patient kam es bis zum

Tag +62 zu einem Abfall des Spenderzell-Anteils. Bei der darauffolgenden Chimärismus-Analyse an Tag +100 hatte er allerdings wieder einen kompletten Spender-Chimärismus erreicht, der bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes stabil blieb. Bei einer Patientin wechselte der komplette Chimärismus an Tag +45 in einen gemischten Chimärismus (MC). Der Anteil an Spenderzellen erreichte bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes nicht mehr 100%. Bei einer weiteren Patientin kam es bis zum Tag +100 ebenfalls zu einem Abfall des Spenderzell-Anteils. Sie starb an Tag +143 an einer ausgeprägten GvHD des Darmes.

Bei 28% (8/29) der Patienten dieser Gruppe musste ein Rezidiv diagnostiziert werden. Ein Patient wurde erfolgreich retransplantiert, 7 sind verstorben (24%). Insgesamt sind 13 Patienten (44%) verstorben.

Tabelle 16: Patienten mit einem Spender-Chimärismus von 100% an Tag +30

Patient [Nr.]	Geschlecht	Grundkrankheit	Spender	Transplantat	Chimärismus	Rezidiv	Status
2	W	AML	MUD	PB	Transienter MC bis Tag +130, CC Tag +150, ab +210 MC, ab Tag + 520	Tag +240 Therapie-2.TX	CR Tag +646
3	W	AML	MUD	KM	CC an Tag +28	Nein	Infektion, † Tag +30
6	W	AML	MRD	PB	Transienter MC (+150)	Nein	CR Tag +461
7	W	AML	MRD	PB	Transienter MC (Tag 70 bis 100), ab Tag 120 stabiler CC, MC ab 449	Tag +449	Rezidiv, †Tag +525
8	W	AML	MRD	PB	Stabiler CC	Nein	CR Tag +959
9	W	AML	MRD	PB	MC ab 54 bis CC Tag 134	Tag +82	cGvHD, †Tag +225
10	W	NHL (MC)	MRD	PB	Stabiler CC	Nein	cGvHD †Tag +433
12	W	CML	MUD	PB	Stabiler CC	Nein	CR Tag +261
13	M	MM	MRD	PB	Stabiler CC	Nein	CR Tag +1276
14	W	MM	MRD	PB	Ab Tag +60 MC	Tag +75	Rezidiv, † Tag +145
15	M	AML	MUD	PB	Stabiler CC	Nein	CR

							+140
16	W	AML	MUD	PB	MC ab Tag +87	Tag +91	Rezidiv, † Tag +122
17	M	CLL	MUD	PB	Transienter MC ab Tag +90	Nein	CR Tag + 650
20	W	AML	MRD	PB	MC ab Tag +180	T +180	Rezidiv, † Tag +486
21	M	AML	MUD	PB	Stabiler CC	Nein	CR Tag +707
23	W	AML	MUD	PB	Stabiler CC	Nein	aGvHD, † Tag 84
24	M	MM	MUD	PB	Stabiler CC	Nein	CR Tag +504
28	W	AML	MUD	PB	Stabiler CC	Nein	CR Tag +224
29	W	AML	MUD	PB	Stabiler CC	Nein	Infektion, † Tag +102
30	W	AML	MUD	pb	Stabiler CC	Nein	CR Tag +155
31	M	MM	MRD	PB	Stabiler CC	Nein	CR Tag +1218
34	W	NHL (DLCL)	MRD	PB	Stabiler CC	Nein	CR Tag +1161
37	M	MDS	MUD	PB	Stabiler CC	Nein	CR Tag +323
39	M	NHL-MC	MRD	PB	Transienter MC von Tag +54 bis Tag +105	Nein	CR Tag +448
41	W	AML	MUD	PB	Stabiler CC	Nein	Infektion, †Tag +108
45	M	NHL (FC)	MRD	PB	Stabiler CC	Nein	CR Tag +595
49	W	AML	MUD	PB	MC (95%) ab Tag +100	Nein	GvHD, †Tag +145
51	M	MM	MRD	PB	Stabiler CC	Extrame- dulläres Rezidiv Tag +196	Rezidiv †Tag +536
52	W	NHL (DLCL)	MRD	PB	Stabiler CC	Extrame- dulläres Rezidiv Tag + 384	Rezidiv †Tag +469

3.1.2.1.2. Patienten mit einem Spenderzell-Anteil von 95% an Tag +30

18% der Patienten (9/50) wiesen bei der ersten Chimärismus-Analyse an Tag +30 einen hohen Spenderzell-Anteil von 95% und mehr, aber nicht 100%, im Knochenmark und im peripheren Blut auf. Diese Patientengruppe umfasst 6 Männer und drei Frauen. Bei vier Patienten war eine AML diagnostiziert worden und bei zwei weiteren ein Multiples Myelom. Bei jeweils einem Patienten waren eine OMF, eine CLL und ein Hodgkin-Lymphom bekannt. Allen Patienten dieser Gruppe waren periphere Blutstammzellen transplantiert worden.

Eine Patientin starb vor der folgenden Chimärismus-Analyse an Tag +77 an einer klinisch diagnostizierten Venenverschußkrankheit. Drei Patienten hatten bis zur darauffolgenden Chimärismus-Analyse einen Spenderzell-Anteil von 100% erreicht, der bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes stabil blieb. Ein Patient erreichte erst an Tag +240 einen Spender-Chimärismus von 100%. Dieser blieb ebenfalls stabil. Ein Patient entwickelte keinen kompletten Spender-Chimärismus. Bei ihm musste an Tag +93 ein Rezidiv diagnostiziert werden. Er starb an Tag +101 an den Folgen eines Myokardinfarktes.

43% (4/9) der Patienten dieser Gruppe entwickelten ein Rezidiv, zwei Patienten verstarben an der wiederaufgetretenen Grunderkrankung, 2 befinden sich in Therapie mit Multiplen Myelom. Insgesamt starben 5 der 9 (55%) Patienten dieser Gruppe.

Tabelle 17: Patienten mit einem Spenderzell-Anteil von 95% an Tag +30

Patient [Nr.]	Geschlecht	Grundkrankheit	Spender	Transplantat	Chimärismus	Rezidiv	Status
1	W	OMF	MRD	PB	MC	nein	VOD, † Tag +77
4	M	CLL	MUD	PB	stabiler CC ab Tag +317	Tag + 88	CR Tag +1081
19	M	AML	MUD	PB	Allmähliche Zunahme des MC	Tag + 117	Rezidiv, †Tag +150
22	M	AML	MUD	PB	Allmähliche Zunahme des MC	Tag + 90	Rezidiv, †Tag +169
25	W	AML	MRD	PB	Stabiler CC ab Tag +60	nein	CR Tag +1373
27	M	AML	MRD	PB	Allmähliche Zunahme des MC	Tag + 90	Myokardinfarkt † Tag +102

32	M	MM	MRD	PB	stabiler CC ab Tag +56	extra- medulläres Rezidiv Tag + 879	Rezidiv, Tag +1287
35	M	MM	MUD	PB	Allmähliche Zunahme des MC	Tag + 123	Rezidiv, Tag +673
40	W	HL	MUD	KM	stabiler CC ab Tag +57	nein	Infektion, †Tag +254

3.1.2.1.3. Patienten mit einem Spenderzell-Anteil < 95 % an Tag +30

Bei 24% (12/50) der Patienten lag der Spenderzell-Anteil an Tag +30 unter 95%.

Zu dieser Gruppe zählten 2 Frauen und 10 Männer. Bei 6 Patienten war eine chronische Leukämie (1 CML, 5 CLL) bekannt; bei 2 Patienten ein Multiples Myelom und bei 4 Patienten eine AML. 4 Patienten dieser Gruppe hatten Knochenmarkzellen erhalten, 8 Patienten waren periphere Blutstammzellen transplantiert worden.

Bei 6 Patienten entwickelte sich ein stabiler kompletter Spender-Chimärismus nach einem mittleren Zeitraum von 257 Tagen (76-490 Tage). Diese Patienten entwickelten kein Rezidiv der Grundkrankheit und waren in kompletter Remission. Ein Patient verstarb an den Folgen einer Herpesvirusenzephalitis fast 2 Jahre nach Transplantation. Bei 6/12 (50%) Patienten musste ein Rezidiv diagnostiziert werden, an dem alle 6 verstarben. Insgesamt verstarben 7 der 12 Patienten. Die anderen 5 Patienten waren in Remission mit stabilem kompletten Chimärismus.

Tabelle 18: Patienten mit einem Spenderzell-Anteil unter 95% an Tag + 30

Patient [Nr.]	Geschlecht	Grund- krankheit	Spender	Trans- plantat	Maximaler Spender- Chimärismus	Rezidiv	Status
5	M	CLL	MUD	KM	stabiler CC ab Tag +376	Nein	CR Tag +1399
11	M	AML	MRD	PB	stabiler CC ab Tag +76	Nein	CR Tag +1111
18	M	CLL	MUD	PB	stabiler CC ab Tag +155	Nein	Infektion, †Tag +628
26	M	AML	MRD	PB	MC (70%)	Tag +22	Rezidiv, † Tag +33

33	M	MM	MRD	PB	MC (85%) später Zunahme bis 60%)	Tag +165	Rezidiv, † Tag +445
36	M	CLL	MRD	KM	MC (90%)	Tag +327	Rezidiv, † Tag +760 CR
42	M	MM	MRD	PB	MC (90%), ab Tag +152 CC		Tag +1154 CR
43	W	CLL	MUD	KM	MC (70%), allmählich Zunahme bis CC ab Tag+490	Nein	Tag +547 CR
46	W	CLL	MUD	KM	MC (90%) Später Zunahme bis 55%	Tag +143	Rezidiv, † Tag +446
47	M	CML	MUD	PB	MC (75%) Später Zunahme bis 5%	Tag +43	Rezidiv, † Tag +108
48	M	AML	MUD	PB	MC (40%)	Rezidiv Tag +55	Rezidiv, † Tag +97 CR
50	M	AML	MRD	PB	MC (90%), ab Tag +56 stabiler CC	Nein	Tag +957 CR

Aus den Ergebnissen von Tag +30 lässt sich ersehen, dass die Patienten mit einem Spender-Chimärismus von 100% seltener ein Rezidiv entwickeln (28%), als die Patienten, bei denen an diesem Tag ein gemischter Chimärismus vorliegt (43% und 50% jeweils in den Gruppen). Wir untersuchten diesen Zusammenhang auf seine Signifikanz. Es konnte der Trend für eine signifikante Korrelation zwischen dem Vorliegen eines gemischten Chimärismus im peripheren Blut oder im Knochenmark und dem Auftreten eines Rezidives nachgewiesen werden (log rank, $p = 0,06$). Wir untersuchten außerdem, ob ein gemischter Chimärismus mit einer verkürzten Überlebenszeit einhergeht. Diese Untersuchung erbrachte keine signifikante Differenz.

41	100	100	100	-	-	-	-	-	†Inf
45	100	100	100	100	100	100	100	100	CR
50	90	100	100	100	100	100	100	100	CR
51	100	100	100	100	100	100	100	100	†Rez
52	100	100	100	100	100	100	100	100	†Rez

3.1.2.2.2. Patienten mit gemischtem Chimärismus an Tag +60

Tabelle 20: Beobachtung des Spenderzell-Anteils [%] der Patienten mit einem gemischten Chimärismus an Tag +60 über ein Jahr

Nr. Patient	Tag nach HSZT							Status
	30	60	100	150	250	300	365	
2	100	95	85	100	Rez.	Rez.	Rez.	CR
5	50	75	95	90	100	100	100	CR
6	100	95	95	100	100	100	100	CR
9	100	70	Rez. 50	100	-	-	-	†GvHD
14	95	90	75	Rez. 60	-	-	-	† Rez
16	100	60	Rez.	-	-	-	-	† Rez
18	90	75	90	100	100	100	100	†Infekt
19	95	90	75	90	Rez.	-	-	† Rez
22	95	90	90	Rez. 70	-	-	-	† Rez
31	100	95	100	100	100	100	100	CR
33	85	95	95	Rez. 70	50	70	Rez.	† Rez
35	95	95	95	-	100	-	100	CR
36	90	Rez. 60	80	85	85	80	40	† Rez
39	100	95	90	90	100	100	100	CR
42	90	Rez. 60	95	95	100	100	100	CR
43	70	90	90	95	95	n.d.	n.d.	CR
46	90	75	60	70	Rez.	Rez.	Rez.	†Infekt
47	75	5	-	-	-	-	-	† Rez
49	100	95	95	-	-	-	-	†GvHD

Bei 19/45 der untersuchten Patienten (42%) wurde an Tag +60 ein gemischter Chimärismus festgestellt. Nur 7/19 (37%) dieser Patienten wurde im Verlauf ein weiterer langsamer Anstieg des Spenderzell-Anteils beobachtet und die Patienten sind in CR. Bei zwei dieser Patienten (2,6) wurde ein Rezidiv diagnostiziert und erfolgreich behandelt (AML, Chemotherapie und DLI bzw. Zweittransplantation). Bei der Chimärismus-Analyse an Tag +365 hatten alle beobachteten 8 (42%) Patienten dieser Gruppe einen kompletten Spender-Chimärismus von 100% erreicht (Tabelle 22). Es verstarben 11/19 (58%), 7 von ihnen im Rezidiv (39%). 13 Patienten hatten ein Rezidiv entwickelt, das nur 1 Patient überlebte.

3.1.2.3. Ergebnisse der Untersuchungen des Chimärismus an Tag 100 und später

Bei 19/43 Patienten (44%) wurde ein inkompletter Chimärismus an Tag 100 gefunden (Tbl. 21 und 22). Nur bei 2 dieser Patienten trat einmalig ein transienter gemischter Chimärismus auf, der später und früher nicht beobachtet wurde und ohne klinische Auswirkung blieb. Auch bei 6 weiteren Patienten war der an Tag 100 gemessene MC ohne klinische Bedeutung; später setzte sich die Spenderhämatopoese komplett durch. Bei weiteren 4 MC Patienten kündigte sich das klinisch noch nicht diagnostizierte Rezidiv an, alle hatten zuvor einen gemischten Chimärismus, 6 von ihnen starben (86%).

3.1.3. Inzidenz und Schwere der Komplikationen

Die Patienten nach RIC entwickelten Komplikationen sowohl nach der Therapie mit Treosulfan und Fludarabin als auch nach der nicht myeloablativen Konditionierung mit 2 Gy und Fludarabin. Insgesamt wurden beide Konditionierungsschemata komplikationsarm vertragen.

3.1.3.1. Toxische Komplikationen

Es traten insgesamt nur bei wenigen Patienten Organtoxizitäten auf, die bei einer Patientin tödlich verliefen.

Die nephrotoxischen Nebenwirkungen der verabreichten Pharmaka werden insgesamt als gering eingeschätzt. 3 Patienten entwickelten ein akutes Nierenversagen, das bei 2 Patienten temporär dialysepflichtig wurde, bei einem Patienten medikamentös beherrscht wurde. Bei weiteren 5 Patienten kam es zu einer kompensierten Niereninsuffizienz, die vermutlich auf die Gabe von Cyclosporin A zurückzuführen war. Dabei handelte es sich jedoch um Patienten mit vorbestehender Niereninsuffizienz bei Multiplem Myelom. Auch diese Komplikation konnte durch Anpassung der Dosierung beherrscht werden.

Eine Patientin entwickelte eine Cyclosporin A induzierte mikroangiopathische hämolytische Anämie. Durch Verabreichung von hoch dosierten Steroiden kam es zu einer Besserung dieser Komplikation.

Bei einem Patienten trat im Anschluss an die HSZT eine Venenverschlusskrankheit (VOD) auf. Durch eine Therapie mit Heparin und Diuretika konnte eine Heilung erreicht werden.

Eine Patientin mit fortgeschrittener Osteomyelofibrose verstarb an Tag 77 nach allogener Transplantation HLA-identer schwesterlicher Blutstammzellen nach vollständiger Regeneration an einer progredienten Leberinsuffizienz bei bestehender krankheitsbedingter Vorschädigung, die *klinisch* als VOD interpretiert wurde, da aus religiösen Gründen auf die Sektion verzichtet werden musste.

Vereinzelt kam es zur Entwicklung einer Diarrhoe, einer Mukositis (eine Patientin mit ulcerierender Mukositis Grad III nach CTC) oder zu einem Exanthem. Bei jeweils einem Patienten traten eine Konjunktivitis, eine akute Pankreatitis und eine Hepatitis auf, die ohne Residuen ausheilten. 23 Patienten entwickelten keine Anzeichen einer Mukositis.

Eine Patientin litt nach der HSZT unter einer neu aufgetretenen intermittierenden Tachyarrhythmia absoluta, wobei sich die Ursache hierfür nicht vollständig klären ließ. Ein Patient verstarb an Tag 102 an den Folgen eines akuten Myokardinfarktes, der in keinen Zusammenhang mit der Konditionierung mit Treosulfan und Fludarabin gestellt wurde. Da sich zeitgleich parallel dazu (Tag 100) ein Rezidiv der AML manifestierte, ist die Todesursache nicht eindeutig zu definieren.

Insgesamt verstarb im Zusammenhang mit Organtoxizitäten somit eine (2 %) Patientin in der Gruppe nach RIC. Langfristige Organschäden mit Insuffizienzen traten nicht auf.

3.1.3.2. Akute und chronische GvHD

Die Graft versus Host Erkrankung trat wie folgt auf: 32 von 52 Patienten entwickelten eine akute GvHD (61%), 20 von 47 (42,5%) auswertbaren Patienten eine chronische GvHD. Die Häufigkeit der einzelnen Grade zeigt die nächste Tabelle 23.

Tabelle 21: Anzahl der Patienten mit unterschiedlichen Schweregraden der akuten GvHD

Grad	Zahl der Patienten	Anteil (%)
0	20	39
I	12	23
II	7	13
III	6	12
IV	7	13
II-IV	20	38

Die Anzahl der Patienten, bei denen unterschiedliche Stadien nach Lokalisation festgestellt wurden, sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 22: Manifestationen der akuten GvHD

Stadium	Gesamt	1	2	3	4
Haut	32	20	10	2	0
Darm	12	1	3	4	4
Leber	5	0	1	0	4

Das Auftreten der akuten GvHD in Abhängigkeit von Zeitpunkt nach der Transplantation stellt sich wie folgt dar, dabei trat die akute GvHD im Mittleren an Tag 53 (16 – 95) auf.

