

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen  
Universität München

*Direktor: Univ. Prof. Dr. H. K. Höfler*

**„Änderungen des Immunphänotyps bei malignen B-NHL unter Anti-CD20-Therapie:  
Untersuchung von Häufigkeit und Ursache sowie Einordnung hinsichtlich der  
Bedeutung für Diagnostik und Verlaufsuntersuchungen“**

**Christiane Paulig**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin (Dr. med.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny  
Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. M. A. Kremer  
2. Univ.-Prof. Dr. H. K. Höfler

Die Dissertation wurde am 26.03.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 02.04.2014 angenommen.



## Verzeichnis der Abkürzungen

ADCC	Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity
AK	Antikörper
ATCC	American Type Culture Collection
Bcl-2	B-cell leukemia 2 protein
B-NHL	B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom
CD	Cluster of differenziation
CDC	Complement dependent cytotoxicity
CHOP	Cyclophosphamid, Vincristin, Doxorubicin, Prednison
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CR	Complete remission = komplette Remission
DLBCL	Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom
DNA	Desoxy-Ribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EMA	European Medicines Agency = Europäische Arzneimittelagentur
EU	European Union = Europäische Union
FACS	Fluorescence-Activated-Cell-Sorter = Durchflusszytometrie
FCS	Fetal calf serum = Fetales Kälberserum
FDA	Food and Drug Administration
FFPE	Formalinfixiert und paraffineingebettet
FL	Follikuläres Lymphom
H.p.	Helicobacter pylori
HE	Hämatoxylin-Eosin
Ig	Immunglobulin
IgH	Immunglobulin-Schwere-Kette
IHC	Immunhistochemie
KM	Knochenmark
LCM	Laser Capture Microdissektion
LK	Lymphknoten
mAK	Monoklonaler Antikörper
MALT	Mukosaassoziiertes lymphatisches Gewebe
MCL	Mantelzell-Lymphom
MZL	Marginalzonenlymphom
n.a.	Nicht auswertbar
n.d.	Nicht durchgeführt
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
ORR	Overall response rate
OS	Overall survival = Gesamtüberleben
PAS	Periodic-Acid-Schiff
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction = Polymerase-Kettenreaktion
RIT	Radio-Immuntherapie
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Sodium dodecyl sulfate = Natriumdodecylsulfat
USA	United States of America
VDJ	Variability, Diversity, Joining = Genregionen
WG	Weichgewebe
WHO	World Health Organization = Weltgesundheitsorganisation



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Hintergrund</b> .....	<b>1</b>
1.1	Maligne Lymphome.....	1
1.2	Histologische und molekularpathologische Lymphomdiagnostik .....	4
1.3	Therapie maligner B-NHL .....	5
1.3.1	Rituximab – Wirkmechanismus und Indikation .....	6
1.3.2	Radioimmuntherapie - Alternative Anti-CD20 Therapeutika .....	12
1.4	CD20-Antigenmodulation infolge Rituximabtherapie .....	14
1.4.1	Wird das CD20 Oberflächenepitop durch Rituximab maskiert? .....	15
1.4.2	CD20-Positivitätsverlust infolge Veränderungen auf Proteinebene .....	16
1.4.3	CD20-Positivitätsverlust infolge Veränderungen auf mRNA-Ebene.....	17
<b>2</b>	<b>Zielsetzung</b> .....	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>19</b>
3.1	Auswahlkriterien für den Einschluss in die Studie .....	19
3.2	Zellkultur .....	20
3.2.1	Verwendete Zelllinien und deren Kultivierung .....	20
3.2.2	Zellernte und Herstellung von Zell-Pellets .....	22
3.2.3	Herstellung von Zelllysaten .....	22
3.3	Immunhistochemie.....	23
3.3.1	Manuelle immunhistochemische Austestung.....	24
3.3.2	Automatischer Immunostainer.....	25
3.3.3	Auswertung.....	26
3.4	Western-Blot.....	27
3.4.1	Probenherstellung aus Zelllysaten .....	27
3.4.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) .....	27
3.4.3	Western Blotting .....	28
3.4.4	CD20-Detektion mit spezifischem Antikörper .....	29
3.5	Quantifizierung des CD20-RNA-Gehalts .....	30
3.5.1	Patientenmaterial .....	30
3.5.1.1	Laser Capture Microdissection (LCM) .....	30
3.5.1.2	RNA-Extraktion aus Paraffinmaterial.....	32
3.5.1.3	cDNA-Synthese .....	34
3.5.1.4	Real-Time quantitative TaqMan PCR.....	34
3.5.2	CD20-RNA-Gehalt in Zelllinien.....	38
3.5.2.1	RNA-Isolation aus Zelllinien .....	38
3.5.2.2	Real-Time quantitative TaqMan PCR.....	39

3.6	Klonalitätsbestimmung .....	39
3.6.1	DNA-Extraktion .....	39
3.6.2	PCR Analyse des Immunglobulin-schwere-Kette Gen-Rearrangements .....	40
3.6.3	Fragmentlängenanalyse.....	42
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>43</b>
4.1	Patientenkollektiv .....	43
4.1.1	Anzahl und Diagnosen .....	43
4.1.2	Therapieabstand .....	44
4.2	Wie häufig ist der Verlust der CD20-Positivität? .....	46
4.3	Korreliert der Verlust der CD20-Positivität mit dem Therapieabstand? .....	56
4.4	Worin ist der CD20-Positivitätsverlust begründet? .....	59
4.4.1	Wird das CD20-Oberflächenepitop durch Rituximab maskiert? .....	59
4.4.2	CD20-Positivitätsverlust infolge Migration in <i>lipid rafts</i> .....	59
4.4.3	Wird CD20 auf mRNA-Ebene herunterreguliert? .....	61
4.4.3.1	CD20 mRNA-Untersuchung am Patientengewebe .....	61
4.4.3.2	CD20 mRNA-Untersuchung an <i>NCEB</i> -Zellen .....	64
4.5	Klonalitätsbestimmung .....	66
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>68</b>
5.1	Häufigkeit des Verlustes der immunhistochemischen CD20-Positivität .....	68
5.2	Korrelation des Verlustes der CD20-Positivität mit dem Therapieabstand.....	72
5.3	Ätiologie der CD20-Antigenmodulation .....	73
5.3.1	Bindungsverlust diagnostischer Antikörper infolge Maskierung des CD20-Epitops .....	73
5.3.2	CD20-Positivitätsverlust infolge Migration in Lipid Rafts.....	74
5.3.3	Herunterregulation von CD20 auf mRNA-Ebene .....	76
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>79</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>81</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>93</b>
<b>9</b>	<b>Dankvermerk .....</b>	<b>95</b>

# 1 Hintergrund

## 1.1 Maligne Lymphome

Maligne Lymphome umfassen eine heterogene Gruppe lymphatischer Neoplasien, die den primären, sekundären und sekundär besiedelten lymphatischen Organen entstammen. Von den Hodgkin-Lymphomen werden die Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) abgegrenzt, die sich wiederum in seltene (ca.10%) T-Zell-NHL und häufigere (ca. 90%) B-Zell-NHL unterteilen lassen. Gegenstand dieser Arbeit waren ausschließlich maligne Non-Hodgkin-Lymphome der B-Zell-Reihe.

B-NHL entstehen durch klonale Expansion einer „entarteten“ B-Zelle entweder bei der Differenzierung von der Stammzelle zur naiven B-Zelle oder bei der Differenzierung in oder nach der Keimzentrumsreaktion im Lymphknoten, so dass sie arretierten lymphatischen Differenzierungsstufen entsprechen (Hiddemann et Anagnostopoulos 2005, Ganten et Alves 2003, Böcker et al. 2008, Fauci et Harrisson 2008).

Erst durch die Immunphänotypisierung konnten, ergänzt durch molekularbiologische Methoden, neue Erkenntnisse über die B-Zelldifferenzierung und die Pathogenese maligner Lymphome gewonnen werden. Diese Erkenntnisse führten 2001 zu einer neuen WHO-Klassifikation der malignen Lymphome (Jaffe et al., IARC Press 2001), die 2008 zuletzt aktualisiert wurde. Sie basiert neben dem Immunphänotyp und dem Genotyp auf multiplen morphologischen und prognostischen Faktoren wie der Lokalisation, dem Wachstumsmuster, dem Blastengehalt und dem zellulären Differenzierungs- bzw. Reifegrad. Dabei ist die korrekte Definition der Ursprungszelle ein wesentliches Klassifikationsprinzip.

Man unterscheidet sich langsam teilende niedrig maligne bzw. indolente Lymphome, hoch maligne aggressive Lymphome mit einer hohen Zellteilungsrate und sehr aggressive Lymphome wie beispielsweise das Burkitt-Lymphom. Anhand des Befallmusters sowie der Klinik werden nach der modifizierten Ann-Arbor Klassifikation außerdem vier klinische Stadien unterschieden, die ebenfalls in die Therapieentscheidung eingehen.

In dieser Arbeit wurden ausschließlich die Entitäten diffus großzelliges B-Zell-Lymphom (DLBCL), follikuläres Lymphom (FL), Mantelzelllymphom (MCL) und Marginalzonenlymphom (MZL) betrachtet, so dass sich die folgende Einführung auf diese Entitäten beschränken wird (vgl. Böcker et al. 2008, Preiß et al. 2010, Huber et al. 2008, Hiddemann et Anagnostopoulos 2005, Ganten et Alves 2003, Fletscher 2007).

### *DLBCL:*

Das mit ca. 35-40% aller Lymphome häufigste B-NHL stellt die Hauptentität der aggressiven, blastischen Lymphome dar. Unter diesem Begriff werden mehrere morphologische Varianten wie das zentroblastische, immunoblastische oder anaplastische Lymphom zusammengefasst. DLBCL zeichnen sich durch ein schnelles Tumorwachstum aus. Unbehandelt ist mit einer rasch progredienten Tumorsymptomatik zu rechnen. Sie können primär oder sekundär aus einem niedrig malignen Lymphom entstehen. Eine sekundäre Entstehung aus einem FL ist mit einer ungünstigen Prognose verbunden. Darüber hinaus entwickeln 2-8% aller CLL-Patienten im Verlauf eine sogenannte „Richter Transformation“ in ein DLBCL (Tsimberidou et al., Curr Hematol Malig Rep, 2007). Der Immunphänotyp zeichnet sich durch die konstante Expression der B-Zell-Antigene CD19, CD20, CD22 und CD79a aus. Sekundäre immunoblastische Lymphome, die z.B. aus einer B-CLL hervorgegangen sind, weisen häufig eine CD5-Positivität auf. Zytogenetisch finden sich komplex aberrante Klone mit einer Vielzahl verschiedener Chromosomenaberrationen, wie beispielsweise die Translokationen t(14;18)(q32;q21) mit Rearrangement von BCL-2 (B-Zell Leukemia Protein 2), t(3;Var)(q27;Var) mit Rearrangement von BCL-6 oder t(8;14)(q24;q32) mit Rearrangement des Regulatorgens Myc.

### *FL:*

Mit 25-30% aller NHL ist das FL das häufigste niedrig-maligne B-Zell-Lymphom. Es zeichnet sich durch ein langsames Wachstum aus und ist häufig erst spät mit klinischen Symptomen in Form von langsam progredienten Lymphknotenvergrößerungen und Splenomegalie assoziiert. Erst in fortgeschrittenen Stadien kann eine beeinträchtigte Hämatopoese zu Blutungsneigung und Infektanfälligkeit führen. FL entstehen infolge neoplastischer Proliferation der aus Zentroblasten und Zentrozyten bestehenden Keimzentrumszellen und imitieren das folliculäre Wachstum normaler Keimzentren (FL Grad I und II). Finden sich histologisch vermehrt Blasten als Zeichen eines Überganges in ein blastisches Lymphom, so liegt ein FL Grad III vor. Bei etwa 25-40% aller FL kommt es im Krankheitsverlauf zu einer Transformation in ein hochmalignes Lymphom. Immunhistochemisch zeichnen sich FL neben der Expression von Pan-B-Zell-Antigenen durch ihre CD10-Positivität und die fehlende Expression von CD5 aus. Des Weiteren ist die BCL2-Positivität charakteristisch. Das antiapoptotische Onkoprotein BCL2 gerät infolge der Translokation t(14;18)(q32;q21) unter den Einfluss der Promotorregion des Immunglobulinschwerkettengens. Die Folge ist eine Deregulation und Überexpression des Onkogens, weshalb der Nachweis von BCL2 in folliculären Strukturen einen Hinweis für eine neoplastische Follikelpopulation darstellt. Die ursächliche Translokation kann in 80-90% der Fälle nachgewiesen werden und ist charakteristisch.



### *MCL:*

MCL haben die ungünstigste Prognose aller niedrig-malignen NHL. Sie machen 5-10% aller NHL aus, wobei Männer signifikant häufiger erkranken. Wie bei den meisten indolenten Lymphomen erfolgt die Diagnosestellung bereits in fortgeschrittenen Stadien. Obwohl es formal zu den indolenten Lymphomen zählt, zeigt diese Erkrankung klinisch einen aggressiven Verlauf. Ursprungsort der malignen zentrozytenähnlichen Zellen ist die Mantelzone der Lymphfollikel. Die Lymphomzellen zeichnen sich durch eine Ig-Oberflächenexpression vom Typ IgM aus. Darüber hinaus werden sowohl die Pan-B-Zellmarker CD19, CD20 und CD79a als auch das CD5-Antigen exprimiert, das typischerweise auf T-Zellen zu finden ist. Charakteristisch ist die Positivität für Cyclin D1. Das zellzyklusregulierende Protein Cyclin D1 wird normalerweise von lymphoiden Zellen nicht exprimiert. Durch die Translokation t(11;14)(q13;q32) gerät das BCL1-Gen unter die Kontrolle der regulatorischen Elemente des IgH-Gens, was zu einer Expression von Cyclin D1 und schließlich zur Proliferation der normalerweise ruhenden Mantelzelle führt. Der Nachweis des BCL-Rearrangements bzw. der Translokation t(11;14) ist hochcharakteristisch, weshalb die molekulargenetische Diagnostik einen hohen Stellenwert hat (Rimokh et al., Blood 1993; Bosch et al., Blood 1994; Zukerberg et al., Am J Clin Pathol 1995).

### *MZL:*

Beim indolenten MZL werden extranodale, splenische und nodale Primärmanifestationen unterschieden. Das extranodale Marginalzonenlymphom vom MALT-Typ, das etwa 5% aller B-NHL ausmacht, manifestiert sich vor allem in den Peyer-Plaques und dem Appendix des Gastrointestinaltrakts, aber auch im Waldeyer-Rachenring und weiteren Lokalisationen wie Haut, Thymus, Schilddrüse, Speicheldrüsen oder dem oberen Respirationstrakt. Die häufigste Lokalisation ist mit ca. 25% der Magen. Klinisch imponieren MZL durch einen meist langjährigen lokalisierten Verlauf mit später Generalisation. Das pathogenetische Prinzip beruht auf einer langfristigen Wachstumsstimulation infolge chronischer Entzündungen oder Autoimmunprozessen, wie der Helicobacter-pylori-assoziierten Gastritis (H.p.-Nachweis in ca 90% aller MALT-Lymphome des Magens) oder der Hashimoto-Thyreoiditis.

Das primär splenische MZL macht nur 0,2-5% aller B-NHL aus. Es äußert sich klinisch durch eine massive Splenomegalie, nicht selten mit leukämischer Ausschwemmung „villöser“ Lymphozyten. Davon abzugrenzen ist das nodale MZL (1-2% aller B-NHL), das auf einer von den Lymphknotensinus ausgehenden neoplastischen Proliferation von monozytoiden B-Zellen basiert. Definitionsgemäß besteht eine primäre Lymphknotenmanifestation und ein mit dem nodalen Infiltrat eines extranodalen MZL vergleichbares Wachstumsmuster. Das klinische Bild entspricht dem des follikulären Lymphoms. Der Immunphänotyp aller MZL ist neben der Expression der B-Zell-Antigene CD19, CD20, CD22, CD79a durch eine fehlende Reaktivität für CD5, CD10 und CD23 charakterisiert.

## 1.2 Histologische und molekularpathologische Lymphomdiagnostik

Aus der Komplexität der unterschiedenen Lymphomentitäten und der Relevanz einer möglichst exakten Klassifikation für die Therapieentscheidung ergeben sich hohe Anforderungen an die Routinediagnostik. So muss die morphologische Analyse durch die immunhistologische Bestimmung des molekularen Phänotyps sowie, bei einigen Lymphomentitäten, durch den Nachweis genotypischer Veränderungen ergänzt werden (Hiddemann et Anagnostopoulos, 2005). In der Lymphomdiagnostik finden vor allem drei konventionelle histologische Färbungen zur Beurteilung der Morphologie einzelner Zellen sowie der gesamten Gewebearchitektur Anwendung: Die Giemsa-Färbung, welche zelluläre Merkmale kontrastiert, die Hämatoxylin-Eosin(HE)-Färbung, welche die Kernmorphologie hervorhebt, und die Periodic-Acid-Schiff(PAS)-Färbung, die Glykogen anfärbt und intrazytoplasmatische sowie intranukleäre Immunglobuline markiert. Eine zentrale Rolle im Diagnoseprozess spielt vor allem die Erkennung distinkter Wachstumsmuster vieler Lymphomentitäten. Obwohl einige wenige Lymphome wie die B-CLL, das FL oder das extranodale MALT-Lymphom zuverlässig anhand ihrer Morphologie diagnostiziert werden können, wird auch bei diesen Entitäten die Genauigkeit der Klassifikation durch die Immunhistologie verbessert (Fletcher 2007). Inzwischen existiert eine Fülle von Antikörpern gegen verschiedenste zelluläre Epitope, wobei viele dieser Epitope nicht nur auf einer Zellart oder in einer bestimmten Differenzierungsstufe exprimiert werden. Dies hat zur Folge, dass für die initiale Einschätzung einer Läsion ein Antikörper-Panel gegen mehrere zellartcharakteristische Antigene eingesetzt werden muss. Dabei hat sich in der Routinediagnostik folgendes differentialdiagnostisches Vorgehen bewährt:

Neben den konventionellen Färbungen werden im ersten Schritt zur Liniendetermination Basisfärbungen für das B-Zell-spezifische Antigen CD20 und das T-Zell-spezifische Antigen CD3 durchgeführt und so B- von T-NHL abgegrenzt (Chadburn et al. Am J Clin Pathol 1994). Über das proliferationsspezifische Antigen Ki-67 und die Berechnung des Ki-67-Index wird die proliferative Aktivität bestimmt. Wird ein low-grade B-NHL vermutet, ist z.B. der nächste differentialdiagnostisch wichtige Antikörper CD5. CD5 wird von B-CLL und MCL exprimiert, nicht jedoch von FL oder MZL. Eine weitere differentialdiagnostische Abgrenzung gelingt mit CD 23 (B-CLL), Cyclin D1 (MCL), CD 10 (FL) und gegebenenfalls der Anfärbung von kappa und lambda Leichtketten. Für jede Entität stehen bei diagnostischer Unsicherheit zusätzliche Antikörper sowie prognostische Marker zur Verfügung (Hiddemann et Anagnostopoulos 2005; Feller, Diebold et Paulli, 2004; Fletcher 2007; Fend et Kremer, Pathobiology 2007; Kremer et al. Virchows Arch, 2005). Zur differentialdiagnostischen Abgrenzung einer Lymphominfiltration von einer reaktiven, nichtneoplastischen Proliferation lymphatischer Zellen stehen mit der Polymerase-Ketten-Reaktion sowie der Fragmentlängenanalyse zusätzliche molekulare Untersuchungsmethoden zum Nachweis klonal expandierter B- oder T-Zellen zur Verfügung.

### 1.3 Therapie maligner B-NHL

Die Wahl der Behandlung eines Non-Hodgkin-Lymphoms hängt von vielen Faktoren ab, wie z.B. dem klinischen Stadium der Erkrankung, der Histologie, der Einschätzung der Bösartigkeit (Grading), dem Alter des Patienten und seinem Allgemeinbefinden. Zudem werden klinische Prognose-Scores wie der „International Prognostic Index“ (IPI) für aggressive NHL oder der „Follicular Lymphoma International Prognostic Index“ (FLIPI) für folliculäre Lymphome herangezogen (The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project, N Engl J Med, 1993; Solal-Celigny et al. Blood 2004; Buske et al. Blood, 2006). Auf Basis der Klassifikation sowie der Risikostratifikation erfolgt letztlich die Therapieentscheidung.

Aggressive NHL zeichnen sich aufgrund des hohen Anteils an proliferierenden Tumorzellen durch eine hohe Strahlen- und Chemosensibilität aus, weshalb der Therapieansatz prinzipiell kurativ ist. Um diesen nicht zu gefährden, ist die systemische Chemotherapie auch in frühen klinischen Stadien (Ann Arbor I und II) Therapie der Wahl. Seit der Einführung des CHOP-Schemas, einer Polychemotherapie mit Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednison, durch McKelvey et al. (Cancer, 1976) hat sich dieses Schema gegenüber anderen Substanzkombinationen als mindestens ebenbürtig erwiesen und galt mehr als 25 Jahre lang als Goldstandard in der Therapie aggressiver Lymphome. Erst die Ergebnisse der französischen Arbeitsgruppe GELA (Coiffier et al., N Engl J Med, 2002) zeigten bei über 60-jährigen Patienten mit DLBCL einen signifikanten Überlebensvorteil für die Kombination von CHOP mit Rituximab (R-CHOP), einem chimären monoklonalen Antikörper gegen das B-Zell-Antigen CD20, gegenüber CHOP alleine. Seither wurde die Behandlung der B-NHL durch Rituximab revolutioniert.

Bei indolenten Lymphomen im Ann-Arbor Stadium I und II wird grundsätzlich ein kurativer Therapieansatz verfolgt. Goldstandard ist hier die Radiatio, wobei unter Experten Uneinigkeit bezüglich des zu bestrahlenden Zielvolumens herrscht (extended field vs. involved field). Ab Ann-Arbor Stadium III werden bei indolenten Lymphomen palliative Therapiekonzepte verfolgt, die individuell auf den jeweiligen Patienten abgestimmt werden. Mögliche Therapiestrategien bestehen aus *watchful waiting*, Polychemotherapie oder kombinierter Immunochemotherapie mit dem monoklonalen AK Rituximab. Zudem werden im Rahmen klinischer Studien experimentelle Therapiestrategien wie die myeloablative Radiochemotherapie mit autologer oder allogener peripherer Stammzelltransplantation oder kombinierter Immunochemotherapie mit anschließender Rituximab-Erhaltungstherapie durchgeführt (vgl. Preiß et al. 2010; Wehling et Diener 2005; Huber et al. 2008).

### 1.3.1 Rituximab – Wirkmechanismus und Indikation

Rituximab (MabThera®, Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz / Rituxan®, Biotech Idec, Cambridge, MA, USA) ist ein monoklonaler Antikörper gegen CD20, der am 26. November 1997 in den USA als erster mAK für die Krebstherapie zugelassen wurde. Die Zulassung für die EU erfolgte am 2. Juni 1998 durch die *European Medicines Agency*.

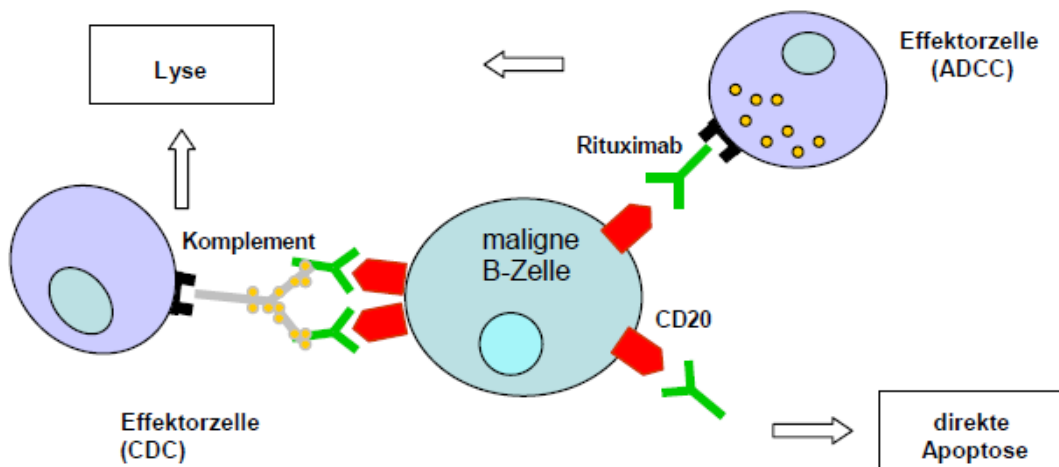
Mit Rituximab hielt die Krebsimmuntherapie Einzug in die onkologische Standardtherapie, wodurch eine neue Ära zielgerichteter Therapiestrategien eingeleitet wurde. Somit konnte Paul Ehrlichs Traum von einer „*magic bullet*“, einem Medikament, das eine Affinität gegen „Parasiten“ hat, jedoch normales Gewebe verschont, nach fast 100 Jahren realisiert werden (Ehrlich, P., Proc Royal Soc London, 1900). Inzwischen gehören neben Rituximab weitere mAK, wie beispielsweise Trastuzumab, Cetuximab oder Bevacizumab, zum onkologischen Standardtherapiepertoire.

Das Prinzip der spezifischen antikörpervermittelten Immuntherapie beruht auf der Wirkung monoklonaler Antikörper gegen tumorassoziierte Proteine. Bereits 1975 war durch die Hybridom-Technologie von Georges J. F. Köhler und César Milstein (Nature, 1975; Nobelpreis 1985) die Herstellung von monoklonalen Antikörpern in beliebiger Menge möglich. Durch Nadler et al. (J Clin Invest, 1981) wurde Anfang der 1980er Jahre mit dem B-Zell-spezifischen Antigen CD20 ein potentielles tumorspezifisches Zielantigen identifiziert und erste Therapieversuche mit spezifischen monoklonalen Antikörpern unternommen (Cancer Res, 1980). Doch sowohl Anti-Idiotyp-Antikörper als auch murine Antikörper erwiesen sich für den breiten klinischen Einsatz aufgrund ungünstiger Nebenwirkungsprofile, allergischer Reaktionen oder der Ausbildung neutralisierender Antikörper (HAMA – human anti-murine antibodies) als ungeeignet (vgl. Huber et al. 2008). Um die Immunogenität zu reduzieren, aber auch um über den Fc-Teil eine Bindung an humane Effektorzellen sowie Komplement zu ermöglichen, erfolgte die Humanisierung der therapeutischen Antikörper.

Rituximab ist ein chimärer mAK der Klasse IgG1, der aus murinen variablen Regionen des Anti-CD20 Antikörpers 2B8 und einem gegen CD20 gerichteten humanisierten Fc-Teil besteht. Er bindet spezifisch an ein extrazelluläres Epitop des CD20-Oberflächenmoleküls, was in vitro zu drei Effektormechanismen führt (vgl. Abb. 1):

- 1) Komplementvermittelte Zytotoxizität (CDC),
- 2) Antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) über Effektorzellen wie Granulozyten, Makrophagen und NK-Zellen,
- 3) Direkte Proliferationshemmung und Apoptoseinduktion.

**Abbildung 1:** Wirkmechanismus von Rituximab, schematisch dargestellt



Zunächst wurde angenommen, dass die komplementvermittelte Zytotoxizität dominieren würde (Manches et al. Blood, 2003; Smith, M. R., Oncogene, 2003; Cheson et al. N Eng J Med, 2008; Fanale et al. Drugs, 2007; Beum et al. J Immunol, 2008). In vivo stellte sich jedoch der Fc-Rezeptor-vermittelte ADCC-Effekt als kritisch heraus, zumal bestimmte Rezeptorpolymorphismen ein besseres Therapieansprechen aufwiesen. Der dominierende Effektormechanismus scheint allerdings zwischen den verschiedenen Lymphomentitäten zu variieren (vgl. Lim et al. Haematologica, 2010; Weng et Levy, J Clin Oncol, 2003; Clynes et al. Nat Med, 2000; Uchida et al. J Exp Med, 2004; Beers et al. Blood, 2010).

Da weder der Anteil der o.g. Mechanismen an der Gesamtwirkung, noch die Funktion von CD20 vollständig geklärt sind, ist auch die exakte Wirkungsweise von Rituximab anhaltender Forschungsgegenstand. Letztlich führen die verschiedenen Mechanismen bei benignen und malignen CD20-positiven Zellen zu Lyse und Apoptose und sensibilisieren zudem maligne B-Zellen für die zytotoxischen Effekte einer Chemotherapie (Alas et Bonavida, Cancer Res, 2001; Ghetie et al. Blood, 2001). Darüber hinaus wird ein Rituximab-vermittelter Immunisierungseffekt angenommen, da Zytolyse und Apoptose zur Freisetzung von Tumorantigenen führen, die wiederum von dendritischen Zellen präsentiert werden und somit eine T-Zell-vermittelte Immunantwort ermöglichen (Lim et al. Haematologica, 2010; Hilchey et al. Blood, 2009), wobei das gehäufte Vorkommen von T-Zell-Infiltraten im KM von Patienten mit gutem Therapieansprechen diese These stützt (vgl. Raynaud et al. Hum Pathol, 2008).

Schließlich verursacht eine Rituximabtherapie eine periphere B-Zell Depletion, die drei bis sechs Monate anhält und sich innerhalb von neun bis zwölf Monaten über hämatopoetische Stammzellen vollständig zurückbildet (Cvetkovic et Perry, Drugs, 2006; Eisenberg et Looney, Clin Immunol, 2005; Stern et Hermann, Crit Rev Oncol Hematol, 2005).

### Das CD20-Oberflächenmolekül:

CD20 ist ein nicht-glykosyliertes Phosphoprotein, das auf der Oberfläche von B-Vorläuferzellen sowie reifen B-Zellen, jedoch nicht auf hämatopoetischen Stammzellen exprimiert wird und nach der Differenzierung zu Plasmazellen verloren geht. Das kodierende Gen ist auf Chromosom 11q12-q13.1 lokalisiert und umfasst bei einer Länge von 16kbp acht Exone. CD20 ist Mitglied der MS4A-Familie und wird auch als MS4A1 (Homo sapiens membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1) bezeichnet, da es wie andere Mitglieder als Transmembranprotein die Zellmembran vierfach durchspannt. In ruhenden B-Zellen erscheint CD20 in der 32kDa-schweren nicht-phosphorylierten Form. Erst nach mitogener Stimulierung erfolgt eine starke Phosphorylierung, so dass 35-37kDa-schwere Isoformen entstehen. Die exakte biologische Funktion von MS4A1 ist nicht gänzlich geklärt, es wird jedoch eine Funktion als nicht-spannungsabhängiger Kalziumkanal postuliert und eine Rolle als Zellzyklus- und Differenzierungsregulator angenommen.

Die langen N-terminalen und C-terminalen Enden des Proteins sind auf der zytoplasmatischen Seite lokalisiert. Im Vergleich dazu machen das Oberflächenepitop und damit auch die Rituximab-Bindungsstelle nur einen kleinen Proteinanteil aus. Die Bindungsstelle ist ein Alanin-N-Prolin-Motiv an Position 170-173 der großen extrazellulären Proteinschleife und wird vom Exon 5 des MS4A1-Gens kodiert (vgl. Cragg et al. 2005, S. 141-147, Ernst et al. Biochemistry, 2005; Tedder et Engel, Immunol Today, 1994; Polyak et al. J Immunol, 1998; Tedder et Schlossmann, J Biol Chem, 1988; Cragg, M. S., Blood, 2011; Niederfellner et al. Blood, 2011).

CD20 ist nach Ligation durch Rituximab vermehrt in lipidreichen Domänen der Zellmembran, sogenannten *lipid rafts*, anzutreffen. Dabei handelt es sich um eine komplexe glycosphingolipid- und cholesterinreiche Membrandomäne, die viele Signalproteine enthält und der eine wichtige Funktion als Plattform für die zelluläre Signalübertragung nachgesagt wird (vgl. Brown et London, Annu Rev Cell Dev Biol, 1998; Simons et Toomre, Nat Rev Mol Cell Biol, 2000). Die Lage in den *lipid rafts* scheint dabei eine Voraussetzung für die Funktion als Kalziumkanal zu sein (vgl. Li et al. J Biol Chem, 2003; Cragg et al. Blood, 2003; Deans et al. Immunology 2002; Janas et al. Biochem Soc Symp, 2005).

Die Migration von CD20 in die *lipid rafts* infolge Rituximab-Bindung gilt als wichtig für die Rituximab-Wirkung. So zeigen die Ergebnisse von Cragg et al. (Blood, 2003) einen Zusammenhang zwischen der komplementabhängigen zytotoxischen Wirkung von Rituximab (CDC) und der Fähigkeit CD20 in die *lipid rafts* zu translozieren. In vitro Untersuchungen an Zelllinien erbrachten, dass Rituximab durch die Migration von CD20 in die Mikrodomänen ihre funktionelle Organisation modifiziert (Semac et al. Cancer Res, 2003), zumal es durch die räumliche Nähe zum Crosslinking der Antikörper kommt, was wiederum eine Verstärkung der Signalwirkung verursacht (Ghetie et al. Blood, 2001; Smith M.R., Oncogene, 2003). So führt die

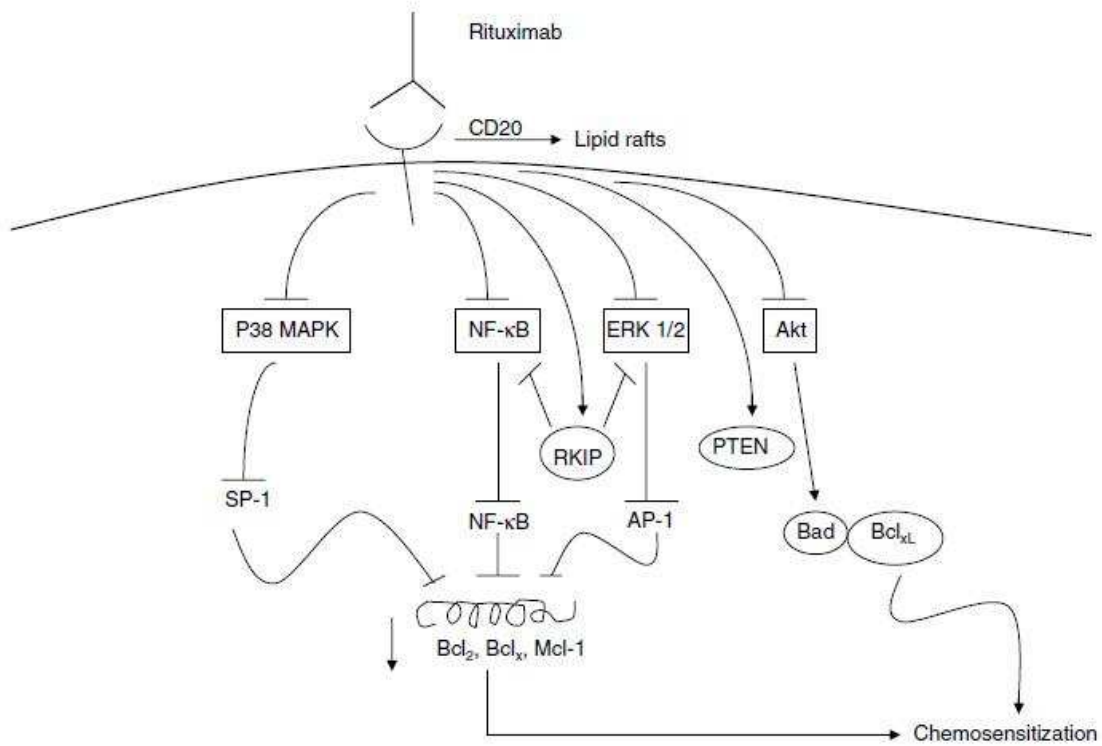
Akkumulation von CD20 u.a. zu einer Down-Regulation der raft-assoziierten Tyrosin-Proteinkinase *Lyn*, einem Schlüsselenzym für die Regulation der Zellaktivität.

