

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

III. Medizinische Klinik des Klinikum rechts der Isar
Schwerpunkt: Hämatologie und Internistische Onkologie
(Leitung: Univ.-Prof. Dr. Chr. Peschel)

Der Rituximab induzierte Zelltod-
Bedeutung der lipid rafts und Modulation durch Antimykotika vom
Azoltyp

Philipp Stefan Krainz

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. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. Chr. Meyer zum Büschenfelde
2. Univ.-Prof. Dr. M. Ebert (schriftliche Beurteilung)
2. Univ.-Prof. Dr. F. R. Greten (mündliche Prüfung)

Die Dissertation wurde am 01.09.2010 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 17.11.2010 angenommen.

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	IV
1. EINLEITUNG.....	1
1.1. Non Hodgkin Lymphome	1
1.1.1. Inzidenz und Ätiologie der Non Hodgkin Lymphome.....	1
1.1.2. Klassifikation der Non Hodgkin Lymphome	1
1.1.3. Therapie der Non Hodgkin Lymphome	2
1.2. Der monoklonale Antikörper Rituximab	3
1.2.1. Allgemeines und Entwicklung der monoklonalen Antikörper.....	3
1.2.2. Das CD20-Oberflächenantigen als Ziel einer Immuntherapie	4
1.2.3. Struktur und Wirkung des Antikörpers Rituximab	4
1.2.4. Klinischen Daten zur Therapie mit Rituximab	5
1.3. Mechanismen des Antikörper induzierten Zelltodes	7
1.3.1. Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC).....	8
1.3.2. Complement Dependent Cytotoxicity (CDC)	8
1.3.3. Der programmierte Zelltod -Apoptose	9
1.4. Lipid rafts.....	10
1.4.1. Entwicklung der Vorstellung biologischer Membranen	10
1.4.2. Funktionen der lipid rafts	11
1.4.3. Lipid rafts und Rituximab	11
1.5. Substanzen mit Einfluß auf die lipid rafts	12
1.5.1. Methyl- β -cyclodextrin (M β CD).....	12
1.5.2. Azol-Antimykotika.....	12
1.6. Zielsetzung	13
2. MATERIAL UND METHODEN	14
2.1. Material	14
2.1.1. Verwendete Geräte, Computer und Software	14

2.1.2.	Allgemeine Materialien und Verbrauchsmaterialien	15
2.1.3.	Chemikalien und Medikamente	16
2.1.4.	Zelllinien und Materialien für Zellkultur	17
2.1.5.	Spezielle Materialien.....	19
2.2.	Methoden.....	22
2.2.1.	Apoptose Nachweis mit der Annexin-V-FITC Färbung	22
2.2.2.	Dot Immunobinding Assay Blot	23
2.2.3.	Durchflußzytometrie (FACS).....	23
2.2.4.	Lipid rafts-Fraktionen	25
2.2.5.	Proteinbestimmung.....	26
2.2.6.	Western Blot.....	28
2.2.7.	Zellproliferationsassay MTS CellTiter 96® AQueous	31
2.2.8.	Zellen.....	32
3.	ERGEBNISSE	33
3.1.	Rituximab induzierter Zelltod	33
3.1.1.	Rituximab sensible und resistente Zelllinien	33
3.1.2.	CD20 - und GM-1-Expression dieser Zelllinien	36
3.1.3.	Wirkung von Rituximab über CDC und Apoptose	39
3.1.4.	Lipid rafts sind essentiell für die Wirkung von Rituximab.....	45
3.2.	Antimykotika vom Azoltyp und Rituximab.....	49
3.2.1.	Ermittlung nicht toxischer Konzentrationen der verwendeten Antimykotika	49
3.2.2.	CD20-Rekrutierung in lipid rafts wird durch Triazol-Antimykotika gehemmt... ..	51
3.2.3.	Die Wirkung von Rituximab wird durch Triazol- Antimykotika herabgesetzt	53
3.2.4.	Antimykotika hemmen die Rituximab vermittelte CDC und Apoptose	55
4.	DISKUSSION	58
4.1.	Rituximab induzierter Zelltod	58
4.1.1.	Expression von GM-1 korreliert mit Ansprechen auf Rituximab	62
4.1.2.	Die Rekrutierung von CD20 in lipid rafts ist essentiell für die therapeutische Wirkung von Rituximab.....	64
4.2.	Antimykotika vom Azoltyp modulieren den Effekt von Rituximab.....	66

4.2.1. Substanzen mit Einfluss auf die lipid rafts modulieren die Effizienz einer Antikörpertherapie	68
5. ZUSAMMENFASSUNG	71
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	72
LITERATURVERZEICHNIS	73
DANKSAGUNG	85

Abkürzungsverzeichnis

abs.	absolut
ADCC	Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity
Ak.	Antikörper
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CDC	Complement Dependent Cytotoxicity
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
et al.	et alii
FT.	Falcon Tube
h	Stunde/n
HI	Hitze inaktiviert
LP	Lysepuffer
Lsg.	Lösung
min	Minute/n
mol	molar
MTT	Zellproliferationstest mit Tetrazoliumbromid
neg.	negativ
NHI	Nicht Hitze inaktiviert
NHL	Non Hodgkin Lymphom
OD	Optical Density
pH	potentia Hydrogenii
PI	Propidium Iodid
pos.	positiv
pTyr	Phosphotyrosin
R.	Rituximab
RT.	Raumtemperatur
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
WB	Western Blot