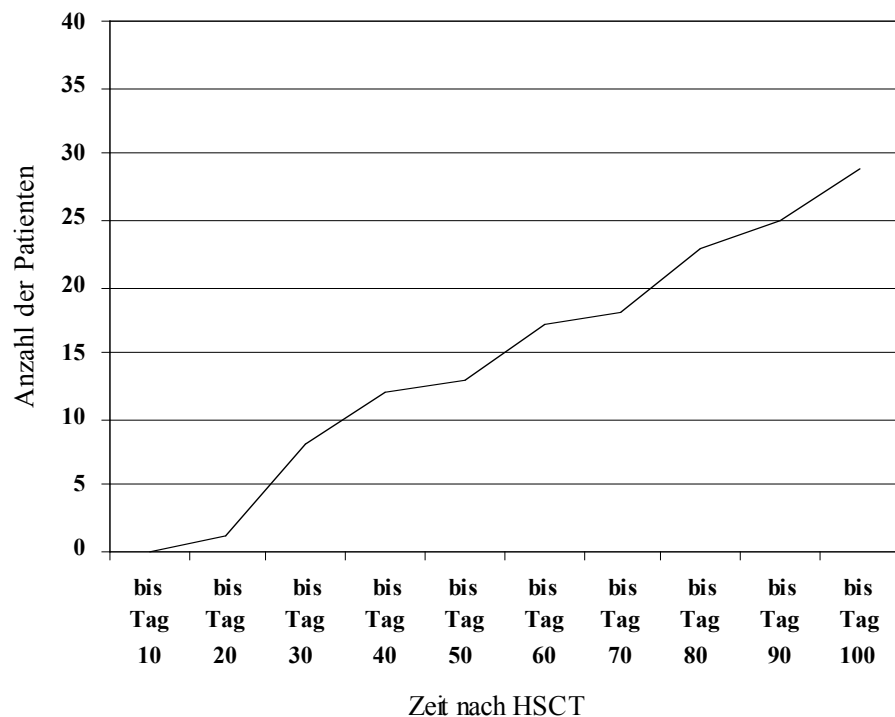


Abbildung 4: Kumulative Inzidenz der akuten GvHD in Abhängigkeit vom Zeitpunkt des Auftretens nach HSCT und RIC

Von den 32 Patienten mit einer akuten GvHD der Haut waren 23 therapiebedürftig. Alle erhielten topische Kortikoide (Ultralan[®] Salbe), bei 18 Patienten war eine interventionelle Therapie mit unterschiedlichen Dosierungen peroraler Kortikoide (Prednisolon) erforderlich, bei allen übrigen genügte die Dosisanpassung von Cyclosporin A. Bei 20 Patienten musste eine schwere akute GvHD mindestens Grad II diagnostiziert werden, 4 Patienten verstarben letztlich an den Folgen der unkontrollierten akuten GvHD der Leber und des Darmes. Alle anderen konnten erfolgreich behandelt werden. Standard war hierbei die Therapie mit 2 mg/kg KG Prednisolon, 15 Patienten sprachen nicht ausreichend auf die Prednisolontherapie

an und erhielten zusätzlich Basiliximab 20mg an Tag 1 und 4 nach 2 Tagen Refraktärität auf das Kortison. 4 Patienten erhielten eine zusätzliche Basiliximabtherapie an Tag 28 und 32 in gleicher Dosis bei ungenügendem Ansprechen. 3 Patienten (Pat. 7, 23, 9) mit einer akuten GvHD des Darmes Grad IV erhielten eine Therapie mit ATG (Thymoglobulin® Merieux, 3mg/kg an 5 Tagen) mit gutem Erfolg.

Eine chronische GvHD wurde bei 20 von 47 (42,5 %) Patienten, die länger als Tag 100 lebten, diagnostiziert. Dabei trat bei 13 Patienten eine begrenzte (*limited*) chronische GvHD auf und bei 7 Patienten eine ausgedehnte (*extensive*). Bei allen Patienten handelte es sich um eine GvHD der Haut, bei 6 Patienten traten zusätzliche Veränderungen der Mundschleimhaut und bei 4 Patienten wurde eine *Conjunktivitis sicca* beobachtet. Alle Patienten erhielten eine Behandlung mit lokalen Therapeutika (Augentropfen, Salben), 10 Patienten wurden mit modifizierter Dosis Cyclosporin A erfolgreich behandelt, nur 3 Patienten erhielten systemische Kortikoide (Prednisolon). Von 7 Patienten mit schwerer chronischer GvHD hatten 3 Patienten ausschließlich Haut und Schleimhautveränderungen, die alle eine systemische Prednisolon-Therapie erforderten und unter dieser rückläufig oder stabil waren. Ein Patient (Pat. 33) entwickelte eine chronische persistierende Diarrhoe mit hohen GvHD-typischen Leberwerten (Bilirubin maximal verdreifacht), die nur unter Dauermedikation mit Prednisolon klinisch toleriert werden konnte. Eine Patientin (Pat. 8) entwickelte eine akute Hepatitis mit Transaminasenanstieg (x 100 der Norm), die gut auf eine Therapie mit Prednisolon 1mg/kg KG pro Tag peroral ansprach und komplett sistierte. Vier Patienten entwickelten zusätzlich Zeichen einer chronischen Darm- und Leber-GvHD, die jedoch mit Steroiden – ein Patient erhielt zusätzlich 2 Gaben Basiliximab mit gutem Erfolg - klinisch kontrolliert werden konnten und sistierten. Ein Patient entwickelte eine Polyserositis mit dem klinisch im Vordergrund stehenden Pleura- und Perikarderguss, die auf die Therapie mit Azathioprin vollständig sistierte. Kein Patient entwickelte pulmonale GvHD-Zeichen. Keiner der Patienten verstarb an den Folgen der chronischen GvHD in der Gruppe nach RIC.

3.1.3.3. Rezidive und Transplantatversagen, Sekundärneoplasien

Das Auftreten eines Rezidives der Grunderkrankung mit und ohne Transplantatabstoßung war die Hauptursache für die Sterblichkeit nach allogener HSCT mit RIC. Es trat bei 21 der 52 (50 %) Patienten ein Rezidiv auf – die Rezidive wurden an Tag 300 (22 – 1321) im Mittleren beobachtet; in deren Entwicklung verstarben 17 Patienten – der Tod trat im Mittleren an Tag

378 (34 – 1464) ein. 18 der Patienten mit Rezidiv erhielten eine Konditionierung mit Treosulfan (8 von 11 Patienten mit Multiplem Myelom, 9 Patienten der 18 mit AML, 2 von 7 Patienten mit CLL, einer der 6 Patienten mit NHL). Zwei Patienten von 10 nach Konditionierung mit Fludarabin und 2 Gy (eine Ph-negative CML und 3 sAML) bekamen ein Rezidiv. Es verstarben 4 der 7 Patienten mit Rezidiv eines Multiplen Myeloms, von den 3 verbliebenen konnte durch Therapie bei 2 Patienten zeitweise erneut eine komplette Remission erreicht werden. Im Mittlere kam es an Tag 388 (74 – 779) nach allogener Transplantation bei den Patienten mit Multiplem Myelom zum Rezidiv, wobei der mittlere Beobachtungszeitraum aller 11 Patienten mit Multiplem Myelom 913 (145 – 1464) beträgt. An der Progression der Grunderkrankung verstarben die Myelom-Patienten durchschnittlich nach 445 (145-536) Tagen nach HSCT. Von den 12 Patienten mit Rezidiv einer AML sind 11 verstorben, eine Patientin (Pat. 2) ist nach Chemotherapie erneut in CR. 2 von 7 mit CLL transplantierten Patienten entwickelten ein Rezidiv und verstarben bei Progression der Grunderkrankung. Der mit Philadelphia Chromosom negativer CML transplantierte Patient verstarb im sehr bald aufgetretenen Rezidiv seiner Erkrankung, ebenso eine Patientin mit sehr aggressivem, diffus großzelligem NHL. In einer Multivarianzanalyse (Cox Regression) wurden am seltensten Rezidive in der Gruppe beobachtet, die eine nicht akute Leukämie hatten und einen kompletten Chimärismus am Tag 60 ($p = 0,02$) aufwiesen. Die gleiche Aussage trifft auch für die Patienten zu, die einen kompletten Chimärismus an Tag 90 hatten ($p = 0,036$). Alle anderen untersuchten Faktoren hatten keinen signifikanten Einfluß auf die Rezidivhäufigkeit (Alter, Geschlecht, Konditionierung, Alter des Spenders und dessen Geschlecht, Transplantatcharakteristika).

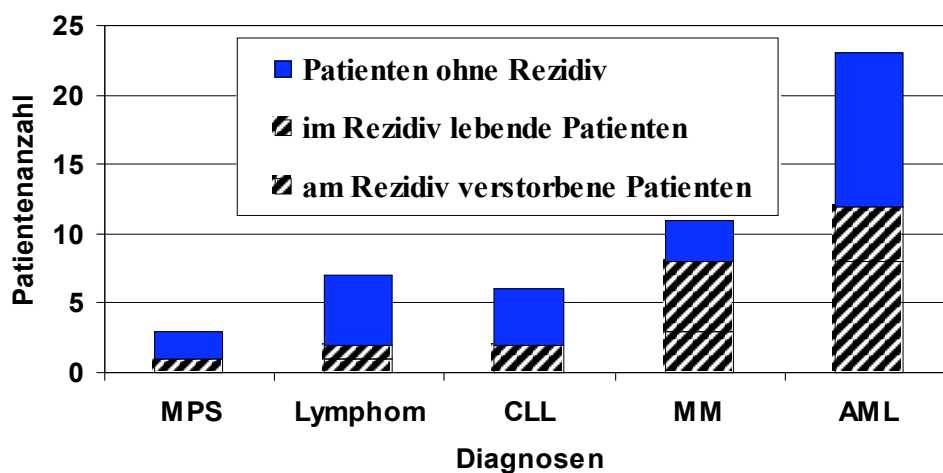


Abbildung 5: Aktueller Status der Patienten nach allogener HSCT und RIC

Bei 2 Patienten wurden Sekundärneoplasien festgestellt. Ein Patient (Pat. 44) entwickelte zunächst ein Rezidiv seines Multiplen Myeloms an Tag 611 nach allogener HSCT, das erfolgreich behandelt wurde. Zeitgleich wurde ein Adenokarzinom des Dickdarms operativ kurativ behandelt. An Tag 1245 musste ein Plattenepithelkarzinom des Zungengrunds festgestellt werden, an dessen Progression er am Tag 1464 verstarb. Eine Patientin (Pat. 23) entwickelte an Tag 70 ein hochmalignes EBV-assoziiertes Lymphom Stad. I (cervical). Sie verstarb 14 Tage darauf an einer therapierefraktären GvHD des Darmes und der Leber Grad IV. Damit musste bei zwei Patienten von 52 (3,8%) ein Zweittumor diagnostiziert werden.

3.1.3.4. Überleben, Therapie bedingte Mortalität, Frühodesfälle

Von 52 leben 26 Patienten. Die mediane Überlebenszeit beträgt 909 Tage (Konfidenzintervall 95%: 653-1164). 24 Patienten leben ohne Rezidiv. Das mediane Rezidiv freie Überleben liegt bei 864 Tagen (Konfidenzintervall 95%: 356 – 1371). Es starben insgesamt 26 (50%) Patienten, 15 Patienten verstarben am Rezidiv (29 %). Bis zum Tag 100 starben 5 (9,6 %) Patienten, davon 2 an Frührezidiven (AML und CML, Philadelphia Chromosom negativ), eine Patientin an einer toxischen Leberschädigung, eine Patientin an einer Candidasepsis und eine Patientin an einer therapierefraktären GvHD Grad IV. Da von den 26 Patienten 15 Patienten an einem Rezidiv verstarben, beträgt die Therapie bedingte Sterblichkeit 21 % (11 Patienten - eine Patientin an toxischem bedingtem Leberversagen, 2 Patienten an den Folgen der akuten GvHD, 2 Patienten an den Folgen einer chronischen GvHD und 6 Patienten an infektiösen Komplikationen, eine Candidiasis, eine Pneumocystis carinii Pneumonie, zwei E.coli Septikämien, zwei Virusenzephalitiden – EBV und HSV). Von den 24 Patienten mit AML starben 14 Patienten - 8 im Rezidiv, 2 Patienten an infektiösen Komplikationen, 3 Patienten an den Folgen der GvHD. Von den 11 Patienten mit Multiplem Myelom starben 4 – drei an den Folgen des Rezidivs, einer an einer Sekundärneoplasie. Von den 7 Patienten mit CLL starben 2 an den Folgen des Rezidivs, ein Patient an einer Infektion. 6 Patienten wurden mit Lymphom transplantiert, von ihnen leben drei, an den Folgen des Rezidivs verstarb eine Patientin, eine verstarb an einer Infektion, eine an den Folgen der chronischen GvHD. Die mit myeloproliferativem Syndrom transplantierten 2 Patienten verstarben jeweils am Rezidiv und am toxischen Leberversagen. Der mit Myelodysplastischem Syndrom (refraktäre Anämie) transplantierte Patient lebt in kompletter Remission (Tag 323).

Von 4 Patienten, die eine 2. Transplantation erhielten (2 Patienten mit sekundärem Transplantatversagen – Tag 422, Tag 730, 2 Patienten zur Therapie eines Mantelzelllymphomrezidives – Tag 411, Tag 220) leben 3 ohne Rezidiv mit stabiler Transplantatfunktion, eine Patientin verstarb an den Folgen der chronischen GvHD.

In einer Multivarianzanalyse (Cox Regression) wurde das beste Überleben in der Gruppe beobachtet, die eine nicht akute Leukämie hatten und einen kompletten Chimärismus am Tag 60 ($p = 0,002$). Diese Aussage war nicht signifikant für die Patienten, die einen kompletten Chimärismus an Tag 90 hatten ($p = 0,08$). Alle anderen untersuchten Faktoren hatten ebenso keinen signifikanten Einfluß auf die Rezidivhäufigkeit (Alter, Geschlecht, Konditionierung, Alter des Spenders und dessen Geschlecht, Transplantatcharakteristika).

3.2. Ergebnisse der Transplantation allogener Blutstammzellen nach konventioneller Konditionierung

Von den Patienten mit allogener Transplantation von HSC mit konventioneller Konditionierung im mittleren Alter von 40 Jahren (17 – 64 Jahre) waren 39 (71%) Männer und 16 Frauen. Der Beobachtungszeitraum endete am 15.03.2006 und betrug im Mittlere 694 Tage (8 – 3462 Tage).

Die 38 Patienten mit unverwandten Stammzellspendern erhielten zusätzlich ATG. Nur 3 dieser Patienten erhielten Knochenmarkstammzellen. Bei 3 Patienten erfolgte die Transplantation als 2. Transplantation und konsolidierende Therapie nach Rezidivbehandlung einer AML.

3.2.1. Wiederherstellung der Zellularität im peripheren Blut (Engraftment)

Von 55 Patienten erreichten 51 (93 %) ein komplettes Engraftment. 2 Patienten verstarben vor leukozytärer Regeneration (Tag 8 und Tag 28). Die Leukozyten der 53 auswertbaren Patienten regenerierten durchschnittlich an Tag 14 (10 - 22). Bei 4 Patienten konnte keine thrombozytäre Regeneration beobachtet werden (Tage 8, 28, 44, 45). Die Thrombozyten regenerierten bei 51 auswertbaren Patienten durchschnittlich an Tag 18 (Tag 9 – 77).

3.2.2. Ergebnisse der Untersuchungen des Chimärismus

Die Analysen des Chimärismus nach konventioneller Konditionierung zeigten bei der Mehrzahl der Patienten (47 von 55 auswertbaren Patienten oder 85%) eine komplette Spenderhämatopoese an Tag +30.

Tabelle 23: Chimärismus bei Patienten nach konventioneller Konditionierung

Patient [Nr.]	Geschlecht	Grundkrankheit	Spender	Transplantat	Chimärismus	Rezidiv	Status
53	m	AML	MUD	PB	MC 40% an Tag +8	nein	Toxische Hepatitis † Tag +8
54	w	AML	MRD	PB	Stabiler CC ab Tag +28	nein	CR Tag +174
55	M	AML	MUD	PB	CC Tag +28, Tag +60, 5% Tag +120	Tag + 120	† Rezidiv, Tag + 121
56	M	CML	MRD	PB	Stabiler CC ab Tag +28	nein	† Infektion, Tag +1260
57	W	ALL	MUD	KM	MC 90% an Tag +20	nein	Toxische Pneumonitis † Tag +28
58	M	ALL	MUD	PB	CC Tag +30, MC 90% Tag +130	nein	aGvHD, † Tag + 135
59	W	CML	MRD	PB	Stabiler CC Tag +30 bis Tag + 2292 und ab Tag +2412	Tag +2292	CR Tag +3462
60	M	CML	MUD	KM	Stabiler CC, MC 95% ab Tag +2135	nein	cGvHD und Infektion, † Tag +2355
61	W	AML	MRD	PB	MC 90% Tag +30, stabiler CC	nein	aGVHD, †Tag + 135
62	M	CML	MUD	PB	Stabiler CC	nein	Infektion, †Tag +279
63	M	AML	MRD	PB	Stabiler CC	nein	CR Tag +320
64	M	AA	MRD	PB	Stabiler CC	nein	CR Tag +476
65	m	ALL	MRD	PB	CC Tag +30	nein	CR Tag +145
66	W	ALL	MUD	PB	CC Tag +30	nein	aGVHD, †Tag +45
67	M	AA	MUD	PB	CC Tag +30	nein	Infektion, † Tag +72

68	W	ALL	MUD	PB	MC 90% Tag +30, dann stabiler CC, bis Tag +150	Tag +175	Rezidiv, † Tag +258
69	M	ALL	MUD	PB	CC Tag +30, 95% Tag 60, ab Tag +100 MC 30%	Tag +71	Rezidiv, † Tag +122
70	m	ALL	MUD	PB	CC Tag +30	nein	CR Tag +282
71	M	ALL	MUD	PB	Stabiler CC bis MC 20% Tag +360	Tag +360	Rezidiv, † Tag +1216
72	m	ALL	MUD	PB	CC Tag +30	nein	CR Tag +113
73	M	NHL (FC)	MRD	PB	Stabiler CC	nein	CR Tag +2227
74	M	AML	MUD	PB	CC Tag +30, MC 10% Tag +56	Tag +71	aGVHD, † Tag +133
75	M	AML	MUD	PB	CC Tag +30, MC 55% Tag +55	Tag +55	Rezidiv, † Tag +166
76	W	AML	MUD	PB	Stabiler CC	nein	Toxische Hepatitis, † Tag +44
77	M	ALL	MUD	PB	Stabiler CC	nein	CR Tag +379
78	M	AML	MUD	PB	Stabiler CC	nein	CR Tag +597
79	W	CML	MUD	PB	MC 90% ab Tag +28 bis CC Tag +276	nein	cGVHD, † Tag +349
80	M	NHL (DLCL)	MUD	PB	Stabiler CC	Ex.me dullär Tag 95	Rezidiv, † Tag +218
81	M	AML	MRD	PB	Stabiler CC	nein	CR Tag +2338
82	M	AA	MUD	PB	Stabiler CC	nein	CR Tag +1471
83	M	ALL	MRD	PB	CC Tag +30, ab Tag +64 MC 20%	Tag +49	Rezidiv, † Tag +100
84	M	ALL	MUD	PB	Stabiler CC, MC 85% Tag +140	Tag +140	Rezidiv, † Tag +437
85	M	MM	MRD	PB	Stabiler CC	nein	Infektion, † Tag +1046
86	M	AML	MRD	PB	Stabiler CC	nein	CR Tag +897
87	M	ALL	MRD	PB	MC 90% Tag +30, dann stabiler CC	nein	CR Tag +1101

88	W	AML	MRD	PB	Stabiler CC	nein	CR Tag +1549
89	M	AML	MRD	PB	Stabiler CC	nein	CR Tag +327
90	M	ALL	MUD	PB	CC von Tag +30, MC Tag +108 30%	Tag +108	Rezidiv, † Tag +125
91	W	CML	MRD	PB	Stabiler CC bis MC 40% Tag 1218, stabiler CC Tag 1310	Tag +1218	CR Tag +2752
92	M	.NHL (DLCL)	MUD	PB	CC Tag +28	nein	Infektion, † Tag +28
93	W	AML	MUD	PB	Stabiler CC	nein	CR Tag +987
94	M	.NHL (DLCL)	MUD	PB	Stabiler CC	nein	CR Tag +246
95	W	CML	MUD	PB	Stabiler CC	nein	CR Tag +1927
96	m	ALL	MUD	PB	Stabiler CC	nein	CR Tag +116
97	W	AML	MRD	PB	Stabiler CC	nein	CR Tag +649
98	W	NHL (DLCL)	MUD	PB	Stabiler CC	nein	CR Tag +116
99	m	ALL	MUD	PB	Stabiler CC	nein	Infektion, † Tag +91
100	M	CML	MUD	PB	CC bis MC 50% Tag + 2252	Tag +2252	Rezidiv- therapie Tag +2341
101	M	AML	MUD	PB	Stabiler CC	nein	Infektion, † Tag +292
102	m	AA	MRD	PB	Stabiler CC	nein	CR Tag +110
103	W	CLL	MRD	PB	CC Tag +30, Tag +60; ab Tag 350 MC 80%	Tag +351	Rezidiv Tag +387
104	M	AML	MRD	PB	Stabiler CC	nein	CR Tag + 429
105	W	ALL	MRD	PB	Stabiler CC	nein	CR Tag + 667
106	W	AA	MUD	PB	Stabiler CC	nein	CR Tag + 629
107	M	CML	MUD	PB	MC 90% Tag +30, 95% Tag +60, ab Tag +90 CC	nein	CR Tag + 1261

2 Patienten (Pat. 53, 57) hatten ohne Engraftment einen sehr frühen (vor Tag +30) inkompletten Spenderchimärismus als Ausdruck der beginnenden Regeneration der Hämatopoese. Beide verstarben an vom Engraftment unabhängigen Komplikationen. 2 Patienten (Pat. 59, 91) hatten bei chronischer myeloproliferativer Erkrankung einen transienten gemischten Chimärismus, der sich später in einen kompletten wandelte. Bei 3 Patienten (Pat. 61, 68, 87) mit akuter Leukämie wurde ein verzögerter kompletter Chimärismus beobachtet. Bei der Patientin 68 kam es kurze Zeit später zu einem Rezidiv der akuten Leukämie, bei einer anderen Patientin wurde eine recht schwere (> Grad II) akute GVHD beobachtet, an der Patientin 61 ad exitum kam. Ebenso war ein späterer gemischter Chimärismus, der nach einem primär kompletten Chimärismus aufgetreten war, assoziiert mit einer schweren, zu tödlichen Komplikationen führenden GvHD (Pat. 58, 60).