#### *Molekulare Signalkaskade infolge Rituximab-Bindung:*

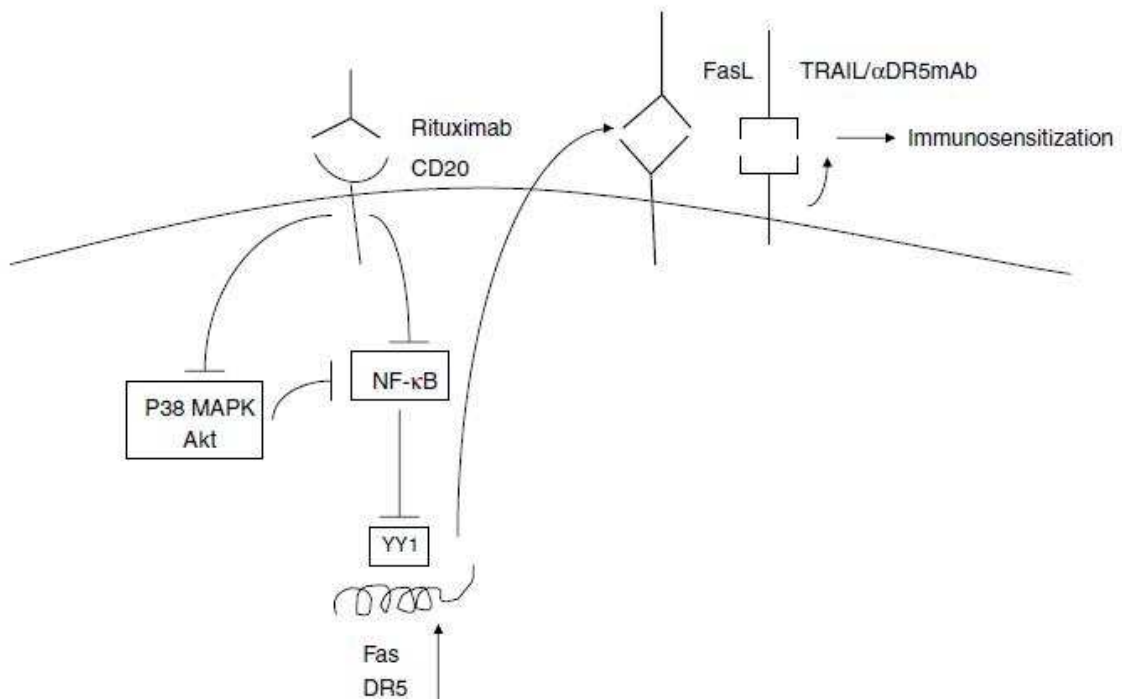
Obwohl der molekulare Wirkmechanismus von Rituximab in vielen Punkten noch Gegenstand aktueller Forschung ist, konnten bereits einige Signalkaskaden identifiziert werden, die infolge Rituximab-Bindung modifiziert werden (vgl. Bonavida, B., *Oncogene*, 2007; Vega et al. *Oncogene*, 2005; Jazirehi et al. *Oncogene*, 2005). So zeigten Untersuchungen an chemotherapieresistenten B-NHL-Zelllinien beispielsweise, dass Rituximab über vier verschiedene Signalkaskaden eine Resensibilisierung der Zellen gegenüber zytotoxischen Pharmaka bewirkt. Die Signalkaskaden resultieren sämtlich in der Downregulation der antiapoptotischen Genprodukte *Bcl-2*, *Bcl-xL* und *MCL-1*, was über die Inhibierung der konstitutiv aktivierten Signaltransduktionswege via *ERK1/2*, *P38 MAPK*, *NF- $\kappa$ B* sowie *Akt* vermittelt wird (vgl. Abb. 2).

Darüber hinaus konnte von der Arbeitsgruppe um B. Bonavida gezeigt werden, dass Rituximab durch die Inhibierung der *NF- $\kappa$ B*-Signalkaskade eine Sensibilisierung von B-NHL-Zelllinien sowohl gegenüber *Fas-Ligand*-vermittelter, als auch gegenüber *TRAIL (Tumor necrosis factor Related Apoptosis-Inducing Ligand)* - vermittelter Apoptose bewirkt. So kommt es infolge der Bindung von Rituximab an CD20 zu einer Inhibierung des *NF- $\kappa$ B* Signaltransduktionsweges, was zu einer Inhibierung des Transkriptionsrepressors Yin Yang 1 (YY1) und somit zu einer vermehrten Oberflächenexpression sowohl des TRAIL-Rezeptors DR5 als auch von Fas führt (vgl. Abb. 3). Voraussetzung für eine Apoptoseinduktion über CD20 scheint eine Quervernetzung (cross-linking) der einzelnen CD20-Moleküle durch Rituximab zu sein (Deans et al. *Immunology*, 2002). Die Translokation von CD20 in lipid rafts infolge Rituximab-Bindung scheint eine weitere Voraussetzung zu sein (Janas et al. *Clin Exp Immunol*, 2005).

**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der Signaltransduktionswege infolge Rituximab-Bindung aus Bonavida, B., Onkogene, 2007, S. 3633



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der molekularen Signaltransduktionswege, die in B-NHL-Zelllinien zu einer Fas Ligand-vermittelten und TRAIL-induzierten Apoptose infolge Rituximab-Bindung führen aus Bonavida, B., Onkogene, 2007, S. 3633





### *Zulassungsstudien:*

Es wurden zahlreiche klinische Studien zur Wirksamkeit von Rituximab als Monotherapie oder in Kombination mit anderen Chemotherapeutika an Patienten mit unbehandeltem oder vorbehandeltem indolentem oder aggressivem B-NHL durchgeführt, die letztlich zur Zulassung von Rituximab für folgende Indikationen führten:

- 1) FL im Stadium III-IV als
  - a) Kombinationstherapie mit einer Chemotherapie für die Erstbehandlung,
  - b) Monotherapie bei CTx-resistenten Verläufen,
  - c) Erhaltungstherapie bei rezidivierendem/refraktärem FL und Ansprechen auf eine Induktionstherapie mit oder ohne Rituximab.
  
- 2) B-CLL als
  - a) Kombinationstherapie mit einer Chemotherapie für die Erstbehandlung,
  - b) Kombinationstherapie mit einer Chemotherapie für rezidivierende oder therapieresistente Verläufe.
  
- 3) CD20-positive DLBCL in Kombination mit einer Chemotherapie aus Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednisolon (CHOP).

An Zulassungsstudien ist für das FL vor allem die Arbeit von Mc Laughlin et al. (J Clin Oncol, 1998) zu nennen, eine Multicenterstudie an 166 Patienten mit vorbehandeltem follikulärem oder low-grade B-NHL, die nach vierwöchiger Therapie mit Rituximab-mono ORR von 48% und eine CR von 6% demonstrierte. Solal-Celigny et al. (Blood, 2004) und Witzig et al. (J Clin Oncol, 2005) konnten mit ORR von 72-80% und CR-Raten von 36-49% die Effektivität einer Rituximab-Monotherapie bei Patienten mit zuvor unbehandeltem FL zeigen. Danach folgten mehrere randomisierte Studien, die nach Zugabe von Rituximab zu diversen Chemotherapieschemata eine Zunahme der Rate an CR sowie des OS beim FL dokumentierten (Hiddemann et al. Blood, 2005; Marcus et al. J Clin Oncol, 2008; Herold et al. J Clin Oncol, 2007). Auch für andere indolente Lymphome, wie beispielsweise das MCL oder die B-CLL, konnte die Wirksamkeit von Rituximab gezeigt werden (Foran et al. J Clin Oncol, 2000; Lenz et al. J Clin Oncol, 2005; Huhn et al. Blood, 2001; Forstpointner et al. Blood, 2004; Tam et al. Blood, 2008; Jaglowski et al. Blood, 2010). Es fanden sich jedoch zwischen den verschiedenen Entitäten erhebliche Unterschiede in der Therapieeffizienz, weshalb Rituximab in der Gruppe der indolenten Lymphome bislang nur für das FL und die B-CLL zugelassen ist. In einem systematischen Review (Schulz et al. Cochrane

Database Syst Rev, 2007) bestätigte sich der Überlebensvorteil einer Kombinationschemotherapie mit Rituximab für indolente Lymphome, insbesondere in der Subgruppe der FL und MCL.

Für das DLBCL zeigten Coiffier et al. (Blood, 1998) in einer randomisierten Multicenterstudie an 54 therapierefraktären Patienten ein Ansprechen auf Rituximab-mono von fast einem Drittel, woraufhin die Einbettung in die bisherige Standardchemotherapie nach dem CHOP-Protokoll erfolgte (Vose et al. J Clin Oncol, 2001). Die GELA-Studie (Coiffier et al. N Engl J Med, 2002), eine randomisierte Phase-III-Studie an 399 Patienten, in der R-CHOP mit dem CHOP-Protokoll verglichen wurde, erbrachte eine signifikante Verbesserung von CR und OS. Diese Ergebnisse wurden durch weitere Studien untermauert (Feugier et al. J Clin Oncol, 2005) und auf breitere Patientenkollektive übertragen (Pfreundschuh et al. Lancet Oncol, 2006), was schließlich zur Etablierung des R-CHOP-Schemas als Standardtherapie in der Erstbehandlung des DLBCL führte.

### **1.3.2 Radioimmuntherapie - Alternative Anti-CD20 Therapeutika**

Neben Rituximab wurde mit Ibritumomab-Tiuxetan (Zevalin<sup>®</sup>, Bayer-Schering AG, Berlin und Biogen IDEC, Cambridge, MA, USA) ein weiterer gegen das CD20-Oberflächenmolekül gerichteter therapeutischer mAK entwickelt. Es handelt sich um einen rekombinanten murinen IgG<sub>1-kappa</sub> mAK, der über einen Chelator kovalent an das Radioisotop <sup>90</sup>Yttrium, einen  $\beta$ -Strahler mit einer mittleren Reichweite von 3,6 mm, gekoppelt ist. Wie Rituximab bindet Ibritumomab-Tiuxetan spezifisch an CD20-positive B-Zellen und führt zu deren Lyse oder Apoptose. Darüber hinaus bewirkt die radioaktive Komponente den Untergang benachbarter Zellen, die für den mAK nicht zugänglich sind oder nicht genügend Antigene für eine AK-Bindung exprimieren (vgl. Huber et al. 2008; Cheson et al. N Engl J Med, 2008).

Die therapeutische Effektivität einer Radioimmuntherapie mit Ibritumomab-Tiuxetan (IDEC-Y2B8) konnte bei guter Verträglichkeit in einer Phase I/II-Studie an Patienten mit therapierefraktärem oder rezidivierendem FL gezeigt werden (Witzig et al. J Clin Oncol, 1999; Wiseman et al. Blood, 2002). So brachte die RIT im Vergleich mit Rituximab signifikant bessere Ergebnisse (ORR 80%, CR-Rate 30%), welche in einer randomisierten Phase III-Studie untermauert wurden (Witzig et al. J Clin Oncol, 2002). Dies führte 2002 in den USA zur Erstzulassung durch die FDA. Seit dem 16. Januar 2004 ist Ibritumomab-Tiuxetan in der EU für die Konsolidierungstherapie nach Remissionsinduktion bei nicht-vorbehandelten Patienten mit follikulärem Lymphom zugelassen. Darüber hinaus besteht eine Zulassung für follikuläre Lymphome mit therapierefraktären oder rezidivierenden Verläufen nach Rituximab-Therapie.

Das Behandlungsschema beinhaltet die intravenöse Gabe von 250mg/m<sup>2</sup> Rituximab an Tag eins, gefolgt von einer weiteren Rituximab-Infusion in gleicher Dosierung an Tag sieben, acht oder neun.

Innerhalb von acht Stunden nach der zweiten Gabe wird dann über zehn Minuten die <sup>90</sup>Y-radiomarkierte Zevalin®-Lösung infundiert. Dabei wird die Dosis in Abhängigkeit von der Thrombozytenzahl und dem Körpergewicht gewählt, wobei eine Maximaldosis von 1200 MBq nicht überschritten werden darf (vgl. Fischer et al. Nuklearmedizin, 2004). Die Vorbehandlung mit Rituximab führt durch die Entfernung zirkulierender B-Zellen zu einer zielgerichteteren Wirkung von Ibritumomab-Tiuxetan auf das B-Zell-Lymphomgewebe.

Neben Zevalin® existiert mit <sup>131</sup>Jod-Tositumomab (Bexxar®, GlaxoSmithKline, London) ein weiterer kommerziell verfügbarer Anti-CD20-mAK. Da für <sup>131</sup>Jod-Tositumomab jedoch in der EU keine Zulassung besteht, fand es keinen Eingang in diese Arbeit, weshalb auf eine weitere Ausführung verzichtet wird.

Ebenfalls keinen Eingang in diese Arbeit fand der Anti-CD20-mAK Ofatumumab (Arzerra®, GlaxoSmithKline, London, Vereinigtes Königreich), ein vollhumaner mAK (IgG1), der am 26. Oktober 2009 durch die FDA und am 19. April 2010 durch die EMA für die Therapie der Fludarabin- und Alemtuzumab-refraktären CLL zugelassen wurde. Im Gegensatz zu Rituximab ist Ofatumumab gegen ein unterschiedliches extrazelluläres CD20-Epitop gerichtet, das beide extrazelluläre Schleifen des Moleküls umfasst. Da Ofatumumab dadurch näher an der Zellmembran bindet, wird eine größere CDC-Wirkung postuliert (Zhang et al. MAbs, 2009; Lemery et al. Clin Cancer Res, 2010; Cheson et al. J Clin Oncol, 2010).

Nachdem in einer Phase I/II Studie Effizienz und Sicherheit von Ofatumumab in der Behandlung therapierefraktärer CLL-Patienten gezeigt werden konnte (Coiffier et al. Blood, 2008), führte die Interim-Analyse einer Phase I/II-Studie an Patienten mit Fludarabine- und Alemtuzumab-refraktären Verläufen (Osterborg et al. ASH Annual Meeting Abstracts, 2008, Wierda et al. J Clin Oncol, 2010) zur Zulassung für diese Patientensubgruppe. Die Wirkung von Ofatumumab bei Patienten mit therapierefraktärem FL wurde von der Arbeitsgruppe von Hagenbeek et al. untersucht (Blood, 2008; ASH Annual Meeting Abstracts, 2009); eine Überlegenheit gegenüber Rituximab konnte bislang jedoch nicht gezeigt werden.

Weitere aktive Anti-CD20-mAK wie beispielsweise Veltuzumab (Immunomedics, Morris Plains, NJ, U.S.A.), Ocrelizumab (Genentech BioOncology, San Francisco, U.S.A.), PRO131921 (Genentech BioOncology), AME-113v (Applied Molecular Evolution / Eli Lilly, San Diego, U.S.A.) und Obinutuzumab (GA-101, Roche, Basel, Schweiz) sind in der klinischen Entwicklung.

## 1.4 CD20-Antigenmodulation infolge Rituximabtherapie

Zahlreiche Studien hatten *in vitro* und *in vivo* gezeigt, dass das CD20-Epitop weder Modulation noch Shedding unterworfen ist und nach Ligandierung mit spezifischen Antikörpern nur in sehr geringem Maße internalisiert wird (Press et al. *Blood*, 1987; Press et al. *Clin Cancer Res*, 1989; Vervoordeldonk et al. *Cancer*, 1994; Press et al. *Blood*, 1994). Schon kurz nach der Erstzulassung wurden jedoch in mehreren Einzelfallberichten CD20-negative Lymphomrezidive infolge Rituximab-Therapie beschrieben und dieses Phänomen als möglicher Tumor-escape-Mechanismus interpretiert (Kinoshita et al. *J Clin Oncol*, 1998; Davis et al. *Clin Cancer Res*, 1999; Schmitz et al. *Br J Haematol*, 1999; Haidar et al. *Eur J Haematol*, 2003; Pijuan et al. *Am J Surg Pathol*, 2005; Ohno et al. *Int J Hematol*, 2006). Dabei entwickeln klonale Tumorzellen einen Mechanismus, der ihnen eine Resistenz gegen spezifische Therapien verleiht. Ein Beispiel für eine erworbene Resistenz von B-Zell-Neoplasien wurde von Meeker et al. (*N Engl J Med*, 1985) für Anti-Idiotyp-Antikörper beschrieben, die gegen die spezifischen Immunglobuline an der Oberfläche einzelner B-NHL gerichtet waren. Es kam zur Selektion von Subklonen mit mutierten Idiotypen, die nicht mehr auf die Therapie ansprachen. So könnte auch der Selektionsdruck des monoklonalen Anti-CD20-AK Rituximab zur *de novo*-Evolution eines CD20-negativen Lymphomklones führen. Diese These wird in der Literatur von vielen Autoren vertreten, wobei Alvaro-Naranjo et al. (*Ann Hematol*, 2003) darüber hinaus die Möglichkeit eines präexistenten CD20-negativen Klones, der sich infolge Rituximabtherapie durchsetzt, diskutieren.

Dass das Expressionslevel von CD20 nicht nur zwischen den verschiedenen Stadien der B-Zell-Reifung, sondern auch zwischen einzelnen neoplastischen Zellen verschiedener B-Zell-Neoplasien variiert, ist bekannt. Zudem weisen CD20-Knockout Mäuse eine normale B-Zell-Entwicklung und -Funktion auf, so dass CD20 für das B-Zell-Überleben nicht maßgeblich zu sein scheint (vgl. O'Keefe et al. *Immunogenetics*, 1998; Uchida et al. *Int Immunol*, 2004).

Zwischen der CD20-positiven Ausgangsbiopsie und dem CD20-negativen Rezidiv konnte anhand von PCR-Analyse des Immunglobulin-Schwere-Ketten-Gen-Rearrangements eine hohe klonale Übereinstimmungsrate gezeigt werden, was für eine Änderung des Immunphänotyps des ursprünglichen B-Zelllymphoms infolge Rituximabtherapie spricht (Chu et al. *Leuk Lymphoma*, 2002; Davis et al. *Clin Cancer Res*, 1999).

Ein veränderter Immunphänotyp wirft diagnostische Probleme auf. So muss, um eine fehlende CD20-Positivität nicht fälschlicherweise als Abwesenheit maligner B-Zellen zu interpretieren, das diagnostische Antikörper-Panel in der Routinediagnostik um alternative B-Zellmarker erweitert werden (vgl. Douglas et al. *Am J Pathol*, 1999). Die Arbeitsgruppe von Chu et al. (*Am J Clin Pathol*, 2006) untersuchte die Expression alternativer B-Zellmarker an CD20-negativen B-Zellneoplasien nach Rituximabtherapie und identifizierte Pax-5 sowie CD79a für diese Fragestellung als Marker der ersten Wahl. Der Transkriptionsfaktor Pax-5 wird ausschließlich von

B-Lymphozyten und B-Zell-Neoplasien exprimiert und erst im Zuge der Plasmazelldifferenzierung supprimiert (Torlakovic et al. Am J Surg Pathol, 2002; Feldman et Dogan, Adv Anat Pathol, 2007; Dong et al. Histopathology, 2008), während der pan-B-Zellmarker CD79 mit den Komponenten CD79a und CD79b auch von Plasmazellen exprimiert wird (Chu et Arber, Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2001). Bei CD20-negativen MCL steht mit Cyclin D1 ein weiterer hoch spezifischer und sensitiver Marker zur Verfügung, da Cyclin D1 normalerweise von lymphoiden Zellen nicht exprimiert wird (Bosch et al. Blood, 1994).

Bezüglich der Häufigkeit einer CD20-Antigenmodulation infolge Rituximabtherapie variieren die Angaben in der Literatur stark, wobei bislang systematische immunhistochemische Studien mit großer Fallzahl fehlen (Kennedy et al. Br J Haematol, 2002; Seliem et al. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2006; Chu et al. Leuk Lymphoma, 2002; Foran et al. Br J Haematol, 2001). Dabei erschwert die oftmals fehlende Aufschlüsselung nach Lymphomentitäten oder zeitlichem Abstand zu einer Rituximabtherapie die Vergleichbarkeit. Ob eine Korrelation zwischen dem Therapieabstand und dem Verlust der CD20-Positivität besteht, wurde bisher noch nicht systematisch untersucht. Systematische Studien zu diesen Fragestellungen werden unter anderem durch das limitierte Untersuchungsmaterial erschwert, da im klinischen Alltag bei Lymphomrezidiven häufig auf die Gewinnung von Gewebeproben verzichtet wird.

Die Ätiologie der CD20-negativen Lymphomrezidive ist bislang ungeklärt. Der Verlust der immunhistochemischen und durchflusszytometrischen CD20-Positivität könnte sowohl auf einen Bindungsverlust der diagnostischen Antikörper, als auch auf einen Expressionsverlust des CD20-Antigens zurückzuführen sein. In der Literatur finden sich diesbezüglich diverse Theorien, auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

#### **1.4.1 Wird das CD20 Oberflächenepitop durch Rituximab maskiert?**

Rituximab hat mit etwa 20 Tagen eine sehr lange Eliminationshalbwertszeit, die bei Folgegaben noch zunimmt. Etwa 10% des Medikaments ist zwei Monate nach der letzten Infusion noch im Serum detektierbar; bei manchen Patienten gelingt der Nachweis sogar bis zu sechs Monate nach Infusion. Bei mehrwöchigen Therapieschemata ist zudem von einer Akkumulation des Antikörpers auszugehen (vgl. Plosker et al. Drugs, 2003; Smith, M. R., Oncogene, 2003; Iacona et al. Ther Drug Monit, 2000). Scheidhauer et al. (Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2002) zeigten, dass Rituximab in keinem anderen Kompartiment außer Tumorgewebe signifikant bindet, was auf eine Akkumulation von Rituximab im Tumorgewebe schließen lässt.

Vor diesem Hintergrund erwogen schon Douglas et al. (Am J Clin Pathol, 1999), dass Rituximab selbst möglicherweise das CD20-Oberflächenepitop blockieren und durch eine Saturierung der

Bindungsstellen, noch Monate nach der Therapie, eine immunhistochemische CD20-Detektion verhindern könnte.

#### 1.4.2 CD20-Positivitätsverlust infolge Veränderungen auf Proteinebene

Der Theorie nachgehend, dass eine Veränderung des CD20-Moleküls auf Proteinebene zu einem veränderten Bindeverhalten und somit zu einem Verlust der immunhistochemischen Positivität führen könnte, wurde die Literatur nach Veränderungen des CD20-Moleküls infolge Rituximab-Therapie durchsucht.

So zeigte die Forschungsgruppe um Mark Cragg (Blood, 2003), dass die Bindung von Rituximab an CD20 eine Migration der CD20-Moleküle in cholesterinreiche Mikrodomänen der Zellmembran, sogenannte *lipid rafts*, bewirkt. Die Daten von Anolik et al. (Eur J Immunol, 2003) sprechen für eine CD20-Modulation im Zusammenhang mit *lipid rafts*. Zwar stand bei dieser Arbeit mit CD40 ein anderer CD20-Ligand im Untersuchungsfokus. Es konnte jedoch nicht nur gezeigt werden, dass CD40 eine Expressionsabnahme von CD20 bei normalen B-Zellen bewirkt. Die Ergebnisse lassen zudem auf eine CD20-Down-Regulation infolge Endozytose nach Migration in *lipid rafts* schließen. Dies steht im Gegensatz zu der bisherigen Annahme, dass CD20 nicht internalisiert wird und keinen natürlichen Liganden aufweist. Interessanterweise sensibilisiert CD40 CLL-Zellen gegenüber der zytotoxischen Wirkung von Rituximab (Jak et al. Leukemia, 2011), so dass ein ähnlicher zugrunde liegender Mechanismus vermutet werden kann. Für eine mögliche Internalisierung von CD20 nach Rituximabbindung sprechen auch die Ergebnisse von Jiliani et al. (Blood, 2003). So konnten CD20 und Rituximab posttherapeutisch mittels Durchflusszytometrie nicht mehr detektiert werden. Erst nach Detergentiengabe gelang der zytoplasmatische Nachweis sowohl von Rituximab, als auch von CD20, so dass die Autoren auf eine Internalisierung des CD20/Rituximab-Komplexes schlossen.

Eine alternative Erklärung für die Antigenmodulation von CD20 infolge Rituximab-Therapie bieten die Forschungsergebnisse der Arbeitsgruppe um Paul Beum und Adam Kennedy. So fand sie bei CLL-Patienten unmittelbar nach Rituximabinfusion ein rasches Verschwinden der B-Zellen aus der Blutbahn, gefolgt von einer unmittelbaren Rückkehr CD20-negativer B-Zellen. Da ein gegen den Fc-Teil von Rituximab gerichteter Antikörper keine Bindung zu diesen rezirkulierenden Zellen aufwies, führte sie den akuten CD20-Verlust auf eine Entfernung des gesamten CD20-Rituximab-Komplexes durch Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems zurück (Kennedy et al. J Immunol, 2004). Diese Annahme wird durch ein in-vitro Modell gestützt, in dem, nach gemeinsamer Inkubation von mit Rituximab opsonierten CD20-positiven B-Zellen und Monozyten, der Rituximab-CD20-Komplex auf den Monozyten nachgewiesen werden konnte (Beum et al. J Immunol, 2006).

Die Entfernung des CD20-Rituximab-Komplexes von zuvor CD20-positiven B-Zellen wird als *shaving* bezeichnet. Dabei scheint der zugrunde liegende Prozess der *Trogozytose* zu ähneln, einer Form der Endozytose, bei der Rezeptoren der Akzeptorzellen an Liganden der Donorzellen binden und eine sogenannte *immunologische Synapse* bilden. Über diese gehen nach Verschmelzung beider Zellmembranen Teile der Donorzellmembran inklusive gebundenem Liganden auf die Akzeptorzelle über, woraufhin das transferierte Material von dieser internalisiert wird (vgl. Glennie et al. Mol Immunol, 2007).

Nicht zuletzt könnte ein Bindungsverlust diagnostischer Antikörper theoretisch auch auf eine veränderte Proteinstruktur von CD20 infolge einer Veränderung der Aminosäuresequenz zurückzuführen sein. Dieser These nachgehend wurde das Rituximab-Bindungssepitop des CD20 Antigens, das in Exon 5 des MS4A1-Gens kodiert wird, von Johnson et al. (Blood, 2009; Haematologica, 2009) sequenziert und entsprechende Mutationen mit der CD20-Proteinexpression nach Rituximabtherapie korreliert. Insgesamt traten Mutationen im Bindungssepitop sowohl *de novo* als auch nach Rituximabtherapie selten auf. Insbesondere CD20-negative Lymphomrezidive zeigten keine regelhaften Mutationen im Bereich des Bindungssepitopes, so dass eine Veränderung der Proteinsequenz für den CD20-Positivitätsverlust nicht ursächlich zu sein scheint.

#### **1.4.3 CD20-Positivitätsverlust infolge Veränderungen auf mRNA-Ebene**

Auch für einen Verlust der CD20-Positivität auf translationaler Ebene, also infolge Herunterregulation der CD20-Proteinexpression über verminderte Transkription mit entsprechender Downmodulation der CD20-mRNA, finden sich in der Literatur mehrere Hinweise. So konnten Jiliani et al. (Blood, 2003) nach Rituximabtherapie mittels RT-PCR eine Downmodulation der CD20-mRNA zeigen, die in Gegenwart von Plasma signifikant zunahm. Auch Pickartz et al. (Exp Hematol, 2001) zeigten an B-CLL-Zellen, dass der Verlust der durchflusszytometrischen CD20-Positivität während einer vierwöchigen Monotherapie mit Rituximab mit einer Downmodulation der mRNA-Transkription korreliert. Schließlich fanden auch Czuczman et al. (Clin Cancer Res, 2008) im Zuge ihrer Untersuchungen an Rituximab-resistenten Zelllinien im Vergleich zu sensiblen Zelllinien eine signifikante Down-Modulation sowohl des CD20-Antigens als auch der CD20-mRNA.

Es finden sich in diesen Publikationen mehrere Hinweise, die auf einen transienten Effekt auf die CD20-Genexpression schließen lassen. Bislang steht der Nachweis eines direkten Zusammenhanges zwischen der immunhistochemischen CD20-Negativität nach einer Rituximabtherapie und der quantitativen Reduktion der CD20-mRNA ebenso aus wie systematische Untersuchungen, die sich der Frage widmen, ob dieses Phänomens nicht auch *in vivo* transient sein könnte.

## 2 Zielsetzung

Der obige Abriss der bisherigen Erkenntnisse im Zusammenhang mit der CD20-Modulation infolge Rituximab-Therapie lässt viele Fragen offen.

Einerseits fehlen Untersuchungen, die eine fundierte Aussage über die Häufigkeit und somit die klinische Relevanz des Phänomens erlauben. Die gezogenen Schlussfolgerungen stützen sich bislang auf Einzelfallberichte oder Untersuchungen an kleinen Patientenkollektiven; systematische immunhistochemische Studien mit größerer Fallzahl fehlen. Zudem mangelt es den bisherigen Arbeiten an Subgruppenanalysen, die die Rolle einzelner Lymphomentitäten herausarbeiten oder auf den zeitlichen Abstand zwischen Probeentnahme und letztmaliger Rituximab-Gabe eingehen. Das primäre Ziel dieser Arbeit ist deshalb die Untersuchung der Häufigkeit des immunhistochemischen Verlustes der CD20-Positivität mittels einer systematischen retrospektiven Analyse sequentieller Biopsien verschiedener B-NHL-Entitäten unter Berücksichtigung der jeweiligen Therapieabstände. Darüber hinaus soll durch die Verwendung alternativer diagnostischer Antikörper deren Rolle bei der Detektion residueller B-NHL Infiltrate untersucht werden. Diese Arbeit soll somit dazu beitragen, das Phänomen eines veränderten Immunphänotyps nach Rituximab-Therapie hinsichtlich seiner Bedeutung für die histopathologische Diagnostik einzuordnen.

Dass sich zu allen aufgeführten Theorien bzgl. der Ätiologie der CD20-Modulation in der Literatur zahlreiche Publikationen finden, die die jeweilige Theorie untermauern, zeigt, wie unvollständig das bisherige Verständnis der zugrunde liegenden molekularen Zusammenhänge ist. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es deshalb, von den unter 1.4 vorgestellten Theorien drei wesentliche ätiologische Ansätze zu überprüfen und dabei, soweit möglich, auf das vorhandene Patientenmaterial zurückzugreifen.

So wird erstens der Frage nachgegangen, ob das CD20-Oberflächenepitop im FFPE-Material der immunhistochemischen Diagnostik nicht zugänglich ist, weil es lediglich durch Rituximab maskiert wird.

Zweitens wird die These einer ursächlichen Modulation des CD20-Moleküls auf Proteinebene aufgegriffen und untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen dem Verlust der CD20-Positivität und der Translokation von CD20 in *lipid rafts* besteht.

Die dritte aufgegriffene Theorie postuliert eine verminderte CD20-Proteinexpression infolge verminderter Transkription mit entsprechender Downmodulation der CD20-mRNA. Entsprechend soll im Zuge dieser Arbeit ein möglicher Zusammenhang zwischen der immunhistochemischen CD20-Negativität nach einer Rituximabtherapie und der quantitativen Reduktion der CD20-mRNA analysiert werden.



### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Auswahlkriterien für den Einschluss in die Studie**

Anhand des Archivs des Instituts für Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München wurden Patienten ausgesucht, von denen mehr als ein Biopsat mit Infiltraten eines B-NHL in zeitlichem Abstand entnommen wurde. Hierbei beschränkte sich die Recherche auf folgende Entitäten: Follikuläre Lymphome, diffus großzellige B-Zell-Lymphome, Mantelzelllymphome und Marginalzonenlymphome. Zusätzlich wurden B-CLL-Patienten, die eine so genannte Richter Transformation durchliefen, überprüft. Probematerial, das vor 1998 entnommen wurde, wurde nicht berücksichtigt, da die Fixierung damals mit 1% Formaldehyd/0,5% Glutaraldehyd (pH 7,4) durchgeführt wurde, was die Immunhistochemie für bestimmte Antikörper negativ beeinflusst. Außerdem ist bei dieser Fixierung keine RNA-Extraktion möglich.

Die so ermittelten Fälle wurden mit Patientendaten der III. Medizinischen Klinik des Klinikums Rechts der Isar, Technische Universität München, abgeglichen, wobei folgende klinische Daten erhoben wurden:

- Zeitpunkte einer Behandlung mit Rituximab oder Zevalin® (Radioimmuntherapie),
- Chemotherapie-Schemata,
- Soweit durchgeführt: Durchflusszytometrische (FACS) Ergebnisse im Zeitraum der in die Studie eingeschlossenen Biopsien.

Die FACS-Daten dienten bei geringer Zellzahl bzw. unsicherer Diagnose bei der Reevaluation als Referenz.

Für den Einschluss in die Studie mussten folgende Bedingungen erfüllt werden:

1. Die Biopsien wurden 0-16 Monate nach Beginn einer Anti-CD20-mAK-Therapie entnommen und
2. pro Patient existiert mindestens eine prätherapeutische „Referenzbiopsie“.

Auch posttherapeutische Biopsien, die im Verlauf reaktive lymphatische Infiltrate zeigten, wurden somit eingeschlossen.

Von allen Patienten, die diese Kriterien erfüllten, wurden sämtliche Paraffinblöcke und Paraffinschnitte aus dem Archiv des Instituts für Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München herausgesucht. Es wurde ausschließlich Material des Instituts verwendet.

Anhand von histologischen und immunhistochemischen Standardfärbungen (Hämatoxylin-Eosin, Giemsa, Gomori, Periodic Acid-Schiff, Eisen, Naphtyl-Chloracetat-Esterase, CD20, CD3, Cyclin D1) wurden die Fälle hinsichtlich Diagnose und Infiltrationsausmaß durch zwei Hämatopathologen, PD Dr. M. Kremer und Prof. Dr. F. Fend, unabhängig voneinander reevaluiert und anhand der WHO Kriterien von 2008 klassifiziert bzw. reklassifiziert (Jaffe et al. IARC Press, 2008).

Gemäß histologischen Standardprotokollen des Instituts waren alle Biopsate unmittelbar nach ihrer Gewinnung in 4%iger neutraler Formalinlösung über 24h fixiert worden. Knochenmark-Biopsate waren anschließend in neutraler (pH 7,0) gepufferter Natrium-EDTA-Lösung entkalkt worden.

### 3.2 Zellkultur

#### 3.2.1 Verwendete Zelllinien und deren Kultivierung

Zusätzlich zu dem Paraffinmaterial wurden in dieser Studie insgesamt drei Zelllinien sowie zwei Primärzellen von B-CLL-Patienten verwendet. Die Zelllinien stammten von einem Mantelzell-Lymphom (NCEB-1), einer B-CLL (MEC-1) sowie einem DLBCL (DB).

**Tabelle 1:** *verwendete Zelllinien*

Zelllinie	Typ	Spender	Herkunft, Katalogisierungsnummer
NCEB-1	MCL	Männlich, 75 Jahre	ATCC, CRL-3005
MEC-1	B-CLL	Männlich, 61 Jahre	DSMZ, ACC 597
DB	DLBCL	Männlich, 45 Jahre	ATCC, CRL-2289

Wie Meyer zum Büschenfelde et al. (Cancer Res, 2008) zeigen, führt Rituximab sowohl bei *NCEB*, als auch bei *MEC-1* zum Zelluntergang. Bei der *DB*-Zelllinie hingegen wurde, selbst bei hohen Dosen, kein zytotoxischer Effekt beobachtet; diese Zelllinie gilt als Rituximab-resistent.

Die verwendeten Primärzellen stammen von B-CLL-Patienten, die zuvor keine Therapie mit einem monoklonalen CD20-Antikörper erhalten haben.

Die Experimente mit Material aus Zellkulturen wurden in Kooperation mit der III. Medizinischen Klinik des Klinikums Rechts der Isar, München, durchgeführt. Alle Zellen wurden in Kulturflaschen kultiviert und wuchsen unter aseptischen Bedingungen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Die Umsetzung erfolgte alle zwei Tage auf 2 x 10<sup>5</sup> Zellen/ml. Das Kulturmedium enthielt neben RPMI 1640, einer Formulierung, die in den 1960er Jahren am *Roswell Park Memorial Institute* zur Kultivierung von

Leukozyten entwickelt wurde, 1% Penicillin-Streptomycin, 1% L-Glutamin, 60µl 2-Mercaptoethanol 50nM und, soweit nicht anders aufgeführt, 10% fetales Kälberserum (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich). Medium und Zusätze wurden von der Firma Invitrogen, Life Technologies in Karlsruhe bezogen.

#### *Inkubation von Primärzellen und Zelllinien mit Rituximab bzw. B1:*

Für die spätere Analyse des CD20-Proteins im Western Blot wurden die oben aufgeführten Zelllinien und Primärzellen vor der Zellernte entweder je fünf Minuten mit 10µg Rituximab (MabThera®, Roche Pharma AG, Granzach-Wyhlen, Deutschland) oder B1 (Maus IgG2a, Coulter, Miami, USA) pro Milliliter Kulturlösung inkubiert. Für die Negativkontrolle wurden sämtliche Zellen zudem ohne vorherige Inkubation mit Rituximab oder B1 geerntet.

#### *Kultivierung NCEB-1-Zellen mit Rituximab:*

Um mögliche Veränderungen auf CD20-mRNA-Ebene zu untersuchen, wurden NCEB-Zellen in Kulturmedium mit 10µg Rituximab pro Milliliter Kulturlösung kultiviert. Das Kulturmedium wurde vier Wochen lang alle drei bis vier Tage ausgetauscht und enthielt neben den oben aufgeführten Zusätzen entweder 20% Humanserum (von gesunden Spendern, bei 37°C aufgetaut) oder 20% fetales Kälberserum (FCS). Dieser doppelte Ansatz wurde gewählt, um die Rituximab-Wirkung sowohl in An-, als auch in Abwesenheit von aktivem Komplement untersuchen zu können. Als Kontrolle wurden die Zellen jeweils in Nährmedien ohne Rituximab kultiviert.

Es ergab sich folgende Versuchsanordnung:

- Medium 1) 20% fetales Kälberserum (FCS)
- Medium 2) 20% Humanserum
- Medium 3) 20% FCS + Rituximab
- Medium 4) 20% Humanserum + Rituximab

Nach 24, 48 und 96 Stunden sowie nach 7, 14, 21 und 28 Tagen wurden jeweils  $2 \times 10^6$  Zellen geerntet und bei -80°C in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Durch Kultivierung in vier verschiedenen Medien und Ernte zu sieben verschiedenen Zeitpunkten ergaben sich, unter Berücksichtigung einer Kontrolle, die zum Zeitpunkt Null entnommen wurde, insgesamt 29 zu untersuchende Proben.