1. Einleitung

1.1. Non Hodgkin Lymphome

1.1.1. Inzidenz und Ätiologie der Non Hodgkin Lymphome

Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) bilden eine heterogene Gruppe von Neoplasien des lymphatischen Gewebes, die vom B-oder T-Zell-System ausgehen. Diese werden als maligne Lymphome bezeichnet. Es werden Vorläufer- und reife Neoplasien des lymphatischen Systems unterschieden. Die malignen Lymphome gehören heute weltweit zu den zehn häufigsten malignen Erkrankungen und ihre Häufigkeit hat besonders in der westlichen Welt stark zugenommen ³¹. Dabei verdoppelte sich die Inzidenzrate und die Mortalitätsrate stieg um ca. 45 Prozent ³¹. Trotz intensiver Forschung und vieler verschiedener Studien ist die Ätiologie bislang nicht vollständig klar. Eine mögliche Ursache der frühen Tumorgenese stellen fehlerhafte Reaktionen lymphatischer Zellen gegen spezifische Antigene dar. Gesichert ist, dass das Risiko, ein NHL zu entwickeln, mit der Schwächung des Immunsystems ansteigt, wie bei Immunsuppression, nach Organtransplantation oder nach HIV-Infektion. Auch berufliche Exposition mit Chemikalien, wie Herbiziden oder organischen Lösungsmitteln, steigert das Risiko ⁵⁶. Weiter sind bestimmte Viren, wie z.B. das Epstein-Barr-Virus oder das humane T-cell-lymphoma-virus I (HLTV-1), wahrscheinlich für die Entwicklung bestimmter Lymphomentitäten mitverantwortlich ⁷⁷. In letzter Zeit konnten chromosomale Veränderungen (Mutationen), wie z.B. die Translokation des bcl-2 Gens (t14; 18), als wichtiger Faktor für die Entstehung vieler NHL identifiziert werden ⁸¹.

1.1.2. Klassifikation der Non Hodgkin Lymphome

Über Jahrzehnte standen sich konkurrierende und kaum vergleichbare Einteilungen der malignen Lymphome gegenüber, wobei die Kiel-Klassifikation im deutschsprachigen Europa und die „Working Formulation“ vornehmlich in den USA Anwendung fand. Anfang der 90er Jahre wurde eine internationale Klassifikation geschaffen, die sogenannte Revised-European-American-Lymphoma- (REAL-)Klassifikation. Hierbei wurden auch immunophänotypische und molekulargenetische Merkmale herangezogen ⁵³. Die REAL Klassifikation wurde durch ein internationales Pathologengremium aktualisiert und zum vierten Mal überarbeitet ¹³¹.

1.1.3. Therapie der Non Hodgkin Lymphome

Es gibt für die verschiedenen Formen der Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) eine Reihe von Behandlungsmethoden. Häufig wird eine Kombination verschiedener Therapien miteinander gewählt, um optimale Ergebnisse zu erzielen. Diese Kombinationen sind für jedes Lymphom unterschiedlich, so dass man nicht von einem generellen Standard in der Therapie der Non-Hodgkin-Lymphome sprechen kann. Es lassen sich jedoch zwei Gruppen voneinander abgrenzen, welche einen unterschiedlichen Krankheitsverlauf, eine andere Prognose und verschiedene Therapieansätze haben.

Therapie der indolenten oder niedrigmalignen Lymphome

Die indolenten Lymphome werden auch als niedrigmaligne Lymphome bezeichnet, wachsen langsam und nehmen einen chronischen Verlauf. Sie machen ca. 70% der Lymphome aus und sind morphologisch durch kleine reife Lymphozyten gekennzeichnet. Indolente Lymphome lassen sich durch eine Behandlung zurückdrängen, aber ein kurativer Ansatz ist selten. Nur die lokalisierten Stadien I, II und IIIA nach der modifizierten Ann-Arbor Klassifikation werden mit kurativer Intention bestrahlt¹²². Retrospektiv und prospektiv durchgeführte Studien zeigten ein Gesamtüberleben von 80-100% nach 5 Jahren, nach 10 Jahren waren 50% weiter krankheitsfrei^{130 147}. Bei den fortgeschrittenen indolenten Lymphomen (Stadien IIIb bis IV) ist eine Heilung in den meisten Fällen nicht möglich. Daher kann bei Patienten, welche keine Beschwerden und eine ausreichende Hämatopoese haben, zunächst eine abwartende Haltung hinsichtlich einer chemotherapeutischen Behandlung vertreten werden (watch and wait). Eine Therapie wird erst beim Vorliegen von Komplikationen, wie Zytopenien oder einer vorliegenden B-Symptomatik, begonnen. Neben klassischer zytostatischer Therapie konnten auch Interferone und Purinanaloga anhaltende Vollremissionen bei indolenten Lymphompatienten erzielen^{97 49}. Die entscheidende Verbesserung der Therapie indolenter Lymphome brachte jedoch die Einführung des monoklonalen Antikörpers Rituximab. Dieser wird in Form einer kombinierten Immuno-Chemotherapie verwendet. In mehreren randomisierten Studien zeigte sich dabei ein signifikant verlängertes progressionsfreies Überleben der Patienten, welche zusätzlich mit Rituximab behandelt wurden^{59 24}. Dabei ist das progressionsfreie Überleben und die Ansprechrate durch Gabe von Rituximab sowohl in der Primärtherapie, als auch in der Therapie des Rezidives eines folliculären Lymphoms signifikant erhöht¹²². Heutzutage ist die Kombinationstherapie mit Rituximab Standard in der Behandlung der indolenten NHL.