Immer waren spätere Verschiebungen des primär kompletten Chimärismus zu einem gemischten Chimärismus Ausdruck oder erstes Zeichen eines Rezidivs der Grundkrankheit (Pat. 55, 68, 69, 74, 75, 84, 91, 100, 103).

3.2.3. Inzidenz und Schwere der Komplikationen

Die Patienten nach konventioneller Konditionierung entwickelten erwartungsgemäß eine Vielzahl schwerwiegender, teils letaler Organkomplikationen mit vollständigem oder zeitweiligem Ausfall der Funktionen. Insgesamt war bei 9 Patienten eine Lungenersatz und bei 10 Patienten eine Nierenersatztherapie erforderlich.

3.2.3.1. Toxische Komplikationen

Toxische Komplikationen sind in dieser Patientengruppe häufig sowohl als Folge der Konditionierung oder der Therapie von infektiösen Komplikationen als auch infolge einer aggressiven Therapie der GvHD aufgetreten. Insgesamt kam es bei 19 Patienten nur zu geringeren Organtoxizitäten. Jedoch entwickelten alle Patienten eine Mukositis der Mundschleimhaut, die eine Therapie mit Opiaten erforderte. Bei 27 (49 %) Patienten war diese Mukositis sehr schwer (Grad III und IV nach CTC).

Einschränkungen der Nierenfunktion traten bei 21 Patienten auf, das sind 38 %. Bei 9 Patienten waren sie kurzfristig und die Niereninsuffizienz trat im Rahmen der Transplantation

oder der Cyclosporin A Applikation oder einer anderen Medikamentennebenwirkung auf und war reversibel. Zehn Patienten waren Dialyse pflichtig, 2 davon im späteren Verlauf im Rahmen der Therapie von Komplikationen der chronischen GvHD. Nur bei einem Patienten konnte eine Wiederherstellung der renalen Funktion beobachtet werden. 9 Patienten verstarben im Rahmen zusätzlicher intensivmedizinischer Maßnahmen. Bei diesen 9 ergab sich zusätzlich die Notwendigkeit einer Lungenersatztherapie. Bei 8 dieser Patienten war der Grund für die Intubation eine fortschreitende pulmonale Insuffizienz bei Pneumonie – bei 6 Patienten bei führend bakterieller, bei zwei Patienten vorwiegend mykotischer Ursache; bei einer Patientin war eine toxische Lungenschädigung nach Konditionierung mit Ganzkörperbestrahlung und Cyclophosphamid aufgetreten, die trotz intensiver Therapie letal verlief.

Bei 40 % der Patienten (22 Patienten) wurde eine Leberschädigung (wenigstens >3 fache Erhöhung eines Laborparameters) beobachtet. Ein Patient verstarb an Tag 8 am akuten Leberversagen. Bei den 9 Patienten mit komplexen intensivtherapeutischen Maßnahmen kam es zu einem teilweise exzessiven Anstieg der Leberwerte (Bilirubin >50 fache der Norm). Nur bei 3 dieser Patienten konnte eine GvHD (2 akute, eine chronische) gesichert werden. Bei einer Patientin stand das toxische Leberversagen im Vordergrund.

3 Patienten entwickelten eine durch Medikamente induzierte mikroangiopathische hämolytische Anämie. Die Verabreichung von hochdosierten Steroiden, das Umsetzen von Cyclosporin A auf Tacrolimus und bei der dritten Patientin das Absetzen des Cyclosporin A bewirkten ein allmähliches Abklingen und letztlich das Sistieren der Hämolyse.

Bei 6 Patienten (11%) traten klinisch relevante kardiale Komplikationen auf. 2 Patienten entwickelten während der ersten 6 Monate nach HSCT einen akuten Myokardinfarkt, bei einer Patientin erfolgte eine ständige elektrische Stimulation (Implantation eines Schrittmachers). Ein Patient entwickelte im Verlauf der ersten 3 Monate nach Transplantation eine schwere kardiale Insuffizienz, die therapiepflichtig blieb und den Krankheitsverlauf im Rahmen der später unkontrollierten chronischen GvHD negativ beeinflusste.

Eine Patientin entwickelte eine schwere reaktive Steroidpsychose 90 Tage nach HSCT, die eine zweimonatige psychiatrische stationäre Behandlung erforderlich machte. Sie klang folgenlos ab.

Es starben 3 Patienten an direkten toxischer Nebenwirkungen der Konditionierung: zweimal stand ein Leberversagen in Vordergrund, bei einer Patientin handelte es sich primär um eine Lungenschädigung. In der Frühphase nach HSCT waren 9 Patienten in intensivmedizinischer Behandlung. Langfristige Organschäden mit Insuffizienzen traten nicht auf.

3.2.3.2. Akute und chronische GvHD

Es kam bei den meisten der Patienten zu einer Graft-versus-Host Erkrankung. Insgesamt hatten 18 Patienten keinerlei Zeichen einer akuten oder chronischen GvHD. 27 von 54 auswertbaren Patienten entwickelten eine akute GvHD (50 %), 20 von 48 (42 %) auswertbaren Patienten eine chronische GvHD. Die Häufigkeit der einzelnen Grade zeigt die nächste Tabelle.

Tabelle 24: Anzahl der Patienten mit unterschiedlichen Schweregraden der akuten GvHD

Grad	Zahl der Patienten	Anteil (%)
0	27	50
I	8	15
II	11	20
III	3	5
IV	5	10
II-IV	19	35

Die Anzahl der Patienten, bei denen unterschiedliche Stadien nach Lokalisation festgestellt wurden, sind in der folgenden Tabelle dargestellt (Tabl.27).

Tabelle 25: Manifestationen der akuten GvHD

Stadium	Gesamt	1	2	3	4
Haut	23	8	8	3	4
Darm	8	-	3	2	3
Leber	5	-	-	2	3

Das Auftreten der akuten GvHD in Abhängigkeit von Zeitpunkt nach der Transplantation stellt sich wie folgt dar, dabei trat die akute GvHD im Mittelern an Tag 30 (9 – 95) auf.

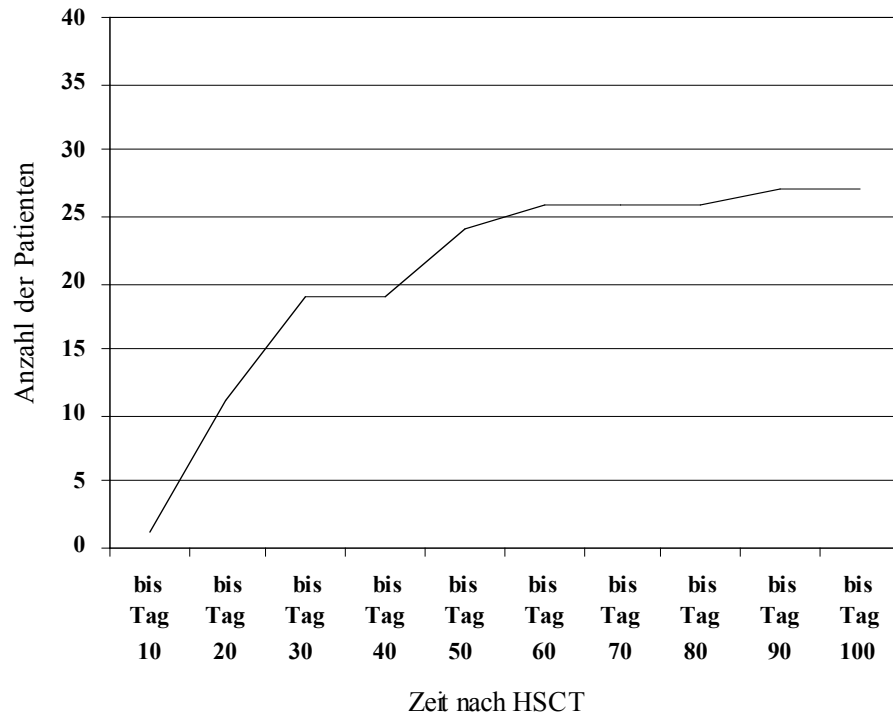


Abbildung 6: Kumulative Inzidenz der akuten GvHD in Abhängigkeit vom Zeitpunkt des Auftretens nach HSCT und konventioneller Konditionierung

Von den 23 Patienten mit einer akuten GvHD der Haut waren 22 therapiebedürftig. Alle erhielten topische Kortikoide (Ultralan[®] Salbe), bei 18 Patienten war eine zusätzliche Therapie mit unterschiedlichen Dosierungen peroraler Kortikoide (Prednisolon) erforderlich, den übrigen genügte die Dosisanpassung von Cyclosporin A. Bei 19 Patienten musste eine schwere akute GvHD mindestens Grad II diagnostiziert werden, 5 Patienten verstarben an den Folgen der unkontrollierten akuten GvHD der Leber und des Darmes. Alle anderen konnten erfolgreich behandelt werden. Standard war hierbei die Therapie mit 2 mg/kg KG Prednisolon, 13 Patienten sprachen nicht ausreichend auf die Prednisolontherapie an und erhielten zusätzlich Basiliximab 20mg an Tag 1 und 4 nach 2 Tagen Refraktärität auf das Kortison. 2 Patienten erhielten eine zusätzlich Basiliximabtherapie an Tag 28 und 32 in gleicher Dosis bei ungenügendem Ansprechen.

Die chronische GvHD wurde bei 20 von 48 (42 %) Patienten, die länger als Tag 100 lebten, diagnostiziert. Dabei trat bei 9 Patienten eine begrenzte (*limited*) chronische GvHD auf und bei 11 Patienten eine ausgedehnte (*extensiv*). Bei allen Patienten handelte es sich um eine GvHD der Haut, bei 8 Patienten traten zusätzliche Veränderungen der Mundschleimhaut und bei 5 Patienten wurde eine *Conjunktivitis sicca* beobachtet. Alle Patienten erhielten eine Behandlung mit lokalen Therapeutika (Augentropfen, Salben), 4 Patienten wurden mit

modifizierter Dosis Cyclosporin A erfolgreich behandelt, 10 Patienten erhielten systemische Kortikoide (Prednisolon). Von 11 Patienten mit schwerer chronischer GvHD hatte nur ein Patient ausschließlich Haut und Schleimhautveränderungen, die eine systemische Prednisolon-Therapie erforderten und unter dieser rückläufig waren oder nicht fortschritten. 4 Patienten entwickelten eine chronische persistierende Diarrhoe, die nur unter Dauermedikation mit Prednisolon bei einem Patienten sistierte, bei 3 Patienten schließlich unkontrolliert war. 9 Patienten entwickelten eine hepatische GvHD mit Bilirubinanstieg. Bei ebenfalls 3 Patienten (bei denen auch die Darm GvHD unkontrolliert war) kam es zu einem fortschreitenden und Therapie refraktären Leberversagen. 3 Patienten entwickelten pulmonale GvHD Zeichen mit dem klinischen Bild einer Bronchiolitis obliterans mit organisierender Pneumonie (BOOP), die jedoch unter Erhöhung der langfristigen Kortisontherapie sistierten. Zusammenfassend ist festzustellen, dass 3 Patienten an den Folgen eines Multiorganversagens bei progredienter refraktärer chronischer GvHD verstarben.

3.2.3.3. Rezidive und Transplantatversagen

Es trat bei 14 der 55 (25 %) Patienten ein Rezidiv auf – das Rezidiv wurde an Tag 600 (55 – 2292) im Mittel beobachtet; es verstarben 10 Patienten (71 % der Patienten, die ein Rezidiv entwickelten, 18 % aller Patienten) – der Tod trat im Mittleren an Tag 381 (100 – 1216) ein. 7 der 10 verstorbenen Patienten litten an einer akuten lymphatischen Leukämie (1 T-ALL), 2 Patienten an einer AML, ein an einem Multiplen Myelom. Von den 4 lebenden Patienten haben 3 eine inzwischen erfolgreich mit Tyrosinkinaseinhibitor behandelte CML, eine Patientin eine in Therapie befindliche CLL. Ein primäres Transplantatversagen trat bei einer Patientin unter intensivmedizinischer Betreuung mit toxischer Lungenschädigung nach Ganzkörperbestrahlung und Cyclophosphamid auf. In einer Multivarianzanalyse (Cox Regression) wurden am seltensten Rezidive in der Gruppe beobachtet, die eine nicht akute Leukämie hatten und einen kompletten Chimärismus am Tag 60 ($p = 0,02$) erreichten. Die gleiche Aussage trifft auch für die Patienten zu, die einen kompletten Chimärismus an Tag 90 hatten ($p < 0,0001$). Alle anderen untersuchten Faktoren hatten keinen signifikanten Einfluß auf die Rezidivhäufigkeit (Alter, Geschlecht, Konditionierung, Alter des Spenders und dessen Geschlecht, Transplantatcharakteristika).

3.1.3.4. Überleben, Therapie bedingte Mortalität, Frühodesfälle

Von 55 Patienten leben 30 Patienten (55 %). Die mediane Überlebenszeit beträgt 1216 Tage (Konfidenzintervall 95%: 186 – 2245). 26 Patienten leben ohne Rezidiv. Das mediane Rezidiv freie Überleben liegt bei 2252 Tagen (Konfidenzintervall 95%: 1214 – 3289). Es starben insgesamt 25 (45%) Patienten, 9 Patienten verstarben am Rezidiv, das sind 20%. Bis zum Tag 100 starben 8 (14,5 %) Patienten, davon 3 an akuter Organtoxizität und eine Patientin an den Folgen einer akuten GvHD sowie 3 an Infektionen, ein Patient im Rezidiv. Nach Tag 100 starben 17 Patienten. Außer den 8 primär am Rezidiv nach Tag 100 Verstorbenen trat bei 3 Patienten der Tod an den Folgen der akuten GvHD, bei 2 Patienten an Komplikationen der chronischen GvHD ein, 4 Patienten starben an Infektionen (Tage 292, 1260, 279, 1046). Von den 34 Patienten mit akuten Leukämien starben 9 (26,5%) im Rezidiv ihrer Grunderkrankung. Die Therapie bedingte Mortalität beträgt damit insgesamt 29 % (16 Patienten). In einer Multivarianzanalyse (Cox Regression) wurde das beste Überleben in der Gruppe beobachtet, die eine nicht akute Leukämie hatten und einen kompletten Chimärismus am Tag 60 ($p = 0,0296$). Die gleiche Aussage trifft auch für die Patienten zu, die einen kompletten Chimärismus an Tag 90 hatten ($p < 0,0001$). Alle anderen untersuchten Faktoren hatten keinen signifikanten Einfluß auf das Überleben nach konventioneller Konditionierung (Alter, Geschlecht, Konditionierung, Alter des Spenders und dessen Geschlecht, Transplantatcharakteristika). Die gleiche Aussage wurde hinsichtlich der Rezidivwahrscheinlichkeit getroffen.

3.3. Statistische Analyse und Vergleich beider Gruppen

Beim Vergleich der Altersgruppen ergibt sich ein hochsignifikanter Unterschied bei einem mittleren Alter in der Gruppe nach reduzierter Konditionierung von 53 Jahren (18 – 72) und in der Gruppe nach konventioneller Konditionierung von 40 Jahren (17 – 64) (Chi Quadrat Test, $p < 0,001$). Hinsichtlich Geschlecht, Spender- und Transplantatcharakteristika, Malignitätsgrad der Grunderkrankung (Diagnosen) ergaben sich keine Differenzen.

Nach der Analyse des Gesamtüberlebens für 107 Patienten und eines Vergleichs der beiden Gruppen mit allogener Transplantation hämatopoetischer Stammzellen nach reduzierter Konditionierung oder nach konventioneller Konditionierung ergibt sich keine statistische Differenz (log rank; $p = 0,83$).

Abbildung 7: Vergleich der Gesamtüberlebens nach konventioneller(□) und Konditionierung mit reduzierter Intensität (o), log rank $p = 0,83$.

Für das Rezidiv freie Überleben in beiden Gruppen ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,026$).

Abbildung 8: Rezidiv freies Überleben nach konventioneller (□) und Konditionierung mit reduzierter Intensität (o), log rank $p = 0,026$.

Werden alle Patienten gemeinsam hinsichtlich des Einflusses verschiedener Faktoren auf das Gesamtüberleben oder das Rezidiv freie Überleben analysiert, konnten signifikante Abhängigkeiten nachgewiesen werden. Das Gesamtüberleben war nicht vom Alter abhängig (log rank $p = 0,12$). Rezidive traten signifikant häufiger im höheren Alter auf ($p = 0,0092$).

Abbildung 10: Rezidivhäufigkeit bei allen Patienten in Abhängigkeit vom Alter bei Patienten jünger als 50 Jahre (\square) und Patienten gleich und älter als 50 Jahre (o), log rank $p = 0,0092$.

Bei der Analyse in den beiden Gruppen ergab sich hinsichtlich des Alters das gleiche Bild allerdings ohne Signifikanzen bei kleiner Zahl der Patienten.

Die Grunderkrankung hat Einfluß sowohl auf das Überleben als auf die Rezidivwahrscheinlichkeit, in beiden Gruppen zusammen sind diese Unterschiede signifikant für das Gesamtüberleben ($p = 0,017$), in der Tendenz signifikant für das Rezidiv freie Überleben ($p = 0,07$). Faktoren wie Alter und Geschlecht des Spenders, Transplantatcharakteristika, Geschlecht des Patienten blieben in den Untersuchungen ohne Einfluß auf Gesamtüberleben oder Rezidivwahrscheinlichkeit. Für die Gruppen getrennt analysiert ergeben sich gleiche statistisch bewertete Resultate. In der Gruppe nach RIC gibt es keinen Unterschied im Überleben in Abhängigkeit vom Alter, beide Kurven laufen fast deckungsgleich. In der Gruppe nach konventioneller Konditionierung gibt es eine deutliche

Tendenz ($p = 0,12$) zugunsten der jüngeren Patienten, ohne dass eine statistisch signifikante Aussage wegen der zu geringen Patientenzahl erreicht wird.