### **3.2.2 Zellernte und Herstellung von Zell-Pellets**

Nach Abschätzung der Zellzahl anhand geeigneter Tabellen wurde das Kulturmedium vollständig aspiriert und die Zellen zweimal mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Dann wurde das PBS durch PBS mit 0,1% Trypsin ersetzt (PBS und Trypsin von Invitrogen, Life Technologies Karlsruhe, Deutschland). Da das Trypsin das Ablösen der Zellen vom Boden der Kulturflasche bewirkt, konnten die gelösten Zellen nun nach Zugabe von Kulturmedium in ein RNase-freies Tube überführt und drei Minuten zentrifugiert werden. So bildete sich ein Zell-Pellet, aus dem nach vollständigem Abpipettieren und Verwerfen des Überstandes im Anschluss entweder RNA isoliert oder ein Zelllysate hergestellt wurde.

### **3.2.3 Herstellung von Zelllysaten**

Für die Untersuchung des CD20-Oberflächenmoleküls im Western Blot mussten aus den angezüchteten Zelllinien (NCEB-1, MEC-1, DB sowie primäre B-CLL Zellen) Zelllysate hergestellt werden. Dazu wurde zunächst aus 15ml 1% NP40, PI (1:20), Vanadata (1:100) und NaF (1:100) ein Lysepuffer hergestellt und gekühlt. Anschließend erfolgte die Poolung von Zellen gleicher Abstammung und gleicher Vorbehandlung. Die gepoolten Zellen wurden gezählt und auf  $2 \times 10^6$ /ml eingestellt. Es folgte eine 5-minütige Zentrifugation bei 1500 rpm. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die entstandenen Zellpellets in 1ml reinem Medium (RPMI1640) mit 10µg *Rituximab* oder 5µg *B1* resuspendiert und fünf Minuten lang behandelt. Als Kontrolle wurden die Zellpellets jeweils auch in reinem Medium ohne CD20-Antikörper resuspendiert. Erneut erfolgte eine 5-minütige Zentrifugation bei 6000 rpm und 4°C mit anschließendem Verwerfen des Überstandes. Der verbleibende Zellanteil wurde jeweils in 200µl Lysepuffer aufgelöst. Die Lyse erfolgte in 30 Minuten auf Eis unter ständigem Schwenken. Nach 10-minütiger Zentrifugation mit 1400 rpm bei 4°C wurde der Überstand in ein neues Safe-Lock Tube abpipettiert und bei -86°C gelagert.

### 3.3 Immunhistochemie

Um den Immunphänotyp der Lymphozyten zu charakterisieren und Lymphominfiltrate von reaktiven Zellinfiltraten zu unterscheiden, wurden die Biopsien im automatischen Immunostainer mit einer Palette von diagnostischen Antikörpern untersucht.

Darüber hinaus wurde ein F<sub>c</sub>-spezifischer Anti-human IgG Antikörper, der an Rituximab bindet, manuell ausgetestet.

Eine adäquate Anfärbung wurde für alle Antikörper durch Positivkontrollen verifiziert. Folgende Antikörper kamen in folgenden Konzentrationen zur Anwendung:

**Tabelle 2:** *Verwendete Antikörper, deren Verdünnung, Kontrollen und Färbemethode*

Antikörper gegen		Klone	Hersteller	Verdünnung LK / KM	Positivkontrolle	Färbemethode
CD20	Monoclonal Mouse Anti-Human CD20cy	L26	Dako, Kopenhagen, Dänemark	1:500 / 1:2000	Tonsille	Automatischer Immunostainer
CD5	Monoclonal Mouse Anti-Human CD5	4C7	Novocastra, Newcastle, UK	1:20	Tonsille	Automatischer Immunostainer
CD3	Monoclonal Rabbit Anti-Human CD3	SP7	NeoMarkers, Fremont, USA	1:10	Tonsille	Automatischer Immunostainer
CD79a	Monoclonal Rabbit Anti-Human CD79a	SP18	NeoMarkers, Fremont, USA	1:100 / 1:20	Tonsille	Automatischer Immunostainer
Cyclin D1	Monoclonal Mouse Anti-Human Cyclin D1	P2D11F11	Novocastra, Newcastle, UK	1:10	Cyclin D1-positives MCL, t(11;14)	Automatischer Immunostainer
PAX 5	Purified Mouse Anti-Pax-5	24	BD Biosciences, San Jose, USA	1:20	Tonsille	Automatischer Immunostainer
Rituximab	Goat Anti-Human IgG (Fc specific) Peroxidase-conjug.		Sigma, Saint Louis, USA	Austestung	Negativkontrolle Tonsille	Manuelle Austestung

Für sämtliche Färbungen wurden zunächst mit Hilfe eines Mikrotoms 3-4 µm dicke Schnitte von den entsprechenden Paraffinblöcken hergestellt und auf Glasobjektträger (Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH und Co. KG, Sondheim, Deutschland) gebracht.

Das Gewebe wurde dann folgendermaßen entparaffiniert und rehydriert:

2 x 5 Minuten in Xylol,

2 x 5 Minuten in 100% Ethanol,

1 Minute in 100% Ethanol,

2 x 1 Minute in 96% Ethanol,

1 Minute in 70% Ethanol,

3 Minuten in Aqua dest.

### 3.3.1 Manuelle immunhistochemische Austestung

Der verwendete Antikörper der Firma Sigma (Saint Louis, USA) bindet spezifisch an den F<sub>c</sub>-Teil von humanen IgG-Antikörpern. Auch Rituximab, ein chimäres IgG Immunglobulin mit murinen variablen und humanen konstanten Regionen, wird von diesem Antikörper erkannt, weshalb er für diesen Versuch ausgewählt wurde.

Bisher existieren für diesen Antikörper in der Immunhistochemie keine etablierten Positivkontrollen. Als Negativkontrollen dienten zwei nicht-pathologische Lymphknotenbiopsate. Des Weiteren wurden zwei Lymphknotenbiopsien (LK) von Lymphompatienten zeitnah nach Rituximab-Therapie ausgewählt, wobei einer der beiden Fälle immunhistochemisch komplett negativ für CD20 war (vgl. Tabelle 3).

**Tabelle 3:** Charakteristika der Fälle für die Anti-CD20-AK Austestung

Gewebe	Lymphom	Therapieabstand	CD20-Status
LK	DLBCL	1 Monat	CD20 <sup>+</sup>
LK	FL	3 Monate	CD20 <sup>-</sup>

Nach Entparaffinierung und Rehydrierung der Gewebsschnitte (vgl. 3.3) wurden die Schnitte mit TBS (1M Tris-NaCl (pH 7,6), 9:1 mit Aqua dest. verdünnt; Tris: Pufferan, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) gespült.

Anschließend erfolgte das so genannte *Antigen retrieval*: Da bei der Fixierung mit Formaldehyd sowohl Proteine als auch DNA quervernetzt werden, sind diese Zielstrukturen immunhistochemischer Färbungen für Antikörperbindungen nur eingeschränkt zugänglich. Setzt man das fixierte Gewebe hohen Temperaturen aus, so können diese Quervernetzungen wieder aufgebrochen werden, was als *antigen retrieval* bezeichnet wird (Dinges et al. 2002; Boenisch T. et Henne, C., 2003). Hierfür wurde eine Küvette mit verdünntem Puffer (1:9 entsprechend 20 ml Target Retrieval Solution, 10x Konzentrat (DakoCytomation, Denmark A/S, Glostrup, Dänemark) ad 180ml Aqua destillata) gefüllt, mit einem Deckel versehen und 20 Minuten in einem Dampfgerät erwärmt. Dann wurden die zu färbenden, entparaffinierten Schnitte in der Küvette für 30 Minuten gekocht und anschließend erneut mit TBS gespült. Um die endogene Peroxidase zu blockieren, folgte eine 15-minütige Inkubation in Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 3% (Merk, Darmstadt, Deutschland). Um die optimale Einwirkzeit auszutesten, erfolgte diese Blockung für die Verdünnungen 1:50, 1:20 und 1:10 zusätzlich 20 Minuten lang.

Alle weiteren Schritte wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt.

Da einige Gewebe Avidin oder andere Komponenten des Biotin-Avidin-Systems binden können, noch bevor ein biotinylierter Antikörper hinzugefügt wurde, wurden die Gewebsschnitte für je 15 Minuten zunächst mit Avidin, dann mit Biotin, vorbehandelt (Avidin/Biotin Blocking Kit, Vector

Laboratories Inc., Burlingame, USA). Anschließend erfolgte eine Blockung mit 100µl Normalserum 5% (Goat Serum, Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark) je Schnitt für mindestens 30 Minuten. Das Ziegen Serum soll unspezifische Bindungen an das Gewebe verhindern, so dass es vor allem an antikörperspezifischen Bindungsstellen zu einer Bindung kommt und eine Hintergrundanfärbung reduziert wird.

Daraufhin wurden mit dem F<sub>c</sub>-spezifischen Anti-Human IgG Antikörper (Sigma, Saint Louis, USA) und Antibody Diluent (Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark) die Verdünnungsstufen 1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:200 sowie 1:400 hergestellt, mit denen die Schnitte dann je eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Nach Spülung mit TBS wurden je 100µl Sekundär-Antikörper (Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark) aufgetragen und erneut 30 Minuten inkubiert. Nach 30-minütiger Inkubation mit je 100 µl Komplexbildner (Dako Chem Mate, Chromogen Red) erfolgte die Visualisierung mit DAB (Diaminobenzidinlösung in HRP-Substratpuffer), gefolgt von der Gegenfärbung mit Hämalaun. DAB, HRP-Substratpuffer, biotinylierter Sekundärantikörper und Komplexbildner stammten ebenfalls von der Firma Dako (Glostrup, Dänemark).

Abschließend wurden die Schnitte jeweils zehn Minuten in aufsteigender Alkoholreihe entwässert (2x 70% Ethanol, 2x 96% Ethanol, 2x 100% Ethanol, 2x Xylol) und eingedeckelt.

### **3.3.2 Automatischer Immunostainer**

Mit Hilfe eines automatischen Immunostainers (Ventata, Medical Systems, Tucson, AZ, USA) wurden die Studienfälle gemäß Herstellerprotokollen mit allen diagnostischen Antikörpern angefärbt.

Bei allen prätherapeutischen Referenzbiopsien wurden, wenn nötig, Färbungen mit dem Antikörper gegen CD20 sowie gegen die T-Zellmarker CD3 und CD5 ergänzt. Diese „Minimalpalette“ wurde bei allen Biopsien, die nach einer Therapie mit Rituximab gewonnen wurden, durch den CD79a-AK erweitert, der, ebenso wie der CD20-AK, reife B-Lymphozyten, darüber hinaus aber auch Plasmazellen anfärbt.

Da mit Cyclin-D1 ein spezifischer und sensitiver Marker für MCL zur Verfügung steht, wurde bei Fällen dieser Entität zusätzlich der Cyclin-D1-AK verwendet.

Fälle, die einen Verlust der CD20-Positivität zeigten, wurden zusätzlich mit PAX5 angefärbt.

Bei den automatisierten immunhistochemischen Färbungen mit dem Immunostainer wurde das *antigen retrieval* nach Anweisung der Hersteller durch Kochen der Schnitte in der Mikrowelle durchgeführt. Dazu wurde mit 2,1g Zitronensäuremonohydrat pro Liter Aqua destillata (0,01 mol/L) ein Zitratpuffer hergestellt, der mit 2N-NaOH auf einen pH-Wert von 6,0 eingestellt wurde. Die

entparaffinierten Schnitte wurden in Glasschaukeln in einen mit 1,5l Zitratpuffer gefüllten Behälter gestellt und bei 800 Watt 40 Minuten in der Mikrowelle gekocht.

Zur Abkühlung und ersten Blockung wurden die Schnitte anschließend sofort in 20°C warmes TBS mit 3% Ziegen Serum (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) gestellt und mindestens 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger mit computerlesbaren Etiketten versehen, die Fallnummer, Monat und Jahr, verwendete Antikörper sowie deren Verdünnung enthielten. Dann wurden sie über Nacht mit dem entsprechenden Antikörper, der zuvor mit Antibody Diluent (Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark) auf die gewünschte Verdünnung gebracht wurde, bei Raumtemperatur inkubiert.

Die folgenden Schritte erfolgten automatisiert in einem Immunostainer (Ventana Medical Systems Inc., Tucson AZ, USA): sekundärer Antikörper, Avidin-Biotin Komplex (ABC), Farbentwicklung sowie Gegenfärbung entsprechend dem Protokoll des jeweiligen Antikörpers. Abschließend wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (vgl. oben) und eingedeckelt.

### **3.3.3 Auswertung**

Die immunhistochemischen Färbungen mit den entsprechenden Antikörpern wurden gemeinsam mit zwei Hämatopathologen, Hr. Priv.-Doz. Dr. M. A. Kremer und Hr. Univ-Prof. Dr. F. Fend unabhängig voneinander semiquantitativ ausgewertet und die posttherapeutischen Biopsien jeweils mit der Vorbiopsie verglichen. Dabei wurde die Gewebeeinfiltration in Prozent und die Färbeintensität des CD20-Antikörpers in drei Abstufungen (+ = gering, ++ = mittel, +++ = stark) beurteilt. Für die CD20-Färbung der posttherapeutischen Biopsien ergaben sich dadurch folgende mögliche Ergebnisse:

1. unveränderte CD20-Positivität,
2. relativer Verlust der CD20-Positivität (geringe Färbeintensität bei starker Färbeintensität der Vorbiopsie oder Mischpopulation aus CD20-positiven und CD20-negativen Zellen) und
3. kompletter Verlust der CD20 Positivität.

Außerdem wurde die Diagnose unter Berücksichtigung aller diagnostischen Antikörper reevaluiert.



### 3.4 Western-Blot

Bei diesem Verfahren werden Proteine zunächst in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese entsprechend ihrer Größe und Ladung aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert, wo sie aufgrund von hydrophober Wechselwirkungen haften bleiben und schließlich von einem spezifischen Antikörper gebunden werden. An den ersten, spezifischen Antikörper bindet ein Peroxidase-konjugierter zweiter Antikörper, der sich durch eine Lumineszenz auf einem Film detektieren lässt. So können die Proteine schließlich identifiziert werden.

#### 3.4.1 Probenherstellung aus Zelllysaten

Um die Proben für den Western-Blot herzustellen, wurden die bei -86°C gelagerten Zelllysate auf Eis aufgetaut. Die Lysate wurden dann, falls nötig, mit Lysepuffer (vgl. 3.2.3) auf 40µl Probevolumen aufgefüllt und mit 8µl 6x Probepuffer (7ml 4xTris-SDS-Lsg. (pH 6,8), 3ml Glycerol, 1g SDS, 0,9g DTT, 1,2mg Bromphenolblau) versetzt. Das darin enthaltene SDS, ein anionisches Tensid, führt bei der anschließenden 5minütigen Erhitzung der Proben bei 95°C im Thermocycler *Thermomixer comfort* (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland) zur Denaturierung der Proteine und Aufschlüsselung ihrer Tertiär- und Sekundärstruktur in Polypeptidketten. Anschließend wurden die Proben zur Auftrennung in die Taschen des polymerisierten Sammelgels gefüllt.

#### 3.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Schon Shapiro et al. (Biophys. Res. Commun., 1967) zeigten, dass die Zugabe von SDS die negativen Ladungsunterschiede zwischen den Proteinen minimiert und als Resultat einer Komplexbildung mit SDS alle Proteine als Anionen unabhängig von ihrer ursprünglichen Ladung dem molekularen Gewicht entsprechend aufgetrennt werden. Das verwendete Verfahren geht auf U. K. Laemmli (Nature, 1970) zurück. Dazu wurde die Gelkammer *Hoefler SE 400* (Amersham Biosciences Corp., San Francisco, USA) aufgebaut und das vorbereitete Trenngel (10ml Acrylamid, 7,5ml 4xTris (pH 8,8), 12,5ml Aqua dest., 100µl APS, 20µl Temed) zwischen die Glasplatten eingefüllt. Da das Molekulargewicht von CD20 in seiner phosphorylierten Form maximal 37 kDa beträgt, wurde eine Acrylamid-Konzentration des Gels von 10% gewählt. Es wurde 1ml Aqua destillata auf das feinporige Trenngel gegeben und die Polymerisation abgewartet. Nach Abkippen des restlichen Wassers wurde das grobporige Sammelgel (1,3ml Acrylamid, 2,5ml 4x Tris (pH 6,8), 6,1 ml Aqua dest., 50µl APS, 10µl Temed) auf die polymerisierte Trenngelphase gebracht. Danach wurde ein Kamm der Taschengröße 1,5mm mittig eingelegt, der 15 Auftragsaschen für die Proben formte. Anschließend wurden die Glasplatten mit den

Polyacrylamidgelen in die mit 1x Laufpuffer (100ml 10x Laufpuffer aus 144g Glycin, 30,2g Tris und Aqua dest. ad 1000ml, 900ml Aqua dest., 10ml 10% SDS-Lsg.) gefüllte untere Pufferkammer der Gelkammer gebracht. Nach Entfernung des Kammes wurden die Taschen mittels einer Einweg-Kunststoffspritze luftblasenfrei mit 1x Laufpuffer ausgespült. 12µl des Markers *Precision Plus Protein Standards* (BIORAD, Hercules, USA) wurden eingebracht, die Proben in die Geltaschen gefüllt, die obere Gelkammer befestigt und ebenfalls mit 1x Laufpuffer befüllt. Nachdem die Verkleidung der Gelkammer angebracht worden war, konnte die Elektrophoreseeinheit an die Spannungsquelle *PowerPac HC* (BIORAD, Hercules, USA) angeschlossen und somit eine konstante Spannung von 200V erzeugt werden. Das Bromphenolblau im Probenpuffer ermöglicht die visuelle Verfolgung des Elektrophoreselaufs. Die Elektrophorese wurde gestoppt, wenn die Trenngelphase bis auf etwa 1 cm durchlaufen war.

### 3.4.3 Western Blotting

1979 beschrieben Towbin et al. (Proc Natl Acad Sci USA, 1979) erstmals den elektrophoretischen Transfer von Proteinen von einem Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrozellulosemembran. Dabei bewirkt das senkrecht zum Gel gerichtete elektrische Feld die Elution der Proteine aus der Polyacrylamidmatrix sowie den Transfer auf diese Membran, an der sie dann aufgrund hydrophober Wechselwirkungen unter Erhalt der elektrophoretischen Auftrennung haften bleiben. W. Neal Burnette (Anal Biochem, 1981) gelang schließlich der quantitative Proteintransfer. Er prägte für diese Methode, in Anlehnung an die von E.M. Southern 1975 etablierte Technik für DNA-Fragmente, den Namen „Western“ Blotting.

In dieser Studie kam ein Tank-Blot-System mit der Transferkammer *Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* (BIORAD, Hercules, USA) zur Anwendung. Dafür wurde zunächst mit 300ml 10x Laufpuffer, 600ml Ethanol 99,8% und Aqua destillata ad 3 Liter ein Transferpuffer angesetzt und über Nacht auf 4°C gekühlt. Sofort nach der Elektrophorese wurde das Gel von den Glasplatten gelöst und das Trenngel vom Sammelgel entfernt. Dann wurden die Schwammeinlagen der Transferkammer zusammen mit Filterpapier (Gel Blotting Papier 1,4mm, Whatman GmbH, Dassel, Deutschland) und der Nitrozellulosemembran *Protran BA85* (Porengröße 0,45µm, Whatman GmbH, Dassel, Deutschland) in Transferpuffer getränkt. Anschließend wurde in der Gel-Kassette in folgender Reihenfolge das „Blot-Sandwich“ aufgebaut: Schwammeinlage, Filterpapier, Trenngel, Nitrozellulosemembran, Filterpapier, Schwammeinlage. Nach Verschluss der Gelkassette wurde diese in die mit Transferpuffer gefüllte Transferkammer eingesetzt. Durch Anschluss an die Spannungsquelle erfolgte dann bei konstant 4°C und 25V über Nacht der Proteintransfer. Bei diesem Vorgang wird das an den Proteinen angelagerte SDS ausgewaschen. Dadurch können die Proteine renaturieren und teilweise ihre Sekundär- und Tertiärstruktur wieder einnehmen, was eine Erkennung durch spezifische Antikörper ermöglicht (vgl. Eckert, W.A. et Kartenbeck, J., 1997).

### 3.4.4 CD20-Detektion mit spezifischem Antikörper

Die transferierten Proteine können mit Hilfe spezifischer Antikörper identifiziert werden. Dabei bindet zunächst ein Primärantikörper (1. Antikörper) an die auf der Nitrozellulose immobilisierten Antigene. An den F<sub>c</sub>-Teil dieses Antikörpers bindet wiederum ein zweiter, speziesspezifischer Antikörper (Anti-Mouse bzw. Anti-Rabbit IgG), der mit der Peroxidase *HRP* (horseradish peroxidase) konjugiert ist. Dieses Enzym katalysiert die Oxidation von Luminol, wobei eine Chemilumineszenz entsteht, die sich mit Hilfe eines Röntgenfilms detektieren lässt.

Nach Entfernen aus der Transferkammer wurde die Nitrozellulosemembran drei Minuten in Aqua destillata gewaschen und anschließend mit Ponceaurot (Ponceau S Solution, FluKa Biochemika GmbH, Buchs, Schweiz) angefärbt, um den Marker und die Proteinbanden darzustellen. Das überschüssige Ponceaurot wurde durch Waschen in 1x PBS-Lösung (100ml 10x PBS-Lösung, 900ml Aqua dest., 1ml Tween) wieder vollständig entfernt. Anschließend wurde zur Blockung unspezifischer Bindungsstellen 5% Milchpulverlösung (5g Milchpulver, 100ml 1x PBS-Lsg.) auf die Membran gegeben und eine Stunde inkubiert. Währenddessen wurden 3ml der Milchpulverlösung 15µl des Anti-CD20 Antikörpers (1. AK) zugegeben, vermischt und bei 4°C aufbewahrt.

**Tabelle 4:** *verwendete Antikörper*

	Name	Klon	Konzentration	Firma
1. AK	Lyophilized Mouse Monoclonal Anti-human CD20	7D1	1:200	Novocastra, Newcastle, U.K.
2. AK	Peroxidase-AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)		1: 30.000	Jackson Immuno Research Lab., West Grove, USA

Für den Immunoblot wurde die Membran in eine Dokumentenfolie (Prospekthüllen, Esselte Leitz GmbH & Co KG, Stuttgart, Deutschland) gelegt, mit einem Folienschweißgerät (Severin GmbH, Sundern, Deutschland) an drei Seiten verschweißt, mit der AK-Milchpulverlösung luftblasenfrei benetzt und schließlich zugeschweißt. Nach 24h bei 4°C wurde die Membran aus dem Folienquadrat entfernt und fünfmal je zehn Minuten mit 1x PBS gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper, von dem, analog zum 1. AK, zuvor 0,6µl mit 20ml der 5%igen Milchlösung versetzt worden waren. Abermals wurde die Membran fünfmal mit 1x PBS gewaschen.

Zur Detektion des entstandenen Immunkomplexes kam die Entwicklungslösung *SuperSignal West* (Thermo Scientific, Rockford, USA) zum Einsatz, mit der die Membran eine Minute inkubiert wurde. Die Visualisierung gelingt, weil die am Sekundärantikörper gebundene Meerrettichperoxidase das in der Entwicklungslösung enthaltene zyklische Diacylhydrazid-Luminol unter Lichtemission ( $\lambda = 428 \text{ nm}$ ) oxidiert.

Danach wurde die Membran in Klarsichtfolie (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) verpackt und in die Filmkassette *Hypercassette* (Amersham Biosciences Corp., San Francisco, USA) geschoben, wo ein Röntgenfilm *CL-Xposure Clear Blue* (Thermo Scientific, Rockford, USA) eine Stunde belichtet wurde. Die Filmentwicklung erfolgte in dem automatischen Entwicklungsgerät Hyperprocessor der Firma Amersham Biosciences (San Francisco, USA).

Alle Versuche wurden dreifach wiederholt.

### **3.5 Quantifizierung des CD20-RNA-Gehalts**

#### **3.5.1 Patientenmaterial**

Um der Frage nachzugehen, ob die CD20-Negativierung auf eine Veränderung auf mRNA-Ebene zurückzuführen ist, wurden, nach Auswertung der immunhistochemischen Untersuchungen, aus jeder Ergebnisgruppe Fälle ausgewählt, die ein möglichst großes Tumordinfiltrat aufwiesen. Dabei diente für jeden Fall die Ausgangsbiopsie vor Rituximab-Therapie als Referenz und wurde ebenfalls analysiert.

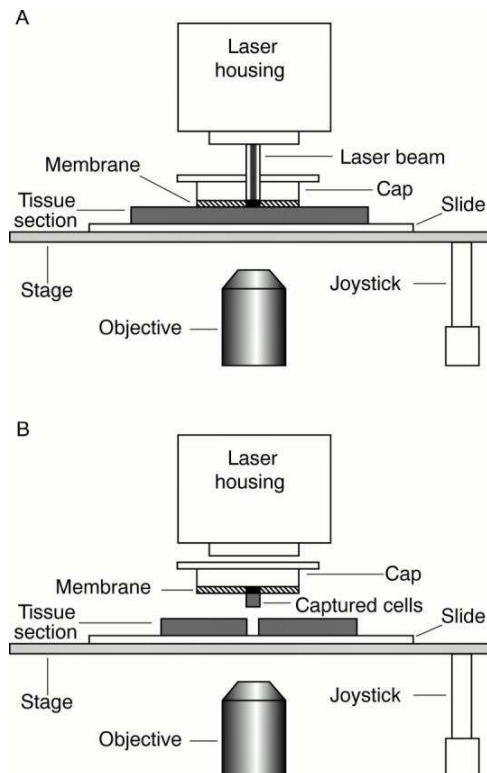
Für die molekulare Analyse wurden jeweils fünf serielle Gewebsschnitte à 10µm angefertigt, auf Glasobjektträger (Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH und Co. KG, Sondheim, Deutschland) gebracht und 30 Minuten lang bei 55°C getrocknet. Nach Entparaffinierung (vgl. 3.3) wurden die Schnitte mit Hämalaun angefärbt, wieder entwässert, in 10% Xylol gelagert und unmittelbar vor der Dissektion luftgetrocknet.

##### **3.5.1.1 Laser Capture Microdissection (LCM)**

Heterogenität des zu untersuchenden Gewebes und ein variabler Anteil reaktiver Zellpopulationen können einen signifikanten Einfluss auf die Ergebnisse und die Interpretation molekularer Studien haben. Die Reliabilität der Untersuchungen hängt also maßgeblich von dem relativen Anteil der Zielzellen in der zu untersuchenden Probe ab (vgl. Fend F. et Raffeld, M., J Clin Pathol, 2000; Fend et al. Pathol Res Prac, 2003). Um die Konzentration der Zielpopulation und somit die Sensitivität der Genexpressionsanalyse zu erhöhen, kam bei kleinen Lymphomfiltraten die Laser Capture Microdissektion zum Einsatz. Diese Technik, die von Emmert-Buck et al. (Science, 1996) am National Cancer Institute in Bethesda, USA entwickelt wurde, ermöglicht die Isolation

morphologisch definierter Zellpopulationen aus komplexen Geweben und erlaubt so präzise *in vivo* Analysen von kleinsten Läsionen wie zum Beispiel einem Carcinoma in situ.

Die LCM basiert auf der Adhärenz visuell selektierter Zellen an eine thermoplastische Ethylvinylacetatmembran, die auf einem entwässerten Gewebeschnitt zu liegen kommt und durch einen Infrarot-Laserimpuls fokal geschmolzen wird. Das geschmolzene Polymer dehnt sich in das Gewebe aus und füllt darin kleinste Zwischenräume aus. Binnen Millisekunden verhärtet es



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung der LCM. (A) Laseraktivierung führt zu fokalem Schmelzen der Polymer-Membran. (B) Anheben der Kappe löst die an der Membran anhaftenden Zellen selektiv aus dem Gewebsschnitt.

Aus Fend, F. et Raffeld, M., J Clin Pathol, 2000, S. 667

wieder, so dass die gewünschten Zellen durch Anheben der Membran selektiv vom Objektträger entfernt werden können. Da die meiste Energie von der Membran absorbiert wird und die Maximaltemperatur von etwa 90°C nur über einen Sekundenbruchteil bestehen bleibt, ist die Intaktheit biologischer Makromoleküle gewährleistet (Fend, F. et Raffeld, M., J Clin Pathol, 2000). Die Durchführbarkeit der LCM an Paraffingewebe ist ebenso beschrieben, wie die Möglichkeit der nachfolgenden Untersuchung von RNA mittels quantitativer RT-PCR (Fink et al. Nat Med, 1998; Specht et al. Clin Cancer Res, 2002; Murray et al. Acta Histochem, 2007).

Das verwendete Mikrodissektionssystem *PixCell 2e* (Arcturus Engineering, Mountain View, CA, USA) besteht aus einem invertierten Mikroskop mit steuerbarem Objektträger, einer Laserdiode, einer Laserkontrolleinheit sowie einer CCD-Kamera mit Farbmonitor. Bei der LCM wird eine durchsichtige Kunststoffkappe *CapSure HS* (Arcturus Bioscience, Mountain View, CA, USA), auf der die thermoplastische Membran angebracht ist, auf einen mechanischen Transportarm gesteckt

und auf das gewünschte Areal des entwässerten Gewebeschnitts aufgesetzt. Unter mikroskopischer Kontrolle werden nun die gewünschten Zellen mittels eines Positionsstrahls visuell selektiert. Die Freisetzung eines fokalen Laserimpulses erfolgt auf Knopfdruck. Schließlich wird die Kunststoffkappe mit Hilfe des Transportarms vom Gewebeschnitt abgehoben, wodurch die selektierten Zellen vom Objektträger abgelöst werden.

Auf diese Weise wurden die Lymphominfiltrate von drei prätherapeutischen und sechs posttherapeutischen Fällen mikrodiseziert (vgl. Tabelle 5). Dabei wurden jeweils die mikrodisezierten Zellen von fünf seriellen Gewebeschnitten gepoolt, so dass für die Genexpressionsanalyse eine Mindestzellzahl von 200 Zellen zur Verfügung stand.

**Tabelle 5:** Entnahmekzeitpunkt, Diagnose, Organtopologie und Infiltratgröße der mikrodisezierten Biopsien

Nr.	Entnahmekzeitpunkt	Diagnose	Organtopologie	Ursprüngliche Infiltratgröße
1	prätherapeutisch	MZL	Lymphknoten	50%
2	prätherapeutisch	FL	Knochenmark (KM)	30%
3	prätherapeutisch	B-CLL	KM	40%
4	post Rituximab	FL	KM	15%
5	post Rituximab	MZL	KM	10%
6	post Rituximab	MCL	Magen, Duodenum	
7	post Rituximab	FL	KM	10%
8	post Rituximab	FL	KM	10%
9	post Rituximab	FL	Ileum	

### 3.5.1.2 RNA-Extraktion aus Paraffinmaterial

Im Anschluss an die LCM wurde die thermoplastische Mikrodisektionsmembran unter sterilen Bedingungen mit einem Einwegskalpell von der Kunststoffkappe abgelöst und in je 200µl Lysepuffer (10mM Tris/HCl (pH 8,0), 0,1mM EDTA (pH 8,0), 2% SDS) aufgenommen. Bei Fällen, bei denen aufgrund der Infiltratgröße keine LCM erforderlich war, wurde der infiltrierte Bereich zunächst unter dem Mikroskop markiert. Anschließend wurden die markierten Ariele der seriellen Gewebeschnitte mit einem Einmalskalpell abgetragen und ebenfalls in 200µl Lysepuffer aufgenommen.

Für den Verdau zellulärer Proteine wurden die Proben jeweils mit 10µl Proteinase K (GE Health Care, Dallas, Texas, USA) der Konzentration 50mg/ml versetzt und 16 Stunden bei 60°C mit einer Frequenz von 450 pro Minute geschüttelt. Der Verdau von Proteinen, die durch die Formalinfixierung Quervernetzungen mit der RNA eingegangen sind, ist entscheidend für die RNA-Isolation aus FFPE-Material, da verbleibende Proteine die cDNA-Synthese inhibieren würden (Koch et al. Diagn Mol Pathol, 2006). Koch et al. zeigten auch, dass die RNA-Extraktion mittels

Phenol-/Chloroformextraktion für Paraffinmaterial bessere Resultate erzielte, als die Verwendung eines RNeasy Kits (vertrieben von Quiagen, Hilden, Deutschland), weshalb diese Extraktionstechnik gewählt wurde.

Jeder Probe wurden 20µl Natriumacetat (3M, pH 4,0) sowie 200µl Phenol und 100µl Chloroform/Isoamylalkohol (Verhältnis 24:1) zugegeben, vermischt und sechs Minuten in einer vorgekühlten *Eppendorf Centrifuge 5417R* (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) mit 13000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Unter dem Abzug wurde der Überstand mit einer Pipette aufgenommen und für die anschließende Chloroformextraktion in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Die Chloroformextraktion dient dem Entfernen von gelöstem Phenol aus der wässrigen Phase, wodurch der DNase Verdau effizienter ablaufen kann. Hierzu wurde den Proben nochmals 100µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugefügt und sie wurden nach gründlichem Mischen drei Minuten bei 4°C zentrifugiert. Erneut wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und in einem neuen Reaktionsgefäß zur Isopropanolpräzipitation mit 220µl Isopropanol und 2µl des Carriers Glykogen (20 mg/ml, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) versetzt. Nachdem die Proben 15 Minuten bei -20°C in Gefrierschrank eingefroren worden waren, wurde die RNA durch 30minütige Zentrifugation bei 4°C pelletiert. Die Pellets wurden zweimal mit je 500µl Ethanol 70% gewaschen und nach kurzer Lufttrocknung in 16µl RNase-freiem Wasser (Quiagen, Hilden, Deutschland) resuspendiert.

Anschließend erfolgte ein DNA-Verdau. Hierzu wurden die Proben mit je 2µl *RQ1 DNase 10x Reaktionspuffer* (400mM Tris/HCl, 100mM MgSO<sub>4</sub>, 10mM CaCl<sub>2</sub>) und 1µl *RQ1 RNase-freier DNase* 30 Minuten in einem Heizblock *Eppendorf Thermomixer comfort* (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bei 37°C inkubiert. Dann wurde je 1µl *RQ1 DNase Stop-Solution* zugegeben und die DNase zehn Minuten bei 65°C hitzeinaktiviert (DNase, Reaktionspuffer und Stop-Solution von Promega, Mannheim, Deutschland). Nachdem die Proben mit RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 200µl gebracht worden waren, wurde zur RNA-Extraktion die oben beschriebene Phenol-/Chloroformextraktion nochmals wiederholt, wobei zunächst 200µl einer 25:24:1-Mischung aus Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und dann 200µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) verwendet wurden.

Die Präzipitation erfolgte danach mit 500µl Ethanol 100%, 12µl LiCl (4M in RNase-freiem Wasser) und 2µl des Carriers Glykogen. Nach 15minütigem Einfrieren bei -20°C wurde die RNA durch 30minütiges Zentrifugieren pelletiert, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und schließlich in 19µl RNase-freiem Wasser aufgenommen.

Die RNA-Konzentration der Proben wurde in einer standardisierten photometrischen Analyse mit dem Spektrophotometer *NanoDrop 1000* und der Software *ND-1000 V3.1.0* (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA) nach Anweisungen des Herstellers ermittelt. Anschließend wurden die Proben entweder direkt in die stabilere cDNA transkribiert oder bis zur cDNA-Synthese bei -20°C gelagert.

### 3.5.1.3 cDNA-Synthese

Um RNA mittels quantitativer PCR nachweisen zu können, wurde anhand der einsträngigen RNA mit einer retroviralen reversen Transkriptase (RT) eine zur RNA komplementäre einsträngige DNA (cDNA) synthetisiert, die bei der PCR dann als Matrize diente.

Für diesen Prozess wurde das *SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR* mit *Superscript II* reverser Transkriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) verwendet.

Um 1 µg Gesamt-RNA revers zu transkribieren, wurden je 17,5 µl Probevolumen 1 µl *Random Primers* der Konzentration 200 ng pro µl zugegeben und in einem Heizblock *Thermomixer comfort* (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) zunächst fünf Minuten bei 70°C, dann fünf Minuten bei 25°C inkubiert. Dabei kam es zur Bindung der Oligonukleotide an die RNA-Stränge. Währenddessen wurde auf Eis ein Mastermix hergestellt, indem für jede Probe 6 µl 5x RT-Puffer, 3 µl 0,1 M DTT und 1 µl 10 nM *dNTP-Mix* (aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP) vermischt wurden. Außerdem wurden pro Probe je 0,5 µl RNase Inhibitor *RNase Out* (40 U/µl) mit je 1 µl Reverser Transkriptase (200 U/µl) vermengt. Das RNA-Primer-Gemisch wurde dann mit je 10 µl des Mastermixes und je 1,5 µl des Inhibitoren-Enzym-Gemisches versetzt und während einer Stunde bei 42°C im Heizblock revers transkribiert. Die so synthetisierte cDNA wurde ausgehend von der photometrischen Messung der ursprünglichen RNA-Konzentration durch Zugabe von Wasser auf eine Zielkonzentration von 10 ng cDNA pro Mikroliter gebracht und bei -20°C eingefroren.