Therapie der aggressiven Non-Hodgkin-Lymphome

Auf der anderen Seite werden einige Subtypen zur Gruppe der hochmalignen (also aggressiv verlaufende) Non-Hodgkin-Lymphome zusammengefasst. Die hochmalignen Lymphome sprechen besser auf die Behandlung an als niedrigmaligne NHL. Sie können mit einer Kombinationschemotherapie auch in fortgeschrittenen Stadien wirkungsvoll bekämpft werden. Durch Chemotherapie können in frühen Stadien komplette Remissionen in fast allen Fällen und selbst in fortgeschrittenen Stadien bei rund 60% der Patienten erreicht werden. Die Therapiestrategie der hochmalignen Lymphomen ist grundsätzlich kurativ ausgerichtet, das bedeutet, eine Heilung wird zunächst durch das Erreichen einer Vollremission angestrebt. Die Standardchemotherapie erfolgte bisher nach dem CHOP-Schema, das aus den Zytostatika Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednisolon besteht¹²². Erstmals beschrieb McKelvey 1976 die Kombinationschemotherapie mit Cyclophosphamid bei fortgeschrittenen NHL⁹⁴. Diese Standard Therapie wurde über 25 Jahre verwendet, allerdings sprachen nur 40% mit einer kompletten Remission an^{38 18}. Versuche die Therapie durch Zugabe anderer zytotoxischer Agentien zu verbessern brachten lange Zeit keinen signifikanten Erfolg³⁸. Erst die Einführung des Antikörpers Rituximab in die therapeutischen Regime der NHL Behandlung brachte signifikante Verbesserungen der Ansprechraten, des progressionsfreien und des Gesamtüberlebens. Die klinischen Daten sind ausführlich in 1.2.4 dargestellt.

1.2. Der monoklonale Antikörper Rituximab

1.2.1. Allgemeines und Entwicklung der monoklonalen Antikörper

Durch die Entdeckung der Technologie zur Herstellung monoklonaler Antikörper durch Milstein und Köhler Anfang der 70er Jahre gelang ein entscheidender Schritt in der passiven Immuntherapie, welcher für die Hämato- Onkologie von enormer Bedeutung war⁷⁸. Da Lymphome eine Vielzahl Antigene exprimieren, welche nicht ubiquitär auf anderen lymphatischen Zellen vorkommen, eignen sich diese besonders für die gezielte Therapie mit Antikörpern. Die zytotoxische Wirkung können monoklonale Antikörper auf dreierlei Weise entfalten: Durch Apoptose, über eine Komplement-vermittelte Zytolyse (CDC) oder eine Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität (ADCC). Als Strukturen für die gezielte Antikörpertherapie gegen Lymphomzellen sind Oberflächenantigene wie CD5 CD19, CD20, CD25 oder CD52 geeignet³⁹.

1.2.2. Das CD20-Oberflächenantigen als Ziel einer Immuntherapie

CD20 ist eines der ersten humanen Differenzierungsantigene, welches mit Hilfe monoklonaler Antikörper auf der Oberfläche von menschlichen Zellen nachgewiesen werden konnte¹²⁹. Es ist ein membranständiges nicht-glykosyliertes Phosphoprotein, welches auf der Oberfläche von reifen B-Zellen und B-Zell-Vorläufern exprimiert wird, auf Stammzellen und Prä-prä-B-Zellen aber fehlt. Differenziert eine normale B-Zelle zu einer Antikörper produzierenden Plasmazelle, so geht es verloren. Das menschliche Gen für das CD20-Antigen ist auf Chromosom 11q12-q13 lokalisiert¹³³. Das CD20-Molekül besteht aus vier transmembranösen Anteilen, wobei sowohl das Amino-, als auch das Carboxylende des Proteins intrazellulär liegt. Nur ein kleiner Teil des Proteins liegt extrazellulär¹³⁶. Die genaue Funktion des CD20-Antigens ist noch immer nicht vollständig geklärt, doch Untersuchungen weisen darauf hin, dass es bei der Regulation von Wachstum, Differenzierung und Proliferation aktivierter B-Lymphozyten eine große Rolle spielt^{132 134}. Press et al. konnten zeigen, dass sich das CD20-Antigen besonders für eine Immunotherapie eignet, weil es nur eine geringe Internalisierungsrate nach Bindung des Antikörpers aufweist^{111 112}. Die Struktur des CD20-Antigens gibt Hinweise, dass es sich um einen Ionenkanal handelt. Mehrere Arbeitsgruppen konnten einen Zusammenhang zwischen dem CD20-Antigen und der intrazellulären Calciumkonzentration herstellen^{7 42}. So führt die Bindung eines Antikörpers an CD20 zu einer Aktivierung der Tyrosin- und Serin/Tyreonin-Kinasen, welche dann zu einer Thyrosinphosphorylierung der Phospholipase C und zu einem Anstieg des $[Ca^{2+}]_i$ führt²⁹. Die Arbeitsgruppe um Shan konnte zeigen, dass bei gleichzeitiger Bindung eines zweiten Anti-IgG-Antikörpers an den Fc-Teil des CD20- Antikörpers (*hypercross-linking*), die intrazelluläre Calciumkonzentration soweit angehoben werden konnte, dass Apoptose eintrat¹²⁴. Monoklonale CD20-Antikörper zeigen verschiedene Effekte auf den Zellzyklus und damit auf die Proliferation von B-Lymphozyten nach Bindung an das CD20-Antigen. So stimuliert der monoklonale CD20-Antikörper 1F5 den Übertritt von der G_0 in die G_1 Phase, während ein anderer Antikörper (B1) den Übertritt von der G_1 -Phase des Zellzyklus in die S/ G_2 +M-Phase erst nach mitogener Stimulation inhibiert^{48 135}.