Hinsichtlich der Analyse des Einflusses eines gemischten oder kompletten Chimärismus an den Tagen 30, 60, 100 und später auf das Überleben und die Rezidivwahrscheinlichkeit ergab sich Folgendes: Ob an Tag 30 ein kompletter oder gemischter Chimärismus nachzuweisen war, war in beiden Gruppen getrennt und gemeinsam ohne Einfluß auf die untersuchten Endpunkte. Exemplarisch sei hier die Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben gezeigt.

Abbildung 11: Vergleich der Gesamtüberlebens bei komplettem Chimärismus(o) und gemischtem Chimärismus an Tag 30 (\square) (log rank $p = 0,50$)

Bei der Analyse des Einflusses eines kompletten oder gemischten Chimärismus auf das Gesamtüberleben oder die Rezidivwahrscheinlichkeit konnten signifikante Abhängigkeiten festgestellt werden. Patienten mit einem kompletten hämatopoetischen Chimärismus an Tag 60 und ebenso an Tag 100 haben eine signifikant höhere Überlebenschance ($p = 0,001$ und $p < 0,0001$ entsprechend). Das gilt für alle Patienten ebenso wie für die Gruppe der Patienten nach Konditionierung mit reduzierter Intensität wie nach konventioneller Konditionierung.

Abbildung 12: Vergleich der Gesamtüberlebens bei komplettem Chimärismus (o) und gemischtem Chimärismus an Tag 60 (□) (log rank $p = 0,001$)

Abbildung 12: Vergleich der Gesamtüberlebens bei komplettem Chimärismus (o) und gemischtem Chimärismus an Tag 100 (□) (log rank $p < 0,0001$)

Für das Auftreten der Rezidive ist die Bestimmung des Chimärismus am Tag 60 und am Tag 90 ebenso ein Prognosefaktor. Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines Rezidivs ist signifikant höher in der Gruppe mit gemischtem Chimärismus im Vergleich mit der Patientengruppe mit komplettem Chimärismus ($p = 0,03$). Für die Gruppe der Patienten nach RIC konnte ein p-Wert von 0,025 und für die Gruppe nach konventioneller Konditionierung ein p-Wert von 0,020 ermittelt werden. Der komplette Chimärismus an Tag 60 ist damit in allen untersuchten Gruppen ein Vorhersageparameter für eine höhere Überlebenswahrscheinlichkeit. Für den Tag 100 war der p-Wert in der Gruppe nach RIC bei 0,08, es zeigte sich nur eine statistische Tendenz zu höherer Überlebenswahrscheinlichkeit. In der Gruppe nach konventioneller Konditionierung betrug $p < 0,0001$. Besteht an Tag 60 und später ein gemischter Chimärismus, ist die Überlebensprognose eingeschränkt.

Hinsichtlich der Rezidivhäufigkeit kann für alle Patienten die Aussage getroffen werden, dass ein gemischter Chimärismus an Tag 60 und Tag 100 das Risiko einer Wiederkehr der Erkrankung signifikant erhöht ($p = 0,030$).

Abbildung 13: Vergleich des Auftretens eines Rezidives bei komplettem Chimärismus (o) und gemischtem Chimärismus (□) an Tag 60 (log rank $p = 0,0306$)

Analysiert man den Einfluß des Chimärismus an Tag 100 hinsichtlich der Rezidivwahrscheinlichkeit in den Gruppen nach der Art der Konditionierung getrennt, ergeben sich ebenso signifikante p-Werte ($p = 0,036$ nach RIC und $p < 0,0001$ nach konventioneller Konditionierung).

In einer Multivarianzanalyse wurde der Einfluß verschiedener Faktoren auf das Überleben der Patienten untersucht. Hochsignifikant ($p < 0,0001$) von Vorteil ist ein kompletter Chimärismus an Tag 60 bei Patienten mit einer niedrigmalignen Erkrankung (CLL, CML, niedrigmalignes NHL, SAA). Sowohl Patienten mit einem kompletten Chimärismus bei hochmaligner Erkrankung als auch mit einem gemischten Chimärismus bei hoch- oder niedrigmaligner Erkrankung haben eine schlechtere Prognose. Die anderen untersuchten Faktoren hatten keinen signifikanten Einfluß (Alter und Geschlecht des Patienten, Art der Konditionierung, Alter und Geschlecht des Spenders).

Abbildung 14: Vergleich des Gesamtüberlebens bei Patienten mit niedrigmaligner Erkrankung und komplettem Chimärismus an Tag 60 (x), mit hochmaligner Erkrankung und komplettem Chimärismus an Tag 60 (\square), mit niedrigmaligner Erkrankung und gemischtem Chimärismus an Tag 60 (Δ) und mit hochmaligner Erkrankung und gemischtem Chimärismus an Tag 60 (log rank, $p < 0,0001$)

Wurde der Einfluß einzelner Faktoren in den beiden Patientengruppen separat durchgeführt, fanden sich die gleichen Parameter, die einen Einfluß auf die Prognose nahmen. In der Gruppe nach RIC lag die Signifikanz bei $p < 0,001$, entsprechend in der Gruppe nach konventioneller Konditionierung betrug der p-Wert $p = 0,029$.

4. Diskussion

Die allogene Transplantation hämatopoetischer Stammzellen hat in der vergangenen Dekade eine sprunghafte Entwicklung durchlaufen. Von einer Methode der Maximaltherapie wurde sie zu einer Behandlung, die immunologische Prozesse begleitet und moduliert. Die Nutzung der Immuneffekte in der allogenen Stammzelltransplantation erreichte mit dem erfolgreichen klinischen Einsatz der Spender-Lymphozyteninfusion durch Kolb einen ersten Höhepunkt (Kolb et al., 1990). Die von der aggressiven Hochdosistherapie wegführende Orientierung auf dosis- und intensitätsreduzierte Konditionierungen ermöglicht die breite Anwendung der HSCT altersunabhängig und bei Patienten mit verschiedenen Erkrankungen des Knochenmarkes. Die Idee eines allmählichen, schmerzfreien Ersatzes des kranken blutbildenden Systems durch ein gesundes, neues Myelon findet ihre Verwirklichung in der Praxis. Als begleitende und die Transplantation bestätigende molekulargenetische Methode spielt dabei die Analyse des hämatopoetischen Chimärismus eine Schlüsselrolle.

Die nach der Jahrtausendewende in unserer Klinik vollzogene breite Einführung neuer Konditionierungsprotokolle erlaubte eine prospektive Analyse der klinischen und laborexperimentellen Daten aller Patienten, die sich einer allogenen HSCT unterzogen. 52 Patienten erhielten eine Konditionierung mit reduzierter Intensität und 55 eine Konditionierung nach konventionellem Schema. Bei allen Patienten erfolgte eine Untersuchung des hämatopoetischen Chimärismus im Verlauf nach der Übertragung der Stammzellen.

Die von uns favorisierte Konditionierung mit Treosulfan und Fludarabin ist entgegen ursprünglicher Interpretationen myeloablativ. Die hohe Zahl der Patienten (zusammen 75%) mit frühem kompletten (58%) und gemischtem Chimärismus mit sehr hohem Anteil an Spenderzellen (18%) an Tag 30 belegt die vollständige Umstellung der Hämatopoese auf die des Spenders. Zählt man die sieben Patienten, die bis zum Tag 60 einen CC entwickelten

hinzu, haben rund 90% aller Transplantierten, die mit reduzierter Intensität konditioniert wurden, eine vollständige Spenderhämatopoese und damit keine eigene Resthämatopoese, weder vertreten durch maligne noch durch normale Zellen. Die Konditionierung ist myeloablativ. Diese Daten stimmen mit den Publikationen aus anderen Zentren überein (Westerhof et al., 2000; Casper et al., 2004). Nach konventioneller Konditionierung wird ein kompletter früher Chimärismus bei allen Patienten, die ein Engraftment erreichten, erwartet. Das entspricht unserer Erfahrung und den veröffentlichten Daten (Socie et al., 1995; Lapointe et al., 1996; Ploemacher et al., 2000; Gleissner et al., 2001). Die Untersuchung des Chimärismus bei diesen Patienten bestätigte unsere Annahme. In der Gruppe Patienten nach konventioneller Konditionierung hatte nach einem Monat 85% der Untersuchten eine komplette Spenderhämatopoese. An keinem Tag einen kompletten Chimärismus erreichten Patienten ohne Engraftment und Patienten, die ein frühes Rezidiv entwickelten, bzw. an einer schweren GvHD verstarben. Ein nicht kompletter Chimärismus nach konventioneller Konditionierung geht mit einer ungünstigen Prognose einher, der frühe komplette Chimärismus nach RIC und allogener Transplantation belegt die myeloablativ Potenz des neuen Konditionierungsregimes. Diese Aussagen konnten statistisch hochsignifikant für die Chimärismusanalyse an Tag 60 und später bestätigt werden.

Während einen Monat nach Transplantation der Anteil von Patienten mit nicht komplettem Chimärismus in der Gruppe nach RIC und allogener HSCT mit 42% hoch ist und keine Korrelation mit Rezidiv oder anderen Komplikationen gefunden wurden, ist die Abhängigkeit des weiteren Verlaufes vom Chimärismusstatus an Tag 60 statistisch signifikant belegt. Andere Autoren beobachten diese Korrelation erst im dritten Monat (Lamba et al., 2004). Etwa die Hälfte aller Patienten nach RIC und allogener HSCT fallen in die Gruppe, die einen stabilen CC ab Tag 60 entwickelten. Bei 18,5% (5/27) von ihnen musste ein Rezidiv festgestellt werden, und 74% der Patienten leben länger als ein Jahr. Damit handelt es sich um die prognostisch günstigste Gruppe und die Daten von Lamba für Tag 90 können wir für Tag 60 und für den Tag 100 bestätigen (Lamba et al., 2004). Auf der anderen Seite haben Patienten, bei denen an Tag 60 und später kein kompletter Chimärismus nachgewiesen werden konnte, eine signifikant ungünstige Prognose: Von diesen sind 61% bereits verstorben, 73% von diesen im Rezidiv. Ein gemischter Chimärismus ab 2 Monate nach Transplantation ist mit und ohne klinische Zeichen eines Rezidivs ein signifikantes Kriterium für einen zu erwartenden Rückfall der Erkrankung. Damit ist die frühe Einleitung therapeutischer Maßnahmen indiziert. In Ausnahmefällen ist ein MC im Verlauf bis Tag 150 festgestellt worden, ohne dass dies mit einer schlechten Prognose korreliert: bei 4 Patienten

mit einer chronischen lymphatischen Leukämie. In Kenntnis der Biologie dieser Erkrankung ist die langfristige Persistenz einer Restpopulation CD 19 positiver B-Lymphozyten des Empfängers bei normaler Transplantatfunktion ohne klinische Bedeutung. In der Literatur wird das allmähliche Verschwinden niedrig maligner lymphatischer Tumorzellen als Beleg für den Graft-versus-Leukämie Effekt gewertet (Dreger et al., 2005; Khouri et al., 1999). Mit Hilfe von zusätzlichen Untersuchungen des Chimärismus der Subpopulationen konnte nachgewiesen werden, dass die Empfänger-Restzellen bei den drei Patienten mit CLL der Population des Tumors zuzuordnen sind. Die Persistenz der wenig proliferationsaktiven Tumorzellen erfordert eine direkte therapeutische Einflussnahme. In den meisten Fällen führt eine Modifizierung der Immunsuppression zu einer Zurückdrängung des malignen Klon. Der Verlauf des Chimärismus der Patienten A.V. (Nr. 5) und S.M. (Nr. 43) belegt dieses therapeutisch notwendige Vorgehen. Bei Patienten nach konventioneller Konditionierung ist das Wiederauftreten eines gemischten Chimärismus nach komplettem Chimärismus in fast allen Fällen Ausdruck des Rückfalls der Grundkrankheit. Patienten aus dieser Gruppe leiden an hochmalignen Erkrankungen. Die leukämischen Blasten von Patienten mit akuter Leukämie zeichnen sich durch hohe Proliferationskapazität aus (Afanasjew et al., 1981). Unabhängig davon, dass neuerdings immunologische Behandlungsansätze, z.B. Vakzinierungen gegen Tumorantigene, effektiv in der Leukämietherapie sind, lässt sich von unseren Daten kein Hinweis für eine wirksame Graft-versus-Leukämie-Reaktion bei diesen Patienten ableiten. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Erfahrungen anderer Gruppen (Mengarelli et al., 2002; Stelljes et al., 2005).

Ein gemischter Chimärismus ist prinzipiell in beiden untersuchten Patientengruppen signifikant prognostisch ungünstig. Die Persistenz von Empfängerzellen in der Gruppe der Patienten nach RIC und allogener HSCT ist nicht zwingend Ausdruck eines klinischen Rezidivs, erfordert jedoch immer therapeutische Korrekturen. Ein länger als 3 Monate nachzuweisender oder neu aufgetretener MC nach CC ist prognostisch ungünstig.

Bei den Komplikationen in den beiden Gruppen ergeben sich auffällige Unterschiede und eine Bestätigung für eine vorliegende Modifikation der neuen Form der Konditionierung. Kein Patient in der Gruppe nach RIC und allogener Transplantation musste aufgrund von organotoxischen Nebenwirkungen intensivmedizinischen Maßnahmen unterzogen werden. Damit war die Konditionierung von verminderter, reduzierter Toxizität. Im gravierenden Unterschied hierzu waren aufgrund toxizitätbedingten Organversagens bei neun (16 %) Patienten nach konventioneller Konditionierung intensivtherapeutische Maßnahmen

erforderlich. Die Patienten wurden intubiert und eine künstliche Beatmung erfolgte. Nur ein Patient überlebte die Komplikationen, die die intensivmedizinischen Maßnahmen erforderlich gemacht hatten. Bei sieben Patienten war zudem eine Nierenersatztherapie mit kontinuierlicher Hämofiltration erforderlich. Bei sechs Patienten handelte es sich um ein Multiorganversagen, das keiner überlebte. Bei zwei Patienten war die Nierenersatztherapie temporär und die Nierenfunktion regenerierte sich wieder. Diese Daten finden Bestätigung in Publikationen (Kew et al., 2006). Noch vor drei Jahren starben in einem großen deutschen universitären Zentrum 90 % aller Patienten, die in Zytopenie, im Rahmen einer Chemotherapie induzierten Knochenmarkinsuffizienz, ein oder mehrere zusätzliche Organersatztherapien benötigten (Kroschinsky et al., 2002). Die untersuchten Patienten entwickelten die intensivtherapiepflichtigen Organinsuffizienzen fast ausschließlich als Folge der toxischen Konditionierung. Trotz vorbestehenden Organfunktionseinschränkungen (z.B. bei Patienten mit Multiplem Myelom Stad. IIIB, bei bekannter koronarer Herzkrankheit, bei chronisch obstruktiver Lungenerkrankung) kam es nicht zum Organversagen.

Nur in einem Fall musste im Rahmen der reduzierten Konditionierung ein letal verlaufendes Organversagen diagnostiziert werden. Eine Patientin mit schwer vorgeschädigter, stark vergrößerter Leber im Rahmen der Grundkrankheit Osteomyelofibrose verstarb an Tag 77 an der Venenverschlusskrankheit nach RIC. Die Transplantation erfolgte in blastischer Transformation und es bestanden keine nicht chemotherapeutischen Therapieoptionen. Bei Vorhandensein eines HLA-identischen Familienspenders und bei Therapiewunsch von Patientin und Familie wurde die Indikation zur HSCT gestellt und diese durchgeführt. In der Literatur ist die Entwicklung einer VOD unabhängig von der Dosis der Chemotherapie eine zu erwartende Komplikation (Wadleigh et al., 2003). Das sich bei der Patientin entwickelnde Leberversagen war therapeutisch nicht kontrollierbar. Es gab zusätzliche, sehr unterschiedliche Ursachen für die Entwicklung einer Leberinsuffizienz. Sie traten begleitend bei allen Patienten auf, die intensivmedizinischer Maßnahmen bedurften. Bei einigen Patienten kam es in Folge der Immunsuppression mit Cyclosporin A zur Induktion einer Mikroangiopathie mit autoimmunhämolytischem Phänomen, eine typische, in der Literatur beschriebene Komplikation (Chemnitz et al., 2000). Der Unterschied in beiden Gruppen ist - obwohl alle Patienten das lebertoxische Cyclosporin A erhielten - auffällig. Seltener wurden Leberinsuffizienzzeichen, unabhängig welcher Genese, in der Gruppe der Patienten nach RIC und allogener HSCT beobachtet. Der Vorteil einer Vorbereitung (Konditionierung) von Patienten auf die allogene Transplantation ohne letale Komplikationen ist augenscheinlich und der Unterschied für jeden Patienten vorteilhaft.

Hinsichtlich der nicht vital bedrohlichen Komplikationen sind die Abhängigkeiten von der Art der Konditionierung nicht weniger auffällig. So trat nur bei einer Patientin eine Mukositis höher als Grad 2 nach RIC und allogener HSCT auf, während die Hälfte der konventionell Transplantierten eine schwere Mukositis entwickelte. Die Patienten nach konventioneller Konditionierung entwickelten fast immer eine Mukositis, während nur bei der Hälfte der Patienten mit RIC eine Schleimhautentzündung beobachtet wurde. Andere Organtoxizitäten (Pankreatitis, Gastroenteritis, Konjunktivitis) heilten ohne Folgen ab.

Die Inzidenz der Graft-versus-Host Erkrankung unterschied sich in beiden Gruppen nicht signifikant und trat praktisch gleich häufig auf. Von Interesse ist der Zeitpunkt des Auftretens: nach RIC und allogener Transplantation trat die akute GvHD im Mittel nach 53 Tagen, in der anderen Patientengruppe nach 30 Tagen auf. Dieses verzögerte Auftreten der akuten GvHD nach intensitätsreduzierter oder nicht myeloablativer Konditionierung hat seine Ursache im Fehlen eines wichtigen pathogenetischen Faktors der Auslösung der GvHD. Die typischerweise frühe, schwere GvHD nach konventioneller Konditionierung wird durch die Zytokinfreisetzung, beispielsweise bei Strahlendermatitis oder -enteritis, medikamententoxischer Hepatitis oder Mukositis ausgelöst (Ferrara, Reddy, 2006). Da diese Organschädigungen durch die RIC nicht auftraten, kam es zu einem entsprechend späteren Immunkonflikt, getriggert durch die im Transplantat enthaltenen T-Lymphozyten. Oben genannte Beobachtungen stehen in Einklang mit den Angaben in der Literatur (Perez-Simon et al, 2005). Andererseits sind die Inzidenzen der GvHD in beiden Gruppen nicht wesentlich differierend. Zwar findet sich die Tendenz einer etwas häufigeren akuten GvHD nach RIC und allogener HSCT als nach konventioneller Konditionierung (61% und 50% entsprechend), wobei der Unterschied nicht signifikant ist. Bei der Analyse der tödlichen Komplikation jedoch ergeben sich deutliche Verschiedenheiten. Die akute GvHD Grad II, III und IV nach konventioneller Konditionierung und allogener HSCT ist häufig Therapie refraktär und hat bei drei Patienten direkt zum Tode geführt. In der anderen Gruppe gab es einen Todesfall. Es gibt in der Literatur keine Aussage hierzu, das gleichzeitige Auftreten von Komplikationen bei diesen Patienten ist aber wahrscheinlich und erschwert ein wirkungsvolles therapeutisches Eingreifen oder schließt es aus. Diese Beobachtung gilt in besonderem Maße für die Patienten, die durch Organfunktionsausfälle intensivmedizinischer Betreuung im Sinne einer Organersatztherapie bedurften. Alle drei verstorbenen Patienten befanden sich in dieser Situation auf der Intensivstation des Klinikums. Diese Daten widerspiegeln in besonderer Weise den Zusammenhang von toxischer Konditionierung und tödlich verlaufenden Komplikationen jedweder Art. Die Reduzierung der Mortalität bis Tag 100 ist ein wichtiger

Grund für die bessere Akzeptanz und breite Anwendung der neuen Therapie. In den 90iger Jahren erreichte die 100-Tage Mortalität nach konventioneller Konditionierung und allogener Transplantation bei Risikopatienten nach eigenen Daten noch bis zu 30% (Römer et al., 1998). Zwar ist die jetzt erreichte Rate nach konventioneller Konditionierung von 13% deutlich niedriger (die Sterblichkeit bis Tag 150 erreicht allerdings knapp 25%), jedoch unterscheidet sie sich, wenn auch nicht signifikant, von der Todeshäufigkeit nach RIC und allogener HSCT (8% und 20% entsprechend).