### 3.5.1.4 Real-Time quantitative TaqMan PCR

#### *Hintergrund*

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde erstmals 1985 von Saiki et al. (Science, 1985) beschrieben. Sie ermöglicht die Vervielfältigung eines bestimmten Nukleinsäureabschnitts, wobei lediglich die Ränder dieses Abschnittes bekannt sein müssen. Zu diesen Rändern werden komplementäre Oligonukleotide, sogenannte Primer, synthetisch hergestellt. Die PCR läuft immer in drei Schritten ab: Zunächst wird der DNA-Doppelstrang durch Hitze denaturiert und so in zwei Einzelstränge aufgetrennt. Dann folgt das Annealing, das Binden der Primer an die beiden Nukleinsäurestränge. Schließlich katalysiert eine DNA-Polymerase die Neusynthese von nun zwei Doppelsträngen. Durch wiederholte Abfolge dieses Prozesses wird die Template-DNA so exponentiell vervielfältigt.

Real-Time quantitative PCR (RT-qPCR) ist die zuverlässige Detektion und Messung von Reaktionsprodukten, die in einem PCR-Zyklus generiert werden. Das generierte Amplifikat ist zu der eingesetzten DNA-Menge in der Theorie zwar direkt proportional, in der Praxis führen jedoch Faktoren wie eine sterische Hemmung der Primer, eine zunehmende Reaktionsdauer und die



abnehmende dNTP-Konzentration mit der Zeit zu einem Abweichen von der strengen Exponentialität. Um die ursprüngliche Template-Menge quantifizieren zu können, muss daher die Akkumulation des PCR-Produkts über jeden PCR-Zyklus im zeitlichen Verlauf gemessen werden. Als erstes gelang dies der Arbeitsgruppe um Higuchi et al. (Bio Technology, 1993). Nach mehrfacher Modifikation der Methode hat sich inzwischen die Quantifizierung mittels Fluoreszenzmessung durchgesetzt (vgl. Ginzinger, D. G., Exp Hematol, 2002).

In dieser Studie wurde ein 5'-Nuklease-Assay mit einer spezifisch bindenden *TaqMan* Sonde angewendet. Bei dieser Sonde handelt es sich um ein Oligonukleotid, an das am 5'-Ende kovalent der Fluoreszenzfarbstoff *FAM* (6-Carboxy-Fluoreszein) gebunden ist. Am 3'-Ende der Sonde befindet sich ein *TAMRA* (6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin)-Molekül, das die von *FAM* emittierte Fluoreszenz absorbiert, da dessen Resonanzfrequenz genau im Frequenzbereich dieser Fluoreszenz liegt.

Bei der Replikation bewirkt die 5'-3'-Nukleaseaktivität der Taq-Polymerase die Abspaltung des 5'-Fluoreszenzfarbstoffs von der Sonde und entfernt ihn dadurch räumlich vom 3'-Ende, so dass das Fluoreszenzsignal nicht mehr absorbiert wird. Da nur die Amplifikation der Zielsequenz ein Fluoreszenzsignal hervorruft, werden unspezifische Amplifikationen nicht erfasst. Die Signalstärke wird nach jedem PCR-Zyklus über einen Spektrographen gemessen und als Funktion der Zykluszahl halblogarithmisch aufgetragen. Mit Hilfe der Sequence Detection Software (Applied Biosystems) wird ein Reaktionsgraph generiert, der im Anfangsbereich rein logarithmisch verläuft, dann jedoch aus oben genannten Gründen zunehmend abflacht. Die Zykluszahl, bei der ein Signal signifikant stärker ist als das Hintergrundsignal, wird *threshold cycle* oder Ct-Wert genannt.

RT-qPCR und Detektion erfolgten automatisch in einem real-time Thermocycler *Abi Prism® 7700 Sequence Detection System* (Applied Biosystems, Foster City, USA).

Koch et al. (Diagn Mol Pathol, 2006) zeigten, dass quantitative Genexpressionsanalysen zuverlässig an FFPE-Material durchgeführt werden können, wenn die RNA-Extraktion optimiert und das Amplikon kleiner als 100 Basenpaare gewählt wird. Da bei dieser Methode nur wenig Input-RNA benötigt wird, kann sie auch bei mikrodisezierten Proben angewendet werden.

Um die CD20-Genexpression zu bestimmen, wurde eine absolute Quantifizierung durchgeführt, wobei das Housekeeping Gen *18S rRNA* als Referenz diente, an der die CD20-Messungen normalisiert wurden. Dies kompensiert sowohl für Variationen in RNA-Menge und -Qualität als auch in der cDNA-Synthese.

Alle Messungen wurden mindestens zweifach in Dubletten durchgeführt.

Mit Hilfe der *primer express software* (Applied Biosystems, Foster City, USA) wurden spezifische Primer und TaqMan-Sonden für CD20 und 18S generiert. Dabei wurden Intron-überspannende Primer gewählt, so dass eine Amplifikation von genomischer DNA ausgeschlossen wurde. Um

auch die Detektion von fragmentierter oder teilweise degradierter RNA zu ermöglichen, wurden Zielsequenzen unter 100bp gewählt.

Primer und Sonden wurden von Microsynth (Balgach, Schweiz) bezogen und hatten für CD20 (Genbankzugriffsnummer NM152866) folgende Sequenzen:

CD20-F (sense): 5'-TGT AAT AGC TGG CAT CGT TGA GA-3'  
 CD20-R (antisense): 5'-TTC TGC TGA CAG GAG AAC TAT GTT AGA-3'  
 CD20-I (Sonde): 5'-FAM TGG AAA AGA ACG TGC TCC AGA CCC A TAMRA-3'  
 Fragmentgröße: 82bp

Primer und Sonde für das Referenzgen *18S rRNA* setzten sich folgendermaßen zusammen:

18S-F (sense): 5'-CCC TGT AAT TGG AAT GAG TCC AC-3'  
 18S-R (antisense): 5'-GCT GGA ATT ACC GCG GCT-3'  
 18S-II (Sonde): 5'-FAM TGC TGG CAC CAG ACT TGC CCT C TAMRA-3'

Für CD20 wurde eine Standardkurve generiert, indem von der MCL-Zelllinie *Granta 519* stammende cDNA bekannter Konzentration seriell verdünnt wurde. Dann wurden die in der RT-qPCR gemessenen Ct-Werte gegen die jeweiligen Konzentrationen aufgetragen. Es resultierte die in Abbildung 5 dargestellte Standardkurve, die durch folgenden Term ausgedrückt werden kann, wobei x die RNA-Menge in Nanogramm bezeichnet:

$$x = e^{(29,656 - Ct)/1,4987}$$

**Abbildung 5:** Standardkurve für CD20 in halblogarithmischer Auftragung. Abszisse: RNA-Menge in Nanogramm; Ordinate: gemessene Ct-Werte; Der Korrelationskoeffizient von 0,998 deutet auf einen hohen Grad des linearen Zusammenhangs hin.



Entsprechend wurde anhand serieller Verdünnungen von cDNA, das aus FFPE-Material der humanen Multiplen Myelom-Zelllinie *U266* gewonnen worden war, für 18S eine Standardkurve generiert, die durch diesen Term beschrieben wird:

$$x = e^{(16,861 - Ct)/1,4971}$$

#### Durchführung

Um die Genexpression der ausgewählten FFPE-Fälle zu untersuchen, wurden auf jeder 96-Well-Platte alle Proben jeweils im doppelten Ansatz hinsichtlich CD20 und 18S untersucht. Zusätzlich wurden als Positivkontrollen cDNA von der Myeloma-Zelllinie *U266* (FFPE-Material) für 18S, sowie cDNA von der CD20-positiven MCL-Zelllinie *Granta 519* auf jeder Platte mitgeführt. Außerdem wurden für jedes Gen jeweils zwei Wells ohne Template-cDNA belassen, die als *No Template Control (NTC)* über das Hintergrundrauschen hinaus kein Signal zeigen durften.

Der Reaktionsansatz für jede durchgeführte RT-qPCR enthielt ein Gesamtvolumen von 23µl pro Well und ist in seiner Zusammensetzung in Tabelle 6 beschrieben.

**Tabelle 6:** Zusammensetzung der Reagenzien für die RT-qPCR

	Menge	Bezeichnung	Firma
Aqua destillata	13,56µl		DeltaSelect, Pfullingen, BRD
10x RT-PCR Puffer	2,3µl	TaqMan Kit	Eurogentec, Seraing, Belgien
50 mM MgCl <sub>2</sub>	2,3µl	TaqMan Kit	Eurogentec, Seraing, Belgien
5 mM dNTP	0,9µl	TaqMan Kit	Eurogentec, Seraing, Belgien
Sonde	0,3µl	CD20 oder 18S	Microsynth, Balgach, Schweiz
Forward-Primer	0,27µl	CD20 oder 18S	Microsynth, Balgach, Schweiz
Reverse-Primer	0,27µl	CD20 oder 18S	Microsynth, Balgach, Schweiz
Taq Polymerase <i>HotGoldStar</i>	0,1µl	5U/µl, TaqMan Kit	Eurogentec, Seraing, Belgien
Template-cDNA	3,0µl	verdünnt, 10ng/µl	

Die RT-qPCR verlief nach folgendem Schema:

Zehn Minuten bei 95°C zur Aktivierung der Taq Polymerase, gefolgt von

40 PCR-Zyklen mit je:

15 Sekunden Denaturierung bei 95°C und

1 Minute Hybridisierung bei 64°C.

## Auswertung

Die mRNA-Menge pro Well wurde ausgehend von den gemessenen Ct-Werten über eine lineare Regressionsanalyse anhand der entsprechenden Standardkurve ermittelt. Von den Dubletten wurde jeweils das arithmetische Mittel berechnet. Alle Dubletten, deren Ct-Werte mehr als 1 differierten, wurden erneut gemessen. Um Messungen von verschiedenen RT-qPCR-Läufen miteinander vergleichen zu können, wurden die Ct-Werte für CD20 anhand einer jeweils mitgeführten *Granta*-Messung, deren RNA-Gehalt mit 30ng bekannt war, kalibriert. Für 18S diente eine U266-Probe mit gleichem RNA-Gehalt als Kalibrator. Schließlich wurde durch Division der CD20- durch die 18S-Mengen die relative Höhe der CD20-Expression ermittelt.

### 3.5.2 CD20-RNA-Gehalt in Zelllinien

Mit der Kultivierung von *NCEB-1*-Zellen in Gegenwart von Rituximab und deren Ernte zu festen Zeitpunkten (vgl. 3.2.1) war ein standardisiertes Modell entwickelt worden, anhand dessen eine mögliche Auswirkung der Rituximab-Therapie auf die CD20-Genexpression untersucht werden konnte.

#### 3.5.2.1 RNA-Isolation aus Zelllinien

Die Isolierung der nativen RNA aus den *NCEB*-Zellen wurde nach dem RNeasy Mini Protokoll unter Verwendung des *RNeasy Mini Kits* (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Da bei dieser Methode ein Zelllysate gewonnen wird, das frei von Zellkernen ist, konnte auf einen DNase-Verdau verzichtet werden.

Um die Zellen aufzuschließen, wurde bei einer geschätzten Zellzahl von unter  $5 \times 10^6$  350µl RTL-Puffer hinzugegeben. Das Zell-Lysate wurde anschließend in eine *QIA-shredder-spin-column* pipettiert und zwei Minuten zentrifugiert. Dem dadurch homogenisierten Lysate wurde dann je 350µl 70% Ethanol hinzugefügt und vermischt. Die Proben wurden anschließend in eine *RNeasy mini column* pipettiert und zentrifugiert. Danach wurden die RNeasy-Säulen zunächst mit 700µl *RW1*-Puffer und dann mit 500µl *RPE*-Puffer gewaschen. Dieser Vorgang wurde mit weiteren 500µl *RPE*-Puffer wiederholt, wobei diesmal durch zweiminütiges Zentrifugieren bei gleicher Geschwindigkeit die Kieselgelmembran in der Säule getrocknet wurde. Dieser Trocknungsschritt dient der vollständigen Elimination von Ethanol, das die nachfolgenden Reaktionen behindern würde.

Um die RNA zu eluieren, wurde 50µl RNase-freies Wasser direkt auf die Kieselgelmembran der Säule pipettiert und eine Minute bei 10.000 rpm zentrifugiert.

2µl der so gewonnenen RNA-Proben wurden entnommen und im Anschluss zur Konzentrationsbestimmung mit dem Spektrophotometer *NanoDrop 1000* (Thermo Fisher Scientific,

Wilmington, USA) vermessen (vgl. 3.5.1.2). Anhand dieser Ergebnisse wurde jeweils das Äquivalent von 1µg RNA mit RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 17,5µl gebracht und daraus, wie in 3.5.1.3 beschrieben, cDNA synthetisiert. Die restlichen RNA-Proben wurden mit 75% Ethanol auf die gleiche Endkonzentration gebracht und bei -80°C eingefroren.

### **3.5.2.2 Real-Time quantitative TaqMan PCR**

Analog zu der in 3.5.1.4 beschriebenen Genexpressionsanalyse am Patientenmaterial wurde mit 3µl der synthetisierten cDNA der CD20-RNA-Gehalt des Zellmaterials mittels RT-qPCR bestimmt. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung der generierten Standardkurven in identischer Art und Weise.

## **3.6 Klonalitätsbestimmung**

Insbesondere bei Knochenmarksbiopsien gestaltet sich die Differenzierung zwischen benignen lymphoiden Infiltraten und nodulären Infiltraten eines B-Zell-NHL oft schwierig. Immunhistochemisch zeigen benigne lymphoide Infiltrate ein buntes Färbemuster mit einer gemischten Population aus B- und T-Lymphozyten, während Lymphominfiltrate durch eine Immunglobulin-Leichtkettenrestriktion oder einen abnormen Immunphänotyp auffallen (Kremer et al. Hum Pathol, 2000). Trotz dieser Unterscheidungsmöglichkeiten gibt es bei der Differentialdiagnose oft diagnostische Unsicherheiten, gerade bei Fällen, die einen Verlust der CD20-Positivität zeigen. Um diese gegebenenfalls auszuräumen, wurde die Klonalität dieser Fälle durch PCR-Analyse des Immunglobulin-Schwere-Ketten-Gen-Rearrangements (FR3A) mit anschließender Fragmentlängenanalyse bestimmt.

Dabei war insbesondere von Interesse, ob Fälle, die nach Rituximab-Therapie eine CD20 Negativierung zeigen, noch den identischen Klon aufweisen wie vor der Therapie.

### **3.6.1 DNA-Extraktion**

Für die Gewinnung von DNA aus Paraffinmaterial wurden je nach Größe des Gewebes vier bis zehn Schnitte à 9µm des entsprechenden Paraffinblocks hergestellt und direkt in ein 1,5ml-Sarstedt-Röhrchen überführt. Dieses wurde zur Entparaffinierung mit 1ml Xylol versetzt, 15 Sekunden im Vortexer *Reax top* (Heidolph, Kehlheim, Deutschland) durchmischt und, nach Zugabe von 250µl Ethanol 70% und erneuter Durchmischung, fünf Minuten bei 14.000 rpm in der

*Eppendorf Centrifuge 5417R* (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet bei geöffnetem Deckel in einem *Thermomixer Comfort* (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 55°C getrocknet.

Das trockene Pellet wurde dann in einem Proteinase K-Puffer aus 50ml 1M Tris/HCl (pH 8,3), 2ml 0,5M EDTA (pH 8,0), Aqua destillata ad 1000ml und 4ml TWEEN 20 (Merck, Darmstadt, Deutschland) gelöst, wobei das Volumen je nach Pelletgröße zwischen 25 und 200µl variierte. Der Verdau der zellulären Proteine erfolgte durch Zugabe von Proteinase K in der Konzentration 20mg/ml Puffer und anschließender Inkubation über Nacht im *Thermomixer Comfort* bei 55°C und einer Schüttelfrequenz von 450 rpm. Zur Inaktivierung der Proteinase K wurden die Sarstedt-Röhrchen danach für zehn Minuten auf 100°C erhitzt und kurz zentrifugiert.

### **3.6.2 PCR Analyse des Immunglobulin-schwere-Kette Gen-Rearrangements**

Wie von Segal et al. (Hum Pathology, 1994) beschrieben, wurde eine single-step PCR durchgeführt, die mit der hochvariablen Region der V<sub>H</sub>-D<sub>H</sub>-J<sub>H</sub>-Sequenz von B-Lymphozyten die Genregion untersucht, die für die schwere Kette der Immunglobuline (IgH) codiert. Dafür wurden Konsensusprimer eingesetzt, die gegen eine Sequenz der *framework Region III* (FR3a) des variablen Abschnittes sowie gegen eine Sequenz der Joining-Regionen (LJH, VLJH) gerichtet sind. Konsensusprimer benötigen für eine Bindung keine 100%ige Komplementarität ihrer Bindungssequenz. Verwendet wurde das Primer-Paar FR3A-JHa mit folgenden Sequenzen:

FR3A: 5' -ACA CGG CYS TGT ATT ACT GT-3'

JHa: 5' -ACC TGA GGA GAC GGT GAC C-3'.

Für die anschließende computerassistierte Fragmentlängenanalyse wurde ein endständig fluoreszenzmarkierter JHa-Primer gewählt. Jeder Fall wurde mindestens im doppelten Ansatz untersucht, was eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sicherstellt. Bei jedem Ansatz wurde mit der DNA eines malignen Lymphoms sowohl eine Positivkontrolle als auch eine Negativkontrolle in Form von polyklonaler DNA eines reaktiv veränderten Lymphknotens mitanalysiert. Zudem wurde eine *no template control*, also eine DNA-freie Kontrolle, mitgeführt.

Der Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 25µl bestand aus 15,25µl Aqua destillata (Delta Select GmbH, Pfullingen, Deutschland), 4µl dNTP, 2,5µl Puffer (20 mM MgCl<sub>2</sub>, eigene Herstellung), je 0,5µl der Primer FR3A und JHa (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland), 0,25µl TaqPolymerase *AmpliTaQGold* sowie 2µl Template-DNA, die zuvor mit Aqua destillata 1:10 verdünnt worden war. TaqPolymerase und dNTP stammten von Applied Biosystems (Foster City, USA).

Die PCR erfolgte im *Cycler Primus 96 plus* (MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland) in folgenden Schritten:

- Denaturierung bei 95°C für 10 Minuten,
- 40 Zyklen mit je 1 Minute Denaturierung bei 94°C, 1 Minute Annealing bei 56°C und 1 Minute Neusynthese bei 74°C,
- 6 Minuten Final Extension bei 74°C,
- Abkühlen auf 4°C.

### *Gelelektrophorese*

Zur Visualisierung des PCR-Produkts wurden je 10µl Reaktionsprodukt zur Gelelektrophorese auf ein 3%iges Metaphor®-Agarosegel (Cambrex BioScience, Rockland, ME, USA) aufgebracht. Die Herstellung des Gels erfolgte nach Angaben des Herstellers mit 3g Agarosepulver in 100ml 1xTBE-Puffer (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, USA). Um die Banden einer Detektion unter UV-Licht zugänglich zu machen, wurde dem Gel 0,7 mg/ml Ethiumbromid (Eurobio, Cedex, Frankreich) zugesetzt, das im Zuge der Elektrophorese in die DNA interkaliert. Als Elektrophoresepuffer diente ebenfalls 1xTBE-Puffer, der auch mit einem Tropfen Ethiumbromid pro 100ml Puffer versetzt wurde. Das Bromphenolblau im Lade-Puffer ermöglicht die visuelle Verfolgung des Elektrophoreselaufs bei Raumbelichtung. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer Elektrodenspannung von 130V (vgl. 3.4.2). Anschließend wurde das Ergebnis unter UV-Licht abgelesen und fotografiert.

Eine einzige bzw. zwei scharf begrenzte Banden wurden als klonal interpretiert, wenn sie in einer dem Primerpaar angemessenen molekularen Größenordnung von 70 bis 140 Basenpaaren gewandert waren. Man spricht von mono- oder biallelischem Rearrangement (vgl. Kremer et al. Hum Pathol, 2000).

Zeigten sich mehr als zwei Banden, wurde das Ergebnis als oligoklonal bzw. polyklonal interpretiert. Ein polyklonales Muster schließt jedoch eine monoklonale Population nicht definitiv aus, da das polyklonale Muster eine klonale Bande überdecken könnte (vgl. Coad et al. Mol Diagn, 1996). Aus diesem Grund wurde mit den PCR-Produkten zusätzlich eine Fragmentlängenanalyse durchgeführt.

### 3.6.3 Fragmentlängenanalyse

Gerade bei Fällen, die neben dem Tumorfiltrat einen hohen Anteil an nicht-neoplastischen B-Lymphozyten aufweisen, ermöglicht eine automatische Fragmentlängenanalyse mit einem Kapillarsequenzierer eine klare Detektion des monoklonalen IgH-Produktes. Dank der hohen Auflösung kann die Länge der DNA-Fragmente exakt bestimmt werden (vgl. Linke et al. Leukemia, 1997).

Die Fragmentlängenanalyse erfolgte mittels 4-Kapillarelektrophorese in dem Kapillarsequenzierer *ABI Prism 3130 Genetic Analyzer* (Applied Biosystem, Foster City, USA) nach Angaben des Herstellers.

Dazu wurde aus 3,5ml 10x TBE-Puffer und 31,5ml Aqua dest. (Merck, Darmstadt, Deutschland) ein Laufpuffer hergestellt. Je 5µl des fluoreszenzmarkierten PCR-Produktes wurden in 15µl HiDi™-Formamid aufgenommen und nach Zugabe von 0,5µl Gene Scan™ 500 ROX™ Size Standard zwei Minuten bei 95°C denaturiert, um unspezifische Bindungen zu lösen.

Die Kapillarelektrophorese erfolgte vollautomatisch im ABI Prism 3130 Genetic Analyzer in POP-7™ Polymer. Dabei wird das Polymer zunächst in die Silica-Kapillaren geladen. Nach Probeninjektion erfolgt dann die elektrophoretische Auftrennung nach Fragmentlänge, wobei die DNA-Fragmente durch einen Argon-Laserstrahl angeregt eine Fluoreszenz emittieren, der von einer CCD-Kamera detektiert wird.

Mittels der *ABI Prism GeneScan® Analysis Software* (Applied Biosystems, Foster City, USA) wurden die gewonnenen Daten analysiert, ein Profil der Auftrennung erstellt, die Länge jedes Fragments in Basenpaaren bestimmt, sowie die relative Konzentration jedes Fragments in der Probe ermittelt.

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Reagenzien von Applied Biosystems (Foster City, USA) bezogen.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Patientenkollektiv

#### 4.1.1 Anzahl und Diagnosen

Es wurden insgesamt 48 Patienten ermittelt, bei denen zwischen 1996 und 2007 ein B-NHL diagnostiziert wurde und die alle Einschlusskriterien erfüllen. Von jedem Patienten wurden neben einer prätherapeutischen Referenzbiopsie alle posttherapeutischen Folgebiopsien in die Studie eingeschlossen, auch wenn diese frei von Tumorresiduen waren. Daher zeigen einige Studienpatienten Krankheitsverläufe von bis zu acht Jahren.

So wurden insgesamt 131 Formalin-fixierte und paraffineingebettete Knochenmark- oder Lymphknotenbiopsien, sowie Biopsien extranodaler Tumorinfiltrate untersucht, wovon 48 Biopsien vor und 83 Biopsien nach einer Therapie mit dem CD20-Antikörper Rituximab entnommen worden waren. Anhand der WHO-Kriterien von 2008 (Jaffe et al., IARC Press, 2008) erfolgte eine Reklassifikation nach morphologischen und immunhistochemischen Gesichtspunkten. Die Verteilung der 48 Patienten auf die fünf Entitäten FL, MCL, DLBCL, MZL sowie B-CLL kann der Tabelle 7 entnommen werden.

**Tabelle 7:** *Patientenkollektiv, Biopsieanzahl und Organtopographie nach Entitäten*

Diagnose	Anzahl Patienten	Biopsien nach Rituximabtherapie	Organtopographie		
			LK	KM	extranodal
FL	17	26	2	22	2
MCL	14	36	4	16	16
DLBCL	13	17	3	7	7
MZL	3	3	-	3	-
B-CLL	1	1	-	1	-
Summe	48	83	9	49	25

Bei insgesamt 17 der 48 Patienten lagen Daten zu immunzytologischen Untersuchungen (FACS) vor, die zeitgleich mit den untersuchten Biopsien aus Knochenmarksaspiraten oder Vollblut erhoben worden waren.

28 von 83 (34%) der untersuchten Fälle erreichten eine komplette Remission ohne immunphänotypischen oder molekularen Nachweis einer Lymphominfiltration in den posttherapeutischen Biopsien. 55 Fälle (66%) zeigten eine verbleibende Erkrankung bzw. entwickelten ein Rezidiv.

#### 4.1.2 Therapieabstand

Anhand der erhobenen klinischen Daten und dem Zeitpunkt der Biopsieentnahme wurde der Abstand zwischen letztmaliger Rituximab-Therapie und Biopsieentnahme in Monaten ermittelt. Dabei waren bei acht der 83 Biopsien die verfügbaren klinischen Daten für diese Auswertung unvollständig, weshalb sich die Berechnungen des Therapieabstandes und alle daraus abgeleiteten Aussagen über statistische Häufungen nur auf 75 der untersuchten Biopsien beziehen.

Der Therapieabstand lag entsprechend der Einschlusskriterien zwischen null und 16 Monaten, wobei ein Therapieabstand von null Monaten einem Abstand von unter vier Wochen bzw. einer Probenentnahme während einer laufenden Therapie entspricht.

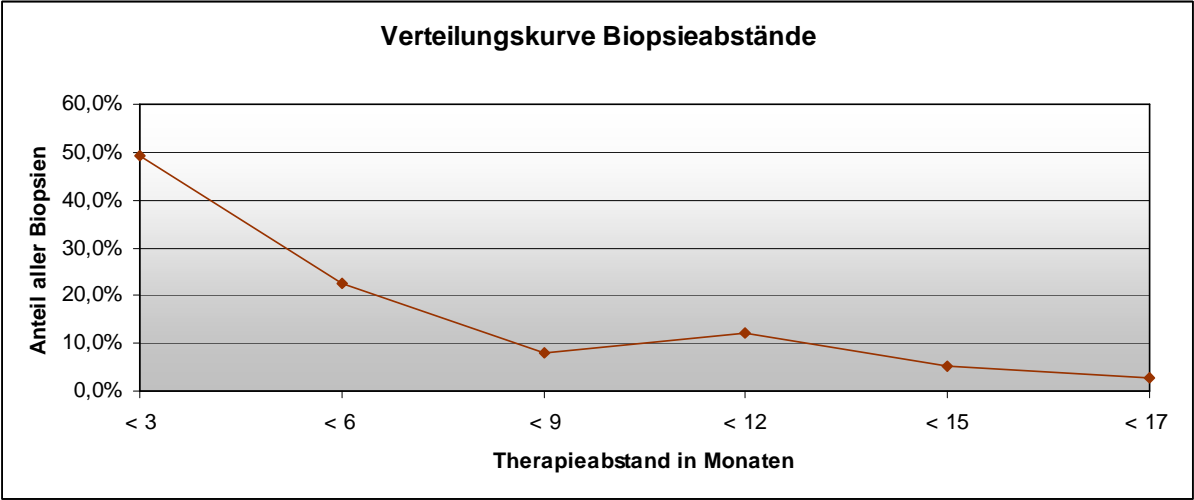
Da die Biopsieabstände über alle 17 Zeitpunkte streuten, wurden zur besseren Auswertbarkeit Zeitgruppen von drei Monaten gebildet, die der Tabelle 8 entnommen werden können.

**Tabelle 8:** *Zusammensetzung der gebildeten Zeitgruppen*

Zeitgruppe	Monat	Monate
1	0 - 2	< 3
2	3 - 5	< 6
3	6 - 8	< 9
4	9 - 11	< 12
5	12 - 14	< 15
6	15 - 16	< 17

Die Verteilung der Biopsieabstände auf die entsprechenden Zeitgruppen ist in Abbildung 6 dargestellt. Knapp die Hälfte aller Biopsien (49,3%) waren innerhalb des ersten Vierteljahres nach Therapie entnommen worden; weitere 22,7% wiesen einen Therapieabstand von unter einem halben Jahr auf. Danach nahm die Biopsiehäufigkeit, abgesehen von einem kleinen Anstieg auf 12% etwa ein Jahr nach Therapie, stetig ab.

Abbildung 6: Verteilung der Biopsien nach Therapieabstand in Monaten in Prozent aller Biopsien



## 4.2 Wie häufig ist der Verlust der CD20-Positivität?

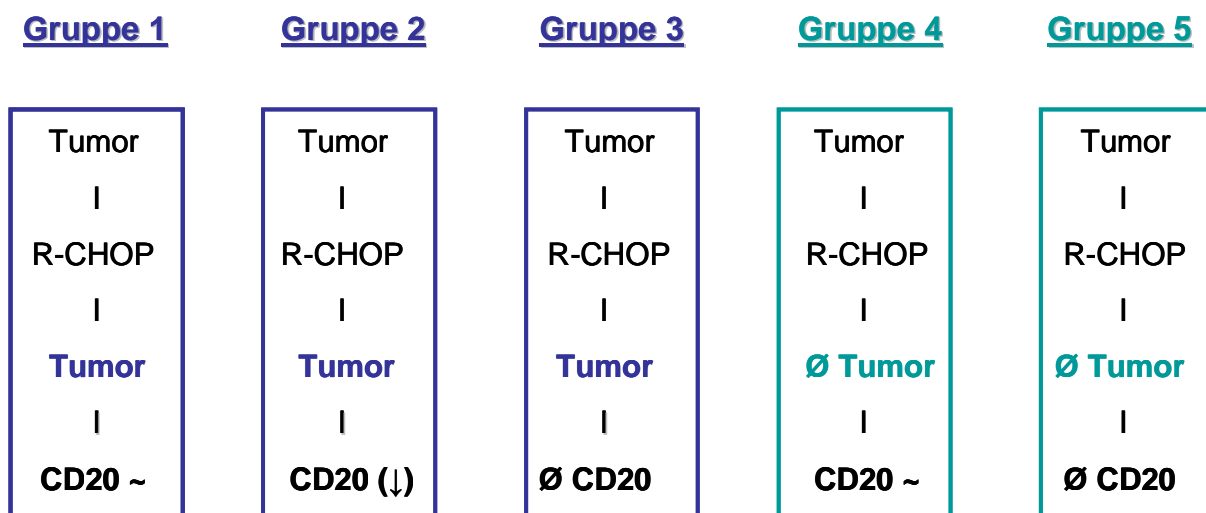
Bei der Auswertung der immunhistochemischen Färbungen der 131 Biopsien mit den entsprechenden Antikörpern wurden die posttherapeutischen Biopsien jeweils mit der Vorbiopsie verglichen. Dabei ergaben sich für die CD20-Färbung der posttherapeutischen Biopsien folgende drei Ergebnismöglichkeiten:

1. Unveränderte CD20-Positivität,
2. relativer Verlust der CD20-Positivität oder
3. kompletter Verlust der CD20-Positivität.

Unter einem relativen Verlust der CD20-Positivität wurde dabei eine geringe Färbeintensität des Tumorfiltrats bei starker Färbeintensität von Vorbiopsie und Kontrollen verstanden.

Nachdem die Fälle außerdem hinsichtlich des Therapieerfolgs unterteilt wurden, ergaben sich insgesamt fünf verschiedene Gruppen. So zeigten die Fälle, die nach Therapie noch residuelle Tumorfiltrate aufwiesen, entsprechend den drei oben genannten Ergebnismöglichkeiten entweder einen unveränderten CD20-Status (Gruppe 1), einen relativen (Gruppe 2) oder einen kompletten Verlust der CD20-Positivität (Gruppe 3). Bei den posttherapeutischen Biopsien der Gruppe 4 und Gruppe 5 hingegen konnte anhand des Immunphänotyps sowie den Ergebnissen der molekularen Analysen eine Infiltration durch das bekannte NHL ausgeschlossen werden; die Patienten befanden sich in kompletter Remission. Auch diese reaktiven Zellinfiltrate zeigten entweder einen unveränderten CD20-Status (Gruppe 4) oder aber einen kompletten Verlust der CD20-Positivität (Gruppe 5). Ein relativer Verlust der CD20-Positivität wurde bei den Patienten in Remission nicht beobachtet.

**Abbildung 7:** Schematische Darstellung der fünf Ergebnisgruppen mit posttherapeutischem (nach R-CHOP) Rezidiv (blau) bzw. posttherapeutischer Remission (türkis) und entweder unverändertem CD20-Status (CD20 ~) oder relativem (↓) bzw. komplettem Verlust (∅) der CD20-Positivität



In den folgenden Abbildungen ist von den drei Ergebnisgruppen mit verändertem CD20-Status jeweils ein Fall exemplarischer dargestellt.

**Abbildung 8:** LK Biopsien eines MCL; CD20-Färbung vor (a) und nach (A) Rituximab-Therapie sowie Cyclin D1 vor (b) und nach (B) Rituximab-Therapie

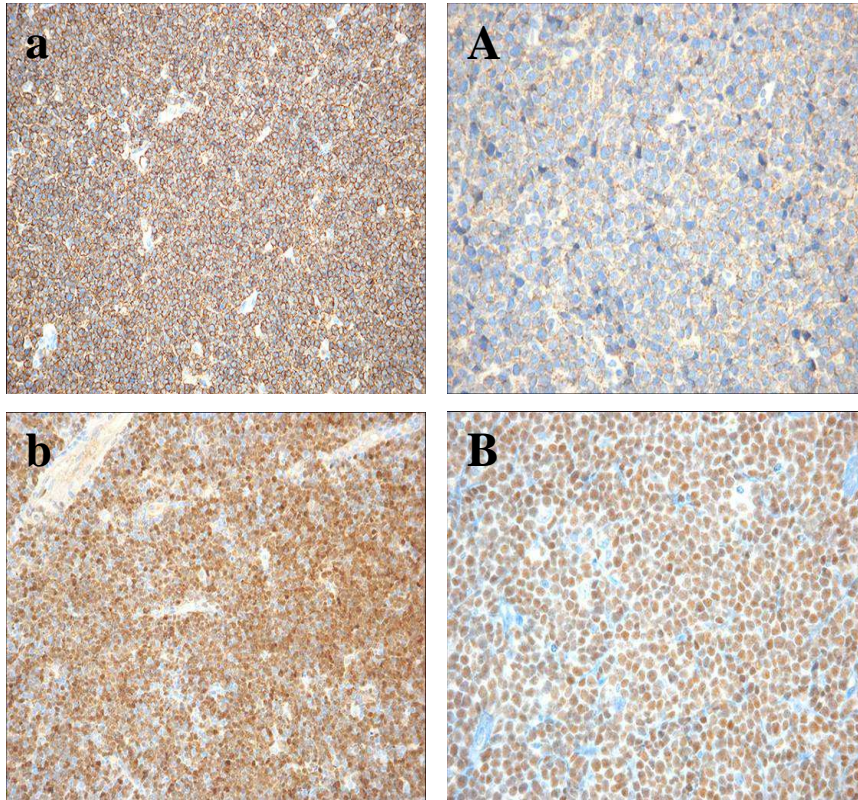
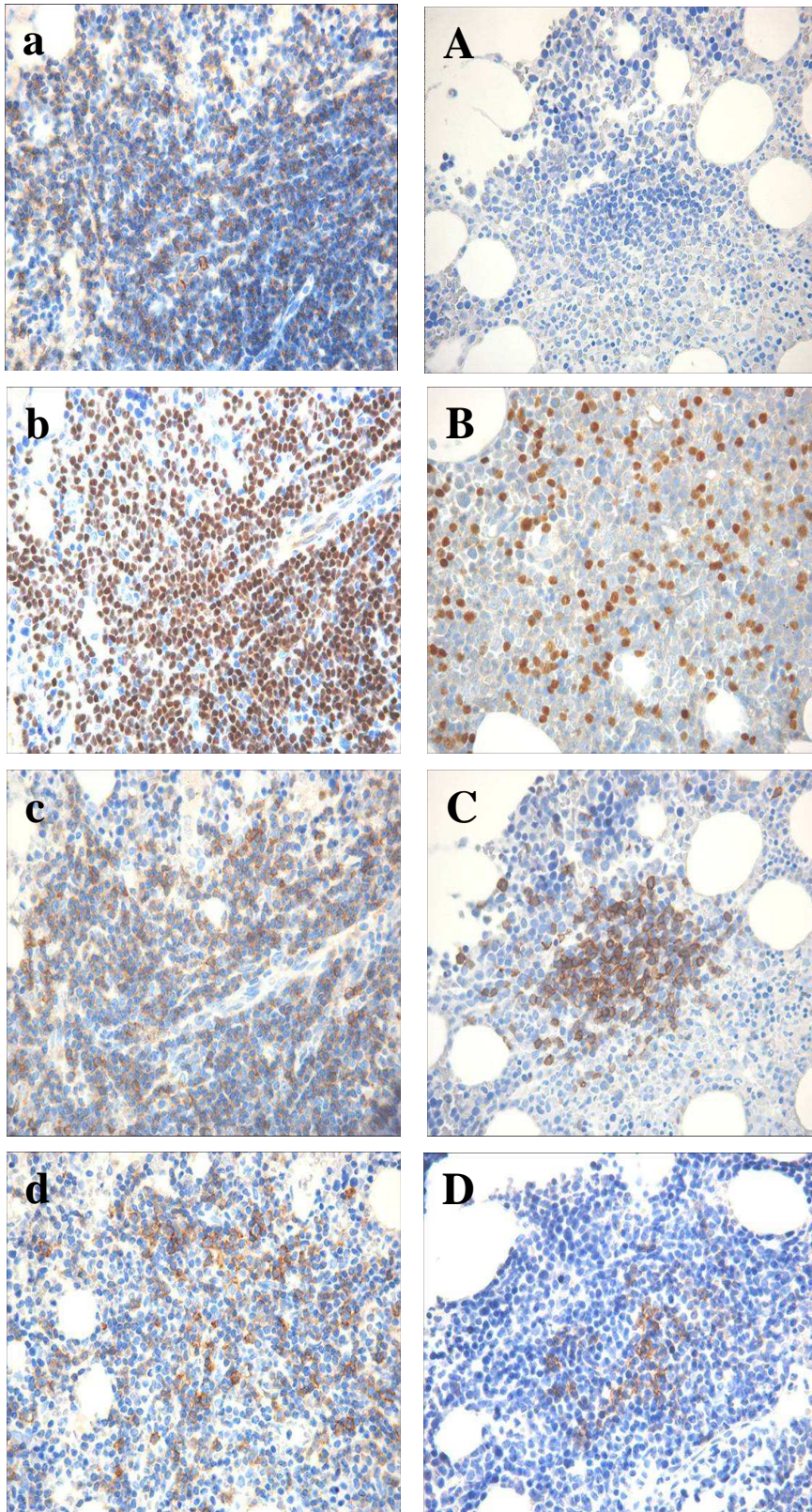


Abbildung 8 zeigt immunhistochemische Färbungen von zwei Lymphknotenbiopsien eines MCL-Patienten. Die Färbungen auf der linken Seite (Kleinbuchstaben) stammen von der prätherapeutischen Referenzbiopsie, während die Färbungen auf der rechten Seite (Großbuchstaben) von der posttherapeutischen Biopsie stammen. Die oberen beiden Schnitte sind gegen CD20, die unteren beiden Schnitte gegen Cyclin D1 angefärbt worden.