1.2.3. Struktur und Wirkung des Antikörpers Rituximab

Rituximab ist ein monoklonales, gentechnisch hergestelltes IgG1 Kappa-Immunglobulin, welches aus einer variablen Maus- und einer konstanten humanen Region besteht. Es gehört

damit in die Gruppe der chimären Antikörper, die den Vorteil gegenüber rein murinen Antikörpern besitzen, weniger immunogen zu sein. Außerdem haben chimäre Antikörper den Vorteil, dass aufgrund der humanen Fc-Region eine effektive Aktivierung des menschlichen Immunsystems möglich ist, während bei rein murinen Antikörpern z.B. eine Komplementbindung nicht möglich ist. Rituximab ist ein glykosyliertes Protein, welches aus 1328 Aminosäuren besteht und ein Molekulargewicht von 144 Kilodalton aufweist. Rituximab bindet spezifisch an das CD20- Antigen, das von mehr als 90 % aller B-Zell-NHL exprimiert wird. Der exakte Wirkungsmechanismus ist noch unklar, doch haben *in vitro*-Studien gezeigt, dass Rituximab humanes C1q binden kann und so in der Lage ist, Komplement-vermittelte Lyse zu induzieren^{115 68}. Außerdem ist Rituximab in der Lage, in Anwesenheit immunkompetenter humaner Effektorzellen Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität zu vermitteln¹¹⁵. Weiterhin ist Rituximab bei einigen B-NHL-Zelllinien in der Lage direkt Apoptose zu induzieren⁸⁷. Weitgehend ungeklärt ist auch die Fähigkeit von Rituximab die Empfindlichkeit primär resistenter humaner Lymphomzelllinien gegenüber dem zytotoxischem Effekt von Ricin, VP-16 und Adriamycin zu erhöhen³⁰. Bis dato besteht kein Marker oder Prädiktor für das Ansprechen eines Patienten auf den Antikörper Rituximab¹²⁷.

1.2.4. Klinischen Daten zur Therapie mit Rituximab

Die Therapie der NHL wurde durch den Anti-CD20 Antikörper Rituximab entscheidend verbessert. Dabei profitierte sowohl die Therapie der indolenten, als auch die der aggressiven Lymphome. Für die Therapie der niedrigmalignen Lymphome (FL) mit Rituximab konnte in einer Reihe von Studien eine signifikante Verbesserung der Remissionen und des Gesamtüberlebens nachgewiesen werden^{88 89}. Diese Erfolge konnten in nachfolgenden Studien bestätigt werden^{36 54 55}. Dabei konnten z.B. Czuczman et al. bei Patienten mit niedrigmalignen NHL eine Gesamtansprechrates von 95 % mit 55 % CR und 40 % PR nachweisen²⁵. Wie schon beschrieben revolutionierte der Antikörper Rituximab ebenfalls die Therapie der hoch malignen Lymphomentitäten. So konnte die Zugabe von Rituximab zu dem klassischen Schema CHOP die Rate an kompletten Ansprechen und das Gesamtüberleben der Patienten mit diffus großzelligen Lymphomen signifikant verbessern³⁵. Bei den diffus großzelligen Lymphomen konnte die Kombination von Rituximab mit konventioneller Chemotherapie (CHOP-Schema) bei unbehandelten Patienten mit einem fortgeschrittenen hochmalignen NHL in klinischen Studien von 33 Patienten bei 20 Patienten eine CR, bei 11 Patienten eine PR nachweisen¹⁴⁹. Coiffier et al. fanden ebenfalls in einer Studie mit