Die chronische GvHD tritt unabhängig von der Art der Konditionierung gleichhäufig in beiden Gruppen auf (42% und 43% entsprechend), wobei in der Gruppe nach konventioneller Therapie die schwere Form der GvHD (*extensive* GvHD) etwas häufiger diagnostiziert wurde (23%, 15% in der Gruppe nach RIC). Das Befallsmuster der GvHD war nicht verschieden.

In Publikationen der vergangen 2 Jahre erfolgte eine retrospektive Auswertung der Inzidenz und der Formen der GvHD nach allogener HSCT nach RIC (Perez-Simon et al., 2005). Die GvHD als typische Komplikationen nach allogener Transplantation tritt dabei unabhängig von der Art der Konditionierung in gleicher Häufigkeit auf. Unterschiede finden die Autoren im Zeitpunkt des Auftretens und in der Assoziation mit anderen Komplikationen und damit in der Behandelbarkeit des induzierten Immunkonfliktes GvHD.

Die wichtigste Todesursache der Patienten, die mit reduzierter Intensität konditioniert wurden, war ein Rezidiv der Grunderkrankung. 17 der 26 Verstorbenen erlagen der Progression ihres Tumorleidens. Das sind 33 % aller Patienten und immerhin 65 % der Verstorbenen. Das belegt die Begrenztheit der therapeutischen Kapazität der RIC. Die Rezidivrate nach RIC im Vergleich zur konventionellen Konditionierung war bei den untersuchten Patienten signifikant höher. Die noch vor fünf Jahren bestehende Euphorie hinsichtlich der neuen Transplantationsvorbereitung musste inzwischen einer realistischen Einschätzung weichen. In größeren Patientengruppen konnte gezeigt werden, dass höher maligne Tumore des blutbildenden Systems, die nicht chemotherapeutisch kontrolliert sind, insbesondere akute Leukämien, nicht effektiv mit reduzierter Intensität konditioniert werden können (Mengarelli et al., 2002). Von den transplantierten 18 Patienten mit akuten Leukämien verstarben 9 im Rezidiv. Hier liegen die Grenzen der Methode. Der immunologische Effekt des Transplantates ist bei diesen Patienten nicht ausreichend, um die Leukämie dauerhaft zu verdrängen, wird dabei auf intensive Strahlen- und/oder Chemotherapie verzichtet. Andererseits schließt die RIC und allogene HSCT eine Wiederholung einer intensiven Therapie nicht in dem Maße aus, wie die konventionelle Konditionierung. Erst nach einer

sechsmonatige Chemotherapiepause vor einer erneuten Rezidivbehandlung überleben Patienten die wiederholten chemotherapeutischen Behandlungen und sind langfristig geheilt (Blau et al., 2000). So konnten vier unserer Patienten erfolgreich behandelt werden und befinden sich nach wie vor in stabiler Remission bei vollständiger hämatologischer Regeneration des Transplantates. In der Gruppe nach konventioneller Konditionierung wurden zwei Patienten, ebenfalls erfolgreich, ein zweites Mal transplantiert, allerdings ist der Beobachtungszeitraum hier noch sehr kurz. Von den Patienten, die nach konventioneller Transplantation verstorben (45 %) sind, erlagen neun Patienten einem Rezidiv der Grundkrankheit, alle litten an einer akuten Leukämie. Ein Drittel der Patienten starb am Organversagen, das durch die Toxizität der Konditionierung bedingt war und ein anderes Drittel an einer GvHD oder Infektionen als Folge der Immundefizienz. Trotz verbesserter Therapiemöglichkeiten der GvHD und effektiver Antiinfektiva bleiben für viele Patienten Infektionen und Immunkonflikt schwerwiegende, letale Probleme. Die therapiebedingte Letalität beträgt zusammengefaßt nach konventioneller Konditionierung 29%, nach RIC nur 17%, die Rezidivwahrscheinlichkeit liegt entsprechend bei 16% und 33%.

Aufgrund der insgesamt eher kurzen Beobachtungszeit sind sekundäre Neoplasien selten beobachtet worden. In der Literatur findet man eine Inzidenz von bis 2 % nach der Chemo- und Strahlentherapie bei Morbus Hodgkin (Franklin et al., 2006) nach frühestens 2-4 Jahren. Ein Patient nach RIC und allogener HSCT ist gegenwärtig aufgrund eines Plattenepithelkarzinoms im Zungenbereich in Behandlung (Demarosi et al., 2005). Andere Zweitneoplasien wurden bis zum Abschluß der Datenerhebung nicht diagnostiziert.

Hinsichtlich der langfristigen Beobachtung der Patienten stellt sich die Frage nach der Bedeutung des wieder diagnostizierten Tumors und seiner Behandelbarkeit im Verlauf nach allogener HSCT. Erwähnenswert ist die Zahl der im oder nach einem Rezidiv lebenden Patienten, das heißt, mit einer klinisch präsenten oder erfolgreich behandelten Tumorerkrankung nach allogener Transplantation. In der Gruppe nach RIC sind es vier von 21 Patienten, in der anderen Gruppe sind es vier von 14 der Patienten mit Rezidiv des Tumorleidens, die erfolgreich behandelt und am Leben sind. Noch vor sieben Jahren schien eine Therapie der Rezidive nach allogener Transplantation scheinbar aussichtslos (Blau et al., 2000). Diese Zahlen dokumentieren einerseits die Einführung neuer Medikamente in die onkologische Behandlungspraxis, insbesondere der sogenannten Target-Therapeutika wie Imatinib für die CML (Ramanayanaran et al., 2006, Weissner et al., 2006) und Bortezomib für das MM (Blau et al., 2004). Medikamente ohne wesentlich systemische Nebenwirkungen

können erfolgreich nach allogener Transplantation zum Einsatz kommen. Andererseits kann eine aktive Graft-versus-Leukämie Reaktion, wie sie besonders bei den sich langsam stabilisierenden Patienten mit CLL zu beobachten ist und im länger persistierenden oder transienten gemischten Chimärismus eine genetische Bestätigung findet, nach RIC und allogener Transplantation Wirkung zeigen.

Das Gesamtüberleben der Patienten war in der Gruppe nach RIC zwar etwas besser als das Gesamtüberleben nach konventioneller Konditionierung, jedoch statistisch nicht signifikant unterschiedlich (50% und 55% entsprechend). Das mittlere Alter in beiden Gruppen ist jedoch hochsignifikant unterschiedlich (53 Jahre und 40 Jahre entsprechend). In der Gruppe mit RIC und allogener HSCT sind Patienten transplantiert worden, die sich für eine Standardkonditionierung nicht qualifizierten: 24 Patienten waren älter als 55 Jahre, der älteste 72 Jahre, es leben 13 Patienten, der älteste, erfolgreich transplantierte Patient ist 66 Jahre alt (Tag +1034). In der Gruppe nach konventioneller Konditionierung und allogener HSCT waren fünf Patienten über 55, der älteste war 61 Jahre, es leben drei von diesen Patienten. Die Konditionierung mit reduzierter Intensität ist für ältere Patienten verträglich und unsere Daten bestätigen die Daten der Literatur. Damit ist die allogene HSCT zunehmend auch für ältere Patienten eine mögliche Behandlungsoption, unter der Maßgabe, dass Patienten mit reduzierter Intensität konditioniert werden.

Die Methode der Bestimmung und des Monitorings des hämatopoetischen Chimärismus nach allogener Transplantation ist seit etwa zehn Jahren etabliert und spielt eine große Rolle bei der Diagnostik von Transplantatversagen, Rezidiv und Persistenz der Grundkrankheit (Thiede et al., 2001). Die Annahme, die durch die vorliegenden Daten Bestätigung findet, spiegelt die Rolle des Gesamtchimärismus, also eines Chimärismus des ganzen Knochenmarks und des ganzen Blutes wider. Damit ist ein effektives und rechtzeitiges differentialdiagnostisches und differentialtherapeutisches Vorgehen möglich. Bei einzelnen Patienten erfolgte eine Chimärismusuntersuchung von Subpopulationen hämatopoetischer Zellen, so der CD 19 positiven Zellen bei CLL oder der CD 138 positiven Zellen bei Patienten mit MM. Für Patienten mit Erkrankungen, bei denen CD 34 positive Zellen zum malignen Klon gehören, scheint der Chimärismus innerhalb dieser Subpopulation von Interesse. Es gibt jedoch keine publizierten Daten für die Bedeutung eines gemischten Chimärismus in der Fraktion der CD 34 positiven Stammzellen insbesondere hinsichtlich der Interpretation einer klinisch stabilen Situation mit normaler Hämatopoese und einem Knochenmarkchimärismus von 100 %. Transplantationszentren akzeptieren einen Anteil von bis zu 20 % Empfängergenom in der

CD 34 positiven Zellfraktion, ohne diesem Wert eine pathologische Bedeutung zuzumessen (Bornhäuser, persönliche Mitteilung).

Die Bestimmung des Chimärismus in der Population der T- und B-Lymphozyten spielt eine Rolle in der Diagnostik der GvHD und des Fortschreitens der Immunregeneration nach allogener Transplantation (Thiede et al., 2001). Die GvHD-Diagnostik erfolgte prinzipiell histologisch und ergänzende Untersuchungen der T- und NK-Lymphozyten gilt es in der Zukunft zu etablieren.

Patienten, die eine allogene Transplantation hämatopoetischer Stammzellen erhielten, hatten verschiedene Diagnosen und waren unterschiedlich intensiv vorbehandelt. Jedwede Therapie einer Erkrankung des Knochenmarkes sollte zu einer Normalisierung der typischerweise verkürzten Lebenserwartung führen. Die aktuelle Entwicklung in der Transplantation allogener Stammzellen revolutioniert die Behandlung hämatologischer Erkrankungen. Die Einführung der an Intensität reduzierten Konditionierung vor der Transplantation erschließt für Patienten, die zuvor palliativ behandelt wurden, eine kurative Behandlung: Patienten mit CLL, MM oder MPS. Eine Altersbeschränkung gibt es nicht, sowohl unsere Daten als auch Publikationen der letzten Jahre demonstrieren erfolgversprechende Eingriffe bei immer älteren Patienten (Hegenbart et al., 2006). Deeg sieht auch bei sechszwanzigjährigen Patienten eine Altersgrenze noch nicht erreicht (Deeg et al., 2000). Zwar hat sich das Alter von Patienten, die nach konventioneller Konditionierung transplantiert werden, in den letzten zwei Jahrzehnten ebenfalls deutlich verschoben, trotzdem bleibt eine Altersbegrenzung bei dieser Behandlungsmodalität erforderlich, wobei besonders vorliegende Begleiterkrankungen die Möglichkeit der Durchführung der konventionellen Konditionierung einschränken.

Der Übergang zu kurativen Behandlungszielen von Patienten mit niedrig malignen Tumoren bedeutet einen Fortschritt in der Hämatologie. Von besonderer Bedeutung ist, dass die Gefährdung dieser Patienten durch die Therapie bedingten Komplikationen minimal bleibt. Da bereits mit konventioneller Chemotherapie ein mittleres Überleben bei Patienten mit MM von über 7 Jahren (Barlogie et al., 2006) und bei Patienten mit CLL von über 6 Jahren (Leporrier et al., 2001) erreicht wird, dürfen kurative Behandlungsansätze wie beispielsweise eine allogene HSCT die mittlere Lebenserwartung nicht verkürzen. Die Daten der Patienten mit CLL, die in die Auswertung eingeflossen sind, belegen schlaglichtartig die neue Qualität der Behandlungsmöglichkeiten. Nach 12 Jahren Therapie und schweren Komplikationen bei trilineärer Knochenmarkinsuffizienz wurde eine erfolgreiche allogene Transplantation mit Stammzellen von einem HLA-identischen unverwandten Spender für einen

fünfundfünfzigjährigen Patienten (Pat. 5), der geheilt werden konnte und heute 4 Jahre nach Transplantation sozial rehabilitiert gesund lebt (Körper et al., 2007) durchgeführt. Insgesamt wurden acht Patienten (sieben Patienten nach RIC, ein Patient nach konventioneller Konditionierung) mit CLL, 12 (11 und ein) Patienten mit MM und vier (drei und ein) Patienten mit niedrig malignem Lymphomen transplantiert; von 24 (21 und 3) Patienten mit niedrig malignen Erkrankungen des lymphoproliferativen Systems leben 16 (14 und zwei), und 12 (11 und ein) in kompletter Remission, die diese Patienten nach konventioneller Chemo- oder Strahlentherapie nicht erreicht hätten. Von den acht verstorbenen Patienten waren sieben wegen der Progression ihrer malignen Grunderkrankung ad exitum gekommen, ein Patient verstarb an den Folgen einer Infektion bei fortbestehender Immunschwäche nach Transplantation. Diese Ergebnisse entsprechen denen, die andere Zentren erreichten und die das Vorgehen bei Patienten mit niedrigmalignen und hochmalignen Erkrankungen entsprechend begründen. Das wichtigste Problem der Patienten nach RIC bleibt die Wiederkehr der malignen Grunderkrankung. Ist diese jedoch eine niedrig maligne Erkrankung, wie beispielsweise eine CLL oder ein MM, so hat der Patient Heilungschancen, die es zuvor bei konventioneller Chemo- und/oder Strahlentherapie nicht gab. Diese Gruppe von Patienten profitiert von der neuen RIC: es eröffnet sich ihnen die Chance, mit normaler Knochenmarkfunktion gesund zu werden und bei vielen gelingt zudem die soziale Reintegration. Patienten, die an hochmalignen Erkrankungen leiden, sind dabei dem Risiko eines Rezidives zwar verstärkt ausgesetzt, aber auch bei dieser Gruppe von Patienten werden immuntherapeutische Behandlungsstrategien nach allogener Transplantation unter Nutzung von Graft-versus-leukemia-Effekten getestet (Khoury et al., 1998).

All dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die in den letzten Jahren etablierte Konditionierung mit reduzierter Intensität als Standardtherapie für ältere Patienten mit hoch- oder niedrigmalignen hämatologischen Erkrankungen anzusehen ist. Dabei müssen Patienten-Risikogruppen für die Erkrankungen definiert werden, für die die Transplantation indiziert ist und die das Gesamtüberleben der Patienten mit den entsprechenden Krankheitsentitäten verbessern. Neben einer effektiven Standarddiagnostik zur Verhinderung schwerwiegender Komplikationen bereits präemptiv, also vor Ausbruch der klinischen Erscheinungen, ist für die Steuerung der immunologischen Therapie die regelmäßige molekulargenetische Analyse des Chimärismus erforderlich.

5. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Die allogene Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen ist eine etablierte Behandlungsmodalität bei malignen und einigen nicht malignen hämatologischen Erkrankungen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Ergebnisse von 107 allogenen Transplantationen am Campus Benjamin Franklin der Charité analysiert und in zwei Gruppen gegenübergestellt: 55 Patienten erhielten eine Transplantation nach konventioneller Konditionierung und 52 Patienten eine Transplantation nach Konditionierung mit reduzierter Intensität. Diese Therapiemodalität wurde erfolgreich in der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Transfusionsmedizin eingeführt und ist jetzt Behandlungsoption für einen Teil der Patienten.

In der Analyse wurde gezeigt, dass trotz signifikanter Altersunterschiede beider Gruppen (53 Jahre mittleres Alter nach RIC und 40 Jahre mittleres Alter nach konventioneller Konditionierung), die Therapieergebnisse hinsichtlich des Gesamtüberlebens gleich sind. Zwar treten in der Gruppe nach RIC häufiger Rezidive auf, jedoch sind die Komplikationen, die durch die toxischen Nebenwirkungen der Konditionierung verursacht sind, weniger ausgeprägt. Hinsichtlich akuter und chronischer GvHD und dem Auftreten infektiöser Komplikationen gab es keine Differenzen. Die Wiederherstellung der Hämatopoese hinsichtlich leukozytärer und thrombozytärer Regeneration nach Transplantation läuft gleich schnell.

Bei Patienten mit akuten Leukämien ist das Rezidiv freie Überleben mit 50 % nach RIC und allogener Transplantation und 73 % nach konventioneller Konditionierung und allogener Transplantation entsprechend dem in der Literatur für diese beiden Patientengruppen. Der Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen ist zwar nicht signifikant, es gibt jedoch einen Vorteil für die Patienten, die mit konventioneller Chemo- und/oder Strahlentherapie konditioniert wurden. Die konventionelle Konditionierung bleibt nach den hier vorgelegten Daten und den Daten der Literatur der Standard vor einer allogenen Stammzelltransplantation bei Patienten mit akuten Leukämien.

Handelt es sich um Patienten mit niedrigmalignen Erkrankungen, lag der Anteil der Überlebenden in dieser Untersuchung drei Jahre nach Transplantation bei 80%, unabhängig vom Alter und Geschlecht der Patienten, Art der Konditionierung, Art des Transplantates, Alter und Geschlecht der Spender und CMV-Status von Patient und Spender. Ein Vorteil für

die Patienten nach RIC oder die Patienten nach konventioneller Konditionierung fand sich nicht.

Die seriellen Untersuchungen zum hämatopoetischen Chimärismus an den Tagen 30, 60, 100 und später charakterisierten die Transplantatfunktion und gaben Hinweise auf eine Persistenz bzw. ein Wiederauftreten des malignen Zellklons des Patienten. Die Ergebnisse der Chimärismusanalyse der Knochenmarkzellen nach Transplantation hämatopoetischer Stammzellen hatten somit einen prädiktiven Wert für den einzelnen Patienten. Sie erlauben eine Vorhersage von Rezidivwahrscheinlichkeit und Gesamtüberleben.

In der Multivarianzanalyse ist der komplette Spender-Chimärismus am Tag 60 der stärkste Faktor hinsichtlich eines verbesserten Gesamtüberlebens sowohl in den Gruppen der Patienten nach RIC als auch nach konventioneller Konditionierung.

Ein Rezidiv bei Patienten mit einem gemischten Chimärismus an Tag 60 nach Transplantation tritt signifikant häufiger auf als bei Patienten mit komplettem Chimärismus an Tag 60.

Die Ergebnisse der Chimärismus-Analyse an Tag 100 korrelierten analog zu den Ergebnissen an Tag 60 mit Rezidivwahrscheinlichkeit und Überleben.

Ein früher kompletter Chimärismus an Tag 30 korreliert nicht mit der Häufigkeit eines Rezidivs der Grundkrankheit oder mit der Überlebenschance der Patienten, ebenso nicht ein gemischter Chimärismus an Tag 30. Damit ist die Chimärismusanalyse an Tag 30 ohne prädiktiven Wert für den weiteren Verlauf nach der Transplantation.

Ein früher Spender-Chimärismus ist aber bedeutend für die Beurteilung der Transplantatfunktion bei fehlendem klinischen Engraftment.