Es zeigt sich prätherapeutisch sowohl für CD20, als auch für Cyclin D1 eine starke Anfärbung aller Zellen des dargestellten Ausschnitts (a und b). Posttherapeutisch zeigt sich hingegen für CD20 (A) insgesamt nur eine schwache Positivität, wobei in der Vergrößerung einzelne ungefärbte Zellen zur Darstellung kommen. Die Cyclin D1-Färbung (B) identifiziert auch diese Zellen als zum MCL gehörig. Dieser Fall zeigt somit einen relativen Verlust der CD20-Positivität und wurde der Ergebnisgruppe 2 zugeordnet.



**Abbildung 9:** KM-Biopsien einer B-CLL; Kleinbuchstaben bezeichnen prätherapeutische Biopsien, Großbuchstaben Biopsien nach Rituximab-Therapie; immunohistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen: CD20 (a-A), PAX-5 (b-B), CD5 (c-C) und CD23 (d-D)



In Abbildung 9 sind die immunhistochemischen Färbungen von zwei Knochenmarkbiopsien eines Patienten mit einer B-CLL dargestellt, wobei die mit Kleinbuchstaben gekennzeichneten Färbungen (links) wieder von der prätherapeutischen Referenzbiopsie stammen. Angefärbt wurden die abgebildeten Knochenmarkschnitte mit Antikörpern gegen CD20 (a-A), PAX-5 (b-B), CD5 (c-C) sowie CD23 (d-D).

Vor einer Behandlung mit Rituximab weist das Knochenmarksinfiltrat mit einer Positivität der B-Zell-assoziierten Antigene CD20 (a) und PAX-5 (b) sowie einer Koexpression von CD5 (c) einen für eine B-CLL typischen Immunphänotyp auf. Durch die Positivität für CD23 (d) kann es diagnostisch eindeutig von einem Mantelzelllymphom abgegrenzt werden.

Nach Rituximab-Therapie zeigt das residuelle Infiltrat einen veränderten Immunphänotyp. Der dargestellte Knochenmarkschnitt ist komplett negativ für CD20 (A), während die PAX-5-Färbung (B) zahlreiche B-Lymphozyten identifiziert. Erst durch Färbungen gegen CD5 (C) und CD23 (D) kommt ein kleines Infiltrat zur Darstellung. Es handelt sich bei diesem Fall also um eine residuelle B-CLL, die posttherapeutisch einen vollständigen Verlust der CD20-Positivität aufweist und somit der Ergebnisgruppe 3 zugeordnet wurde.



**Abbildung 10:** Posttherapeutische Knochenmarksbiopsie mit immunhistochemischen Färbungen gegen CD20 (A), CD5 (B), CD79a (C), und PAX-5 (D)

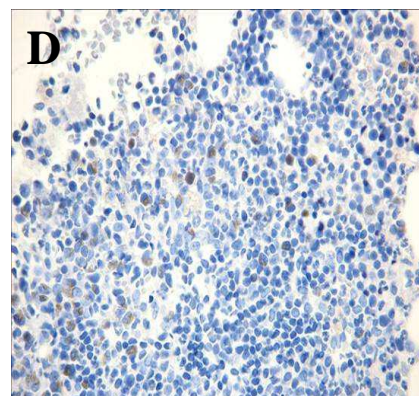
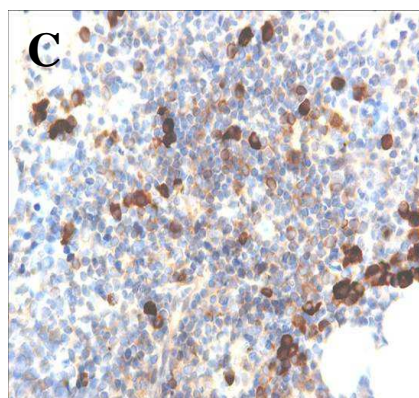
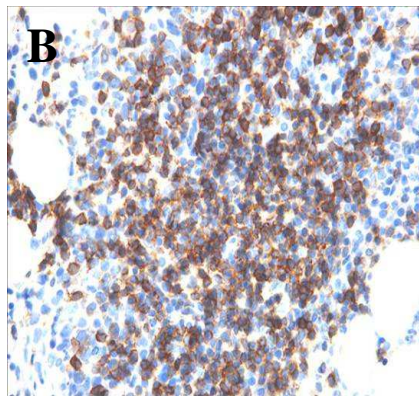
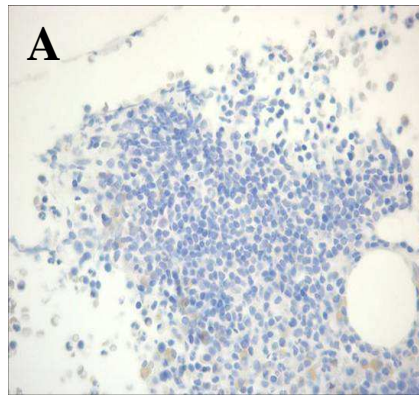




Abbildung 10 zeigt einen Fall der Ergebnisgruppe 5. Es handelt sich um die immunhistochemischen Färbungen einer Knochenmarkbiopsie, die drei Monate nach einer Rituximab-Therapie entnommen wurde. Die dargestellten Knochenmarkschnitte wurden mit Antikörper gegen CD20 (A), CD5 (B), CD79a (C) sowie PAX-5 (D) angefärbt.

In der prätherapeutischen Vorbiopsie war ein CD20-positives Follikuläres Lymphom diagnostiziert worden.

Posttherapeutisch ist das Knochenmark komplett negativ für CD20 (A). Die Anfärbung mit einem Antikörper gegen das T-Zell-assoziierte Antigen CD5 identifiziert eine Ansammlung positiver Zellen, die als reaktives lymphoides T-Zell-Infiltrat gewertet werden (B). Die Färbungen gegen CD79a (C) sowie PAX-5 (D) zeigen vereinzelt positive B-Lymphozyten, die in der CD20-Färbung (A) negativ sind. Somit zeigt dieser Fall nach Rituximab-Therapie eine komplette Remission des vorbekannten NHL, wobei die B-Lymphozyten des posttherapeutischen Knochenmarks einen kompletten Verlust der CD20-Positivität aufweisen.

Wie in Tabelle 9 dargestellt, haben von den insgesamt 55 posttherapeutischen Biopsien mit residuellem Lymphom 32 Fälle (58%) einen unveränderten CD20-Status (Gruppe 1). Ein partieller Verlust von CD20 (Gruppe 2) wurde in 17 Fälle (31%) gefunden, während sechs Fälle (10,9%) einen kompletten Verlust von CD20 (Gruppe 3) aufweisen. Eine Änderung des immunhistochemischen Färbeverhaltens zuvor CD20-positiver Zellen konnte also insgesamt in 23 von 55 Fällen (41,8%) dokumentiert werden (Gruppe 2 und Gruppe 3).

Tumorfremie reaktive Zellinfiltrate wurden in 28 Fällen untersucht, wobei fünf Fälle einen unveränderten CD20-Status (Gruppe 4) und 23 Fälle (82%) einen kompletten Verlust von CD20 aufweisen (Gruppe 5).

**Tabelle 9:** Zusammenstellung der immunhistochemischen CD20-Expression aller posttherapeutischen Biopsien. Links die Fälle mit residuellem NHL, rechts die Fälle in kompletter Remission mit entweder unveränderter (~), relativ verminderter (↓) oder fehlender (∅) CD20-Positivität.

<u>Tumor</u>	CD20 ~	CD20 (↓)	∅ CD20	<u>∅ Tumor</u>	CD20 ~	∅ CD20
<b>FL</b>	8/13 (61%)	3/13 (23%)	2/13 (15%)	<b>FL</b>	2/15 (13%)	13/15 (87%)
<b>MCL</b>	18/30 (60%)	10/30 (33%)	2/30 (7%)	<b>MCL</b>	1/7 (14%)	6/7 (86%)
<b>MZL</b>	1/2 (50%)	1/2 (50%)	0/2 (0%)	<b>MZL</b>	0/1 (0%)	1/1 (100%)
<b>B-CLL</b>	0/1 (0%)	0/1 (0%)	1/1 (100%)	<b>B-CLL</b>	0/0 (0%)	0/0 (0%)
<b>DLBCL</b>	5/9 (55%)	3/9 (33%)	1/9 (11,1%)	<b>DLBCL</b>	2/5 (40%)	3/5 (60,0%)
<b>Total</b>	<b>32/55 (58%)</b>	<b>17/55 (31%)</b>	<b>6/55 (11%)</b>	<b>Total</b>	<b>5/28 (18%)</b>	<b>23/28 (82%)</b>

Bei den Follikulären Lymphomen zeigten 13 von insgesamt 28 Biopsien (46,4%) nach Rituximab-Therapie noch Tumorresiduen, während 15 Biopsien tumorfrei waren. Entsprechend waren bei 30 der 37 Biopsien (81,1%) mit der Diagnose MCL noch residuelle Infiltrate nachweisbar. Von den drei untersuchten MZL-Biopsien wiesen zwei (66,7%) posttherapeutische Residuen auf und auch die einzige eingeschlossene B-CLL Biopsie war posttherapeutisch nicht tumorfrei. Bei den DLBCL wurden residuelle Lymphominfiltrate in neun von 14 Fällen (64,3%) diagnostiziert.

Bei den Biopsien mit residuellem Lymphom fand sich ein kompletter CD20-Verlust mit 15,4% aller untersuchten Biopsien am häufigsten bei den FL-Patienten. Danach folgten Patienten mit einem DLBCL (11,1%) und einem Mantelzelllymphom (6,7%). Der einzige B-CLL-Fall zeigte nach Therapie mit Rituximab ebenfalls einen kompletten Verlust der CD20-Positivität. Eine von zwei Biopsien eines Marginalzonen-Lymphoms zeigte einen relativen Verlust der CD20-Positivität. Dieses Phänomen wurde auch bei jeweils einem Drittel aller untersuchten MCL- und DLBCL-Biopsien gefunden und war noch bei 23,1% der FL-Biopsien nachzuweisen.

In der Gruppe der tumorfreien Biopsien (28) war der Verlust der CD20-Positivität beim FL mit 86,7% am häufigsten, dicht gefolgt vom MCL mit 85,7%. Auch der einzige tumorfreie MZL-Fall hatte nach Rituximab-Therapie die CD20-Positivität verloren. Dieses Phänomen trat bei insgesamt 82,1% der tumorfreien Biopsien auf und war damit in dieser Gruppe am häufigsten.

Um eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit zu treffen, dass im Krankheitsverlauf eines Patienten infolge einer Rituximab-Therapie eine Veränderung des Immunphänotyps auftritt, wurden die Ergebnisse außerdem nach Patientenanzahl ausgewertet.

Es wurden bei 35 der 48 Patienten posttherapeutisch residuelle Lymphominfiltrate diagnostiziert, während die übrigen 13 eingeschlossenen Patienten posttherapeutisch ausschließlich tumorfreie Biopsien aufwiesen. Tabelle 10 und Tabelle 11 zeigen die Auswertung der Studienpatienten nach Lymphomentität und Diagnosegruppe.

**Tabelle 10: Patienten mit posttherapeutisch residuellem NHL nach Lymphomentität**

	Anzahl	Relativer Verlust (Gruppe 2)	Vollständiger Verlust (Gruppe 3)	Verlust CD20 Gesamt	Verlust CD20 %
FL	11	3	2	5	45,5%
MCL	12	7	2	9	75,0%
MZL	2	1	0	1	50,0%
B-CLL	1	0	1	1	100,0%
DLBCL	9	3	1	4	44,4%
<b>Alle</b>	<b>35</b>	<b>14</b>	<b>6</b>	<b>20</b>	<b>57,1%</b>

**Tabelle 11: Patienten mit posttherapeutisch ausschließlich tumorfreien Biopsien nach Lymphomentität**

	Anzahl	Vollständiger Verlust (Gruppe 5)	Relativer Verlust	Verlust CD20 Gesamt	Verlust CD20 %
FL	7	6	-	6	85,7%
MCL	3	2	-	2	66,7%
MZL	1	1	-	1	100,0%
B-CLL	0	0	-	0	0,0%
DLBCL	2	1	-	1	50,0%
<b>Alle</b>	<b>13</b>	<b>10</b>	<b>-</b>	<b>10</b>	<b>76,9%</b>

Es zeigte sich bei kleiner Fallzahl ohne statistische Signifikanz, dass 57,1% der Patienten mit posttherapeutisch residuellem NHL im Krankheitsverlauf eine Änderung im Immunphänotyp aufwiesen. Bei den Patienten in Remission zeigten 76,9% dieses Phänomen.

Insgesamt konnte ein Verlust der CD20-Positivität also häufiger bei Patienten festgestellt werden, die nach einer Rituximab-Therapie tumorfrei waren.

In Tabelle 12 werden sowohl die Patienten mit Tumorresiduen als auch diejenigen, die sich zum Biopsiezeitpunkt in kompletter Remission befanden, gemeinsam betrachtet. Dabei wird deutlich, dass bei 36 von 48 Patienten (75%) in mindestens einer posttherapeutischen Biopsie eine Änderung des Immunphänotyps diagnostiziert wurde.

**Tabelle 12:** Absoluter und relativer CD20-Verlust aller Studienpatienten nach Lymphomentität und Diagnosegruppen

	Anzahl	Kompletter Verlust (Gruppe 3 + Gruppe 5)	Relativer Verlust (Gruppe 2)	Verlust CD20 Gesamt	Verlust CD20 %
FL	17	13	1	14	77,8%
MCL	15	6	6	12	80,0%
MZL	3	1	1	2	66,7%
B-CLL	1	1	0	1	100,0%
DLBCL	11	4	3	7	63,6%
<b>Alle</b>	<b>48</b>	<b>25</b>	<b>13</b>	<b>38</b>	<b>79,0%</b>

Da die Ergebnisgruppe 3 aufgrund der persistierenden Lymphomerkrankung bei fehlender CD20-Positivität von besonderer klinischer und diagnostischer Relevanz ist, werden die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen der prä- und posttherapeutischen Biopsien aller sechs Fälle in Tabelle 13 aufgeführt. Fallnummer 1 bezeichnet dabei beispielsweise die Referenzbiopsie vor Rituximab-Therapie, während es sich bei Fallnummer 1a um die posttherapeutische Biopsie handelt. Die Diagnosen umfassten zwei Follikuläre sowie zwei Mantelzell-Lymphome, eine B-CLL sowie ein DLBCL, das als Richter-Transformation aus einem B-CLL hervorgegangen war. Bis auf die Referenzbiopsie des Falles Nr. 1 entstammen sämtliche Biopsien dem Knochenmark. Fünf von sechs Fällen (83,3%) weisen einen Therapieabstand von höchstens zwei Monaten auf. Fall Nr. 5 zeigte einen Therapieabstand von über einem halben Jahr.

Alle prätherapeutischen Referenzbiopsien sind in der Immunhistochemie CD20-positiv. Für Fall Nr. 3 und Fall Nr. 6 sind zum Zeitpunkt der Biopsieentnahme außerdem immunzytologische Untersuchungen durchgeführt worden, die jeweils den positiven CD20-Status bestätigten.

Alle Lymphominfiltrate der posttherapeutischen Biopsien sind negativ für CD20, wobei in einem Fall (3a) durchflusszytometrische Ergebnisse vorliegen, die dies bestätigen. Der linienspezifische Surrogatmarker CD79a ist hingegen durchwegs positiv. Auch der B-Zell-spezifische Transkriptionsfaktor Pax-5 konnte mit Ausnahme des Falles Nr. 5a in allen Fällen nachgewiesen werden. Eine unterdrückte Pax-5 Expression kann in diesem Fall jedoch durch den plasmoblastischen Typ des DLBCL erklärt werden (vgl. Dong et al. Histopathology, 2008). Die Fälle Nr. 3 und Nr. 4 sind zudem prä- wie posttherapeutisch positiv für das MCL-spezifische Cyclin D1. Fall Nr. 6 war außerdem prä- wie posttherapeutisch positiv für CD23 und CD5 (nicht dargestellt). Anhand der Färbungen von CD79a, Pax-5 sowie Cyclin D1 wurde das Infiltrationsausmaß bestimmt, das von 5% bis 100% streut.

Die Hälfte der Fälle war bei der Analyse des Immunglobulin-schwere-Kette Gen-Rearrangements monoklonal, wobei bei gleicher Fragmentlänge vor und nach Rituximab-Therapie jeweils vom identischen Klon ausgegangen werden kann. Bei Fall Nr. 1a blieb die molekulare Analyse ohne

Ergebnis; eine Wiederholung war aufgrund von Materialknappheit nicht möglich. Die Fälle Nr. 2 und Nr.4 waren prä- wie posttherapeutisch polyklonal.

**Tabelle 13:** Aufstellung der immunhistochemischen, durchflusszytometrischen und molekularen Ergebnisse aller Fälle mit komplettem Verlust der CD20-Positivität bei residuellem Tumor vor und nach (a) Rituximab-Therapie.

Nr.	Diagnose	Lokalisation	CD20	CD79a	Pax5	Cyclin D1	IgH	FACS	Therapieabstand
1	FL	Ileum	+++	+++	+++	n.d.	Polyklonal	n.d.	
1a	FL	KM	∅	++ (30%)	+++ (30%)	n.d.	n.a.	n.d.	1 Monat
2	FL	KM	+++	n.d.	n.d.	n.d.	Polyklonal	n.d.	
2a	FL	KM	∅	+ (20%)	++ (15%)	n.d.	Polyklonal	n.d.	2 Monate
3	MCL	KM	+++	+++	n.d.	+++	Monoklonal (95bp)	50% B-Zellen CD19+ CD20+ CD5+ CD38 (+)	
3a	MCL	KM	∅	++ (5%)	+++ (5%)	++ (5%)	Monoklonal (95bp)	16% B-Zellen CD19+ CD20- CD5+ CD38(+)	Während Therapie
4	MCL	KM	+++	n.d.	n.d.	+++	Polyklonal	Kein Nachweis monoklonaler Zellen	
4a	MCL	KM	∅	+++ (15%)	+++ (15%)	+++ (10%)	Polyklonal	Kein Nachweis monoklonaler Zellen	1 Monat
5	B-CLL	KM	+	n.d.	n.d.	n.d.	Monoklonal (103bp)	n.d.	
5a	DLBCL	KM	∅	+ (100%)	∅	n.d.	Monoklonal (103bp)	n.d.	> 6 Monate
6	B-CLL	KM	++	+++	n.d.	n.d.	Monoklonal (106bp)	42% B-Zellen CD5+ CD19+ CD20+ CD23+ CD38+ kappa Leichtkette	
6a	B-CLL	KM	∅	+++ (15%)	+++ (15%)	n.d.	Monoklonal (106bp)	n.d.	2 Monate

### 4.3 Korreliert der Verlust der CD20-Positivität mit dem Therapieabstand?

Um dieser Frage nachzugehen, wurden die ermittelten Therapieabstände mit den immunhistochemischen Ergebnissen in Beziehung gesetzt. Dies war, wie bereits unter Punkt 4.1.2 erläutert, nur für 75 der 83 Biopsien möglich.

Für diese Auswertung wurden ebenfalls die bereits in Tabelle 8 dargestellten Zeitgruppen à drei Monaten verwendet. Da jedoch nur zwei der Biopsien (2,9%) einen Therapieabstand von 15 bzw. 16 Monaten aufweisen und Zeitgruppe 6 lediglich zwei statt drei Monate umfasst, wurde die Zeitgruppe 5 auf einen Therapieabstand von nun zwölf bis 16 Monate ausgedehnt. Dadurch vergrößerte sich diese Zeitgruppe von vier auf sechs Biopsien (8%), was die Vergleichbarkeit zwischen den Gruppen erhöht. Die Gruppenstärke kann Tabelle 14 entnommen werden.

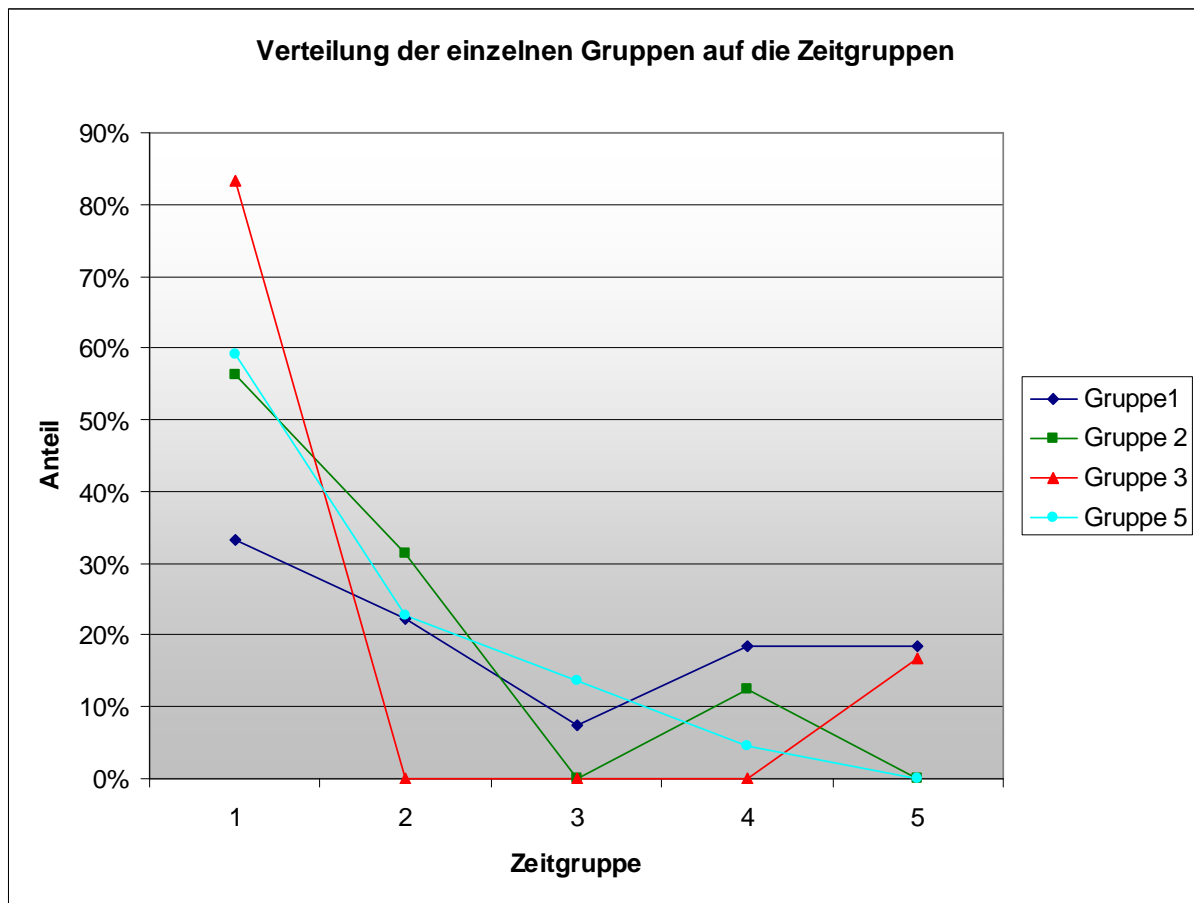
**Tabelle 14:** Absolute und relative Gruppenstärke der einzelnen Zeitgruppen

Zeitgruppe	Therapieabstand in Monaten	Anzahl Biopsien	Anteil in Prozent
1	0 – 2	37	49,3%
2	3 – 5	17	22,7%
3	6 – 8	6	8,0%
4	9 – 11	9	12,0%
5	12 – 16	6	8,0%

Zunächst wurde die prozentuale Verteilung der Ergebnisgruppen auf die Zeitgruppen betrachtet. Da eine zeitliche Häufung von ausschließlich tumorfreien Biopsien mit unverändertem CD20-Status für diese Fragestellung von untergeordneter Relevanz ist, wurde auf eine Darstellung der Ergebnisgruppe 4 verzichtet. Diese Gruppe umfasst lediglich vier Biopsien, die gleichmäßig auf die ersten vier Zeitgruppen verteilt sind. Die übrigen Ergebnisse sind in Abbildung 11 dargestellt.

Dabei ist die Ergebnisgruppe 1 (blau) mit 29 Biopsien residueller Lymphominfiltrate bei unverändertem CD20-Status am gleichmäßigsten auf alle Zeitgruppen verteilt. So wurden mit 33,3% die meisten Biopsien in Zeitgruppe 1 entnommen, die wenigsten in Zeitgruppe 3 (7,4%). Die 16 Biopsien der Ergebnisgruppe mit relativer CD20-Downregulation (grün) hingegen haben mit 56,3% aller Biopsien ihr Maximum klar in Zeitgruppe 1, gefolgt von einem guten Drittel (31,3%) der Biopsien, die in Zeitgruppe zwei entnommen wurden. Fünf der sechs Biopsien (83,3%) mit komplettem Verlust der CD20-Positivität bei residuellem Tumor (rot) hatten einen Therapieabstand von unter drei Monaten. Auch die Gruppe mit komplettem Verlust der CD20-Positivität im reaktiven Zellinfiltrat (türkis) hat ihr Maximum mit 59,1% der 22 Biopsien klar in Zeitgruppe 1. Danach zeigt sich eine stetige Abnahme. Einen Therapieabstand von einem Jahr oder mehr weist keine Biopsie dieser Gruppe auf.

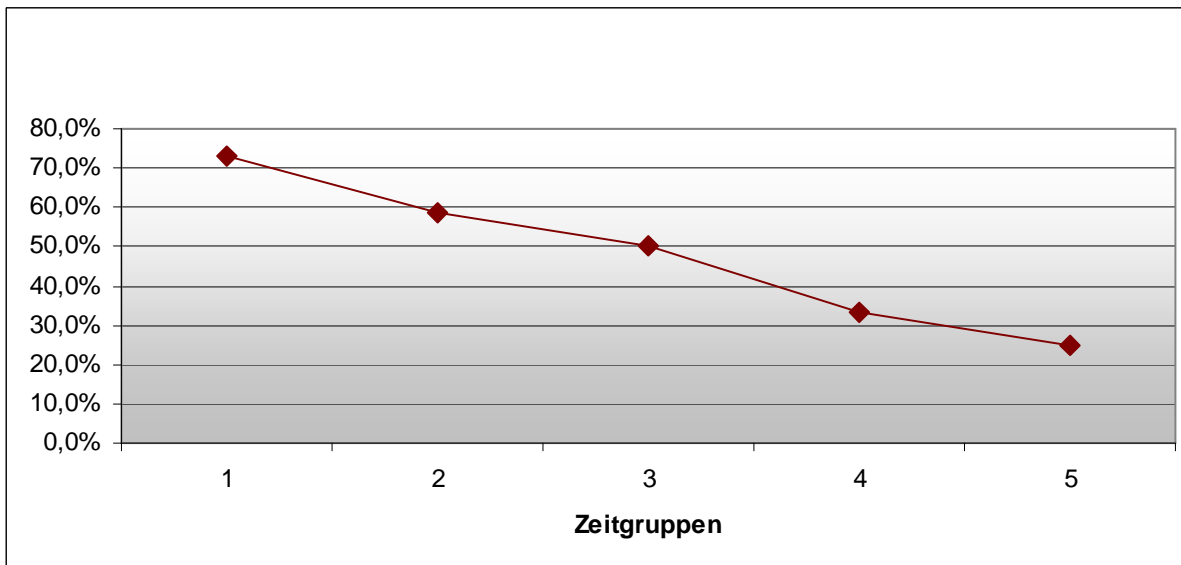
**Abbildung 11:** Prozentuale Verteilung der einzelnen Ergebnisgruppen auf die Zeitgruppen



Insgesamt ist ein Trend erkennbar, dass Biopsien mit unverändertem CD20-Status eher eine gleichmäßige Verteilung auf die Zeitgruppen zeigen, Biopsien mit verändertem CD20-Status hingegen gehäuft in Zeitgruppe 1 entnommen wurden. Deshalb wurde der Anteil aller Biopsien, die eine Veränderung des Immunphänotyps aufweisen (Gruppe 2, Gruppe 3 und Gruppe 5) an den Gesamtbeobachtungen nach Zeitgruppen aufgetragen.

Abbildung 12 zeigt, dass ein direkter Zusammenhang zwischen Therapieabstand und Änderung des CD20-Immunphänotyps besteht.

**Abbildung 12:** *Prozentueller Anteil aller Biopsien mit verändertem Immunphänotyp an den Gesamtbeobachtungen nach Zeitgruppen*



Betrachtet man alle Biopsien, die in Zeitgruppe 1 entnommen wurden, so fand sich bei 73% von ihnen ein totaler oder relativer Verlust der CD20-Positivität. Bei Biopsien, die drei bis fünf Monate nach einer Therapie mit Rituximab entnommen wurden, war dies noch bei 58,8% der Fall. Lag der Biopsieabstand zwischen sechs und acht Monaten, so zeigte immer noch die Hälfte aller Biopsien eine Veränderung in der CD20-Positivität.

Das Phänomen eines veränderten CD20-Immunphänotyps nach Rituximab-Therapie ist demnach abhängig vom Therapieabstand und tritt am häufigsten innerhalb des ersten Vierteljahres nach Therapie auf.



#### 4.4 Worin ist der CD20-Positivitätsverlust begründet?

##### 4.4.1 Wird das CD20-Oberflächenepitop durch Rituximab maskiert?

Wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben wurde ein Fc-spezifischer Antikörper gegen Anti-Human IgG manuell ausgetestet, um der These nachzugehen, dass eine eventuell noch bestehende Rituximab-Bindung am CD20 Oberflächenepitop eine immunhistochemische Detektion von CD20 inhibiert.

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen ergab sowohl für die Lymphombiopsien mit positivem bzw. negativem CD20-Status, als auch für die physiologischen Kontrollbiopsien ohne Rituximab-Exposition, dass weder mit den zunächst gewählten Verdünnungsstufen 1:100, 1:200 und 1:400 noch mit den geringeren Verdünnungen von 1:10, 1:20 und 1:50 eine spezifische hintergrundfreie Färbung erzielt werden konnte. Auch die Verlängerung der Wasserstoffperoxidblockung bei den letzten drei Verdünnungsstufen von 15 auf 20 Minuten hatte ebenso wie alternative Methoden des Antigen-Retrievals (Kochen bei einem pH von 6,0 oder 9,0 bzw. Einsatz von Pepsin) keinen sichtbaren Effekt.

Da dieser Ansatz kein eindeutiges Ergebnis zu liefern versprach, wurde er nicht weiter verfolgt.

##### 4.4.2 CD20-Positivitätsverlust infolge Migration in *lipid rafts*

Um zu analysieren, ob eine Rituximab-Therapie das CD20-Molekül auf Proteinebene verändert, wurde ein Western-Blot, wie in Kapitel 3.4 beschrieben, durchgeführt.

Abbildung 13 zeigt das CD20-Membranprotein verschiedener Zelllinien, das nach Immundetektion auf einem Röntgenfilm visualisiert wurde. Dabei ist diese Abbildung repräsentativ für die insgesamt drei Wiederholungen des Western-Blots, die alle ein ähnliches Ergebnis aufwiesen.

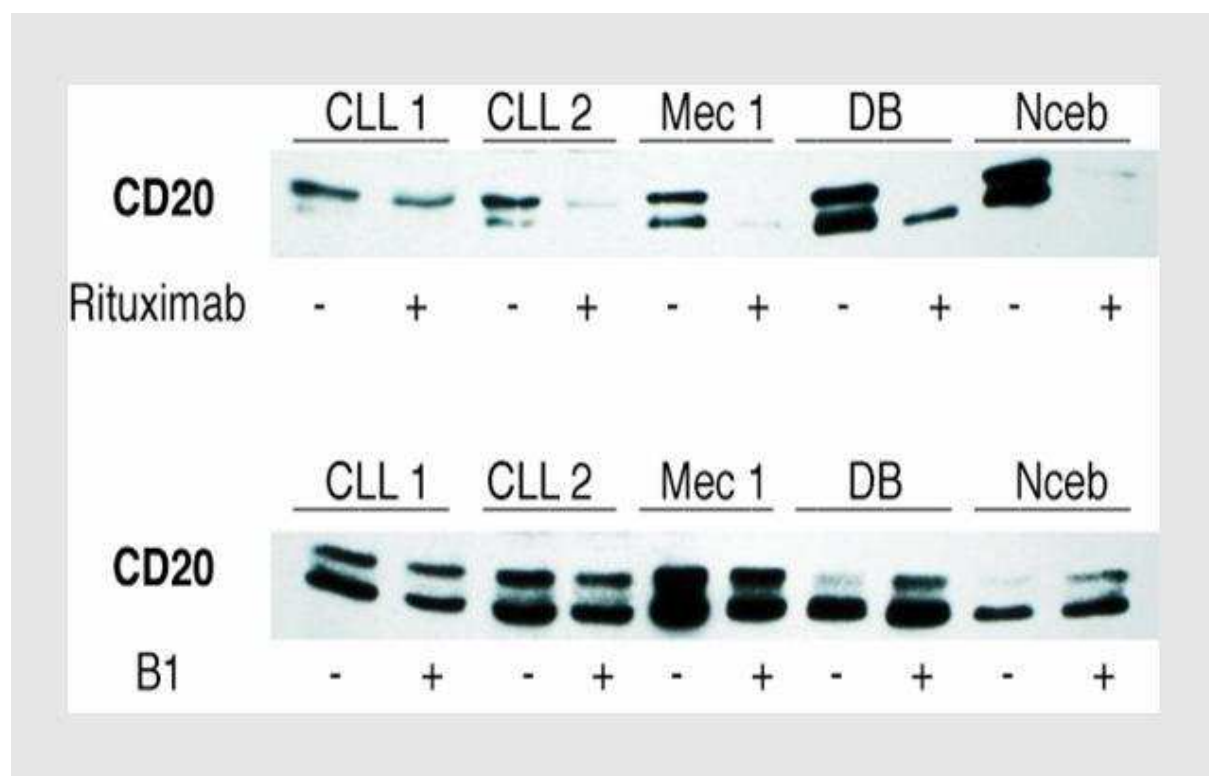
CD20 migriert infolge unterschiedlicher Phosphorylierung im Western Blot als Doppelbande in der 33/35 kDa-Fraktion. Dabei überwiegt die untere Bande und ist bei begrenzter Proteinmenge die einzig detektierbare (vgl. Deans et al. J Biol Chem, 1998). Wie im oberen Blot zu sehen ist, ist bei den beiden primären B-CLL Zellen sowie der B-CLL-Zelllinie *MEC-1* und der MCL-Zelllinie *NCEB* die Bande für den CD20-Rezeptor nach fünfminütiger Inkubation mit Rituximab (+) deutlich schwächer als die Kontrolle ohne vorherige Rituximabbehandlung (-). Auch *DB* zeigt nach Inkubation eine deutliche Abschwächung der Bandenstärke, obwohl diese Zelllinie gegen die zytotoxische Wirkung von Rituximab resistent ist (vgl. Meyer zum Büschenfelde et al. Cancer Res, 2008).

Für den unteren Immunoblot wurden die Zelllinien fünf Minuten mit *B1* inkubiert (+), einem mAK gegen CD20, der im Gegensatz zu Rituximab nicht zu einer Translokation von CD20 in *lipid rafts*

führt (vgl. Cragg et al. Blood, 2003). Anders als im oberen Blot zeigen sich hier, verglichen mit den unbehandelten Referenzzellen (-), keine erkennbar schwächeren Banden.