insgesamt 399 älteren Patienten mit diffus großzelligen B-Zell- Lymphomen (DLCL) eine signifikant höhere CR bei den Patienten, die mit CHOP und Rituximab behandelt wurden (76 % versus 63 %, $P = 0,005$)²⁰. So konnte also die Therapie in Kombination mit dem Antikörper eine signifikante Verbesserung des Gesamtüberlebens erreichen (siehe Abb. 1). Auch Patienten mit Mantelzelllymphomen profitierten von der kombinierten Immunochemotherapie mit Rituximab. Das Mantelzelllymphom macht 5-10% aller Lymphome in Amerika und Europa aus^{71 96} und hat eine der schlechtesten Prognosen der B-Zell Lymphome, da es sich durch eine schlechte Sensitivität für Chemotherapeutika auszeichnet⁴³. Durch die Zugabe von Rituximab konnte die Prognose entscheidend verbessert werden. Die mit R-CHOP behandelte Gruppe der Mantelzelllymphom Patienten zeigte signifikant höhere Response Raten und eine höhere Rate an vollständigen Remissionen⁸². In einer großen Metaanalyse konnte bewiesen werden, dass Rituximab einer alleinigen Chemotherapie im Bezug auf das Gesamtüberleben deutlich überlegen ist¹²³.

Unerwünschte Arzneimittelwirkungen von Rituximab

Die Nebenwirkungen, die mit Rituximab in Verbindung gebracht werden, treten überwiegend während der ersten Infusion auf. Häufig wurden grippeähnliche Symptome beobachtet, aber auch allergische Reaktionen⁸⁸. Unter der Therapie mit Rituximab mit 375 mg/m² kam es zu akuten Tumor-Lyse-Syndromen mit lebensbedrohlichen Komplikationen, bis zum Multiorganversagens^{75 154}. Die Ursachen für das Auftreten von Nebenwirkungen sind bisher nicht vollständig geklärt. Diskutiert wird ein „cytokine release Syndroms“, eine Assoziation zwischen der im Blut zirkulierenden Menge an Tumorzellen und der nach Erstinfusion auftretenden Nebenwirkungen oder eine starke Komplement-vermittelte Zelllyse^{153 11 75}. Kürzlich wurden auch mehrere Fälle einer Progressiven multifokalen Leukenzephalopathie (PML) nach Rituximab in Kombination mit anderen Therapeutika beobachtet^{5 40}.

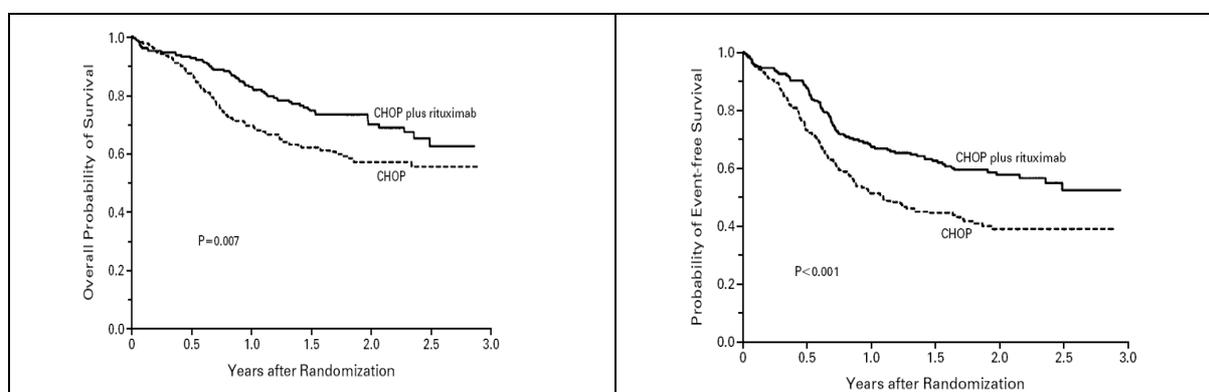


Abb. 1 CHOP vs. R-CHOP bei Diffus großzelligen Lymphomen²⁰

1.3. Mechanismen des Antikörper induzierten Zelltodes

Wie schon beschrieben wurde, kann der monoklonale Antikörper Rituximab seine zytotoxische Wirkung über drei verschiedene Wege vermitteln, durch Apoptose, über eine Komplement-vermittelte Zytolyse (CDC) oder eine Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität (ADCC). Dabei ist sowohl der exakte Mechanismus als auch die Relevanz der einzelnen Bestandteile und Wege bis dato unklar ^{4 22 91}. *In vitro* Studien haben gezeigt, dass Rituximab humanes C1q binden kann und so in der Lage ist, Komplement-vermittelte Lyse zu induzieren ^{115 68}. Weiterhin konnten Reff et al. nachweisen, dass Rituximab in Gegenwart immunkompetenter humaner Effektorzellen die Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität auslöst ^{115 16}.

Andere Arbeitsgruppen, z.B. Maloney et al., konnten zeigen, dass Rituximab bei einigen B-NHL-Zelllinien in der Lage ist, direkt Apoptose zu induzieren ⁸⁷. Abb. 2 zeigt die von der malignen B-Zelle ausgehenden Reaktionen die nach Bindung des Antikörpers folgen. Im folgenden sollen die Grundzüge der einzelnen Wege kurz dargestellt werden.