Nach den erhobenen Daten ist der Chimärismus zwei Monate nach Transplantation von entscheidender prognostischer Bedeutung und damit für Therapieentscheidungen heranzuziehen. Differenziert werden kann mittels Analyse der minimalen Resterkrankung (MRD) zwischen einer Persistenz und einem Rezidiv der Grundkrankheit oder einer Regeneration der normalen Empfängerhämatopoese. Ohne Chimärismusanalyse ist das Engraftment nach Transplantation mit RIC nicht beurteilbar. Die Wahl der Therapie beinhaltet die Entscheidung zur Induktion einer *Graft-versus-leukemia*-Reaktion mittels Reduktion der immunsuppressiven Therapie, einer Immunstimulation und der DLI oder die Entscheidung für eine Tumorthherapie.

Es erwies sich, dass auch Patienten höheren Alters, die sich einer konventionellen komplexen Polychemotherapie eines hämatologischen Malignoms unterziehen, mit einer allogenen Transplantation nach RIC geheilt werden können. Eine Altersgrenze kann somit nicht mehr empfohlen werden. Da Patienten mit einem Alter über 50 Jahre nur in Ausnahmen eine konventionelle Konditionierung mit anschließender Transplantation allogener Stammzellen tolerieren, ist für sie eine Konditionierung mit reduzierter Intensität die Therapie der Wahl.

Gemäß dieser Analyse und der aktuellen Literatur wird die Transplantation nach Konditionierung mit reduzierter Intensität (RIC) nunmehr als Standardtherapieverfahren genutzt. Die Analyse des hämatopoetischen Chimärismus ist dabei eine wesentliche Voraussetzung für die rechtzeitige Prognostizierung eines Rezidivs der Grunderkrankung und folglich die Basis für einen dauerhaften Erfolg der Transplantation allogener Stammzellen und damit der Heilung der Patienten.

6. Literatur

Afanasjew BW, Elstner E, Saidali MA, Zabelina TS. 1998. Proliferation and maturation of hematopoietic cells in adult patients with different forms of acute leukemia and chronic myeloid leukemia in agar und liquid cultures. *Haematology and Blood Transfusion*, 26:251-4.

Afessa B, Peters SG. 2006. Major complications following hematopoietic stem cell transplantation. *Semin Respir Crit Care Med* 27:297-309.

Aoudjhane M, Labopin M, Gorin NC, Shimoni A, Ruutu T, Kolb HJ, Frassoni F, Boiron JM, Yin JL, Finke J, Shouten H, Blaise D, Falda M, Fauser AA, Esteve J, Polge E, Slavin S, Niederwieser D, Nagler A, Rocha V, Acute Leukemia Working Party (ALWP) of the European group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). 2005. Comparative outcome of reduced intensity and myeloablative conditioning regimen in HLA identical sibling allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for patients older than 50 years of age with acute myeloblastic leukaemia: a retrospective survey from the Acute Leukemia Working Party (ALWP) of the European group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Leukemia* 19:2304-12.

Arinkin MI. 1929. Die intravitale Untersuchungsmethodik des Knochenmarks. *Folia Haematologica* 38:233-40.

Atkinson K, Nivison-Smith I, Dodds A, Concannon A, Milliken S, Downs K. 1989. A comparison of the pattern of interstitial pneumonitis following allogeneic bone marrow transplantation before and after the introduction of prophylactic ganciclovir therapy in 1989. *Bone Marrow Transplant* 21:691-6.

Baccarani M, Saglio G, Goldman J, Hochhaus A, Simonsson B, Appelbaum F, Apperley J, Cervantes F, Cortes J, Deininger M, Gratwohl A, Guilhot F, Horowitz M, Hughes T, Kantarjian H, Larson R, Niederwieser D, Silver R, Hehlmann R. 2006. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 108:1809-20.

Bader P, Hancock J, Kreyenberg H, Goulden H, Niethammer D, Handgretinger R, Oakhill A, Steward C, Beck J, Kilngiebel T. 2001. Minimal residual disease status prior to allogeneic stem cell transplantation in children with ALL has a profound impact on post-transplant outcome. *Bone Marrow Transplant* 27:54.

Banna GL, Aversa S, Sileni VC, Favaretto A, Ghiotto C, Monfardini S. 2004. Nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation (NST) after truly nonmyeloablative and reduced-intensity conditioning regimens. *Critical Review of Oncology and Hematology* 51:171-89.

Barlogie B, Kyle RA, Anderson KC, Greipp PR, Lazarus HM, Hurd DD, McCoy J, Moore DF, Dakhil SR, Lanier KS, Chapman RA, Cromer JN, Salmon SE, Durie B, Crowley JC. 2006. Standard chemotherapy compared with high-dose chemoradiotherapy for multiple myeloma: final results of phase III US Intergroup Trial S9321. *J Clin Oncol* 24:929-36.

Barrett AJ, Savani BN. 2006. Stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning regimens: a review of ten years experience with new transplant concepts and new therapeutic agents. *Leukemia* [Epub ahead of print].

Basara N, Baurmann H, Kolbe K, Yaman A, Labopin M, Burchardt A, Huber C, Fauser AA, Schwerdtfeger R. 2005. Antithymocyte globulin for the prevention of graft-versus-host disease after unrelated hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia: results from the multicenter German cooperative study group. *Bone Marrow Transplant* 35:1011-8.

Basara N, Blau IW, Kiehl MG, Schmetzer B, Bischoff M, Kirsten D, Gunzelmann S, Fauser AA. 2000. Mycophenolate mofetil for the prophylaxis of acute GVHD in HLA-mismatched bone marrow transplant patients. *Clin Transplant* 14:121-6.

Baynes RD, Parchment R, Dansey RD. 2000. Phase I evaluation of high dose melphalan, DTIC and treosulfan (MDT) in previously treated metastatic breast and ovarian cancer [abstract 585]. *Proc Am Soc Clin Oncol* 19:148a.

Beelen DW, Elmaagacli A, Muller KD, Hirche H, Schaefer UW. 1999. Influence of intestinal bacterial decontamination using metronidazole and ciprofloxacin or ciprofloxacin alone on the development of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation in patients with hematologic malignancies: final results and long-term follow-up of an open-label prospective randomized trial. *Blood* 15:3267-75.

Bender JG, Unverzagt KL, Walker DE, Lee W, Van Epps DE, Smith Dh, Stewart CC, To LB. 1991. Identification and comparison of CD34-positive cells and their subpopulations from normal peripheral blood and bone marrow using multicolor flow cytometry. *Blood* 77:2591-6.

Benito AI, Furlong T, Martin PJ, Anasetti C, Appelbaum FR, Doney K, Nash RA, Papayannopoulou T, Storb R, Sullivan KM, Witherspoon R, Deeg HJ. 2001. Sirolimus (Rapamycin) for the treatment of steroid refractory acute Graft-versus-Host Disease. *Transplant* 72:1924-9.

Bensinger WI, Buckner CD, Shannon-Dorcy K, Rowley S, Appelbaum FR, Benyunes M, Clift R, Martin P, Demirer T, Storb R, Lee M, Schiller G. 1996. Transplantation of allogeneic CD34+ peripheral blood stem cells in patients with advanced hematologic malignancy. *Blood* 88:4132-8.

Billingham RE. 1967. The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect.* 1966-1967; 62:21-78.

Bischoff ME, Blau W, Wagner T, Wagenmann W, Dorner O, Basara N, Fauser AA. 1998. Total body irradiation and cyclophosphamide is a conditioning regimen for unrelated bone marrow transplantation in a patient with chronic myelogenous leukemia and renal failure on hemodialysis. *Bone Marrow Transplant* 22:591-3.

Blau I.W., Fauser A.A. 1996. Antimykotische Prophylaxe in der protrahierten Neutropenie und der allogenen Knochenmarktransplantation. *Mycoses* 39:81-7.

Blau IW, Knauf WU, Marinets U, Thiel E. 2004. Successful treatment for relapse of multiple myeloma after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation with Velcade as exemplified in two cases. *Bone Marrow Transplant* 33, Suppl, 1: 356.

Blau IW, Basara N, Bischoff M, Günzelmann S, Römer E, Kirsten D, Kiehl MG, Fauser AA. 2000. Second allogeneic bone marrow transplant: successful therapy of leukaemic relapse after first transplant. *Bone Marrow Transplant* 25:41-5.

Blau IW, Schmidt-Hieber M, Leschinger N, Göldner H, Knauf W, Hopfenmüller W, Thiel E, Marinets O. 2006. Engraftment kinetics and hematopoietic chimerism after reduced-toxicity conditioning with fludarabine and treosulfan prior to allogeneic stem cell transplantation [Submitted].

Blazar B, Orr H, Arthur D. 1985. Restriction fragment length polymorphisms as markers of engraftment in allogeneic marrow transplantation. *Blood* 66:1436-44.

Bloomfield C, de la Chapelle A. 1987. Chromosome abnormalities in acute nonlymphocytic leukemia: clinical and biological significance. *Sem Oncol* 14:372-83.

Bloomfield CD. 2003. Genetics in the management of adult de novo AML. *Clin Adv Hematol Oncol* 11:640-6.

Blume KG, Forman SJ, O'Donnell MR, Doroshow JH, Krance RA, Nademanee AP, Snyder DS, Schmidt GM, Fahey JL, Metter GE. 1987. Total body irradiation and high dose etoposide: a new preparatory regimen for bone marrow transplantation in patients with advanced hematologic malignancies. *Blood* 69:1015-20.

Bodey GP, Buckley M, Sathe YS, Freireich EJ 1966. Quantitative relationships between circulating leukocytes and infection in patients with acute leukemia. *Ann Intern Med* 64:328-40.

Bolinger A, Zangwill A, Slattery JT, Glidden D, DeSantes K, Heyn L, Risler LJ, Bostrom B, Cowan MJ. 2000. An evaluation of engraftment, toxicity and busulfan concentration in children receiving bone marrow transplantation for leukemia or genetic disease. *Bone Marrow Transplant* 25:925-30.

Borgmann A, Baldy C, v. Stackelberg A, Beyermann B, Fichtner I, Nurnberg P, Henze G. 2000. Childhood ALL blasts retain phenotypic and genotypic characteristics upon long-term serial passage in NOD/SCID mice. *Pediatr Hematolog Oncol* 17:635-50.

Bruggemann M, Raff T, Flohr T, Gokbuget N, Nakao M, Droese J, Luschen S, Pott C, Ritgen M, Scheuring U, Horst HA, Thiel E, Hoelzer D, Bartram CR, Kneba M; German Multicenter Study Group for Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. 2006. Clinical significance of minimal residual disease quantification in adult patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 107:1116-23.

Buchheidt D, Hiddemann W, Schiel X, Kremery V, Karthaus M, Donnelly JP, Wilhelm M, Maschmeyer G, Link H, Adam D, Helmerking M. 1999. European surveillance of infections and risk factors in cancer patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 18:161-3.

Bunjes D. 2002. 188Re-labeled anti-CD66 monoclonal antibody in stem cell transplantation for patients with high-risk acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 43:2125-31.

Burmeister T, Marschalek R, Schneider B, Meyer C, Gokbuget N, Schwartz S, Hoelzer D, Thiel E. 2006. Monitoring minimal residual disease by quantification of genomic chromosomal breakpoint sequences in acute leukemias with MLL aberrations. *Leukemia* 20:451-7.

Carella AM, Champlin R, Slavin S, McSweeney P, Storb R. 2000. Miniallografts: ongoing trails in human. *Bone marrow transplant* 25:345-50.

Carreras E, Bertz H, Arcese W, Vernant JP, Tomas JF, Hagglund H, Bandini G, Esperou H, Russell J, de la Rubia J, Di Girolamo G, Demuynck H, Hartmann O, Clausen J, Ruutu T, Leblond V, Iriando A, Bosi A, Ben-Bassat I, Koza V, Gratwohl A, Apperley JF. 1998. Incidence and outcome of hepatic veno-occlusive disease after blood or marrow transplantation: a prospective cohort study of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *European Group for Blood and Marrow Transplantation Chronic Leukemia Working Party. Blood* 92:3599-604.

Carreras E, Granena A, Navasa M, Bruguera M, Marco V, Sierra J, Tassies MD, Garcia-Pagan JC, Marti JM, Bosch J. 1993. On the reliability of clinical criteria for the diagnosis of hepatic veno-occlusive disease. *Ann Hematol* 66:77-80.

Casper J, Knauf W, Kiefer T, Wolff D, Steiner B, Hammer U, Wegener R, Kleine HD, Wilhelm S, Knopp A, Hartung G, Dolken G, Freund M. 2004. Treosulfan and fludarabine: a new toxicity-reduced conditioning regimen for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 103:725-31.

Chakraverty R, Peggs K, Chopra R, Milligan DW, Kottaridis PD, Verfuert S, Geary J, Thuraisundaram D, Branson K, Chakrabarti S, Mahendra P, Craddock C, Parker A, Hunter A, Hale G, Waldmann H, Williams CD, Yong K, Linch DC, Goldstone AH, Mackinnon S. 2002. Limiting transplantation-related mortality following unrelated donor stem cell transplantation by using a nonmyeloablative conditioning regimen. *Blood* 99:1071-108.

Chemnitz J, Fuchs M, Blau W, Hartmann P, Wickenhauser C, Scheid C, Schulz A, Diehl V, Sohngen D. 2000. Fatal thrombotic thrombocytopenic purpura as a rare complication following allogeneic stem cell transplantation. *Ann Hematol* 79:527-9.

Chien A, Edgar DB, Trela JM. 1976. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *Journal of Bacteriology* 127:1550-7.

Clift RA, Buckner CD, Appelbaum FR, Bearman SI, Peterson FB, Fisher LD, Anasetti C, Beatty P, Bensinger WI, Doney K. 1990. Allogeneic marrow transplantation in patients with acute myeloid leukemia in first remission: a randomized trial of two irradiation regimen. *Blood* 76:1867-71.

Clift RA, Buckner CD, Appelbaum FR, Bryant E, Bearman SI, Peterson FB, Fisher LD, Anasetti C, Beatty P, Bensinger WI. 1991. Allogeneic marrow transplantation in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase: a randomized trial of two irradiation regimens. *Blood* 77:1660-5.

Corbacioglu S, Greil J, Peters C, Wulffraat N, Laws HJ, Dilloo D, Straham B, Gross-Wieltsch U, Sykora KW, Ridolfi-Luthy A, Basu O, Gruhn B, Gungor T, Mihatsch W, Schulz AS. 2004. Defibrotide in the treatment of children with veno-occlusive disease (VOD): a retrospective multicentre study demonstrates therapeutic efficacy upon early intervention. *Bone Marrow Transplant* 33:189-95.

Couriel D, Carpenter PA, Cutler C, Bolanos-Meade J, Treister NS, Gea-Banacloche J, Shaughnessy P, Hymes S, Kim S, Wayne AS, Chien JW, Neumann J, Mitchell S, Syrjala K, Moravec CK, Abramovitz L, Liebermann J, Berger A, Gerber L, Schubert M, Filipovich AH, Weisdorf D, Schubert MM, Shulman H, Schultz K, Mittelman B, Pavletic S, Vogelsang GB, Martin PJ, Lee SJ, Flowers ME. 2006. Ancillary therapy and supportive care of chronic graft-versus-host disease: national institutes of health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic Graft-versus-host disease: V. Ancillary Therapy and Supportive Care Working Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant* 12:375-96.

Craig-Holmes A, Shaw M. 1971. Polymorphism of human constitutive heterochromatin. *Science* 174:702-4.

Creutzig U, Zimmermann M, Ritter J, Reinhardt D, Hermann J, Henze G, Jurgens H, Kabisch H, Reiter A, Riehm H, Gadner H, Schellong G. 2005. Treatment strategies and long-term results in paediatric patients treated in four consecutive AML-BFM trials. *Leukemia* 19:2030-42.

Dausset J, Brecy H. 1957. Identical nature of leukocyte antigens detectable in monozygotic twins by means of immune iso-leuco-agglutinins. *Nature* 180: 1430-1439

Deeg HJ, Shulman HM, Anderson JE, Bryant EM, Gooley TA, Slattery JT, Anasetti C, Fefer A, Storb R, Appelbaum FR. 2005. Allogeneic and syngeneic marrow transplantation for myelodysplastic syndrome in patients 55 to 66 years of age. *Blood* 95:1188-94.

Deeg HJ, Storb R, Longton G, Graham TC, Shulman HM, Appelbaum F, Thomas ED. 1988. Single dose or fractionated total body irradiation and autologous marrow transplantation in

dogs: effects of exposure rate, fraction size, and fractionation interval on acute and delayed toxicity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 15:647-53.

Delgado J, Cooper N, Thomson K, Duarte R, Jarmulowicz M, Cassoni A, Kottaridis P, Peggs K, Mackinnon S. 2006. The importance of age, fludarabine, and total body irradiation in the incidence and severity of chronic renal failure after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 12:75-83.

Demarosi F, Soligo D, Lodi G, Moneghini L, Sardella A, Carrassi A. 2005. Squamous cell carcinoma of the oral cavity associated with graft versus host disease: report of a case and review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 100:63-9.

Dexter TM, Testa NG. 1976. Differentiation and proliferation of hematopoietic cells in culture. *Methods of cellular biology* 14:387-405.

Dingermann D. 1999. Gentechnik, Biotechnik, Stuttgart.

Dreger P, Ritgen M, Bottcher S, Schmitz N, Kneba M. 2005. The prognostic impact of minimal residual disease assessment after stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia: is achievement of molecular remission worthwhile? *Leukemia* 19:1135-38.

Dubovsky J, Daxberger H, Fritsh G, Printz D, Peters C, Matthes S, Gadner H, Lion T, Muller-Berat N. 1999. Kinetics of chimerism during the early post-transplant period in pediatric patients with malignant and non-malignant hematologic disorders: implication for timely detection of engraftment, graft failure and rejection. *Leukemia* 13:2059-69.

Einsele H, Ehninger G, Hebart H. 1995. Polymerase chain reaction monitoring reduces the incidence of cytomegalovirus disease and the duration and side effects of antiviral therapy after bone marrow transplantation. *Blood* 86:2815-20.

Einsele H, Herbart H, Bock T. 1999. Recommendations for the diagnosis and therapy of cytomegalovirus infection after stem-cell transplantation. *The Research Alliance on the Complications of Organ Transplantation due to Herpes Viruses. Dtsch Med Wochenschr* 124: 501-10.

Fauser AA, Messner HA. 1979. Identification of megakaryocytes, macrophages, and eosinophils in colonies of human bone marrow containing neutrophilic granulocytes and erythroblasts. *Blood* 54:1197-200.

Ferrara JL, Reddy P. 2006. Pathophysiology of graft-versus-host disease. *Semin Hematol* 43:3-10.

Ferrara JL, Yanik G. 2005. Acute graft versus host disease: pathophysiology, risk factors, and prevention strategies. *Clin Adv Hematol Oncol* 3:415-19, 428.

Fichtner I, Becker M, Baumgart J. 2003. Antileukaemic activity of treosulfan in xenografted human acute lymphoblastic leukaemias (ALL). *Eur J Cancer* 39:801-7.

Fietz T, Uharek L, Gentilini C, Muessig A, Rieger K, Marinets O, Sandrock D, Munz DL, Glass B, Thiel E, Blau IW. 2006. Allogeneic hematopoietic cell transplantation following conditioning with 90Y-ibritumomab-tiuxetan. *Leukemia and Lymphoma* 47:59-63.

Fleischhauer K, Locatelli F, Zecca M, Orofino MG, Giardini C, De Stefano P, Pession A, Iannone AM, Carcassi C, Zino E, La Nasa G. 2006. Graft rejection after unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation for thalassemia is associated with nonpermissive HLA-DPB1 disparity in host-versus-graft direction. *Blood* 107:2984-92.