Während eine Rituximab-Exposition also auch im Western-Blot zu einer geringeren Nachweisbarkeit von CD20 führt, hat der mAK *B1* keinen derartigen Effekt auf das CD20-Molekül.

**Abbildung 13:** Western-Blot Analyse von NHL-Zelllinien nach fünfminütiger Behandlung mit Rituximab (oben) oder B1 (unten)

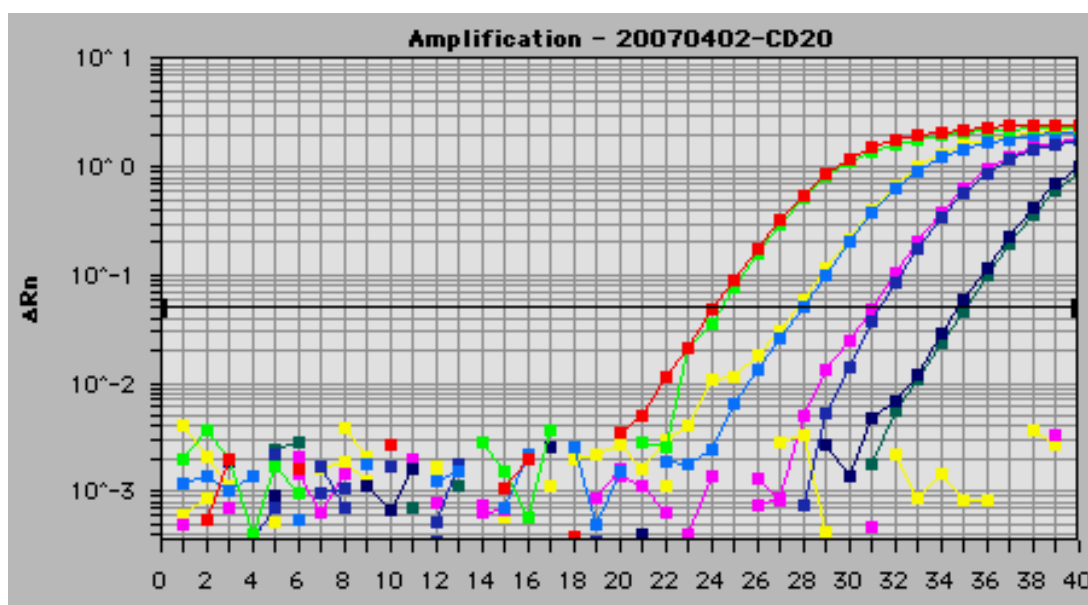


#### 4.4.3 Wird CD20 auf mRNA-Ebene herunterreguliert?

##### 4.4.3.1 CD20 mRNA-Untersuchung am Patientengewebe

Um zu untersuchen, ob eine Downregulation auf mRNA-Ebene ursächlich für den immunhistochemischen Positivitätsverlust von CD20 sein könnte, wurde die Methode der quantitativen TaqMan PCR gewählt und wie in Kapitel 3.5.1 beschrieben durchgeführt.

**Abbildung 14:** Beispielhafte Darstellung des Signalverlaufs der RT-qPCR bei der CD20-mRNA Detektion. Die übereinander liegenden Graphen stammen von Duplikaten derselben Template-cDNA.



Dazu wurden aus den Ergebnisgruppen Nr. 1, Nr. 2 und Nr. 3 insgesamt elf Fälle ausgewählt, die ein möglichst großes Tumordinfiltrat aufwiesen. Die prätherapeutische Referenzbiopsie diente jeweils als Kontrolle, so dass insgesamt 22 Proben auf ihren CD20- sowie ihren 18S-mRNA-Gehalt untersucht wurden.

**Tabelle 15:** Zusammensetzung der Fälle für die Genexpressionsanalyse nach CD20-Status und Lymphomentität

	Fälle gesamt	FL	DLBCL	MCL	MZL
Kein CD20-Verlust	4	1	2	1	0
Relativer CD20-Verlust	4	2	0	1	1
Kompletter CD20-Verlust	3	2	1	0	0
Gesamt	11	5	3	2	1

41% der Fälle (9/22) waren zuvor mit der LCM-Technologie mikrodisseziert worden (vgl. 3.5.1.1), wodurch der relative Anteil an Zielzellen erhöht werden konnte.

Die ausgewählten Fälle sind in den Tabellen Nr. 16 bis 18 im Einzelnen aufgeführt, wobei die Fallnummer 1.1 beispielsweise die prätherapeutische Referenzbiopsie bezeichnet, während die Biopsie Nr. 1.1a nach einer Rituximab-Therapie entnommen wurde.

Die rechte Hälfte der Tabellen zeigt jeweils die Ergebnisse der Auswertung der Genexpressionsanalyse, deren genaue Durchführung im Gliederungspunkt 3.5.1.4 beschrieben wird. Dabei ergab das arithmetische Mittel der Dubletten von Fall Nr. 1.1 nach Kalibrierung im Reaktionsansatz einen prätherapeutischen *CD20*-mRNA-Gehalt von 7,52ng, während ein *18S*-mRNA Gehalt von 4,18ng berechnet wurde. Entsprechend liegt die *CD20*-Genexpression 1,8-fach über der des Referenzgens *18S*. Die relative Höhe der *CD20*-Expression liegt nach Rituximab-Therapie bei 2,07. Die posttherapeutische Biopsie zeigt also zu der prätherapeutischen Biopsie einen relativen *CD20*-Expressionsunterschied ( $\Delta CD20_{rel}$ ) von plus 0,27.

Von den vier untersuchten Fällen mit posttherapeutisch unverändertem *CD20*-Status (Tabelle 16) konnte bei einem Fall mit geringer Restmenge an Primärmaterial (Nr. 1.2) prätherapeutisch weder für *CD20*, noch für *18S* signifikanten Ct-Werte gemessen werden. Die anderen beiden Fälle weisen einen relativen *CD20*-Expressionsunterschied von minus 8,25 bzw. plus 0,18 auf. Die übrigen erhobenen Werte sind im Folgenden abzulesen.

**Tabelle 16:** Ergebnisse aus Immunhistochemie (IHC) und RT-qPCR der ausgewählten Fälle ohne *CD20*-Verlust (Ergebnisgruppe 1) vor bzw. nach (a) Therapie

Fall Nr.	Diagnose	Organ	Infiltrat	Dissektion	IHC	RT quantitative TaqMan PCR			
					CD20	CD20	18S	CD20/18S	$\Delta CD20_{rel}$
1.1	DLBCL	WG	100%	Makro	100%	7,52	4,18	1,80	
1.1a	DLBCL	WG	100%	Makro	100%	16,22	7,85	2,07	+0,27
1.2	DLBCL	WG	100%	Makro	100%	0,01	0,03	-	
1.2a	FL	KM	15%	Mikro	10%	0,08	0,98	0,08	
1.3	FL	WG	100%	Makro	100%	34,65	3,99	8,69	
1.3a	DLBCL	LK	100%	Makro	100%	3,92	8,84	0,44	-8,25
1.4	MCL	Duodenum		Makro	100%	1,66	1,17	1,40	
1.4a	MCL	Duodenum		Makro	100%	1,67	1,05	1,58	+0,18

**Tabelle 17:** Ergebnisse aus Immunhistochemie (IHC) und TaqMan PCR der ausgewählten Fälle mit relativem CD20 Verlust (Ergebnisgruppe 2) vor und nach (a) Therapie

Fall Nr.	Diagnose	Organ	Infiltrat	Dissektion	IHC	RT quantitative TaqMan PCR			
					CD20	CD20	18S	CD20/18S	$\Delta$ CD20rel
2.1	MZL	LK	100%	Mikro	50%	0	0,19	-	
2.1a	MZL	KM	10%	Mikro	5%	0	0,975	-	-
2.2	MCL	Duodenum		Makro	100% +++	1,65	1,17	1,40	
2.2a	MCL	Duodenum		Mikro	100% +	0	0	-	-
2.3	FL	LK	100%	Makro	100% +++	19,49	21,44	0,91	
2.3a	FL	KM	10%	Mikro	10% +	0,45	0,15	3,06	+2,15
2.4	FL	KM	15%	Makro	15% +++	6,46	6,13	1,05	
2.4a	FL	LK	100%	Makro	100% +	3,09	15,36	0,20	-0,85

**Tabelle 18:** Ergebnisse aus Immunhistochemie (IHC) und TaqMan PCR der ausgewählten Fälle mit komplettem CD20 Verlust (Ergebnisgruppe 3) vor und nach (a) Therapie

Fall Nr.	Diagnose	Organ	Infiltrat	Dissektion	IHC	RT quantitative TaqMan PCR			
					CD20	CD20	18S	CD20/18S	$\Delta$ CD20rel
3.1	FL	KM	30%	Mikro	25%	0,11	0,16	0,67	
3.1a	FL	KM	10%	Mikro	∅	0	0,77	-	-
3.2	FL	Ileum		Makro	100%	5,22	14,15	0,37	
3.2a	FL	Ileum		Mikro	∅	0	0,07	-	-
3.3	B-CLL	KM	40%	Mikro	10%	0	0,01	-	
3.3a	DLBCL	KM	100%	Makro	∅	0	2,01	-	-

Obwohl diese Arbeitsgruppe bereits in mehreren Projekten Erfahrungen mit dieser Methode sammeln konnte und sie mehrfach erfolgreich anwendete (vgl. Kremer et al. Hum Pathol, 2000; Kremer et al. Am J Surg Pathol, 2008; Koch et al. Diagn Mol Pathol, 2006), konnten in sechs von elf Fällen in mindestens einer Probe der Fallpaare entweder für CD20 oder 18S keine reproduzierbaren Ct-Werte gemessen werden. Eine Wiederholung von LCM, RNA-Extraktion und qRT-PCR war bei limitiertem Primärmaterial nicht möglich.

#### 4.4.3.2 CD20 mRNA-Untersuchung an NCEB-Zellen

Da eine Downregulation von CD20 auf mRNA-Ebene durch die Genexpressionsanalysen am Patientengewebe nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde, wie in 3.2.1 beschrieben, ein standardisiertes Modell entwickelt, um die Auswirkungen einer Rituximab-Behandlung auf die CD20 mRNA von NCEB-Zellen zu untersuchen. Durch einen doppelten Versuchsansatz mit Kultivierung der Zellen entweder in Humanserum oder FCS wurde außerdem geprüft, ob die Anwesenheit von aktivem Komplement in Kombination mit Rituximab einen Einfluss auf die mRNA-Expression hat.

Abbildung 15 gibt die Ergebnisse der qRT-PCR der in FCS kultivierten NCEB-Zellen wieder. Sie sind entsprechend ihrer Kulturdauer dargestellt, wobei „Tag null“ den Ausgangswert vor Inkubation mit Rituximab bezeichnet. Die übrigen Werte wurden jeweils nach einer Kulturdauer von 24, 48 und 96 Stunden sowie sieben, 14, 21 und 28 Tagen erhoben. Die aus den Ct-Werten für CD20 und das Referenzgen 18S ermittelte *relative Menge an CD20 mRNA* (vgl. 3.5.1.4 und 3.5.2.2) kann jeweils auf der Ordinate abgelesen werden.

Es zeigt sich erstens, dass die relative CD20 mRNA-Menge bei Kultivierung mit Rituximab (rote Kurve), ebenso wie bei der Referenzkultur ohne Rituximab (blaue Kurve), über 28 Tage stabil bleibt. Eine längere Expositionsdauer führt also nicht zu einer Veränderung der Genexpression. Zweitens ließen sich beim Vergleich des Versuchsansatzes mit Rituximabexposition und der Referenzkultur keine signifikanten Differenzen in der CD20 Genexpression feststellen. Auch dieser Versuch lieferte also keinen Hinweis dafür, dass Rituximab eine Downregulation von CD20 auf mRNA-Ebene bewirken könnte.

**Abbildung 15:** Relative CD20 mRNA-Menge in NCEB-Zellen nach Kultivierung in FCS mit (rot) und ohne Zusatz von Rituximab (blau) nach Kulturdauer in Tagen

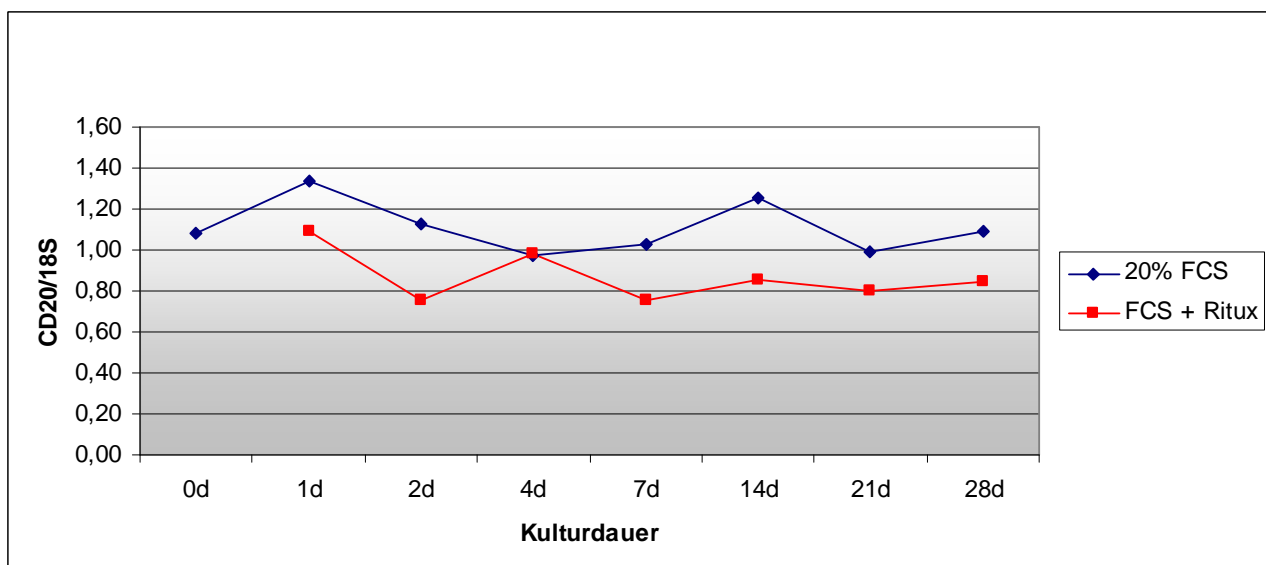
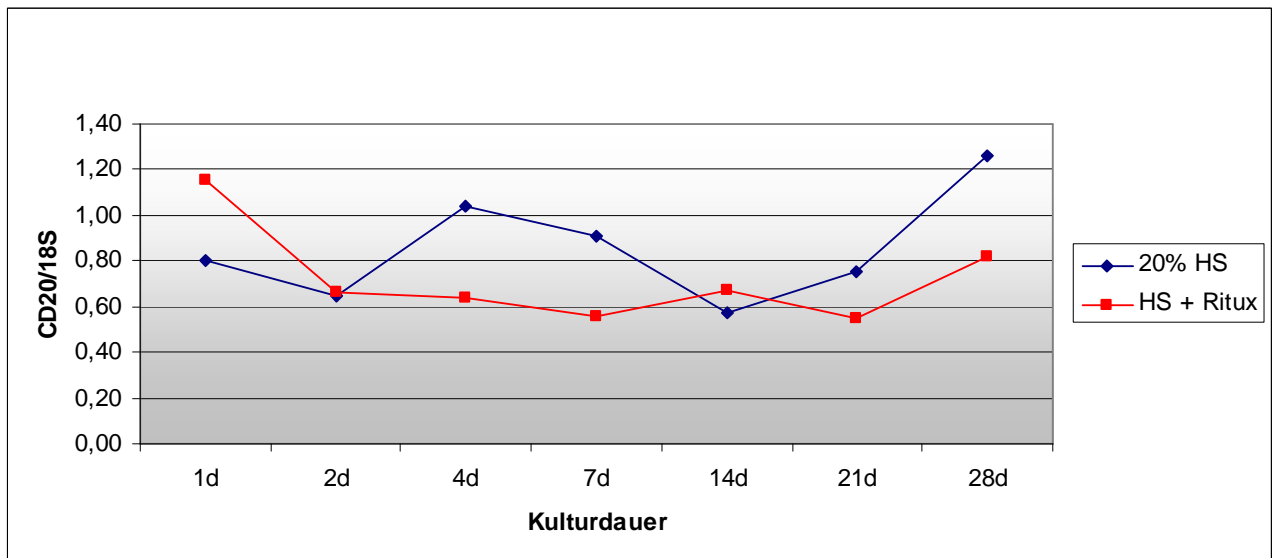


Abbildung Nr. 16 kann entnommen werden, dass auch bei Kultivierung in Humanserum keine abweichenden Ergebnisse erzielt wurden.

Die einzelnen Werte sind ebenso wie ihre ermittelten Differenzen tabellarisch im Anhang aufgeführt (Tabellen 20 und 21).

**Abbildung 16:** Relative CD20 mRNA-Menge in NCEB-Zellen nach Kultivierung in Humanserum (HS) mit (rot) und ohne (blau) Zusatz von Rituximab nach Kulturdauer in Tagen



## 4.5 Klonalitätsbestimmung

Wie in Kapitel 3.6 beschrieben, wurde bei Fällen mit diagnostischen Unsicherheiten hinsichtlich der Dignität eines lymphoiden Infiltrates die Klonalität durch PCR-Analyse des Immunglobulin-Schwere-Ketten-Gen-Rearrangements bestimmt und anschließend eine Fragmentlängenanalyse durchgeführt.

Insgesamt wurde bei 31 Biopsien von 15 Patienten eine Klonalitätsbestimmung durchgeführt. Eine der untersuchten Biopsien wurde nachträglich von der Studie ausgeschlossen, da sie über vier Jahre nach der letzten Rituximab-Therapie entnommen worden war. Somit wurde bei 30 der 131 eingeschlossenen Biopsien (22,9%) die Klonalität mittels IgH-PCR bestimmt. Da es sich bei 13 dieser Biopsien um prätherapeutische Referenzen handelte, die zum Klonalitätsabgleich benötigt wurden, belaufen sich die Klonalitätsbestimmungen an posttherapeutischen Biopsien auf 17. Bei 20,5% der insgesamt 83 posttherapeutischen Biopsien wurde die Diagnose also unter Zuhilfenahme der Ergebnisse des IgH-Rearrangements gestellt.

**Tabelle 19:** Anzahl durchgeführter Klonalitätsbestimmungen nach Lymphomentität

Entität	Anzahl untersuchter Biopsien	Davon prätherapeutische Referenz
FL	13	4
MCL	6	3
MZL	1	0
DLBCL	8	4
CLL	3	2
Summe	31	13

In Zusammenschau mit den Ergebnissen der Immunhistochemie wurde die Dignität dieser 17 Fälle neu bewertet. Dabei wurden zehn Biopsien als komplette Remission eingestuft, während in sieben Fällen ein residuelles Lymphom diagnostiziert wurde.

Sechs der zehn tumorfreien Biopsien hatten einen polyklonalen Immunphänotyp. Die übrigen vier Biopsien zeigten bei der Analyse des IgH-Rearrangements ein oligoklonales Muster, das bei geringer Infiltratgröße und abweichenden Klonen der Vorbiopsien als „Pseudoklonalität“ gewertet wurde. Unter „Pseudoklonalität“ wird ein PCR-Artefakt verstanden, das bei sehr geringen Anfangsmengen der Zielsequenzen entstehen kann. Durch vorrangige Amplifikation von bestimmten V-D-J-Sequenzen kommt es zur Ausbildung oligoklonaler oder gar monoklonaler Banden, die jedoch nicht reproduzierbar sind und eine von den Vorbiopsien abweichende Fragmentlänge aufweisen (vgl. Kremer et al. Hum Pathol, 2000).

Von den sieben untersuchten Biopsien mit residuellem Lymphom sind sechs der Ergebnisgruppe 3 zugeordnet, deren Ergebnisse im Einzelnen unter Punkt 4.2 (Tabelle 13) aufgeführt sind. Bei dem siebten Fall handelt es sich um ein FL der Ergebnisgruppe 1.



Für drei der sieben Fälle konnte ein molekularer Malignitätsbeweis erbracht werden. Sie zeigen ein klonales Bandenmuster, wobei die Fragmentlängenanalyse im Vergleich zu den Vorbiopsien jeweils den identischen Klon identifiziert. Drei weitere Fälle sind, ebenso wie ihre prätherapeutischen Referenzbiopsien, im Ergebnis polyklonal. Besonders bei Follikulären Lymphomen bleibt der molekulare Malignitätsnachweis aufgrund der hohen Rate an somatischen Mutationen oft erfolglos. Aber auch eine variable Effizienz in der Amplifikation des malignen Klons oder Konsensusprimer, die die Zielsequenzen nicht erfassen, können als Gründe für eine fehlende Detektion angeführt werden (vgl. Coad et al. Molecular Diagnosis, 1996; Segal et al. Hum Pathol, 1994).

Der siebte untersuchte Fall bleibt ohne Ergebnis, da auf dem Röntgenfilm keine Banden zur Darstellung kamen. Eine Wiederholung von DNA-Extraktion und IgH-PCR war bei geringem Primärmaterial nicht möglich.

## 5 Diskussion

### 5.1 Häufigkeit des Verlustes der immunhistochemischen CD20-Positivität

Die vorliegende Arbeit analysiert anhand von immunhistochemischen Untersuchungen sequentieller Biopsien von 48 NHL-Patienten den Immunphänotyp vor und nach einer Rituximab-Therapie. Dabei wurden 48 prä- und 83 posttherapeutische Biopsien evaluiert und Krankheitsverläufe von bis zu acht Jahren betrachtet. Zudem wurde eine Subgruppenanalyse nach den fünf eingeschlossenen Lymphomentitäten vorgenommen. Bei der Auswertung wurde zwischen relativer und absoluter CD-20-Negativität unterschieden und auch tumorfreie Verlaufsbiopsien hinsichtlich ihres CD20-Immunphänotyps untersucht.

Von den 55 untersuchten Biopsien mit residuellem Lymphom weisen 58% einen unveränderten CD20-Status, 31% einen partiellen und 11% einen kompletten Verlust der CD20-Positivität auf. Die 28 Biopsien mit reaktiven Zellinfiltraten bei kompletter Remission zeigen zu 82% einen CD20-negativen Immunphänotyp. Ein relativer Verlust der CD20-Positivität wurde bei den Fällen in Remission nicht beobachtet.

Insgesamt konnte eine Änderung des immunhistochemischen Färbeverhaltens zuvor CD20-positiver Zellen bei 55% aller posttherapeutischen Biopsien dokumentiert werden. Auf die Studienpatienten bezogen wurde im Verlauf ihrer Erkrankung bei 75% mindestens einmal eine posttherapeutische Änderung des Immunphänotyps gefunden.

Die Subgruppenanalyse nach Lymphomentitäten zeigt bei kleiner Fallzahl einen Trend auf. So ist der Verlust der CD20-Positivität, sowohl bei residuellem Lymphom als auch bei tumorfreien Biopsien, am häufigsten beim Follikulären Lymphom aufgetreten.

Die verwendeten immunhistochemischen Surrogat-Marker für CD20, Pax-5 und CD79a, bzw. Cyclin D1 beim MCL, erwiesen sich, wie bereits von Chu et al. (*Am J Clin Pathol*, 2006) und Torlakovic et al. (*Am J Surg Pathol*, 2002) publiziert, für diese Fragestellung als geeignet. Eine Änderung ihres Expressionsverhaltens unter Rituximab-Therapie wurde nicht beobachtet.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass die CD20-Antigenmodulation infolge Rituximabtherapie ein häufiges Phänomen darstellt, das immerhin bei 11% der residuellen Lymphombiopsien zu einem kompletten Verlust der immunhistochemischen CD20-Detektion führt.

In der Literatur mangelt es bisher an systematischen immunhistochemischen Studien mit großer Fallzahl. Bezüglich der Häufigkeit einer posttherapeutischen CD20-Antigenmodulation variieren die Daten stark. Außerdem erschwert die oftmals fehlende Aufschlüsselung nach Lymphomentitäten die Vergleichbarkeit. So gibt die Arbeitsgruppe von Kennedy et al. (*Br J Haematol*, 2002) die Inzidenz CD20-negativer Lymphomrezidive mit 60% (n=10), die von Seliem et al. (*Appl*

Immunohistochem Mol Morphol, 2006) mit 56% (n=9) und die Arbeitsgruppe von Chu et al. (Leuk Lymphoma, 2002) mit 37% (n=35) an, während Foran et al. (Br J Haematol, 2001) sie mit 24% (n=25) beziffern. Entsprechend konnte bislang die Frage nach der Häufigkeit einer posttherapeutischen CD20-Antigenmodulation nur unzureichend beantwortet werden. In dieser Arbeit wiesen 11% der Biopsien mit residuellem Lymphom (n=55) eine CD20-Negativität auf, so dass nach aktuellem Kenntnisstand also bei mindestens 10% aller Lymphomrezidive nach Rituximabtherapie mit einem kompletten Verlust der CD20-Positivität zu rechnen ist.

Darüber hinaus zeigt diese Arbeit, dass es neben den Fällen mit absoluter CD20-Negativität auch einen erheblichen Anteil an Fällen mit relativer Downregulation von CD20 gibt (31%, n=55). Die Bedeutung der relativen CD20-Negativität ist bislang unklar. Denkbar wäre ein Übergangstatus im Sinne eines beginnenden Verlustes der CD20-Positivität, ebenso wie eine beginnende Wiedererlangung der ursprünglichen CD20-Positivität nach vorübergehender Downmodulation infolge Rituximabtherapie. Für eine transiente CD20-Downmodulation, wie sie bereits von Foran et al. (Br J Haematol, 2001) vermutet wurde, spricht, dass aus dem Studienkollektiv mehrere Patienten mit posttherapeutisch verändertem CD20-Immunphänotyp im Krankheitsverlauf wieder einen normalen CD20-Status aufwiesen. Um dieser These weiter nachzugehen wären sequentielle Biopsien solcher Fälle mit kurzen zeitlichen Abständen interessant.

Im Gegensatz zu den bislang publizierten Arbeiten zu diesem Thema, wurden in dieser Arbeit auch Fälle systematisch analysiert, die sich nach Rituximab-Therapie in kompletter Remission befanden. Interessanterweise zeigte sich hier bei den reaktiven Infiltraten mit 82% (n=28) ein auffallend hoher Anteil von posttherapeutischer CD20-Negativität, was – entgegen der bisherigen Annahmen – einen positiven Zusammenhang zwischen posttherapeutischer CD20-Downmodulation und dem Therapieansprechen vermuten lässt.

Bislang konnte keine Korrelation zwischen dem CD20-Status und dem Therapieansprechen auf eine Rituximab-Folgetherapie gezeigt werden. Das Therapieansprechen auf die Rituximab-Ersttherapie wird in der Literatur – bei CD20-Positivität – mit 48% bzw. 33% angegeben (McLaughlin et al. J Clin Oncol, 1998; Coiffier et al. Blood, 1998). Für die Rituximab-Folgetherapie erbrachte eine Phase II- Studie von Davis et al. (J Clin Oncol, 2000) eine *overall response rate* (ORR) von 40%. Die übrigen 60%, die initial ein Ansprechen auf Rituximab gezeigt hatten, zeigten sich also gegenüber einer erneuten Gabe refraktär, was als sekundäre Resistenz interpretiert werden kann. Dass diese allein auf eine Änderung des Immunphänotyps zurückzuführen ist, ist nach aktueller Datenlage nicht anzunehmen (vgl. Smith, M. R., Oncogene, 2003).

So fanden Foran et al. (Br J Haematol, 2001) in einer retrospektiven Kohortenanalyse nach Rituximabtherapie sechs CD20-negative FL, von denen vier kein Therapieansprechen gezeigt hatten, während zwei ein partielles Ansprechen aufwiesen. Johnson et al. (Blood, 2009) fanden

ebenso wie Pickartz et al. (Exp Hematol, 2001) zwar einen direkten Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der CD20-Expression und der Sensibilität der Zellen gegenüber Rituximab, jedoch schien auch ein geringes Maß an CD20-Expression für die Rituximabwirkung ausreichend zu sein. Entsprechend gilt die zytotoxische Wirkung von Rituximab als relativ unabhängig vom CD20-Proteinlevel (vgl. Ghetie et al. Blood, 2001; Smith M. R., Oncogene, 2003). Zudem gibt es in der Literatur Hinweise, dass für die Rituximab-Resistenz nicht der Verlust der CD20-Expression, sondern Veränderungen von Signaltransduktionswegen, die das Tumorzellüberleben steuern, verantwortlich sind (vgl. Bonavida, B., Oncogene, 2007).

Eine mögliche Erklärung für den hohen Anteil an CD20-negativen B-Zellen bei kompletter Remission bieten Laurent et al. (Am J Clin Pathol, 2007). Bei der Untersuchung reaktiver Zellinfiltrate im KM von FL-Patienten in CR nach Rituximab-Therapie fanden sie, den hier vorliegenden Daten entsprechend, in neun von zehn Fällen CD79a-positive, CD20-negative B-Zellen. Diese konnten mittels Anti-TdT- (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase) AK, einem Marker für unreife Lymphozyten, zwei Zellpopulationen zugeordnet werden. So scheint es nach Rituximab-Therapie im KM einerseits zu einer Akkumulation unreifer B-Zellen (CD79a+/CD20-/TdT+) zu kommen. Andererseits fand sich auch eine Population reifer B-Zellen (CD79a+/CD20-/TdT-), deren Genese die Autoren nicht schlüssig erklären konnten.

Auch wenn die Bedeutung eines veränderten CD20-Immunphänotyps für die Therapieentscheidung im Rezidiv noch unklar ist, ist – angesichts einer Inzidenz von mindestens 10% – die Relevanz für die pathologische Routinediagnostik offensichtlich.

Eine fehlende immunhistochemische CD20-Positivität könnte in Unkenntnis des Auftretens dieses Phänomens im Zusammenhang mit einer Anti-CD20-Immuntherapie fälschlicherweise als Abwesenheit maligner Zellen interpretiert werden. Diese Arbeit zeigt, dass so eine folgenschwere Fehldiagnose durch die Erweiterung des diagnostischen Antikörper-Panels um CD79a und Pax-5 vermieden werden kann. Entsprechend sollten die Antikörper gegen CD79a und Pax-5 bei allen B-NHL-Patienten, die im Krankheitsverlauf eine Anti-CD20-Immuntherapie erhalten haben, routinemäßig eingesetzt werden. Voraussetzung hierfür sind ausreichende Angaben über den Therapieverlauf seitens der Kliniker. Da Rituximab jedoch in zunehmendem Maße in der Erstlinientherapie eingesetzt wird, erscheint in der Lymphomrezidivdiagnostik eine generelle Erweiterung des diagnostischen Antikörper-Panels um die CD20-Surrogatmarker sinnvoll.

Für die Bundesrepublik Deutschland wird infolge steigender Lymphominzidenz gepaart mit deutlich verbesserten Überlebensaussichten infolge moderner Therapiekonzepte sowie demographischen Effekten, eine Zunahme der Patientenzahlen prognostiziert (Batzler, 2008, S. 94ff; Robert-Koch-Institut, 2010, S. 140ff). Gleichzeitig zeichnet sich ein zunehmender Einsatz von Anti-CD20-Immuntherapien in der onkologischen Standardtherapie ab. Rituximab ist bereits in vielen

Therapieschemata etabliert. Die Indikationsausweitung auf der Grundlage neuer Studienergebnisse, beispielsweise auf einen Therapiebeginn in einem früheren Krankheitsstadium, eine wiederholte Rituximab-Therapie im Rezidiv oder eine Rituximab-Erhaltungstherapie in der Remission, scheint absehbar (vgl. Hainsworth et al. J Clin Oncol, 2002; Hainsworth et al. J Clin Oncol, 2005; Witzig et al. J Clin Oncol, 2005; van Oers et al. Blood, 2006; Vidal et al. J Natl Cancer Inst, 2009; Vidal et al. Cochrane Database Syst Rev, 2009; van Oers et al., J Clin Oncol, 2010). Entsprechend ist künftig, vor dem Hintergrund einer Inzidenz von mindestens 10 %, mit einer absoluten Zunahme von Fällen mit posttherapeutischer CD20-Downmodulation zu rechnen.

Ob bei einer Therapie mit alternativen Anti-CD20-Immuntherapeutika, wie beispielsweise Ofatumumab, Veltuzumab oder Ocrelizumab, ebenfalls mit Veränderungen des Immunphänotyps zu rechnen ist, ist derzeit völlig unklar und Gegenstand künftiger Studien.

## 5.2 Korrelation des Verlustes der CD20-Positivität mit dem Therapieabstand

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die Beantwortung der Frage, ob ein Zusammenhang zwischen dem Therapieabstand und dem Verlust der CD20-Positivität besteht.

Es konnten die immunhistochemischen Ergebnisse von 75 posttherapeutischen Biopsien mit dem Therapieabstand korreliert werden. Im Zuge der Auswertung wurden die Therapieabstände zu Zeitgruppen à drei Monaten zusammengefasst. Dabei zeigten die 29 Biopsien mit residuellen Lymphominfiltraten und unverändertem CD20-Status eine relativ gleichmäßige Verteilung auf die Zeitgruppen, während die 44 Biopsien mit posttherapeutisch verändertem CD20-Status vor allem in dem Zeitraum von wenigen Wochen bis zu drei Monaten nach Therapie entnommen worden waren.

So weisen von den 22 CD20-negativen Biopsien in kompletter Remission 59% und von den 16 Fällen mit residuellen Lymphominfiltraten und relativ verändertem CD20-Status 56% einen entsprechend kurzen Therapieabstand auf. Von den sechs Biopsien mit kompletter CD20-Negativität bei residuellen Lymphominfiltraten haben fünf (83%) einen Therapieabstand von unter drei Monaten. Die sechste Biopsie weicht mit 16 Monaten Therapieabstand deutlich ab. Eine mögliche Erklärung hierfür bietet die Tatsache, dass es sich bei diesem Fall histologisch um eine posttherapeutische Transformation in ein plasmoblastisches DLBCL handelt, das unabhängig von einer Anti-CD20-Immuntherapie im Zuge der Transformation neben PAX-5 auch die Expression von CD20 verlieren kann (vgl. R. Andreesen und H. Heimpel, 2009, S. 165).

Bei genauerer Betrachtung der Zeitgruppe, die einen Therapieabstand von weniger als drei Monaten umfasst, fand sich umgekehrt bei knapp drei Viertel der 37 Biopsien ein posttherapeutisch veränderter CD20-Status.

Bislang fehlen in der Literatur systematische Untersuchungen eines potentiellen Zusammenhanges zwischen Therapieabstand und Modulation des CD20-Immunphänotyps, die zum Vergleich herangezogen werden könnten. Bei den bisherigen Arbeiten, die sich mit Antigenmodulation nach CD20-Immuntherapie beschäftigen, wird der Therapieabstand oftmals nicht berücksichtigt. Einzig ein Literaturreview von Alvaro-Naranjo et al. (Ann Hematol, 2003), der neun Einzelfallberichte über CD20-negative FL-Rezidive nach Rituximab-Therapie untersuchte, kommt zu dem Schluss, dass das Phänomen nach einem kurzen Zeitintervall von zwei bis elf Monaten (Median 5,4 Monate) nach Anti-CD20-Therapie aufträte.

In der vorliegenden Arbeit konnte nun erstmals ein direkter Zusammenhang zwischen Therapieabstand und verändertem CD20-Immunphänotyp nach Rituximab-Therapie gezeigt werden. Es handelt sich also um ein zeitabhängiges Phänomen, das am häufigsten innerhalb des ersten Vierteljahres nach Therapie auftritt und mit zunehmendem Therapieabstand seltener wird. Diese Erkenntnis stützt die bereits in 5.1. aufgestellte These einer transienten CD20-Downmodulation.

### 5.3 Ätiologie der CD20-Antigenmodulation

Um die Ätiologie CD20-negativer Lymphomrezidive zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit drei wesentliche Theorien aufgegriffen. Vor deren Hintergrund werden die Ergebnisse dieser Arbeit im Folgenden diskutiert.

#### 5.3.1 Bindungsverlust diagnostischer Antikörper infolge Maskierung des CD20-Epitops

Der These nachgehend, dass das CD20-Epitop infolge einer Maskierung durch Rituximab der immunhistochemischen Diagnostik nicht zugänglich ist, wurde versucht, Rituximab immunhistochemisch im FFPE-Material nachzuweisen. Hierfür wurde ein Anti-Rituximab-Antikörper, der an den F<sub>c</sub>-Teil von Rituximab bindet, exemplarisch an einem CD20-positiven und einem CD20-negativen B-NHL sowie an zwei Negativkontrollen ausgetestet. Eine spezifische, hintergrundfreie Anfärbung konnte nicht erzielt werden.

Es ist denkbar, dass Rituximab aus verschiedenen Gründen im FFPE-Material nicht oder nur schwer nachweisbar ist. In der Literatur gibt es jedoch zahlreiche Fakten, die gegen eine Maskierung von CD20 durch Rituximab als Ursache für die posttherapeutische Änderung des Immunphänotyps sprechen, weshalb dieser Ansatz nicht weiter verfolgt wurde.