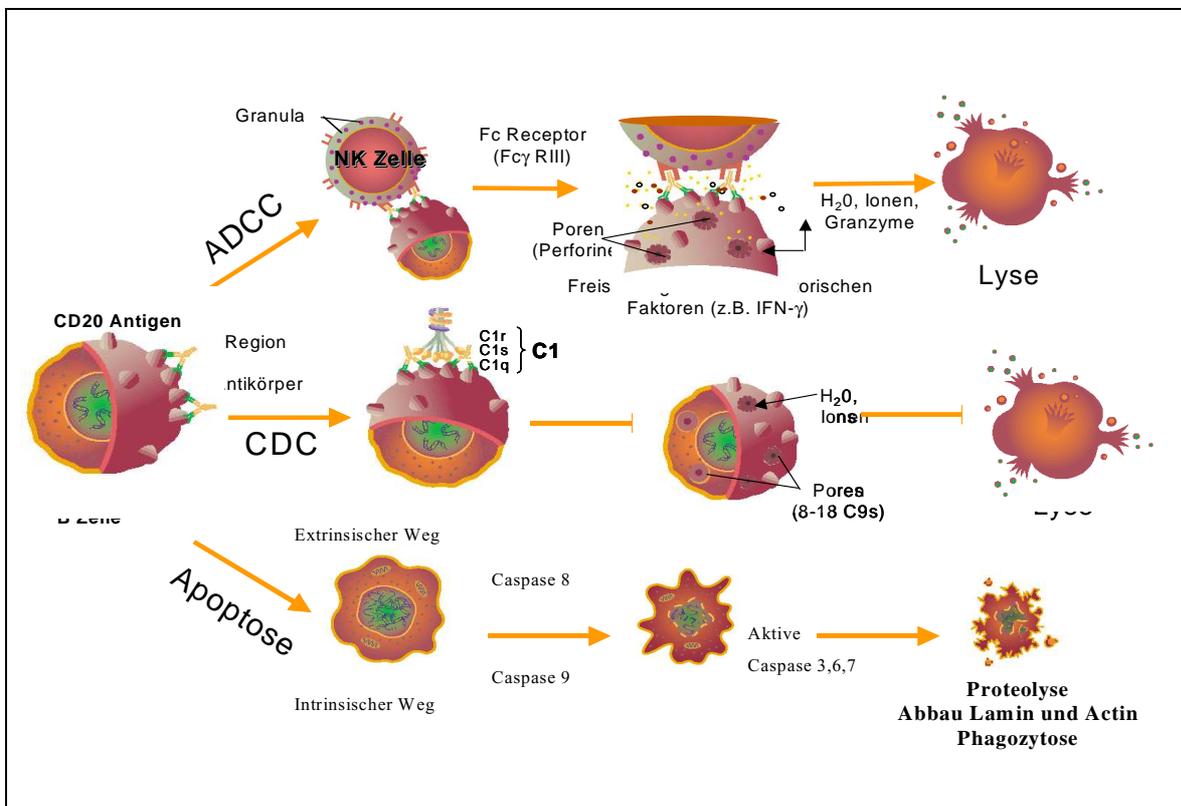


Abb. 2 Wege des Rituximab induzierten Zelltodes

1.3.1. Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC)

Unter ADCC (Abkürzung für antibody dependent cellular cytotoxicity), versteht man die Reaktion von natürlichen Killerzellen (NK) mit antikörperbeladenen Ziel-Zellen (Antigenen oder Pathogenen). Zunächst kommt es zu einer Bindung des Antikörpers an das Oberflächenantigen der Zielzelle. Der IgG Teil des gebundenen Antikörpers wird von spezifischen Zellen, wie Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, sowie Monozyten, erkannt. Nach Bindung der Zellen am Antikörper kommt es zur Freisetzung lytischer Granula und zur Zerstörung der Zielzelle durch programmierten Zelltod oder Lyse. Rituximab bindet also an das CD20 Oberflächenantigen der Zielzelle. Der humane IgG1 Fc- Teil von Rituximab wird von den spezifischen Zellen mit Hilfe deren Fc γ -Rezeptoren (bzw. Fc-RIII) erkannt¹¹³. Bei einigen Patienten mit B-NHL Erkrankung konnte eine Mutationen im Fc-RIIIa Gen nachgewiesen werden. Diese zeigten ein vermindertes Ansprechen auf die Therapie mit Rituximab¹². Die Fc-Rezeptoren gehen eine Bindung mit dem IgG1 Fc-Teil des Antikörpers ein, was zu einer Freisetzung von Perforinen, Granzymen und von Tumornekrosefaktor (TNF) führt, und somit zum Tod der entarteten B-Zelle^{37 150 76}.