Fliedner TM, Flad HD, Bruch C, Calvo W, Goldmann SF, Herbst E, Hugl E, Huget R, Koerbling M, Krumbacher K, Nothdurft W, Ross WM, Schnappauf HP, Steinbach I. 1976. Treatment of aplasric anemia by blood stem cell transfusion: a canine model. *Haematologica* 61:141-56.

Ford C, Hamerton J, Barnes D, Loutit J. 1956. Cytological identification of radiation-chimeras. *Nature* 177:452-4.

Franklin J, Pluetschow A, Paus M, Specht L, Anselmo AP, Aviles A, Biti G, Bogatyreva T, Bonadonna G, Brillant C, Cavalieri E, Diehl V, Eghbali H, Ferme C, Henry-Amar M, Hoppe R, Howard S, Meyer R, Niedzwiecki D, Pavlovsky S, Radford J, Raemaekers J, Ryder D, Schiller P, Shakhtarina S, Valagussa P, Wilimas J, Yahalom J. 2006. Second malignancy risk associated with treatment of Hodgkin's lymphoma: meta-analysis of the randomised trials. *Ann Oncol* [Epub ahead of print].

Frasconi F, Strada P, Sessaredo M, Ernst P, Garthon G, Kolb HJ, Prentice HG, Vernant JP, Zwaan FE, Gratwohl A. 1990. Mixed chimerism after allogeneic marrow transplantation for leukemia: correlation with dose of total body irradiation and graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 5:235-40.

Gleissner B, Blau IW, Sindram A, Reinhardt R, Knauf W, Thiel E. 2001. Analysis of chimerism during the early period after allogeneic peripheral stem cell transplantation. *Clin Lab Haematol* 23:401-6.

Gleissner B, Gokbuget N, Bartram CR, Janssen B, Rieder H, Janssen JW, Fonatsch C, Heyll A, Voliotis D, Beck J, Lipp T, Munzert G, Maurer J, Hoelzer D, Thiel E. German Multicenter Trials of Adult Acute Lymphoblastic Leukemia Study Group. 2002. Leading prognostic relevance of the BCR-ABL translocation in adult acute B-lineage lymphoblastic leukemia: a prospective study of the German Multicenter Trial Group and confirmed polymerase chain reaction analysis. *Blood* 99:1536-43.

Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA, Lerner KG, Thomas ED. 1974. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation* 18:295-304.

Gratwohl A, Baldomero H, Schmid O, Horisberger B, Bargetzi M, Urbano-Ispizua A. 2003. Change in stem cell source for hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in Europe: a report of the EBMT activity survey 2003. *Bone Marrow Transplant* 36:575-90.

Grigg A, Chapman R, Szer J. 1998. Fatal CMV pneumonia associated with steroid therapy after autologous transplantation in patients previously treated with fludarabine. *Bone Marrow Transplant* 21:619-23.

Gropp M, Meier W, Hepp H. 1998. Treosulfan as an effective second-line therapy in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 71:94-8.

Harstrick A, Wilke H, Eberhardt W. 1996. A phase I dose escalation trial of intravenous treosulfan in refractory cancer. *Onkologie* 19:153-6.

Hart JS, Trujillo JM, Freireich EJ, George SL, Frei E. 1971. Cytogenetic studies and their clinical correlates in adults with acute leukemia. *Ann Intern Med* 75:356-60.

Hassan Z, Nilsson C, Hassan M. 1998. Liposomal busulphan: bioavailability and effect on bone marrow in mice. *Bone marrow transplant* 22:913-8.

Hebart H, Kanz L, Jahn G, Einsele H. 1998. Management of cytomegalovirus infection after solid-organ or stem-cell transplantation. Current guidelines and future prospects. *Drugs* 55:59-65.

Hegenbart U, Niederwieser D, Sandmaier BM, Maris MB, Shizuru JA, Greinix H, Cordonnier C, Rio B, Gratwohl A, Lange T, Al-Ali H, Storer B, Maloney D, McSweeney P, Chauncey T, Agura E, Bruno B, Maziarz RT, Petersen F, Storb R. 2006. Treatment for acute myelogenous leukemia by low-dose, total-body, irradiation-based conditioning and hematopoietic cell transplantation from related and unrelated donors. *J Clin Oncol* 24:444-53.

Ho AY, Pagliuca A, Kenyon M, et al. 2004. Reduced-intensity allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia with multilineage dysplasia using fludarabine, busulphan, and alemtuzumab (FBC) conditioning. *Blood* 104:1616-23.

Ho V, Momtaz P, Didas C, Wadleigh M, Richardson P. 2004. Post-transplant hepatic veno-occlusive disease: pathogenesis, diagnosis and treatment. *Rev Clin Exp Hematol* 8:3-20.

Horn PA, Elsner HA, Blasczyk R. 2006. Tissue typing for hematopoietic cell transplantation: HLA-DQB1 typing should be included. *Pediatric Transplant* 10:753-4.

Hsu KC, Keever-Taylor CA, Wilton A, Pinto C, Heller G, Arkun K, O'Reilly RJ, Horowitz MM, Dupont B. 2005. Improved outcome in HLA-identical sibling hematopoietic stem-cell transplantation for acute myelogenous leukemia predicted by KIR and HLA genotypes. *Blood* 105:4878-84.

Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, Branford S, Radich J, Kaeda J, Baccarani M, Cortes J, Cross NC, Druker BJ, Gabert J, Grimwade D, Hehlmann R, Kamel-Reid S, Lipton JH, Longtine J, Martinelli G, Saglio G, Soverini S, Stock W, Goldman JM. 2006. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood* 108:28-37.

Jeffreys A, Wilson V, Neumann R, Keyte J. 1988. Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction: towards DNA fingerprinting of single cells. *Nucleic Acids Res* 16:10953-71.

Josefson A. 1934. A new method of treatment – intraosseal treatment. *Acta medica scandinavica* 81:550-64.

Kache S, Weiss IK, Moore TB. 2006. Changing outcomes for children requiring intensive care following hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatr Transplant* 10:299-303.

Kaledin AS, Sliusarenko AG, Gorodetskii SI. 1980. Isolation and properties of DNA polymerase from extreme thermophilic bacteria *Thermus aquaticus* YT-1. *Biokhimiya* 45:644-51.

Keating MJ. 1990. Fludarabine phosphate in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol* 17:49-62.

Keating MJ. 2001. Progress in CLL: chemotherapy, antibodies and transplantation. *Biomed Pharmacother* 55:524-8.

Keilholz U, Schuster R, Schmittel A, Bechrakis N, Siehl J, Foerster MH, Thiel E. 2004. A Clinical Phase I Trial of Gemcitabine and Treosulfan (GeT) in Uveal Melanoma and other Solid Tumors. *Eur J Cancer* 40:2047-52.

Kern W, Estey EH 2006. High-dose cytosine arabinoside in the treatment of acute myeloid leukemia. *Cancer* 107:116-24.

Kew AK, Couban S, Patrick W, Thompson K, White D. 2006. Outcome of hematopoietic stem cell transplant recipients admitted to the intensive care unit. *Biol Blood Marrow Transplant*. 12:301-5.

Khoury IF, Keating M, Korbling M, Przepiorka D, Anderlini P, O'Brien S, Giralt S, Ippoliti C, von Wolff B, Gajewski J, Donato M, Claxton D, Ueno N, Andersson B, Gee A, Champlin R. 1998. Transplant-lite: induction of graft-versus-malignancy using fludarabine-based nonablative chemotherapy and allogeneic blood progenitor-cell transplantation as treatment for lymphoid malignancies. *J Clin Oncol* 16:2817-24.

Khoury IF, Lee MS, Romaguera J, Mirza N, Kantarjian H, Korbling M, Albitar M, Giralt S, Samuels B, Anderlini P, Rodriguez J, von Wolff B, Gajewski J, Cabanillas F, Champlin R. 1999. Allogeneic hematopoietic transplantation for mantle-cell lymphoma: molecular remissions and evidence of graft-versus-malignancy. *Ann Oncol* 10:1293-9.

Kiehl MG, Shipkova M, Basara N, Blau IW, Schutz E, Armstrong VW, Oellerich M, Fauser AA. 2000. Mycophenolate mofetil in stem cell transplant patients in relation to plasma level of active metabolite. *Clin Biochem* 33:203-8.

Knapp W, Rieber P, Dorken B, Schmidt RE, Stein H, vd Borne AE. 1989. Towards a better definition of human leukocytic surface molecules. *Immunol Today* 10:65-73.

Kolb HJ, Mittermuller J, Clemm C, Holler E, Ledderose G, Brehm G, Heim M, Wilmanns W. 1990. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood* 76:2462-5.

Kolb HJ, Wundisch GF, Bender C, Rodt H, Thiel E, Grosse-Wilde H, Thierfelder S. 1978. Chronic graft-versus-host disease (GVHD). *Pathol Biol* 26:52.

Korbling M, Dorken B, Ho AD, Pezzutto A, Hunstein W, Fliedner TM. 1986. Autologous transplantation of blood-derived hemopoietic stem cells after myeloablative therapy in a patient with Burkitt's lymphoma. *Blood* 67:529-32.

Körper 2007[submitted]

Kotsch K, Wehling J, Blasczyk R. 1999. Sequencing of HLA class II genes based on the conserved diversity of the non-coding regions: sequencing based typing of HLA-DRB genes. *Tissue Antigens* 53:486-97.

Krause H, Hebart H, Jahn G, Muller CA, Einsele H. 1997. Screening for CMV-specific T cell proliferation to identify patients at risk of developing late onset CMV disease. *Bone Marrow Transplant* 19:1111-6.

Kröger N, Badbaran A, Holler E, Hahn J, Kobbe G, Bornhauser M, Reiter A, Zabelina T, Zander AR, Fehse B. 2006. Monitoring of V617F-JAK2-mutation by highly sensitive quantitative real-time PCR after allogeneic stem cell transplantation in patients with myelofibrosis. *Blood* [Epub ahead of print].

Kröger N, Zabelina T, Sonnenberg S, Kruger W, Renges H, Stute N, Finkenstein F, Mayer U, Holstein K, Fiedler W, Colberg H, Sonnen R, Kuse R, Braumann D, Metzner B, del Valle F, Erttmann R, Kabisch H, Zander AR. 2000. Dose-dependent effect of etoposide in combination with busulfan plus cyclophosphamide as conditioning for stem cell transplantation in patients with acute myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant* 26:711-6.

Kroschinsky F, Weise M, Illmer T, Haenel M, Bornhaeuser M, Hoeffken G, Ehninger G, Schuler U. 2002. Outcome and prognostic features of intensive care unit treatment in patients with hematological malignancies. *Int Care Med* 28:1294-1300.

Kruger WH, Hornung RJ, Hertenstein B, Kern WV, Kroger N, Ljungman P, Zander AR; European group for blood and marrow transplantation. 2001. 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.

Laer v. D, Meyer Koenig U, Serr A. 1995. Detection of Cytomegalovirus DNA in CD34+ Cells from blood and bone marrow. *Blood* 86:4086-90.

Lamba R, Abella E, Kukuruga D, Klein J, Savasan S, Abidi MH, Mohamed A, Peres E. 2004. Mixed hematopoietic chimerism at day 90 following allogenic myeloablative stem cell transplantation is a predictor of relapse and survival. *Leukemia* 18:1681-6.

Landsteiner K. 1901. Über Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Blutes. *Wiener Klinische Wochenschrift* 14:15-7.

Langebrake C, Creutzig U, Dworzak M, Hrusak O, Mejstrikova E, Griesinger F, Zimmermann M, Reinhardt D for the MRD-AML-BFM Study Group. 2006. Residual disease monitoring in childhood acute myeloid leukemia by multiparameter flow cytometry: the MRD-AML-BFM Study Group. *J Clin Oncol* 24:3686-92.

Lapointe C, Forest L, Lussier P, Busque L, Lagace F, Perrault C, Roy DC, Gyger M. 1996. Sequential analysis of early hematopoietic reconstitution following allogeneic bone marrow transplantation with fluorescence in situ hybridization (FISH). *Bone Marrow Transplant* 17:1143-8.

Latini P, Aristei C, Aversa F, Checcaglini F, Maranzano E, Raymondi C, Panizza BM, Perrucci E, Martelli MF. 1991. Lung damage following bone marrow transplantation after hyperfractionated total body irradiation. *Radiother Oncol* 22:127-32.

Lee CK, Badros A, Barlogie B, Morris C, Zangari M, Fassas A, van Rhee F, Cottler-Fox M, Jacobson J, Thertulien R, Muwalla F, Mazher S, Anaissie E, Tricot G. 2003. Prognostic factors in allogeneic transplantation for patients with high-risk multiple myeloma after reduced intensity conditioning. *Exp Hematol* 31:73-80.

Leporrier M, Chevret S, Cazin B, Boudjerra N, Feugier P, Desablens B, Rapp MJ, Jaubert J, Autrand C, Divine M, Dreyfus B, Maloum K, Travade P, Dighiero G, Binet JL, Chastang C; French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia. 2001. Randomized comparison of fludarabine, CAP, and ChOP in 938 previously untreated stage B and C chronic lymphocytic leukemia patients. *Blood* 98:2319-25.

Lim Z, Baker B, Zuckermann M, Wade JJ, Ceesay M, Ho AY, Devereux S, Mufti GJ, Pagliuca A. 2006. Toxoplasmosis following alemtuzumab based allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *J Infect* [Epub ahead of print].

Lin PC, Poh SB, Lee MY, Hsiao LT, Chen PM, Chiou TJ. 2005. Fatal fulminant hepatitis B after withdrawal of prophylactic lamivudine in hematopoietic stem cell transplantation patients. *Int J Hematol* 81:349-51.

List AF, Vardiman J, Issa JP, DeWitte TM. 2004. Myelodysplastic syndromes. *Hematology American Society of Hematology Educational Program* 297-317.

Ljungman P, Aschan J, Lewensohn-Fuchs I, Carlens S, Larsson K, Lonnqvist B, Mattson J, Sparrelid E, Winiarski J, Ringden O. 1998. Results of different strategies for reducing cytomegalovirus-associated mortality in allogeneic stem cell transplant recipients. *Transplant* 66:1330-40.

Ljungman P, Cordonnier C, Einsele H; Infectious Diseases Working Party of the EBMT. 1998. Use of intravenous immune globulin in addition to antiviral therapy in the treatment of CMV gastrointestinal disease in allogeneic bone marrow transplant patients: a report from the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Bone Marrow Transplant* 21:473-8.

Ljungmann P. 2002. Beta-herpesvirus challenges in the transplant recipient. *J Infect Dis* 186:99-109.

Malladi RK, Peniket AJ, Norton AE, Campbell FJ, Collins GP, Samol J, Eaglerton H, Miller E, Morgenstern G, Jones J, Keen-Mcguire A, Barnardo M, Lettlewood TJ. 2004. Favourable outcome for patients with myeloid disorders treated with fludarabine-melphalan reduced-intensity conditioning and allogeneic bone marrow stem cell transplantation without the use of T-lymphocyte-depleting antibodies. *Eur J Haematol* 73:85-92.

Martino R, Caballero MD, Canals C, San Miguel J, Sierra J, Rovira M, Solano C, Bargay J, Perez-Simon J, Leon A, Sarra J, Brunet S, de la Camara R; alloPBSCT and Infectious/noninfectious Complications Subcommittees of the Grupo Espanol de Transplante Hematopoyetico (GETH). 2001. Reduced-intensity conditioning reduces the risk of severe infections after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 28:341-7.

Masding J, Sarkar TK, White WF, Barley VL, Chawla SL, Boesen E, Rostom AY, Menday AP. 1990. Intravenous treosulfan versus intravenous treosulfan plus cisplatin in advanced ovarian carcinoma. *Br J Obstet Gynaecol* 97:342-51.

Mattson J, Uzunul M, Remberber M, Ringden O. 2001. T-Cell mixed chimerism is significant correlated to a decrease risk of acute graft versus host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Transplant* 71:433-9.

Mattsson J, Unzunel M, Remberger M, Tammik L, Omazic B, Levitsky V, Zou JZ, Hentschke P, Ringden O. 2001. Poor immune reconstitution after four or five major HLA antigens mismatched T cell-depleted allogeneic and autologous stem cell transplantation. *Clin Exp Immunol* 123:162-9.

Maximow AA 1909. Der Lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschiedenen Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und im postfetalen Leben der Säugetiere. *Folia Haematologica* 8:125-41.

Maywald O, Pfirrmann M, Berger U, Breitscheidel L, Gratwohl A, Kolb HJ, Beelen DW, Tobler A, Metzgeroth G, Gnad SU, Hochhaus A, Hasford J, Hehlmann R, Reiter A; German CML Study Group; Swiss Group of Clinical Cancer Research. 2006. Cytogenetic response to prior treatment with interferon-alpha is predictive for survival after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 20:477-84.

McCann S., Lawler M. 1993. Mixed chimaerism; detection and significance following BMT. *Bone Marrow Transplant* 11:91-4.

McSweeney PA, Storb R. 1995. Mixed chimerism. Preclinical and clinical applications. *Biol Blood Marrow Transplant* 5:192-203.

Meinhardt G, Eppinger E, Jahrsdoerfer B. 2002. Treosulfan is an effective inducer of cell death in myeloma cells. *Blood* 98:642a.

Mengarelli A, Iori A, Guglielmi C, Romano A, Cerretti R, Torromeo C, Micozzi A, Fenu S, Laurenti L, Donato V, De Felice L, Arcese W. 2002. Standard versus alternative myeloablative conditioning regimens in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for high-risk acute leukemia. *Haematologica* 87:52-8.

Meyer RG, Britten CM, Wehler D, Bender K, Hess G, Konur A, Hartwig UF, Wehler TC, Ullmann AJ, Gentilini C, Uharek L, Huber C, Kolbe K, Herr W. 2006. Prophylactic transfer

of CD8-depleted donor lymphocytes after T-cell depleted reduced-intensity transplantation. *Blood* [Epub ahead of print].

Min G, Hibbin J, Arthur C, Apperley J, Jeffreys A, Goldman J. 1988. Use of minisatellite DNA probes for recognition and characterization of relapse after allogeneic bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 68:195-201.

Morisson M, Samwick A. 1940. Intramedullary (sternal) transfusion of human bone marrow. *JAMA* 115:1708-11.

Nagler A, Slavin S, Varadi G, Naparstek E, Samuel S, Or R. 2000. Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation using a fludarabine-based low intensity conditioning regimen for malignant lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 25:1021-8.

Nakamae H, Hino M, Akahori M, Terada Y, Yamane T, Ohta K, Hayashi T, Tsumura K. 2004. Predictive value of QT dispersion for acute heart failure after autologous and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Am J Hematol* 76:1-7.

Nowell P, Hungerford D 1960. A minute chromosome in human granulocytic leukemia. *Science* 132:1497-501.

Olerup O, Zetterquist H. 1992. HLA-typing by PCR amplification with sequence specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 39:225-36.

Onizuka M, Kasai M, Oba T, Atsuta Y, Terakura S, Suzuki R, Kitaori K, Miyamura K, Hotta T, Kodaera Y. 2005. Increased frequency of the angiotensin-converting enzyme gene D-allele is associated with noninfectious pulmonary dysfunction following allogeneic stem cell transplant. *Bone Marrow Transplant* 36:617-20.

Ottinger HD, Muller CR, Goldmann SF, Albert E, Arnold R, Beelen DW, Blasczyk R, Bunjes D, Casper J, Ebell W, Ehninger G, Eiermann T, Einsele H, Fauser A, Ferencik S, Finke J, Hertenstein B, Heyll A, Klingebiel T, Knipper A, Kremens B, Kolb HJ, Kolbe K, Lenartz E, Lindemann M, Muller CA, Mytilineos J, Niederwieser D, Runde V, Sayer H, Schaefer UW, Schmitz N, Schroder S, Schulze-Rath R, Schwerdtfeger R, Siegert W, Thiele B, Zander AR, Grosse-Wilde H. 2001. Second German consensus on immunogenetic donor search for allotransplantation of hematopoietic stem cells. *Ann Hematol* 80:706-14.