So gelang der Arbeitsgruppe um Jilani et al. (Blood, 2003) unter Verwendung polyklonaler Anti-Maus-Immunglobulin-Antikörper (IgG) die durchflusszytometrische Detektion von gebundenem Rituximab an der Zelloberfläche von B-CLL-Zellen aus peripherem Blut. Rituximab war posttherapeutisch jedoch nur bei knapp 5% der Patienten (n=65) detektierbar, während CD20 weitaus häufiger nicht detektierbar war. Zudem zeigte die immunhistochemische Untersuchung von Knochenmarkbiopsien von sieben durchflusszytometrisch CD20- und Rituximab-negativen Fällen unter Verwendung des zytoplasmatischen Antikörpers L26 ebenfalls keine CD20-Detektion. Die Autoren schlossen daraus, dass statt eines Maskierungseffektes vielmehr eine Veränderung des CD20-Moleküls für den Verlust der CD20-Positivität verantwortlich sein muss.

Der Maskierungseffekt scheint für die Durchflusszytometrie relevant zu sein, da hier ein extrazellulär bindender diagnostischer Anti-CD20-Antikörper wie B1 oder B9E9 Anwendung findet (vgl. Grillo-Lopez et al. Clin Cancer Res, 2000). In der Immunhistochemie wird hingegen der Antikörper L26 (Monoclonal Mouse anti-Human CD20cy) verwendet, der auf der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran bindet (vgl. Mason et al. Am J Pathol, 1990), während die Rituximab-Bindung an einem Oberflächenepitop des CD20-Rezeptors erfolgt. Selbst eine persistierende Rituximab-Bindung sollte also die immunhistochemische Diagnostik nicht behindern.

Auch Pickartz et al. (Exp Hematol, 2001) fanden bei der Untersuchung des Immunphänotyps des extrazellulären sowie des zytoplasmatischen Epitops nach Permeabilisierung der Zellmembran *in vitro* eine fehlende Anfärbbarkeit ausschließlich der extrazellulären Domäne, passend zu einem Maskierungseffekt. Die Arbeitsgruppe beschreibt jedoch bei primären B-CLL-Zellen infolge Rituximab-Therapie auch eine vorübergehende gleichsamer Einschränkung der Detektierbarkeit sowohl der extra- als auch der intrazellulären Domäne von CD20.

Wie anhand der Literatur gezeigt wurde, kann Maskierung durch Rituximab bei Verwendung extrazellulär bindender Antikörper zum CD20-Positivitätsverlust führen. Der Verlust der immunhistochemischen Detektierbarkeit der zytoplasmatischen Domäne kann durch den Maskierungseffekt jedoch alleine nicht erklärt werden.

### **5.3.2 CD20-Positivitätsverlust infolge Migration in Lipid Rafts**

Als Zweites wurde die Theorie einer Modulation des CD20-Moleküls auf Proteinebene aufgegriffen und untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen dem Verlust der CD20-Positivität und der Translokation von CD20 in *lipid rafts* besteht. Dafür wurden Primärzellen von zwei B-CLL-Patienten sowie drei Zelllinien (MEC-1, NCEB, DB) entweder mit Rituximab oder B1 behandelt und der CD20-Proteingehalt anschließend mittels Western Blot analysiert. Der zur Detektion verwendete Anti-CD20-Antikörper 7D1 bindet, wie der in der Immunhistochemie eingesetzte Anti-CD20-AK L26, an der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran, so dass eine Vergleichbarkeit zwischen den Ergebnissen der beiden Methoden angenommen werden kann.

Nach Inkubation mit Rituximab war die detektierbare CD20-Proteinmenge sowohl in den primären B-CLL-Zellen als auch in den drei Zelllinien deutlich reduziert, während die Inkubation mit B1 keine solche Auswirkung hatte. Da Rituximab bekanntermaßen eine Migration von CD20 in lipidreiche Mikrodomänen bewirkt (vgl. Cragg et al. Blood, 2003), während B1 einen solchen Effekt nicht hat, ist ein kausaler Zusammenhang zwischen der Translokation des CD20-Rezeptors in die *lipid rafts* und der fehlenden Detektierbarkeit mit einem Anti-CD20-Antikörper anzunehmen.

*Lipid rafts* fungieren als Plattform für die zelluläre Signalübertragung, weshalb die Translokation von CD20 in diese Mikrodomänen für die Rituximabwirkung wichtig zu sein scheint. So fanden Jazirehi et al. (Cancer Res, 2007) bei einer Rituximab-resistenten Lymphomzelllinie nicht nur eine quantitative Reduktion der Oberflächenexpression von CD20, sondern auch eine geringere Fähigkeit zur Translokation von CD20 in *lipid rafts* infolge Rituximab-Bindung. Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Myron Czuczman (Clin Cancer Res, 2008) bestätigen einen Zusammenhang zwischen Rituximab-Resistenz und Abnahme der Migration in die lipidreichen Domänen.



Die in dieser Arbeit verwendete Rituximab-resistente DLBCL-Zelllinie *DB* wies nach Inkubation mit Rituximab genau wie Rituximab-sensible Zellen eine deutliche Abschwächung der Bandenstärke im Western-Blot auf. Die Rituximab-Resistenz von *DB* scheint daher nicht über eine veränderte Fähigkeit zur Translokation von CD20 in die *lipid rafts* vermittelt zu sein.

Die fehlende bzw. verminderte Detektierbarkeit von CD20 nach Inkubation mit Rituximab kann zwei potentielle Ursachen haben:

So könnte das CD20-Protein einerseits aufgrund von strukturellen Veränderungen infolge Rituximab-Bindung einer Immunoblot-Detektion nicht mehr zugänglich sein. Entsprechend vermuteten schon Semac et al. (Cancer Res, 2003) ebenso wie Janas et al. (Biochem Soc Symp, 2005) auf der Grundlage ihrer Forschungsergebnisse, dass die Rituximab-Bindung eine Konformationsänderung des CD20-Membranproteins bewirkt, welche die stabile Assoziation mit den lipidreichen Mikrodomänen erklärt.

Von Winiarska et al. (PLoS MED, 2008) wurde gezeigt, dass Konformationsänderungen des CD20-Antigens beispielsweise im Zusammenhang mit einer Statintherapie auftreten und dass diese das Bindungsverhalten von extrazellulär bindenden mAK beeinflussen.

Entsprechend könnten Konformationsänderungen auch ursächlich für den immunhistochemischen Verlust der CD20-Positivität nach Rituximab-Therapie sein.

In Abwesenheit von Monozyten in der Versuchsanordnung kann die Theorie eines *shavings* von CD20-Rituximab-Komplexen durch Monozyten, wie sie von der Arbeitsgruppe um Paul Beum (J Immunol, 2006) aufgestellt wurde, verworfen werden (vgl. 1.4.2). Da es sich bei dem untersuchten Material um Zelllysate handelt, scheidet anhand der vorliegenden Ergebnisse auch die von Anolik et al. (Eur J Immunol, 2003) sowie Jiliani et al. (Blood, 2003) postulierte Internalisierung von CD20 nach Rituximabtherapie als Erklärung aus. Die vorliegenden Ergebnisse erlauben gar eine Uminterpretation der Daten der Arbeitsgruppe um Jiliani et al. (Blood 2003). Diese hatte eine vermehrte immunhistochemische Nachweisbarkeit von CD20 nach Detergentientherapie beschrieben und auf eine Internalisierung von CD20 geschlossen. Die durchgeführte Detergentienbehandlung erhöht jedoch nicht nur die Permeabilität der Zellmembran und ermöglicht den Nachweis intrazellulärer Moleküle, sie führt auch zum Verlust der Integrität der *lipid rafts*. Vor diesem Hintergrund stützt die von Jiliani et al. beschriebene zunehmende Nachweisbarkeit von CD20 nach Detergentienbehandlung den Rückschluss der vorliegenden Ergebnisse auf einen kausalen Zusammenhang zwischen der Translokation in *lipid rafts* und der fehlenden Detektierbarkeit von CD20.

Andererseits könnte die fehlende Immunoblot-Detektion aber auch auf eine absolute Reduktion der CD20-Proteinmenge zurückzuführen sein. Diese müsste mit einer quantitativen Reduktion der

CD20-mRNA infolge verminderter Transkription einhergehen. Auch wenn aufgrund der kurzen Rituximab-Inkubationszeit vor Zellernte ein Mechanismus, der auf einer mRNA-Downregulation beruht, aus zeitlichen Gründen eher unwahrscheinlich erscheint, wurde diese These im Rahmen dieser Arbeit weiter untersucht.

### **5.3.3 Herunterregulation von CD20 auf mRNA-Ebene**

Die dritte aufgegriffene Theorie postuliert eine verminderte CD20-Proteinexpression infolge verminderter Transkription mit entsprechender Downmodulation der CD20-mRNA. Deshalb wurden alle Fälle, die ein ausreichend großes Tumordinfiltrat aufwiesen, mittels quantitativer RT-PCR auf ihren CD20-mRNA-Gehalt hin untersucht, wobei die prätherapeutischen Ausgangsbiopsien jeweils als Referenz dienten. Um die Sensitivität der Genexpressionsanalyse zu optimieren wurde der relative Anteil der Zielzellen in ausgewählten Fällen zuvor mittels Mikrodissektion (LCM) erhöht. Dennoch konnten in sechs von elf Fällen bei mindestens einem Fallpaar für CD20 oder das Referenzgen 18S keine reproduzierbaren Ct-Werte gemessen werden, so dass dieser Versuchsansatz ohne Ergebnis blieb. Eine Wiederholung war bei limitiertem Primärmaterial nicht möglich.

Neben Fehlern in der praktischen Durchführung ist als mögliche methodologische Fehlerquelle die mangelhafte Qualität der RNA aus FFPE-Material anzuführen, die infolge RNA-Degradierung oder fixationsinduzierter chemischer Modifikation nur noch eine durchschnittliche Länge von 100-250 Basenpaaren hat. Aufgrund von Fragmentation innerhalb des Amplikons sind nur geschätzte 3% der RNA aus Paraffinmaterial einer reversen Transkription zugänglich (vgl. Koch et al. *Diagn Mol Pathol*, 2006). Das für diese Studie gewählte Amplikon war kleiner als 100 Basenpaare. Zudem wurde, um für Variationen in RNA-Menge und -Qualität sowie in der cDNA-Synthese zu kompensieren, die CD20-Messung anhand der korrespondierenden Messungen des Housekeeping Gens *18S* normalisiert.

Die LCM stellt eine weitere mögliche Fehlerquelle dar, da die Zielzellen nur anhand morphologischer Kriterien selektiert wurden. Gerade die Abgrenzung von Lymphominfiltraten gegenüber normalem lymphatischem Gewebe bzw. reaktiven Zellinfiltraten ist anhand morphologischer Merkmale alleine nicht immer mit ausreichender Sicherheit gewährleistet; zumal der dehydrierte Zustand der Schnitte die Beurteilbarkeit zusätzlich erschwert. Es hat sich gezeigt, dass immunhistochemische Färbetechniken und LCM im FFPE-Material ohne große Einbußen bezüglich RNA-Menge und -Qualität kombiniert werden können (Fend et al. *Pathobiology*, 2000; Murray et al. *Acta Histochem*, 2007). Entsprechend wäre künftig die Anwendbarkeit der Immuno-LCM bei ähnlichen Fragestellungen zu prüfen.

Da eine Herunterregulation von CD20 auf mRNA-Ebene anhand des Patientenmaterials nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde ein standardisiertes Modell entwickelt und die Auswirkung von Rituximab auf die CD20-Genexpression von NCEB-Zellen (MCL) untersucht. Es wurde ein doppelter Versuchsansatz gewählt, um den möglichen Einfluss von aktivem Komplement zu berücksichtigen. Die Analyse mittels RT-q-PCR zeigte auch bei einer Expositionsdauer von bis zu vier Wochen keine signifikante Veränderung der Genexpression in Gegenwart von Rituximab. Die Anwesenheit von aktivem Komplement hatte keinen signifikanten Einfluss auf dieses Ergebnis.

Das entwickelte Modell erbrachte somit keinen Hinweis auf einen durch Rituximab vermittelten Expressionsverlust des CD20-Antigens. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Veröffentlichungen von Jiliani et al. (Blood, 2003) sowie Pickartz et al. (Exp Hematol, 2001), die eine posttherapeutische Downmodulation der CD20mRNA beschreiben, die im Falle der erstgenannten Arbeit in Gegenwart von Plasma signifikant zunahm.

So kultivierten Jiliani et al. ebenfalls B-NHL-Zellen in Gegenwart von Humanplasma und Rituximab bzw. FCS und Rituximab. Die Auswirkungen auf die CD20-Genexpression wurden jedoch nur bis maximal 120 Minuten nach Rituximabexposition untersucht, was keinen Rückschluss auf eine längerfristige mRNA-Downregulation erlaubt. Der immunhistochemische Positivitätsverlust nach Rituximab-Therapie, wie er in dieser Arbeit beschrieben wurde, ließe sich jedoch nur durch einen längerfristige Downmodulation der mRNA erklären.

Wie die Ergebnisse des in dieser Arbeit entwickelten Modells zeigen, führt selbst eine dreiwöchige Behandlung mit Rituximab nicht zu einer Downmodulation oder gar einem Verlust der CD20-Genexpression. Somit ist, wie von Jiliani et al. selbst diskutiert, nur ein vorübergehender Effekt auf die CD20mRNA anzunehmen, dessen Rolle für die immunhistochemische Diagnostik fraglich ist.

Darüber hinaus zeigen die von Jiliani et al. veröffentlichten Daten nach 60-minütiger Inkubation zunächst eine Zunahme der relativen CD20-mRNA-Mengen. Die signifikante Abnahme der mRNA-Menge, die nach 120 Minuten nur in Gegenwart von Plasma auftritt, ist auch im Rahmen von Expressionsschwankungen denkbar, wie sie in dieser Arbeit über den gesamten Untersuchungszeitraum von drei Wochen verzeichnet wurden.

Die Arbeitsgruppe um Tilman Pickartz analysierte die CD20-mRNA-Mengen von drei B-CLL Patienten vor, während und nach Rituximabtherapie und fand unter der Therapie eine Abnahme der mRNA-Menge. Posttherapeutisch normalisierte sich jedoch die mRNA-Menge mindestens auf den prätherapeutischen Ausgangswert. Angaben über die entsprechenden Zeiträume wurden dabei nicht gemacht.

Auch diese Ergebnisse lassen auf einen transienten Effekt auf die CD20-Genexpression schließen. Eine zweifelsfreie Erklärung für die Änderung des Immunphänotyps nach Rituximabtherapie bietet sie angesichts des posttherapeutischen Anstiegs der gemessenen mRNA-Mengen nicht.

Der Anschlussversuch der Arbeitsgruppe (vgl. Pickartz et al. Exp Hematol, 2001) wurde an CD20-negativen Primärzellen von Patienten, die *nicht* mit Rituximab vorbehandelt wurden, durchgeführt, weshalb er für die Fragestellung dieser Arbeit nicht herangezogen werden kann. Erwähnenswert ist jedoch, dass bei den primär CD20-negativen B-Zellen ebenso wie bei den CD20-positiven Zellen ein spontaner Anstieg der CD20-mRNA binnen 24 Stunden verzeichnet wurde.

Eine längerfristige Downmodulation der CD20-Genexpression wird in der Literatur bislang ebenso wenig beschrieben, wie ein kompletter Expressionsverlust. So fand selbst die Arbeitsgruppe um Myron S. Czuczman (Clin Cancer Res, 1999), die mehrere Rituximab-resistente Zelllinien züchtete, bei diesen mittels RT-PCR (nicht quantitativ) nur eine moderate Downregulation der CD20-mRNA. Zu einem kompletten Expressionsverlust kam es trotz Verwendung hoher Rituximab-Dosen (bis 128µg/ml) und mehrtägiger Inkubation nicht. Demnach scheint es selbst unter extremem Selektionsdruck nur zu geringeren Modulationen auf translationaler Ebene zu kommen.

## 6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit hatte primär die Untersuchung der Häufigkeit sowie die Beantwortung der Frage nach der klinischen Relevanz des Verlustes der immunhistochemischen CD20-Positivität nach einer Rituximab-Therapie zum Ziel.

Hierfür wurde der Immunphänotyp sequentieller Biopsien von 48 NHL-Patienten (48 prä- und 83 posttherapeutischen Biopsien) systematisch evaluiert und dabei Krankheitsverläufe von bis zu acht Jahren betrachtet, Subgruppenanalysen nach Lymphomentitäten vorgenommen sowie nach relativer oder absoluter CD20-Downmodulation unterschieden. Dabei erwiesen sich CD79a, Pax 5 sowie - bei der Subgruppe der MCL- Cyclin D1 als adäquate Surrogat-Marker für die immunhistochemische Evaluation CD20-negativer Rezidive. Zudem zeigte sich eine hohe Übereinstimmung zwischen den immunhistochemischen und durchflusszytometrischen Ergebnissen sowie der Klonalitätsbestimmung mittels PCR-Analyse des Immunglobulin-Schwere-Ketten-Gen-Rearrangements.

Ein kompletter Verlust der immunhistochemischen CD20-Positivität fand sich bei 11% (6/55) der posttherapeutischen Biopsien mit residuellen Lymphominfiltraten, während 31% (17/55) einen relativen Verlust aufwiesen. Unter Berücksichtigung der Fälle in Remission, von denen 82% (23/28) einen CD20-negativen Immunphänotyp aufwiesen, fand sich bei insgesamt 55% aller Biopsien bzw. bei 75% aller Studienpatienten eine Änderung des Färbeverhaltens infolge Anti-CD20-Therapie.

Unter Berücksichtigung der bisherigen Datenlage sowie der vorliegenden Ergebnisse ist derzeit also bei mindestens 10% aller Rezidive nach Rituximab-Therapie von einem kompletten Verlust der CD20-Positivität auszugehen, wobei angesichts steigender Inzidenz, sinkender Mortalität, demographischer Faktoren sowie absehbarer Indikationsausweitungen künftig mit einer Zunahme der absoluten Häufigkeit des Phänomens zu rechnen ist. Um Fehldiagnosen bei Lymphompatienten nach Rituximab-Therapie zu verhindern und eine CD20-Downmodulation nicht fälschlicherweise als Abwesenheit maligner Zellen zu interpretieren, sollte daher das Antikörper-Panel in der pathologischen Routinediagnostik um die Surrogat-Marker CD79a und Pax 5 erweitert werden.

Nach Korrelation der immunhistochemischen Ergebnisse mit dem Therapieabstand konnte erstmals gezeigt werden, dass es sich bei dem Verlust der CD20-Positivität um ein zeitabhängiges Phänomen handelt, das am häufigsten innerhalb von drei Monaten nach Rituximab-Therapie auftritt. Dies stützt die These einer transienten Downmodulation von CD20, wobei die Fälle mit relativem Positivitätsverlust einem Übergangsstadium entsprechen könnten. Um diese Theorie weiter zu untermauern, wäre die Untersuchung sequentieller Biopsien solcher Fälle interessant.

In einem zweiten Teil wurde im Zuge dieser Arbeit die Ursache des immunhistochemischen Verlustes der CD20-Positivität systematisch untersucht. Hierfür wurden, soweit möglich, anhand des Patientenmaterials sowie anhand geeigneter Zelllinien drei Thesen überprüft:

Dabei ergab sich nach immunhistochemischer Austestung eines Anti-Rituximab-Antikörpers in Übereinstimmung mit der Literatur kein Hinweis für eine ursächliche Maskierung des CD20-Bindungsepitop durch Rituximab selbst.

Zweitens wurde untersucht, ob es infolge verminderter Transkription mit entsprechender Downmodulation der CD20-mRNA zu einer verminderten CD20-Proteinexpression kommt. Da diese Frage anhand des Patientenmaterials nicht hinreichend beantwortet werden konnte, wurde ein standardisiertes Modell entwickelt, mit dessen Hilfe die Auswirkung von Rituximab auf die CD20-Genexpression von NCEB-Zellen analysiert werden konnte. Selbst bei einer Expositionsdauer von bis zu vier Wochen zeigte sich mittels RT-q-PCR auch in Gegenwart von aktivem Komplement kein durch Rituximab vermittelter Expressionsverlust des CD20-Antigens. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem aktuellen Stand der Literatur, nachdem es selbst unter extremem Selektionsdruck nur zu geringeren Modulationen auf translationaler Ebene zu kommen scheint.

Schließlich wurde die These einer ursächlichen Modulation des CD20-Moleküls auf Proteinebene aufgegriffen und untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen dem Verlust der CD20-Positivität und der Translokation von CD20 in *lipid rafts* besteht. Hierfür wurden verschiedene B-NHL-Zelllinien sowie Primärzellen von B-CLL-Patienten entweder mit Rituximab oder B1 behandelt und der CD20-Proteingehalt anschließend mittels Western-Blot analysiert. Nach Rituximab-Inkubation zeigte sich eine deutliche Reduktion der detektierbaren CD20-Proteinmenge. Da die Inkubation mit B1 nicht zu einer Veränderung der CD20-Detektion führte, ist anzunehmen, dass die CD20-Downregulation auf die Translokation des CD20-Rezeptors in *lipid rafts* und eine damit verbundene Konformationsänderung des CD20-Membranproteins zurückzuführen ist.

Entsprechend sind Konformationsänderungen im Zusammenhang mit der Translokation von CD20 in *lipid rafts* infolge Rituximab-Bindung gemäß der vorliegenden Arbeit die wahrscheinlichste Ursache für den posttherapeutischen Verlust der immunhistochemischen CD20-Positivität.

## 7 Literaturverzeichnis

### Monographien:

1. Andreesen, R. & Heimpel, H. *Klinische Hämatologie*. 3rd ed. (Elsevier Urban & Fischer, München, 2009).
2. Batzler, W. U. *Krebs in Deutschland 2003 - 2004. Häufigkeiten und Trends*. 6th ed. (Robert Koch-Institut, Berlin, 2008).
3. Böcker, W., Heitz, P. U., Aguzzi, A. & Böcker-Denk-Heitz-Moch. *Pathologie*. 4th ed. (Elsevier Urban & Fischer, München, 2008).
4. Boenisch, T. & Henne, C. *Handbuch immunchemische Färbemethoden*. 3rd ed. (Hamburg, 2003).
5. Cragg, M. S., Walshe, C. A., Ivanov, A. O., Glennie M. The Biology of CD20 and Its Potential as a Target for mAb Therapy. In: Stohl, W. (Hrsg.): *B cell trophic factors and B cell antagonism in autoimmune disease*. (Karger, Basel [u.a.], 2005).
6. Eckert, W. A. & Kartenbeck, J. *Proteine. Standardmethoden der Molekular- und Zellbiologie : Präparation, Gelelektrophorese, Membrantransfer und Immundetektion* (Springer, Berlin, 1997).
7. Fauci, A. S. & Harrison, T. R. *Harrison's principles of internal medicine*. 17th ed. (McGraw-Hill Medical, New York, 2008).
8. Feller, A. C., Diebold, J. & Paulli, M. *Histopathology of nodal and extranodal non-Hodgkin's lymphomas*. 3rd ed. (Springer, Berlin, 2004).
9. Ferry, J. A. & Harris, N. L. *Atlas of lymphoid hyperplasia and lymphoma* (Saunders, Philadelphia, 1997).
10. Fletcher, C. D. M. *Diagnostic histopathology of tumors*. 3rd ed. (Churchill Livingstone, London, 2007).
11. Ganten, D. & Alves, F. *Molekularmedizinische Grundlagen von hämatologischen Neoplasien. Mit 62 Tabellen* (Springer, Berlin [u.a.], 2003).
12. Hiddemann, W. & Anagnostopoulos, I. *Lymphome. Neue Erkenntnisse und Therapiestrategien; 68 Tabellen* (Thieme, Stuttgart [u.a.], 2005).
13. Huber, C., Rammensee, H.-G., Wölfel, T. & Britten, C. M., (Hrsg.). *Krebsimmuntherapien. Standards und Innovationen* (Dt. Ärzte-Verl., Köln, 2008).
14. Jaffe, E. S., Harris, N. L., Stein, H. & Vardiman, J. W. *World Health Organization Classification of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues* (IARC Press, Lyon, Frankreich, 2008).
15. Pezzutto, A., Ulrichs, T. & Burmester, G.-R. *Taschenatlas der Immunologie. Grundlagen, Labor, Klinik*. 2nd ed. (Thieme, Stuttgart, 2007).
16. Preiß, J., Dornoff, W., Hagmann, F. G. & Schmieder, A. *Taschenbuch Onkologie. Interdisziplinäre Empfehlungen zur Therapie 2010/2011*. 15th ed. (Zuckschwerdt, Germering, 2010).
17. Robert-Koch-Institut (Hrsg). *Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Entwicklung der Prävalenz zwischen 1990 und 2010*, 2010.
18. Robert-Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). *Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends*. 7. Ausgabe, 2010.
19. Wehling, M. & Diener, H.-C. *Klinische Pharmakologie. 256 Tabellen; für das Querschnittsfach nach neuer AO* (Thieme, Stuttgart, 2005).

Zeitschriftenartikel:

1. Alas, S. & Bonavida, B.; Rituximab Inactivates Signal Transducer and Activation of Transcription 3 (STAT3) Activity in B-Non-Hodgkin's Lymphoma through Inhibition of the Interleukin 10 Autocrine/Paracrine Loop and Results in Down-Regulation of Bcl-2 and Sensitization to Cytotoxic Drugs, *Cancer Res* **13**, 5137–5144, (2001).
2. Alvaro-Naranjo, T., Jaén-Martínez, J., Gumá-Padró, J., Bosch-Príncipe, R. & Salvadó-Usach, M. T.; CD20-negative DLBCL transformation after rituximab treatment in follicular lymphoma: a new case report and review of the literature, *Ann Hematol* **9**, 585–588, (2003).
3. Anolik, J., Looney, R. J., Bottaro, A., Sanz, I. & Young, F.; Down-regulation of CD20 on B cells upon CD40 activation, *Eur J Immunol* **9**, 2398–2409, (2003).
4. Beers, S. A., French, R. R., Chan, H. T., Vidal, W. S., Dixon, S. V., Cox, K. L. & Johnston, D. A.; Antigenic modulation limits the efficacy of anti-CD20 antibodies: implications for antibody selection, *Blood* **25**, 5191–5201, (2010).
5. Beum, P. V., Kennedy, A. D., Williams, M. E., Lindorfer, M. A. & Taylor, R. P.; The shaving reaction: rituximab/CD20 complexes are removed from mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia cells by THP-1 monocytes, *J Immunol* **4**, 2600–2609, (2006).
6. Beum, P. V., Lindorfer, M. A., Beurskens, F., Stukenberg, P. T., Lokhorst, H. M., Pawluczkwycz, A. W., Parren, P. W., van Winkel, J. G. & Taylor, R. P.; Complement Activation on B Lymphocytes Opsonized with Rituximab or Ofatumumab Produces Substantial Changes in Membrane Structure Preceding Cell Lysis, *J Immunol* **1**, 822–832, (2008).
7. Bonavida, B.; Rituximab-induced inhibition of antiapoptotic cell survival pathways: implications in chemo/immunosensitivity, rituximab unresponsiveness, prognostic and novel therapeutic interventions, *Oncogene* **25**, 3629–3636, (2007).
8. Bosch, F., Jares, P., Campo, E., Lopez-Guillermo, A., Piris, M. A., Villamor, N., Tassies, D., Jaffe, E.S., Montserrat, E. & Rozman, C.; PRAD-1/cyclin D1 gene overexpression in chronic lymphoproliferative disorders: a highly specific marker of mantle cell lymphoma, *Blood* **8**, 2726–2732, (1994).
9. Brown, D. A. & London, E.; Functions of lipid rafts in biological membranes, *Annu Rev Cell Dev Biol* **1**, 111–136, (1998).
10. Burnette, W. N.; "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A, *Anal Biochem* **2**, 195–203, (1981).
11. Buske, C. Hoster, E., Dereyling, M., Hasford, J., Unterhalt, M. & Hiddemann, W.; The Follicular Lymphoma International Prognostic Index (FLIPI) separates high-risk from intermediate- or low-risk patients with advanced-stage follicular lymphoma treated front-line with rituximab and the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (R-CHOP) with respect to treatment outcome, *Blood* **5**, 1504–1508, (2006).
12. Chadburn, A. & Knowles, D. M.; Paraffin-resistant antigens detectable by antibodies L26 and polyclonal CD3 predict the B-or T-cell lineage of 95% of diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphomas, *Am J Clin Pathol* **3**, 284–291, (1994).
13. Cheson, B. D. & Leonard, J. P.; Monoclonal Antibody Therapy for B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma, *N Engl J Med* **6**, 613–626, (2008).
14. Cheson, B. D.; Ofatumumab, a Novel Anti-CD20 Monoclonal Antibody for the Treatment of B-Cell Malignancies, *J Clin Oncol* **21**, 3525–3530, (2010).
15. Chu, P. G. & Arber, D. A.; CD79: A Review, *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **2**, 97–106, (2001).



16. Chu, P. G., Chen, Y.-Y., Molina, A., Arber, D. A. & Weiss, L. M.; Recurrent B-cell neoplasms after Rituximab therapy: an immunophenotypic and genotypic study, *Leuk Lymphoma* **12**, 2335–2341, (2002).
17. Chu, P. G., Loera, S., Huang, Q. & Weiss, L. M.; Lineage determination of CD20- B-Cell neoplasms: an immunohistochemical study, *Am J Clin Pathol* **4**, 534–544, (2006).
18. Clynes, R. A., Towers, T. L., Presta, L. G. & Ravetch, J. V.; Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets, *Nat Med* **4**, 443–446, (2000).
19. Coad, J. E., Olson, D. J., Lander, T. A. & McGlennen, R. C.; Molecular assessment of clonality in lymphoproliferative disorders: I. Immunoglobulin gene rearrangements, *Molecular Diagnosis* **4**, 335–355, (1996).
20. Coiffier, B., Haioun, C., Ketterer, N., Engert, A., Tilly, H., Ma, D., Johnson, P., Lister, A., Buske, M., F., Radford, J.A., Capdeville, R., Diehl, V. & Reyes, F.; Rituximab (Anti-CD20 Monoclonal Antibody) for the Treatment of Patients With Relapsing or Refractory Aggressive Lymphoma: A Multicenter Phase II Study, *Blood* **6**, 1927–1932, (1998).
21. Coiffier, B., Lepage, E., Briere, J., Herbrecht, R., Tilly, H. Bouabdallah, R., Morel, P., van Den Neste, E., Salles, G., Gaulard, P., Reyes, F., Lederlin, P. & Gisselbrecht, C.; CHOP Chemotherapy plus Rituximab Compared with CHOP Alone in Elderly Patients with Diffuse Large-B-Cell Lymphoma, *N Engl J Med* **4**, 235–242, (2002).
22. Coiffier, B., Lepretre, S., Pedersen, L. M., Gadeberg, O., Fredriksen, H., van Oers, M. H., Wooldridge, J., Kloczko, J., Holowiecki, J., Hellmann, A., Walewski, J., Flensburg, M., Petersen, J. & Robak, T.; Safety and efficacy of ofatumumab, a fully human monoclonal anti-CD20 antibody, in patients with relapsed or refractory B-cell chronic lymphocytic leukemia: a phase 1-2 study, *Blood* **3**, 1094–1100, (2008).
23. Cragg, M. S., Morgan, S. M., Chan, H. T., Morgan, B. P., Filatov, A. V., Johnson, P. W., French, R. R. & Glennie, M. J.; Complement-mediated lysis by anti-CD20 mAb correlates with segregation into lipid rafts, *Blood* **3**, 1045–1052, (2003).
24. Cragg, M. S.; CD20 antibodies: doing the time warp, *Blood* **2**, 219–220, (2011).
25. Cvetković, R. S. & Perry, C. M.; Rituximab: a review of its use in non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia, *Drugs* **6**, 791–820, (2006).
26. Czuczman, M. S., Olejniczak, S., Gowda, A., Kotowski, A., Binder, A., Kaur, H., Knight, J., Starostik, P., Deans, J. & Hernandez-Ilizaliturri, F. J.; Acquirement of Rituximab Resistance in Lymphoma Cell Lines Is Associated with Both Global CD20 Gene and Protein Down-Regulation Regulated at the Pretranscriptional and Posttranscriptional Levels, *Clin Cancer Res* **5**, 1561–1570, (2008).
27. Davis, T. A., Czerwinski, D. K. & Levy, R.; Therapy of B-cell lymphoma with anti-CD20 antibodies can result in the loss of CD20 antigen expression, *Clin Cancer Res* **3**, 611–615, (1999).
28. Davis, T. A., Grillo-Lopez, A. J., White, C. A., McLaughlin, P., Czuczman, M. S., Link, B. K., Maloney, D. G., Weaver, R. L., Rosenberg, J. & Levy, R.; Rituximab Anti-CD20 Monoclonal Antibody Therapy in Non-Hodgkin's Lymphoma: Safety and Efficacy of Re-Treatment, *J Clin Oncol* **17**, 3135–3143, (2000).
29. Deans, J. P., Li, H. & Polyak, M. J.; CD20-mediated apoptosis: signalling through lipid rafts, *Immunology* **107** (2), 176–182, (2002).
30. Deans, J. P., Robbins, S. M., Polyak, M. J. & Savage, J. A.; Rapid Redistribution of CD20 to a Low Density Detergent-insoluble Membrane Compartment, *J Biol Chem* **1**, 344–348, (1998).
31. Dinges, H. P., Denk, H., Reiner, A. & Würtz, F. G.; Immunhistochemie, *ÖGP Qualitätsstandards in der Pathologie*, (2002).

32. Dong, H. Y., Browne, P., Liu, Z. & Gangi, M.; PAX-5 is invariably expressed in B-cell lymphomas without plasma cell differentiation, *Histopathology* **3**, 278–287, (2008).
33. Douglas, V. K., Gordon, L. I., Goolsby, C. L., White, C. A. & Peterson, L. C.; Lymphoid aggregates in bone marrow mimic residual lymphoma after rituximab therapy for non-Hodgkin lymphoma, *Am J Clin Pathol* **6**, 844–853, (1999).
34. Ehrlich, P.; On Immunity with Special Reference to Cell Life, *Proc Royal Soc London*, 424–448, (1900).
35. Eisenberg, R. & Looney, R. J.; The therapeutic potential of anti-CD20 "what do B-cells do?", *Clin Immunol* **3**, 207–213, (2005).
36. Emmert-Buck, M. R., Bonner, R. F., Smith, P. D., Chuaqui, R. F., Zhuang, Z., Goldstein, S. R., Weiss, R. A., Liotta, L. A.; Laser Capture Microdissection, *Science* **5289**, 998–1001, (1996).
37. Ernst, J. A., Li, H., Kim, H. S., Nakamura, G. R., Yansura, D. G. & Vandlen, R. L.; Isolation and Characterization of the B-Cell Marker CD20, *Biochemistry* **46**, 15150–15158, (2005).
38. Fanale, M. A. & Younes, A.; Monoclonal antibodies in the treatment of non-Hodgkin's lymphoma, *Drugs* **3**, 333–350, (2007).
39. Feldman, A. L. & Dogan, A.; Diagnostic uses of Pax5 immunohistochemistry, *Adv Anat Pathol* **5**, 323–334, (2007).
40. Fend, F. & Kremer, M.; Diagnosis and classification of malignant lymphoma and related entities in the bone marrow trephine biopsy, *Pathobiology* **2**, 133–143, (2007).
41. Fend, F., Kremer, M. & Quintanilla-Martinez, L.; Laser capture microdissection: methodical aspects and applications with emphasis on immuno-laser capture microdissection, *Pathobiology* **4-5**, 209–214, (2000).
42. Fend, F., Kremer, M., Specht, K. & Quintanilla-Martinez, L.; Laser Microdissection in Hematopathology, *Pathol Res Prac* **6**, 425–430, (2003).
43. Fend, F. & Raffeld, M.; Laser capture microdissection in pathology, *J Clin Pathol* **9**, 666–672, (2000).
44. Feugier, P., van Hoof, A., Sebban, C., Solal-Celigny, P., Bouabdallah, R., Ferme, C., Christian, B., Lepage, E., Tilly, H., Morschhauser, F., Gaulard, P., Salles, G., Bosly, A., Gisselbrecht, C., Reyes, F. & Coiffier, B.; Long-Term Results of the R-CHOP Study in the Treatment of Elderly Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma: A Study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte, *J Clin Oncol* **18**, 4117–4126, (2005).
45. Fink, L., Seeger, W., Ermert, L., Hanze, J., Stahl, U, Grimminger, F., Kummer, W. & Bohle, R. M.; Real-time quantitative RT-PCR after laser-assisted cell picking, *Nat Med* **11**, 1329–1333, (1998).
46. Fischer, M., Behr, T., Grünwald, F., Knapp, W. H. & Trümper, L.; Leitlinie für die Radioimmuntherapie des rezidivierenden oder refraktären CD20-positiven folliculären B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphoms, *Nuklearmedizin* **5**, 171–176, (2004).
47. Foran, J. M., Rohatiner, A. Z., Cunningham, D., Popescu, R. A., Solal-Celigny, P., Ghielmini, M., Coiffier, B., Johnson, P. W., Gisselbrecht, C., Reyes, F., Reyes, F., Radford, J. A., Bessell, E. M., Souleau, B., Benzohra, A. & Lister, T. A.; European Phase II Study of Rituximab (Chimeric Anti-CD20 Monoclonal Antibody) for Patients With Newly Diagnosed Mantle-Cell Lymphoma and Previously Treated Mantle-Cell Lymphoma, Immunocytoma, and Small B-Cell Lymphocytic Lymphoma, *J Clin Oncol* **2**, 317, (2000).
48. Foran, J. M., Norton, A. J., Micallef, I. N., Taussig, D. C., Amess, J. A., Rohatiner, A. Z. & Lister, T. A.; Loss of CD20 expression following treatment with rituximab (chimaeric monoclonal anti-CD20): a retrospective cohort analysis, *Br J Haematol* **4**, 881–883, (2001).