1.3.2. Complement Dependent Cytotoxicity (CDC)

Nach Bindung von Rituximab an den CD20 Rezeptor konnten einige Autoren in einem *in vitro* Modell eine Induktion von Komplement-vermittelter Lyse beobachten^{115 68}. Auch die Komplement abhängige Zytotoxizität (CDC) spielt eine essentielle Rolle in der Vermittlung der Wirkung von Rituximab. Wie bedeutend dieser Weg allerdings ist, war bisher unklar. Im folgenden soll die CDC kurz erläutert werden. Das menschliche Komplementsystem ist Teil der humoralen Immunantwort des Menschen und besitzt die Aufgabe körperfremde und körpereigene Fremdstoffe unschädlich zu machen. Bestandteile des Komplementsystems sind viele verschiedene hitzeempfindliche Plasmaproteine, welche eine Kaskade verschiedener Faktoren bilden⁷⁴. Das Komplementsystem kann auf zwei unterschiedlichen Wegen aktiviert werden. Beide Wege münden zusammen in der Bildung einer C3-Konvertase, welche die Komponente C3 in die kleine C3a-Untereinheit und in die große C3b-Einheit spaltet⁶⁶. Die Aktivierung der Komplementkaskade endet in der Bildung eines Membranangriffskomplex (MAC), der durch Porenbildung in der Zellmembran zu Lyse der Zelle führt³. Einige Komplementfaktoren können auch direkt an Bakterien oder Fremdstoffe binden und diese für die Phagozytose opsonieren⁷⁴. Der C1-Komplex bildet den ersten Komplementfaktor bei der

Aktivierung der Komplementkaskade im klassischen Weg. Er besteht aus den Komponenten C1q und den beiden Serinproteasen C1r und C1s⁷⁴. *In vitro*- Versuche haben gezeigt, dass Rituximab humanes Komplement bindet und Fc-Rezeptortragende Zellen aktivieren kann¹¹⁵⁴⁷. Im Fc-Teil von Rituximab befinden sich mehrere Regionen, die menschliches C1q binden können⁶⁸⁶⁹. So wird vermutet, dass es nach Bindung von C1q an den Fc-Teil von Rituximab zur Aktivierung der Komplementkaskade und zur Zerstörung der Lymphomzellen kommt⁶⁹.

1.3.3. Der programmierte Zelltod -Apoptose

Pedersen et al. konnten nach Stimulation von Zellen einer chronisch lymphatischen B-Zell Leukämie mit Rituximab ebenfalls eine Induktion der Apoptose nachweisen¹⁰⁷. Auch andere Arbeitsgruppen wie Mathas et al. oder Byrd konnten *in vitro* und *in vivo* die Aktivierung der Apoptose nach Rituximab zeigen⁹³¹⁰. Die Apoptose wird auch als programmierter Zelltod bezeichnet und stellt einen äußerst wichtigen physiologischen Prozess in der Gewebsentwicklung und Homeostase dar³⁴. Spezifische Proteasen, Caspasen, steuern diese und vermitteln die apoptotischen Signale. Der Begriff Caspase ist die Kurzform für das englische Cysteine-Aspartate-Protease. Diese bilden Reaktionskaskaden, welche zum Zelltod führen. Man unterscheidet einen extrinsischen, der mit der Aktivierung der Caspase 8 assoziiert ist, und einen intrinsischen Weg, welcher über die Caspase 9 reguliert wird. Als Effektor fungiert die Procaspase 3, die in die aktive Caspase 3 überführt wird. Dabei werden die inaktiven Proformen durch Abspaltung der Pro-Domänen in aktive Caspasen umgewandelt. Als Gegenspieler der Caspasen agieren Bcl-2 Proteine, Calpain und Ca²⁺³⁴. Als wichtigster Vermittler des extrinsischen Weges gilt die Caspase 8, deren Aktivierung die Apoptose anstößt. Extrinsische Signale lösen eine Spaltung der inaktiven Prä-Caspase 8 in drei kleinere Fragmente aus und damit deren Aktivierung. Nach Aktivierung können diese die Effektor- Caspase 3 ihrerseits spalten und den programmierten Zelltod initiieren. Für den intrinsischen Weg der Apoptoseaktivierung ist die Caspase 9 verantwortlich. Auch hier kommt es durch eine Spaltung zur Aktivierung der Caspase. Diese Protease wird durch ein intrinsisches Signal in Form einer höheren Ausschüttung des Elektronencarriers Cytochrom C aktiviert. Die Prä-Caspase 9 besitzt eine Molekülgröße von 47kDa und wird in zwei aktive Fragmente von 35kDa und 17kDa gespalten. Die aktive Caspase 9 spaltet die Effektorcaspase 3 in die aktive Form und die Kaskade der Apoptose beginnt. Letztendlich löst sich die Zelle in kleine Vesikel auf ohne einen Gewebeschaden oder eine Inflammation zu verursachen. Die Vesikel werden durch Phagozyten aufgenommen¹¹⁴.

1.4. Lipid rafts

Auf molekularer Ebene konnte gezeigt werden, dass Rituximab seine zytotoxische Wirkung über spezielle Membranabschnitte, sog. lipid rafts, vermittelt^{23 72}. Lipid rafts sind Abschnitte der Zellmembran, welche überwiegend aus Sphingolipiden und Cholesterin bestehen. Sie bilden eine wichtige Plattform für die Vermittlung zahlreicher Signale von extra- nach intrazellulär. Im folgenden werden die Struktur und Funktion der lipid rafts genauer dargestellt.