Padovan CS, Bise K, Sostak P, Holler E, Kolb HJ, Straube A. 1999. Angiitis of the central nervous system after allogeneic bone marrow transplantation? *Stroke* 30:1651-6.

Parikh CR, Schrier RW, Storer B, Diaconescu R, Sorror ML, Maris MB, Maloney DG, McSweeney P, Storb R, Sandmaier BM. 2005. Comparison of ARF after myeloablative and nonmyeloablative hematopoietic cell transplantation. *Am J Kidney Dis* 45:502-9.

Parody R, Martino R, Rovira M, Vazquez L, Vazquez MJ, de la Camara R, Blazquez C, Fernandez-Aviles F, Carreras E, Salavert M, Jarque I, Martin C, Martinez F, Lopez J, Torres A, Sierra J, Sanz GF; Infectious/Non-infectious Complications Subcommittee of the Grupo Espanol de Trasplante Hematopoyetico (GETH). 2006. Severe infections after unrelated donor allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adults: comparison of cord blood transplantation with peripheral blood and bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 12:734-48.

Pauwelyn KA, Verfaillie CM. 2006. 7. Transplantation of undifferentiated, bone marrow derived stem cells. *Cur Top Dev Biol* 74:201-51.

Pavletic SZ, Lee SJ, Socie G, Vogelsang G. 2006. Chronic graft-versus-host disease: implications of the National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials. *Bone Marrow Transplant* [Epub ahead of print].

Perez-Simon JA, Diez-Campelo M, Martino R, Brunet S, Urbano A, Caballero MD, de Leon A, Valcarcel D, Carreras E, del Canizo MC, Lopez-Fidalgo J, Sierra J, San Miguel JF. 2005. Influence of the intensity of the conditioning regimen on the characteristics of acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic transplantation. *Br J Haematol* 130:394-403.

Petit T, Raynal B, Socie G, Landmann-Parker J, Bourhis JH, Gluckman E, Pico J, Brison O. Highly sensitive polymerase chain reaction method shows the frequent survival of residual recipients' multipotent progenitors after non T-cell depleted bone marrow transplantation. *Blood* 84:3575-83.

Petz L, Yam P, Wallace R. 1987. Mixed hematopoietic chimaerism following bone marrow transplantation for hematological malignancies. *Blood* 70:1331-7.

Pike BL, Robinson WA. 1971. Human bone marrow colony growth in agar-gel. *J Cel Phys* 76:77-84.

Ploemacher RE, Westerhof GR, Blokland I. 2000. Treosulfan as an alternative conditioning agent in bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transpl* 25:141a.

Preffer FI, Dombkowski D, Sykes M, Scadden D, Yang YG. 2002. Lineage-negative side-population (SP) cells with restricted hematopoietic capacity circulate in normal human adults blood: immunophenotypic and functional characterization. *Stem Cells* 20:417-27.

Prentice HG, Gluckman E, Powles RL, Ljungman P. 1994. Impact of long-term acyclovir on cytomegalovirus infection and survival after allogeneic bone marrow transplantation. European Acyclovir for CMV Prophylaxis Study Group. *Lancet* 343:749-55.

Ramanarayanan J, Dunford LM, Baer MR, Sait SN, Lawrence W, McCarthy PL. 2006. Chronic myeloid leukemia after treatment of lymphoid malignancies: response to imatinib mesylate and favorable outcomes in three patients. *Leuk Res* 30:701-5.

Reed EC, Bowden RA, Dandliker PS, Lilleby KE, Meyers JD. 1988. Treatment of cytomegalovirus pneumonia with ganciclovir and intravenous cytomegalovirus immunoglobulin in patients with bone marrow transplants. *Ann Intern Med* 109:783-9.

Reusser P. 1998. Current concepts and challenges in the prevention and treatment of viral infections in immunocompromised cancer patients. *Support Care Cancer* 6:39-48.

Römer E, Blau IW, Bischoff S, Rudolphi M, Kirsten D, Fauser AA. 1998. Multiorgan Failure as most frequent cause of early transplant related mortality. *Bone Marrow Transplant, Suppl*, 1:91.

Rothberg P, Gamis A, Baker D. 1997. Use of DNA Polymorphism to monitor engraftment after allogeneic bone marrow transplantation. *Clin Lab Med* 17:109-18.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Ehrlich HA. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-91.

Sanchez-Mazas A. 2002. HLA data analysis in Anthropology: basic theory and practice. *Proceedings of the 16th European Histocompatibility Conference, Strasbourg, 19-22 March 2002*, 68-83.

Sandmaier BM, McSweeney PA, Yu C, Storb R. 2000. Nonmyeloablative transplants: preclinical and clinical results. *Sem Oncol* 27:78-82.

Santos G, Sensenbrenner P, Burke P, Mullins GM, Blas WB, Tutschka PJ, Slavin RE. 1972. The use of cyclophosphamide for clinical marrow transplantation. *Transplant Proc* 4:559-64.

Schellong G, Dorffel W, Claviez A, Korholz D, Mann G, Scheel-Walter HG, Bokkerink JP, Riepenhausen M, Luders H, Potter R, Ruhl U. 2005. Salvage therapy of progressive and recurrent Hodgkin's disease: results from a multicenter study of the pediatric DAL/GPOH-HD study group. *J Clin Oncol* 23:6181-9.

Schetelig J, Bornhauser M, Kiehl M, Schetelig J, Schwerdtfeger R, Kroger N, Runde V, Zabelina T, Held TK, Thiede C, Fauser AA, Beelen D, Zander A, Ehninger G, Siegert W; Cooperative German Transplant Study Group. 2004. Reduced-intensity conditioning with busulfan and fludarabine with or without antithymocyte globulin in HLA-identical sibling transplantation--a retrospective analysis. *Bone Marrow Transplant* 33:483-90.

Scheulen ME, Hilger RA, Oberhoff C, Casper J, Freund M, Josten KM, Bornhauser M, Ehninger G, Berdel WE, Baumgart J, Harstrick A, Bojko P, Wolf HH, Schindler AE, Seeber S. 2000. Clinical phase I dose escalation and pharmacokinetic study of high-dose chemotherapy with treosulfan and autologous peripheral stem cell transplantation in patient with advanced malignancies. *Clin Cancer Res* 6:4209-16.

Schilling V. 1913. *Praktische Blutlehre - Ein Ausbildungsbuch für prinzipielle Blutbildverwertung in der Praxis*. Verlag von Gustav Fischer in Jena

Schmid C, Schleuning M, Aschan J, Ringden O, Hahn J, Holler E, Hegenbart U, Niederwieser D, Dugas M, Ledderose G, Kolb HJ. 2004. Low-dose ARAC, donor cells, and GM-CSF for treatment of recurrent acute myeloid leukemia after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia* 18:1430-3.

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

Schmidt-Hieber M, Fietz T, Knauf W, Blau IW. 2005. Efficacy of the interleukin-2 receptor antagonist basiliximab in steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Br J Haematol* 130:568-74.

Schmitz N, Dreger P, Suttorp M, Rohwedder EB, Haferlach T, Hunter A, Russel NH. 1995. Primary transplantation of allogeneic peripheral blood progenitor cells mobilized by filgrastim. *Blood* 85:1666-72.

Schuler U, Ehninger G. 1992. Incidence, therapy and prevention of cytomegalovirus disease after bone marrow transplantation. *Med Klin* 87:30-7.

Shaw PJ, Hugh-Jones K, Hobbs JR, Downie CJ, Barnes R. 1986. Busulphan and cyclophosphamid cause little early toxicity during displacement bone marrow transplantation in fifty children. *Bone marrow transplant* 1:193-200.

Shimoni A, Kroger N, Zabelina T, Ayuk F, Hardan I, Yeshurun M, Shem-Tov N, Avigdor A, Ben-Bassat I, Zander AR, Nagler A. 2005. Hematopoietic stem-cell transplantation from unrelated donors in elderly patients (age >55 years) with hematologic malignancies: older age is no longer a contraindication when using reduced-intensity conditioning. *Leukemia* 19:7-12.

Slavin S, Nagler A, Naparstek E, Kapelushnik Y, Aker M, Cividalli G, Varadi G, Kirschbaum M, Ackerstein A, Samuel S, Amar A, Brautbar C, Ben-Tal O, Eldor A, Or R. 1998. Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases. *Blood* 91:756-63.

Socie G, Lawler M, Gluckman E, McCann SR, Brison O. 1995. Studies on hematopoietic chimerism following allogeneic bone marrow transplantation in the molecular biology era. *Leuk Res* 19:497-504.

Speck B, Zwaan FE, van Rood JJ, Eernisse JG. 1973. Allogeneic bone marrow transplantation in a patient with aplastic anaemia using a phenotypically HL-A-identical unrelated donor. *Transplant* 16:24-8.

Stelljes M, Bornhauser M, Kroger M, Beyer J, Sauerland MC, Heinecke A, Berning B, Scheffold C, Silling G, Buchner T, Neubauer A, Fauser AA, Ehninger G, Berdel WE, Kienast J; Cooperative German Transplant Study Group. 2005. Conditioning with 8-Gy total body irradiation and fludarabine for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in acute myeloid leukemia. *Blood* 106:3314-21.

Storb R, Rudolph RH, Thomas ED. 1971. Marrow grafts between canine siblings matched by serotyping and mixed leukocyte culture. *J Clin Inv* 50:1272-5.

Storb R, Weiden PL, Sullivan KM, Appelbaum FR, Beatty P, Buckner CD, Clift RA, Doney KC, Hansen J, Martin PJ. 1987. Second marrow transplants in patients with aplastic anemia rejecting the first graft: use of a conditioning regimen including cyclophosphamid and antithymocyte globulin. *Blood* 70:116-21.

Storb R, Yu C, Barnett T, Wagner JL, Deeg HJ, Nash RA, Kiem HP, McSweeney P, Seidel K, Georges G, Zaucha JM. 1999. Stable mixed hematopoietic chimerism in dog leukocyte antigen-identical littermate dogs given lymph node irradiation before and pharmacologic immunosuppression after marrow transplantation. *Blood* 94:1131-6.

Strasfeld L, Weinstock DM. 2006. Antifungal prophylaxis among allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients: current issues and new agents. *Expert Rev Anti Infect Ther* 4:457-68.

Sykes M, Preffer F, McAfee. 1999. Mixed lymphohaematopoietic chimerism and graft-versus-lymphoma effects after non-myeloablative therapy and HLA-mismatched bone-marrow transplantation. *Lancet* 353:1755-9.

Thiede C, Bornhaeuser M, Oeschlagel U, Brendel C, Leo R, Daxberger H, Mohr B, Florek M, Kroschinsky F, Geissler G, Naumann R, Ritter M, Prange-Krex G, Lion T, Neubauer A, Ehninger G. 2001. Sequential monitoring of chimerism and detection of minimal residual disease after allogeneic blood stem cell transplantation (BSCT) using multiplex PCR amplification of short tandem repeat markers. *Leukemia* 7:958-65.

Thiede C, Florek M, Bornhauser M. 1999. Rapid quantification of mixed chimerism using multiplex amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection. *Bone Marrow Transplant* 10:1055-60.

Thomas E, Storb R, Clift RA, Fefer A, Johnson FL, Neiman PE, Lerner KG, Glucksberg H, Buckner CD. 1975. Bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 292:832-43.

Thomas ED, Lochte HJL, Lu WC, Ferrebee JW. 1957. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med* 257:491-6.

Thomas ED, Storb R, Fefer A, Slichter SJ, Bryant JI, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA, Funk DD, Lerner KE. 1972. Aplastic anaemia treated by marrow transplantation. *Lancet* 1:284-9.

Tiercy JM, Passweg J, van Biezen A, Zander A, Kroger N, Gratwohl A, Chapuis B, Helg C, Brinch L, Cornelissen J, Oudshoorn M, Ruutu T, Volin L, Niederwieser D, Roosnek E; Chronic Leukemia Working Party of the European Blood and Marrow Transplant Group (EBMT). 2004. Isolated HLA-C mismatches in unrelated donor transplantation for CML. *Bone Marrow Transplant* 34:249-55.

Till JE, McCulloch EA. 1961. A direct measurement of radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 14:213-22.

Tippet P. 1983. Blood group chimeras. A review. *Vox Sang* 44:333-59.

Topaly J, Fruehauf S, Ho AD, Zeller WJ. 2002. Rationale for combination therapy of chronic myelogenous leukaemia with imatinib and irradiation or alkylating agents: implications for pretransplant conditioning. *Br J Cancer* 86:1487-93.

Tutschka PJ, Copelan EA, Klein JP. 1987. Bone marrow transplantation for leukemia following a new busulfan and cyclophosphamid regimen. *Blood* 70:1382-8.

Valcarcel D, Martino R, Sureda A, Canals C, Altes A, Briones J, Sanz MA, Parody R, Constans M, Vilella SL, Brunet S, Sierra J. 2005. Conventional versus reduced-intensity conditioning regimen for allogeneic stem cell transplantation in patients with hematological malignancies. *Eur J Haematol* 74:144-51.

van Besien K, Artz A, Smith S, Cao D, Rich S, Godley L, Jones D, Del Cerro P, Bennett D, Casey B, Odenike O, Thirman M, Daugherty C, Wickrema A, Zimmerman T, Larson RA, Stock W. 2005. Fludarabine, melphalan, and alemtuzumab conditioning in adults with standard-risk advanced acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *J Clin Oncol* 23:5728-38.

Van Rood JJ, Eernisse JG, Leeuwen A. 1958. Leukocyte antibodies in sera from pregnant women. *Nature* 181:1735-40.

Vela-Ojeda J, Garcia-Ruiz Esparza MA, Tripp-Villanueva F, Ayala-Sanchez M, Delgado-Lamas JL, Garces-Ruiz O, Rubio-Jurado B, Montiel-Cervantes L, Sanchez-Cortes E, Garcia-Chavez J, Xolotl-Castillo M, Rosas-Cabral A, Salazar-Exaire D, Galindo-Rodriguez G, Avina-Zubieta A. 2004. Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation using reduced intensity versus myeloablative conditioning regimens for the treatment of leukemia. *Stem Cells Dev* 13:571-9.

- Virchow R. 1845. Weißes Blut. *Frorieps Notizen* 36:151-6.
- Viscoli C, Bruzzi P, Castagnola E. 1994. Factors associated with bacteremia in febrile, granulocytopenic cancer patients. The International Antimicrobial Therapy Cooperative Group (IATCG) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Eur J Cancer* 30A:430-7.
- Vogt MH, van den Muijsenberg JW, Goulmy E, Spierings E, Kluck P, Kester MG, van Soest RA, Drijfhout JW, Willemze R, Falkenburg JH. 2002. The DBY gene codes for an HLA-DQ5-restricted human male-specific minor histocompatibility antigen involved in graft-versus-host disease. *Blood* 99:3027-32.
- Wadleigh M, Ho V, Momtaz P, Richardson P. 2003. Hepatic veno-occlusive disease: pathogenesis, diagnosis and treatment. *Curr Opin Hematol* 10:451-62.
- Wassmann B, Pfeifer H, Goekbuget N, Beelen DW, Beck J, Stelljes M, Bornhauser M, Reichle A, Perz J, Haas R, Ganser A, Schmid M, Kanz L, Lenz G, Kaufmann M, Binckebanck A, Bruck P, Reutzel R, Gschaidmeier H, Schwartz S, Hoelzer D, Ottmann OG. 2006. Alternating versus concurrent schedules of imatinib and chemotherapy as front-line therapy for Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph+ALL). *Blood* 108:1469-77.
- Weber J, May P. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 44:388-96.
- Weisser M, Tischer J, Schnittger S, Schoch C, Ledderose G, Kolb HJ. 2006. A comparison of donor lymphocyte infusions or imatinib mesylate for patients with chronic myelogenous leukemia who have relapsed after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* 91:663-6.
- Westerhof GR, Ploemacher RE, Boudewijn A, Blokland I, Dilingt JH, McGrown, AT, Hadfield JA, Dawson MJ, Down JD. 2006. Comparison of different busulfan analogues for depletion of hematopoietic stem cells and promotion of donor-type chimerism in murine bone marrow transplant recipients. *Cancer Res* 60:5470-8.
- Willasch A, Hoelle W, Kreyenberg H, Niethammer D, Handgretinger R, Lang P, Beck JF, Klingebiel T, Bader P. 2006. Outcome of allogeneic stem cell transplantation in children with non-malignant diseases. *Haematologica* 91:788-94.

Willenbacher W, Basara N, Blau IW, Fauser AA, Kiehl MG. 2001. Treatment of steroid refractory acute and chronic graft-versus-host disease with daclizumab. *Br J Haematol* 112:820-3.

Zeis M, Uharek L, Hartung G, Glass B, Steinmann J, Schmitz N. 2001. Graft-vs-leukemia activity and graft-vs-host disease induced by allogeneic Th1- and Th2-type CD4+ T cells in mice. *Hematol J* 2:136-44.

Zinkernagel RM, Doherty PC. 1974. Immunological surveillance against altered self components by sensitised T-lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. *Nature* 251:547-8.

Danksagung

Besonders wertvoll ist der tätige und gedankliche Anstoß der Habilitation durch Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Eckhard Thiel, der mir Vorbild in seiner besonderen Verbindung von wissenschaftlichem und klinischem Tätigsein ist. Sein unruhiges Drängen im Gleichklang mit der Vermittlung des Gefühls notwendiger Sicherheit für die tägliche, ununterbrochene Arbeit in seiner Klinik legte die notwendige Grundlage für die Niederschrift.

Meiner lieben Frau und klugen Kollegin Dr. Olga Blau möchte ich gern für ihre immerwährende Geduld und Hilfe bei der Erhebung der Daten, der Analyse des Chimärismus und der Ordnung der Ergebnisse danken. Sie schaffte die notwendige Wärme zu Hause, in der die Arbeit gelang.

Meinen Töchtern Antonia und Daniela viel Gutes für ihre *wort-* und *tatkräftige* Unterstützung und das Verständnis in schwieriger Zeit.

Meine Eltern und Kollegen, Frau Dr. Tatjana Blau und Herrn Prof. Dr. Hans-Joachim Blau sind mir mit ihrem vorbildlichen Arztsein ein stetiger Rückhalt für meine Tätigkeit als Mediziner, wofür ich ihnen danke. Meinem Vater Dank für die kritische Begleitung bei Themenwahl und Gestaltung. Seine großen Erfahrungen konnte ich voll Vertrauen in den Dienst meiner Arbeit stellen.

Den Mitarbeitern und Doktoranden der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Transfusionsmedizin des Charité-Campus Benjamin Franklin, die an den Experimenten beteiligt und im klinischen Bereich der Transplantationsstation „Stefan Morsch“ tätig waren, meinen Dank. Zu ihnen gehören Prof. Dr. Wolfgang Knauf, Prof. Dr. Lutz Uharek, Dr. Thomas Fietz, Dr. Katrin Rieger, Dr. Olaf Penack, Dr. Martin Schmidt-Hieber, Carola Tietze-Bürger, Birgit Reufi, Anette Sindram und Nicole Leschinger.

Mein Dank gilt zudem Herrn Emil Morsch, Vorstandsvorsitzender der Stefan-Morsch-Stiftung, der mit seiner großzügigen Förderung den Start dieses Projektes und sein fortschreitendes Wachsen ermöglichte.

ERKLÄRUNG

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

20.01.2007
Datum

Igor Wolfgang Blau.
Unterschrift