49. Forstpointner, R., Dreyling, M., Repp, R., Hermann, S., Hanel, A., Metzner, B., Pott, C., Hartmann, F., Rothmann, F., Rohrberg, R., Bock, H.-P., Wandt, H., Unterhalt, M. & Hiddemann, W.; The addition of rituximab to a combination of fludarabine, cyclophosphamide, mitoxantrone (FCM) significantly increases the response rate and prolongs survival as compared with FCM alone in patients with relapsed and refractory follicular and mantle cell lymphomas: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group, *Blood* **10**, 3064–3071, (2004).
50. Ghetie, M.-A., Bright, H. & Vitetta, E. S.; Homodimers but not monomers of Rituxan (chimeric anti-CD20) induce apoptosis in human B-lymphoma cells and synergize with a chemotherapeutic agent and an immunotoxin, *Blood* **5**, 1392–1398, (2001).
51. Ginzinger, D. G.; Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream, *Exp Hematol* **6**, 503–512, (2002).
52. Glennie, M. J., French, R. R., Cragg, M. S. & Taylor, R. P.; Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies, *Mol Immunol* **16**, 3823–3837, (2007).
53. Grillo-Lopez, A. J. & Kunkel L.; Correspondence re: T. Davis et al., Therapy of B-Cell Lymphoma with Anti-CD20 Antibodies Can Result in Loss of CD20 Antigen Expression. *Clin Cancer Res* **1**, 317–318, (2000).
54. Hagenbeek, A., Fayad, L., Delwail, V., Rossi, J. F., Jacobsen, E., Kuliczowski, K., Link, B. K., Pinter-Brown, L., Radford, J., Hellmann, A., Gallop-Evans, E., Gupta, Ira, Arning, M., Begtrup, K., Schultz, M., Bang, B., Russell, C. A. & Czuczman, M. S.; Evaluation of Ofatumumab, a Novel Human CD20 Monoclonal Antibody, as Single Agent Therapy in Rituximab-Refractory Follicular Lymphoma, *ASH Annual Meeting Abstracts* **22**, 935-, (2009).
55. Hagenbeek, A., Gadeberg, O., Johnson, P., Moller Pedersen, L., Walewski, J., Hellmann, A., Link, B. K., Robak, T., Wojtukiewicz, M., Pfreundschuh, M., Kneba, M., Engert, A., Sonneveld, P., Flensburg, M., Petersen, J., Losic, N. & Radford, J.; First clinical use of ofatumumab, a novel fully human anti-CD20 monoclonal antibody in relapsed or refractory follicular lymphoma: results of a phase 1/2 trial, *Blood* **12**, 5486–5495, (2008).
56. Haidar, J. H., Shamseddine, A., Salem, Z., Mrad, Y. A., Nasr, M. R., Zaatari, G. & Bazarbachi, A.; Loss of CD20 expression in relapsed lymphomas after rituximab therapy, *Eur J Haematol* **5**, 330–332, (2003).
57. Hainsworth, J. D., Litchy, S., Burris, H. A., Scullin, D. C., Corso, S. W., Yardley, D. A., Morrissey, L. & Greco, F. A.; Rituximab as First-Line and Maintenance Therapy for Patients With Indolent Non-Hodgkin's Lymphoma, *J Clin Oncol* **20**, 4261–4267, (2002).
58. Hainsworth, J. D., Litchy, S., Shaffer, D. W., van Lackey, L., Grimaldi, M. & Greco, F. A.; Maximizing Therapeutic Benefit of Rituximab: Maintenance Therapy Versus Re-Treatment at Progression in Patients With Indolent Non-Hodgkin's Lymphoma - A Randomized Phase II Trial of the Minnie Pearl Cancer Research Network, *J Clin Oncol* **6**, 1088–1095, (2005).
59. Herold, M., Haas, A., Srock, S., Nesper, S., Al-Ali, K. H., Neubauer, A., Dölken, G., Naumann, R., Knauf, W., Freund, M., Rohrberg, R., Höffken, K., Franke, A., Ittel, T., Kettner, E., Haak, U., Mey, U., Klinkenstein, C., Aßmann, M. & von Grünhagen, U.; Rituximab Added to First-Line Mitoxantrone, Chlorambucil, and Prednisolone Chemotherapy Followed by Interferon Maintenance Prolongs Survival in Patients With Advanced Follicular Lymphoma: An East German Study Group Hematology and Oncology Study, *J Clin Oncol* **15**, 1986–1992, (2007).
60. Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., & Watson, R.; Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions, *Biotechnology* **11**, 1026-1030, (1993).
61. Hiddemann, W., Kneba, M., Dreyling, M., Schmitz, N., Lengfelder, E., Schmits, R., Reiser, M., Metzner, B., Harder, H., Hegewisch-Becker, S., Fischer, T., Kropff, M., Reis, H.-E., Freund, M., Wörmann, B., Fuchs, R., Planker, M., Schimke, J., Eimermacher, H., Trümper, L., Aladaoud, A., Parwaresch, R. & Unterhalt, M.; Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP)

significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group, *Blood* **12**, 3725–3732, (2005).

62. Hilchey, S. P., Hyrien, O., Mosmann, T. R., Livingstone, A. M., Friedberg, J. W., Young, F., Fisher, R. I., Kelleher, R. J., Bankert, R. B. & Bernstein, S. H.; Rituximab immunotherapy results in the induction of a lymphoma idiotype-specific T-cell response in patients with follicular lymphoma: support for a "vaccinal effect" of rituximab, *Blood* **16**, 3809–3812, (2009).
63. Huhn, D., von Schilling, C., Wilhelm, M., Ho, A. D., Hallek, M., Kuse, R., Knauf, W., Riedel, U., Hinke, A., Srock, S., Serke, S., Peschel, C. & Emmerich, B.; Rituximab therapy of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia, *Blood* **5**, 1326–1331, (2001).
64. Iacona, I., Lazzarino, M., Avanzini, M. A., Rupolo, M., Arcaini, L., Astori, C., Lunghi, F., Orlandi, E., Morra, E., Zagonel, V. & Regazzi, M. B.; Rituximab (IDEC-C2B8): Validation of a Sensitive Enzyme-Linked Immunoassay Applied to a Clinical Pharmacokinetic Study, *Ther Drug Monit* **3**, 295–301, (2000).
65. Jak, M., van Bochove, G. G. W., van Lier, R. A. W., Eldering, E. & van Oers, M. H. J.; CD40 stimulation sensitizes CLL cells to rituximab-induced cell death, *Leukemia*, 1-11, (2011).
66. Janas, E., Priest, R., Wilde, J. I., White, J. H. & Malhotra, R.; Rituxan (anti-CD20 antibody)-induced translocation of CD20 into lipid rafts is crucial for calcium influx and apoptosis, *Clin Exp Immunol* **3**, 439–446, (2005).
67. Janas, E., Priest, R. & Malhotra, R.; Functional role of lipid rafts in CD20 activity?, *Biochem Soc Symp* **72**, 165–175, (2005).
68. Jaglowski, S. M., Alinari, L., Lapalombella, R., Muthusamy, N. & Byrd, J. C.; The clinical application of monoclonal antibodies in chronic lymphocytic leukemia, *Blood* **19**, 3705–3714, (2010).
69. Jazirehi, A. R. & Bonavida, B.; Cellular and molecular signal transduction pathways modulated by rituximab (rituxan, anti-CD20 mAb) in non-Hodgkin's lymphoma: implications in chemosensitization and therapeutic intervention, *Oncogene* **13**, 2121–2143, (2005).
70. Jazirehi, A. R., Vega, M. I. & Bonavida, B.; Development of rituximab-resistant lymphoma clones with altered cell signaling and cross-resistance to chemotherapy, *Cancer Res* **3**, 1270–1281, (2007).
71. Jilani, I., O'Brien, S., Manshuri, T., Thomas, D. A., Thomazy, V. A., Imam, M., Naeem, Sana, Verstovsek, S., Kantarjian, H., Giles, F., Keating, M. & Albitar, M.; Transient down-modulation of CD20 by rituximab in patients with chronic lymphocytic leukemia, *Blood* **10**, 3514–3520, (2003).
72. Johnson, N. A., Boyle, M., Bashashati, A., Leach, S., Brooks-Wilson, A., Sehn, L. H., Chhanabhai, M., Brinkman, R. R., Connors, J. M., Weng, A. P. & Gascoyne, R. D.; Diffuse large B-cell lymphoma: reduced CD20 expression is associated with an inferior survival, *Blood* **16**, 3773–3780, (2009).
73. Johnson, N. A., Leach, S., Woolcock, B., deLeeuw, R. J., Bashashati, A., Sehn, L. H., Connors, J. M., Chhanabhai, M., Brooks-Wilson, A. & Gascoyne, R. D.; CD20 mutations involving the rituximab epitope are rare in diffuse large B-cell lymphomas and are not a significant cause of R-CHOP failure, *Haematologica* **3**, 423–427, (2009).
74. Kennedy, A. D., Beum, P. V., Solga, M. D., DiLillo, D. J., Lindorfer, M. A., Hess, C. E., Densmore, J. J., Williams, M. E. & Taylor, R. P.; Rituximab Infusion Promotes Rapid Complement Depletion and Acute CD20 Loss in Chronic Lymphocytic Leukemia, *J Immunol* **5**, 3280–3288, (2004).
75. Kennedy, G. A., Tey, S.-K., Cobcroft, R., Marlton, P., Cull, G., Grimmett, K., Thomson, D. & Gill, D.; Incidence and nature of CD20-negative relapses following rituximab therapy in

- aggressive B-cell non-Hodgkin's lymphoma: a retrospective review, *Br J Haematol* **2**, 412–416, (2002).
76. Kinoshita, T., Nagai, H., Murate, T. & Saito, H.; CD20-negative relapse in B-cell lymphoma after treatment with Rituximab, *J Clin Oncol* **12**, 3916a, (1998).
  77. Koch, I., Slotta-Huspenina, J., Hollweck, R., Anastasov, N., Hoefler, H., Quintanilla-Martinez, L. & Fend, F.; Real-time quantitative RT-PCR shows variable, assay-dependent sensitivity to formalin fixation: implications for direct comparison of transcript levels in paraffin-embedded tissues, *Diagn Mol Pathol* **3**, 149–156, (2006).
  78. Köhler, G. & Milstein, C.; Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature* **5517**, 495–497, (1975).
  79. Kremer, M., Cabras, A. D., Fend, F., Schulz, S., Schwarz, K., Hoefler, H. & Werner, M.; PCR analysis of IgH-gene rearrangements in small lymphoid infiltrates microdissected from sections of paraffin-embedded bone marrow biopsy specimens, *Hum Pathol* **7**, 847–853, (2000).
  80. Kremer, M., Horn, T., Koch, I., Dechow, T., Gattenloehner, S., Pfeiffer, W., Quintanilla-Martinez, L. & Fend, F.; Quantitation of the JAK2V617F mutation in microdissected bone marrow trephines: equal mutational load in myeloid lineages and rare involvement of lymphoid cells, *Am J Surg Pathol* **6**, 928–935, (2008).
  81. Kremer, M., Quintanilla-Martinez, L., Nahrig, J., Schilling, C. von & Fend, F.; Immunohistochemistry in bone marrow pathology: a useful adjunct for morphologic diagnosis, *Virchows Arch* **6**, 920–937, (2005).
  82. Laemmli, U. K.; Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature* **5259**, 680–685, (1970).
  83. Laurent, C., de Paiva, G. R., Ysebaert, L., Laurent, G., March, M., Delsol, G. & Brousset, P.; Characterization of bone marrow lymphoid infiltrates after immunochemotherapy for follicular lymphoma, *Am J Clin Pathol* **6**, 974–980, (2007).
  84. Lemery, S. J., Zhang, J., Rothmann, M. D., Yang, J., Earp, J., Zhao, H., McDougal, A., Pilaro, A., Chiang, R., Gootenberg, J. E., Keegan, P. & Pazdur, R.; U.S. Food and Drug Administration Approval: Ofatumumab for the Treatment of Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia Refractory to Fludarabine and Alemtuzumab, *Clin Cancer Res* **17**, 4331–4338, (2010).
  85. Lenz, G., Dreyling, M., Hoster, E., Wörmann, B. Dührsen, U., Metzner, B., Eimermacher, H., Neubauer, A., Wandt, H., Steinhauer, H., Martin, S., Heidemann, E., Aldaoud, A., Parwaresch, R. Hasford, J., Unterhalt, M. & Hiddemann, W.; Immunochemotherapy With Rituximab and Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone Significantly Improves Response and Time to Treatment Failure, But Not Long-Term Outcome in Patients With Previously Untreated Mantle Cell Lymphoma: Results of a Prospective Randomized Trial of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG), *J Clin Oncol* **9**, 1984–1992, (2005).
  86. Li, H., Ayer, L. M., Lytton, J. & Deans, J. P.; Store-operated cation entry mediated by CD20 in membrane rafts, *J Biol Chem* **43**, 42427–42434, (2003).
  87. Lim, S. H., Beers, S. A., French, R. R., Johnson, P. W., Glennie, M. J. & Cragg, M. S.; Anti-CD20 monoclonal antibodies: historical and future perspectives, *Haematologica* **1**, 135–143, (2010).
  88. Linke, B., Bolz, I., Fayyazi, A., von Hofen, M., Pott, C., Bertram, J., Hiddemann, W. & Kneba, M.; Automated high resolution PCR fragment analysis for identification of clonally rearranged immunoglobulin heavy chain genes, *Leukemia* **7**, 1055–1062, (1997).

89. Manches, O., Lui, G., Chaperot, L., Grerssin, R., Molens, J.-P., Jacob, M.-C., Sotto, J.-J., Leroux, D., Bensa, J.-C. & Plumas, J.; In vitro mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas, *Blood* **3**, 949–954, (2003).
90. Marcus, R., Imrie, K., Solal-Celigny, P., Catalano, J. V., Dmoszynska, A., Raposo, J. C., Offner, F. C., Gomez-Codina, J., Belch, A., Cunningham, D., Wassner-Fritsch, E. & Stein, G.; Phase III Study of R-CVP Compared With Cyclophosphamide, Vincristine, and Prednisone Alone in Patients With Previously Untreated Advanced Follicular Lymphoma, *J Clin Oncol* **28**, 4579–4586, (2008).
91. Mason, D. Y., Comans-Bitter, W. M., Cordell, J. L., Verhoeven, M. A. & van Dongen, J. J.; Antibody L26 recognizes an intracellular epitope on the B-cell-associated CD20 antigen, *Am J Pathol* **6**, 1215–1222, (1990).
92. McKelvey, E. M., Gottlieb, J. A., Wilson, H. E., Haut, A., Talley, R. W., Stephens, R., Lane, M., Gamble, J. F., Jones, S. E., Grozea, P. N., Gutterman, J., Coltman, C. & Moon, T. E.; Hydroxydaunomycin (adriamycin) combination chemotherapy in malignant lymphoma, *Cancer* **4**, 1484–1493, (1976).
93. McLaughlin, P., Grillo-Lopez, A. J., Link, B. K., Levy, R., Czuczman, M. S., Williams, M. E., Heyman, Bence-Bruckler, I., White, C. A., Cabanillas, F., Jain, V., Ho, A. D., Lister, J., Wey, K., Shen, D. & Dallaire, B. K.; Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program, *J Clin Oncol* **8**, 2825–2833, (1998).
94. Meeker, T., Lowder, J., Cleary, M. L., Stewart, S., Warnke, R., Sklar, J. & Levy, R.; Emergence of Idiotype Variants during Treatment of B-Cell Lymphoma with Anti-Idiotype Antibodies, *N Engl J Med* **26**, 1658–1665, (1985).
95. Meyer zum Büschenfelde, C., Feuerstacke, Y., Gotze, K. S., Scholze, K. & Peschel, C.; GM1 Expression of Non-Hodgkin's Lymphoma Determines Susceptibility to Rituximab Treatment, *Cancer Res* **13**, 5414–5422, (2008).
96. Murray, G. I.; An overview of laser microdissection technologies, *Acta Histochem* **3**, 171–176, (2007).
97. Nadler, L. M., Ritz, J., Hardy, R., Pesando, J. M., Schlossman, S. F. & Stashenko, P.; A unique cell surface antigen identifying lymphoid malignancies of B cell origin, *J Clin Invest* **1**, 134–140, (1981).
98. Nadler, L. M., Stashenko, P., Hardy, R., Kaplan, W. D., Button, L. N., Kufe, D. W., Antman, K. H. & Schlossman, S. F.; Serotherapy of a Patient with a Monoclonal Antibody Directed against a Human Lymphoma-associated Antigen, *Cancer Res* **9**, 3147–3154, (1980).
99. Niederfellner, G., Lammens, A., Mundigl, O., Georges, G. J., Schaefer, W., Schwaiger, M., Franke, A., Wiechmann, K., Jenewein, S., Sloodstra, J. W., Timmerman, P., Brännström, A., Lindtrom, F., Mössner, E., Umana, P., Hopfner, K.-P. & Klein, C.; Epitope characterization and crystal structure of GA101 provide insights into the molecular basis for type I/II distinction of CD20 antibodies, *Blood* **2**, 358–367, (2011).
100. Ohno, T., Sakamoto, T., Mizumoto, C., Miyoshi, T., Ueda, M., Takeoka, T., Yamashita, K., Hishita, T. & Hada, S.; Leukemic and meningeal relapse of CD5+ intravascular large B-cell lymphoma with down-modulation of CD20 after rituximab therapy, *Int J Hematol* **1**, 74–78, (2006).
101. O'Keefe, T. L., Williams, G. T., Davies, S. L. & Neuberger, M. S.; Mice carrying a CD20 gene disruption, *Immunogenetics* **2**, 125–132, (1998).
102. Osterborg, A., Kipps, T. J., Mayer, J., Stilgenbauer, S., Williams, C. D., Hellmen, A., Robak, T., Furman, R. R., Hillmen, P., Trneny, M., Dyer, M. J. S., Padmanabhan, S., Kozak, T., Chan, G., Davis, R. L., Losic, N., Russell, C. A., Piotrowska, M., Wilms, J. & Wierda, W. G.; Ofatumumab (HuMax-CD20), a Novel CD20 Monoclonal Antibody, Is An Active Treatment for Patients with CLL Refractory to Both Fludarabine and Alemtuzumab or Bulky Fludarabine-

- Refractory Disease: Results from the Planned Interim Analysis of An International Pivotal Trial, *ASH Annual Meeting Abstracts* **11**, 328-, (2008).
103. Pfreundschuh, M., Trümper, L., Österborg, A., Pettengell, R., Trneny, M., Imrie, K., Ma, D., Gill, D., Walewski, J., Zinzani, P.-L., Stahel, R., Kvaloy, S., Shipilberg, O., Jaeger, U., Hansen, M., Lehtinen, T., Lòpez-Guillermo, A., Corrado, C., Scheliga, A., Milpied, N., Mendila, M., Rashford, M., Kuhnt, E. & Loeffler, M.; CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: a randomised controlled trial by the MabThera International Trial (MInT) Group, *Lancet Oncol* **5**, 379–391, (2006).
  104. Pickartz, T., Ringel, F., Wedde, M., Renz, H., Klein, A., von Neuhoff, N., Dreger, P., Kreuzer, K. A., Schmidt, C. A., Srock, S., Schoeler, D. & Schriever, F.; Selection of B-cell chronic lymphocytic leukemia cell variants by therapy with anti-CD20 monoclonal antibody rituximab, *Exp Hematol* **12**, 1410–1416, (2001).
  105. Pijuan, L., Vicioso, L., Bellosillo, B., Ferrer, M. D., Baró, T., Pedro, C., Lloreta-Trull, J., Munné, A. & Serrano, S.; CD20-negative T-cell-rich B-cell lymphoma as a progression of a nodular lymphocyte-predominant Hodgkin's lymphoma treated with rituximab: a molecular analysis using laser capture microdissection, *Am J Surg Pathol* **10**, 1399–1403, (2005).
  106. Plosker, G. L. & Figgitt, D. P.; Rituximab: a review of its use in non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia, *Drugs* **8**, 803–843, (2003).
  107. Polyak, M. J., Taylor, S. H. & Deans, J. P.; Identification of a Cytoplasmic Region of CD20 Required for Its Redistribution to a Detergent-Insoluble Membrane Compartment, *J Immunol* **7**, 3242–3248, (1998).
  108. Press, O. W., Appelbaum, F., Ledbetter, J. A., Martin, P. J., Zarling, J., Kidd, P. & Thomas, E. D.; Monoclonal antibody 1F5 (anti-CD20) serotherapy of human B cell lymphomas, *Blood* **2**, 584–591, (1987).
  109. Press, O. W., Farr, A. G., Borroz, K. I., Anderson, S. K. & Martin, P. J.; Endocytosis and Degradation of Monoclonal Antibodies Targeting Human B-Cell Malignancies, *Cancer Res* **17**, 4906–4912, (1989).
  110. Press, O. W., Howell-Clark, J., Anderson, S. & Bernstein, I.; Retention of B-cell-specific monoclonal antibodies by human lymphoma cells, *Blood* **5**, 1390–1397, (1994).
  111. Raynaud, P., Caulet-Maugendre, S., Foussard, C., Salles, G., Moreau, A., Rossi, J. F., Patey, M., Rousselet, M. C., Bene, M. C., Damotte, D., Cornillet Lefebvre, P., Martin, A., Costes, V. & GOELAMS group.; T-cell lymphoid aggregates in bone marrow after rituximab therapy for B-cell follicular lymphoma: a marker of therapeutic efficacy?, *Hum Pathol* **2**, 194–200, (2008).
  112. Rimokh, R., Berger, F., Delsol, G., Charrin, C., Bertheas, M. F., Ffrench, M., Garoscio, M., Felman, P., Coiffier, B. & Bryon, P. A.; Rearrangement and overexpression of the BCL-1/PRAD-1 gene in intermediate lymphocytic lymphomas and in t(11q13)-bearing leukemias, *Blood* **11**, 3063–3067, (1993).
  113. Scheidhauer, K., Wolf, I., Baumgartl, H.-J., von Schilling, C., Schmidt, B., Reidel, G., Peschel, C. & Schwaiger, M.; Biodistribution and kinetics of 131I-labelled anti-CD20 MAB IDEC-C2B8 (rituximab) in relapsed non-Hodgkin's lymphoma, *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **10**, 1276–1282, (2002).
  114. Schmitz, K., Brugger, W., Weiss, B., Kaiserling, E. & Kanz, L.; Clonal Selection of CD20-negative Non-Hodgkin's Lymphoma Cells after Treatment with Anti-CD20 Antibody Rituximab, *Br J Haematol* **2**, 571–572, (1999).
  115. Schulz, H., Bohlius, J., Skoetz, N., Trelle, S., Kober, T., Reiser, M., Dreyling, M., Herold, M., Schwarzer, G., Hallek, M. & Engert, A.; Chemotherapy plus Rituximab versus chemotherapy alone for B-cell non-Hodgkin's lymphoma, *Cochrane Database Syst Rev* **4**, (2007).

116. Segal, G. H., Jorgensen, T., Scott, M. & Braylan, R. C.; Optimal primer selection for clonality assessment by polymerase chain reaction analysis: II. Follicular lymphomas, *Hum Pathol* **12**, 1276–1282, (1994).
117. Seliem, R. M., Freeman, J. K., Steingart, R. H. & Hasserjian, R. P.; Immunophenotypic changes and clinical outcome in B-cell lymphomas treated with rituximab, *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **1**, 18–23, (2006).
118. Semac, I., Palomba, C., Kulangara, K., Klages, N., van Echten-Deckert, G., Borisch, B. & Hoessli, D. C.; Anti-CD20 Therapeutic Antibody Rituximab Modifies the Functional Organization of Rafts/Microdomains of B Lymphoma Cells, *Cancer Res* **2**, 534–540, (2003).
119. Shapiro, A. L., Viñuela, E. & Maizel, J. V.; Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels, *Biochem Biophys Res Commun* **5**, 815–820, (1967).
120. Simons, K. & Toomre, D.; Lipid rafts and signal transduction, *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 31–39, (2000).
121. Smith, M. R.; Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance, *Oncogene* **47**, 7359–7368, (2003).
122. Solal-Celigny, P., Roy, P., Colombat, P., White, J., Armitage, J. O., Arranz-Saez, R., Au, W. Y., Bellei, M., Brice, P., Caballero, D., Coiffier, B., Conde-Garcia, E., Doyen, C., Federico, M., Fisher, R. I., Garcia-Conde, J. F., Guglielmi, C., Hagenbeek, A., Haioun, C., LeBlanc, M., Lister, A. T., Lopez-Guillermo, A., McLaughlin, P., Milpied, N., Morel, P., Mounier, N., Proctor, S. J., Rohatiner, A., Smith, P., Soubeyran, P., Tilly, H., Vitolo, U., Zinzani, P.-L., Zucca, E. & Montserat, E.; Follicular Lymphoma International Prognostic Index, *Blood* **5**, 1258–1265, (2004).
123. Solal-Celigny, P., Salles, G. A., Brousse, N., Franchi-Rezgui, P., Soubeyran, P., Delwail, V., Deconick, E., Haioun, C., Foussard, C., Sebban, C., Tilly, H., Milpied, N.-J., Boue, F., Karsenti, J.-M., Lederlin, P., Najman, A., Thieblemont, C., Morschhauser, F., Berriot-Varoqueaux, N., Bergougnoux, L. & Colombat, P.; Single 4-Dose Rituximab Treatment for Low-Tumor Burden Follicular Lymphoma (FL): Survival Analyses with a Follow-Up (F/Up) of at Least 5 Years, *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* **11**, 585-, (2004).
124. Specht, K., Kremer, M., Müller, U., Dirnhofer, S., Rosemann, M., Höfler, H., Quintanilla-Martinez, L. & Fend, F.; Identification of cyclin D1 mRNA overexpression in B-cell neoplasias by real-time reverse transcription-PCR of microdissected paraffin sections, *Clin Cancer Res* **9**, 2902–2911, (2002).
125. Stern, M. & Herrmann, R.; Overview of monoclonal antibodies in cancer therapy: present and promise, *Crit Rev Oncol Hematol* **1**, 11–29, (2005).
126. Tam, C. S., O'Brien, S., Wierda, W., Kantarjian, H., Wen, S., Do, K.-A., Thomas, D., A., Cortes, J., Lerner, S. & Keating, M. J.; Long-term results of the fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab regimen as initial therapy of chronic lymphocytic leukemia, *Blood* **4**, 975–980, (2008).
127. Tedder, T. F. & Engel, P.; CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes, *Immunol Today* **9**, 450–454, (1994).
128. Tedder, T. F. & Schlossman, S. F.; Phosphorylation of the B1 (CD20) molecule by normal and malignant human B lymphocytes, *J Biol Chem* **20**, 10009–10015, (1988).
129. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Projekt; A Predictive Model for Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma, *N Engl J Med* **14**, 987–994, (1993).
130. Torlakovic, E., Torlakovic, G., Nguyen, P. L., Brunning, R. D. & Delabie, J.; The Value of Anti-Pax-5 Immunostaining in Routinely Fixed and Paraffin-Embedded Sections: A Novel Pan Pre-B and B-Cell Marker, *Am J Surg Pathol* **10**, 1343–1350, (2002).



131. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J.; Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc Natl Acad Sci U S A* **9**, 4350–4354, (1979).
132. Tsimberidou, A.-M., Keating, M. & Wierda, W.; Richter's transformation in chronic lymphocytic leukemia, *Curr Hematol Malign Rep* **4**, 265–271, (2007).
133. Uchida, J., Lee, Y., Hasegawa, M., Liang, Y., Bradney, A., Oliver, J. A., Bowen, K., Steeber, D. A., Douglas, A., Haas, K. M., Poe, J. C. & Tedder, T. F.; Mouse CD20 expression and function, *Int Immunol* **1**, 119–129, (2004).
134. Uchida, J., Hamaguchi, Y., Oliver, J. A., Ravetch, J. V., Poe, J. C., Haar, K. M. & Tedder, T. F.; The Innate Mononuclear Phagocyte Network Depletes B Lymphocytes through Fc Receptor-dependent Mechanisms during Anti-CD20 Antibody Immunotherapy, *J Exp Med* **12**, 1659–1669, (2004).
135. van Oers, M. H. J., Klasa, R., Marcus, R. E., Wolf, M., Kimby, E., Gascoyne, R. D., Jack, A., van't Veer, M., Vranovsky, A., Holte, H., van Glabbeke, M., Teodorovic, I., Rozewicz, C. & Hagenbeek, A.; Rituximab maintenance improves clinical outcome of relapsed/resistant follicular non-Hodgkin lymphoma in patients both with and without rituximab during induction: results of a prospective randomized phase 3 intergroup trial, *Blood* **10**, 3295–3301, (2006).
136. van Oers, M. H. J., van Glabbeke, M., Guirgea, L., Klasa, R., Marcus, R. E., Wolf, M., Kimby, E., van't Veer, M., Vranovsky, A., Holte, H. & Hagenbeek, A.; Rituximab Maintenance Treatment of Relapsed/Resistant Follicular Non-Hodgkin's Lymphoma: Long-Term Outcome of the EORTC 20981 Phase III Randomized Intergroup Study, *J Clin Oncol* **17**, 2853–2858, (2010).
137. Vega, M. I., Huerta-Yepe, S., Jazirehi, A. R., Garban, H. & Bonavida, B.; Rituximab (chimeric anti-CD20) sensitizes B-NHL cell lines to Fas-induced apoptosis, *Oncogene* **55**, 8114–8127, (2005).
138. Vervoordeldonk, S. F., Merle, P. A., van, L. E. F., von, d. B. A. & Slaper-Cortenbach, I. C.; Preclinical studies with radiolabeled monoclonal antibodies for treatment of patients with B-cell malignancies, *Cancer* **3 Suppl**, 1006–1011, (1994).
139. Vidal, L., Gafter-Gvili, A., Leibovici, L. & Shpilberg, O.; Rituximab as maintenance therapy for patients with follicular lymphoma, *Cochrane Database Syst Rev* **2**, (2009).
140. Vidal, L., Gafter-Gvili, A., Leibovici, L., Dreyling, M., Ghielmini, M., Hsu Schmitz, S.-F., Cohen, A. & Shpilberg, O.; Rituximab Maintenance for the Treatment of Patients With Follicular Lymphoma: Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Trials, *J Natl Cancer Inst* **4**, 248–255, (2009).
141. Vose, J. M., Link, B. K., Grossbard, M. L., Czuczman, M., Grillo-Lopez, A., Gilman, P., Lowe, A., Kunkel, L. A. & Fisher, R. I.; Phase II Study of Rituximab in Combination With CHOP Chemotherapy in Patients With Previously Untreated, Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma, *J Clin Oncol* **2**, 389–397, (2001).
142. Weng, W.-K. & Levy, R.; Two Immunoglobulin G Fragment C Receptor Polymorphisms Independently Predict Response to Rituximab in Patients With Follicular Lymphoma, *J Clin Oncol* **21**, 3940–3947, (2003).
143. Wierda, W. G., Kipps, T. J., Mayer, J., Stilgenbauer, S., Williams, C. D., Hellmann, A., Robak, T., Furman, R. R., Hillmen, P., Trneny, M., Dyer, M. J., Padmanabhan, S., Piotrowska, M., Kozak, T., Chan, G., Davis, R., Losic, N., Wilms, J., Russell, C. A. & Österborg, A.; Ofatumumab As Single-Agent CD20 Immunotherapy in Fludarabine-Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia, *J Clin Oncol* **10**, 1749–1755, (2010).
144. Winiarska, M., Bil, J., Wilczek, E., Grzegorz, M., Lekka, M., Engelberts, P. J., Mackus, W. J., Gorska, E., Bojarski, L., Stoklosa, T., Nowis, D., Kurzaj, Z., Makowski, M., Glodkowska, E., Issat, T., Mrowka, P., Lasek, W., Dabrowska-Iwanicka, A., Basak, G. W., Wasik, M., Warzocha, K., Sinski, M., Gaciong, Z., Jakobisiak, M., Parren, P. W. & Golab, J.; Statins

- Impair Antitumor Effects of Rituximab by Inducing Conformational Changes of CD20, *PLoS Med* **3**, (2008).
145. Wiseman, G. A., Gordon, L. I., Multani, P. S., Witzig, T. E., Spies, S., Bartlett, N. L., Schilder, R. J., Murray, J. L., Saleh, M., Allen, R. S., Grillo-Lopez, A. J. & White, C. A.; Ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy for patients with relapsed or refractory non-Hodgkin lymphoma and mild thrombocytopenia: a phase II multicenter trial, *Blood* **12**, 4336–4342, (2002).
  146. Witzig, T. E., Gordon, L. I., Cabanillas F., Czuczman, M. S., Emmanouilides, C., Joyce, R., Pohlman, B. L., Bartlett, N., L., Wiseman, G. A., Padre, N., Grillo-Lopez, A. J., Multani, P. & White, C. A.; Randomized Controlled Trial of Yttrium-90-Labeled Ibritumomab Tiuxetan Radioimmunotherapy Versus Rituximab Immunotherapy for Patients With Relapsed or Refractory Low-Grade, Follicular, or Transformed B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma, *J Clin Oncol* **10**, 2453–2463, (2002).
  147. Witzig, T. E., White, C. A., Wiseman, G. A., Gordon, L. I., Emmanouilides, C., Raubitschek, A., Janakiraman, N., Gutheil, J., Schilder, R. J., Spies, S. Silverman, D. H., Parker, E. & Grillo-Lopez, A. J.; Phase I/II Trial of IDEC-Y2B8 Radioimmunotherapy for Treatment of Relapsed or Refractory CD20+ B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma, *J Clin Oncol* **12**, 3793–3803, (1999).
  148. Witzig, T. E., Vukov, A. M., Habermann, T. M., Geyer, S., Kurtin, P. J., Friedenber, W. R., White, W. L., Chalchal, H. I., Flynn, P. J., Fitch, T. R. & Welker, D. A.; Rituximab Therapy for Patients With Newly Diagnosed, Advanced-Stage, Follicular Grade I Non-Hodgkin's Lymphoma: A Phase II Trial in the North Central Cancer Treatment Group, *J Clin Oncol* **6**, 1103–1108, (2005).
  149. Zhang, B. Ofatumumab, *MAbs* **4**, 326–331, (2009).
  150. Zukerberg, L. R., Yang, W. I., Arnold, A. & Harris, N. L.; Cyclin D1 expression in non-Hodgkin's lymphomas. Detection by immunohistochemistry, *Am J Clin Pathol* **6**, 756–760, (1995).

## 8 Anhang

**Tabelle 20:** Relative Menge an CD20-mRNA in NCEB-Zellen nach Kultur in fätalem Kälberserum (FCS) ohne und mit Rituximab (R) nach Kulturdauer in Tagen

Kulturdauer in Tagen	20% FCS	FCS + R	Differenz
0	1,08		
1	1,34	1,09	-0,24
2	1,13	0,75	-0,38
4	0,97	0,99	+0,02
7	1,03	0,76	-0,27
14	1,26	0,86	-0,40
21	0,99	0,80	-0,19
28	1,09	0,85	-0,25

**Tabelle 21:** Relative Menge an CD20-mRNA in NCEB-Zellen nach Kultur in Humanserum (HS) ohne und mit Rituximab (R) nach Kulturdauer in Tagen

Kulturdauer in Tagen	20% HS	HS + R	Differenz
1	0,08	1,16	+0,35
2	0,64	0,66	+0,02
4	1,04	0,64	-0,40
7	0,90	0,56	-0,35
14	0,57	0,68	+0,11
21	0,75	0,55	-0,20
28	1,26	0,82	-0,44



## 9 Dankvermerk

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Priv.-Doz. Dr. Marcus A. Kremer, für die intensive Betreuung und die zahlreichen Anregungen sowie Herrn Univ-Prof. Dr. Heinz K. Höfler für die Arbeitsmöglichkeiten am Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der TU München. Außerdem möchte ich Herrn Univ-Prof. Dr. Falko Fend, der mich vor seiner Berufung an das Universitätsklinikum Tübingen betreute, für die Vermittlung des interessanten Themas und die Unterstützung in der Initialphase der Arbeit meinen Dank aussprechen.

Desweiteren danke ich Herrn Priv.-Doz. Dr. Christian Meyer zum Büschenfelde und seiner Arbeitsgruppe, allen voran Yvonne Feuerstacke, für die Unterstützung bei der Akquise der klinischen Daten und bei der technischen Umsetzung sowie für die anregenden Diskussionen und die gute Kooperation.

Für ihre technische Unterstützung möchte ich zudem Ina Koch, Birgit Geist und Klara Fizi dankend erwähnen.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie und meinem Verlobten von Herzen für ihr Verständnis und ihre uneingeschränkte Unterstützung danken.