1.4.1. Entwicklung der Vorstellung biologischer Membranen

Unser heutiges Modell von biologischen Membranen beruht auf einer Vielzahl von Erkenntnissen und Entdeckungen. Im Jahre 1895 folgert Charles Overton aus seinen Beobachtungen, dass biologische Membranen aus Lipiden bestehen. 1925 postulierten die Wissenschaftler Gorter und Grendel das „bilayer“ Modell der biologischen Membranen. Dabei sind Phospholipide als Doppelschicht in der Membran angeordnet, so dass die hydrophilen Gruppen der Lipide jeweils nach außen und die hydrophoben Gruppen nach intrazellulär gerichtet sind. Danielli und Davson formulierten 1935 klassische Modell der „Sandwich“ Biomembran. In dieser bimolekularen Lipidschicht stehen sich die hydrophoben Enden der Lipide gegenüber, die Köpfe der Lipide sind von Proteinen überzogen. 1975 entwickelten Singer und Nicolson das „fluid mosaic“ Modell. Dabei schwimmen Proteine in einer „bilayer“ Membran¹²⁶. Van Meer und Simons beschrieben erstmals die lipid rafts¹⁴⁵. In der Membran existieren lipidreiche Inseln („rafts“), welche vor allem aus Sphingolipiden und Cholesterin bestehen (siehe Abb. 3). Diese sind an einer Vielzahl von Signalwegen beteiligt.

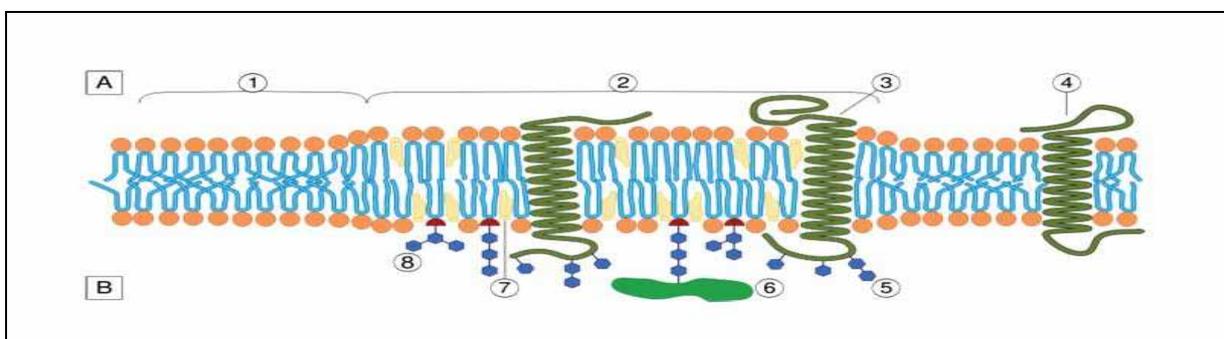


Abb. 3 Biologische Membran mit lipid raft

A. Intrazellulärer Raum; B. Extrazellulärer Raum; 1. Non raft Abschnitt der Membran; 2. Lipid Raft; 3. Lipid Raft assoziiertes Protein; 4. Non Raft Protein; 5. Glucose; 6. GPI-Protein; 7. Cholesterin; 8. Glykolipid

Quelle: http://de.wikipedia.org/wiki/Biomembran#Geschichte_der_Modell-Entwicklung

1.4.2. Funktionen der lipid rafts

Während des Keystone Symposiums 2006 wurden Lipid rafts als kleine (10-200nm), heterogene, dynamische, cholesterin- und sphingolipidreiche Mikrodomänen der Membran, definiert, welche für zelluläre Prozesse Kompartimente bereitstellen und eine Vielzahl weiterer Funktionen ausführen. Die genauen Funktionen der lipid rafts sind Gegenstand der aktuellen Forschung. Die Bildung von Kompartimente für zelluläre Prozesse wird z.B. für die Ansammlung von Molekülen die an der Signaltransduktion beteiligt sind benötigt. Somit nehmen die Lipid rafts eine wichtige Position in der Signalvermittlung wahr und funktionieren als Plattform für die Signaltransduktion, indem sie selektiv Rezeptoren und Signaleffektoren kompartimentieren⁶. Weiterhin beeinflussen die Lipid rafts durch ihren hohen Cholesteringehalt die Membranfluidität. Dadurch können Proteine in der Membran wandern. Auch die Endozytose wird durch lipid rafts gesteuert¹⁰⁹. Ebenso spielen die lipid rafts eine wichtige Rolle bei der Steuerung der Lokalisation von Rezeptoren und der Ausschüttung von Neurotransmittern⁷⁹. Als molekularer Marker für die lipid rafts werden spezifische Ganglioside gebraucht^{101 73}. In dieser Arbeit wird das Gangliosid GM-1 verwendet, welches von einigen Autoren als Marker für lipid rafts etabliert wurde^{125 157}.

1.4.3. Lipid rafts und Rituximab

Auch für die Funktion des monoklonalen Antikörpers Rituximab sind die lipid rafts von entscheidender Bedeutung. Deans et al. konnten das Zielantigen CD20 nach Stimulation mit Rituximab vermehrt in den lipidreichen Membranabschnitten nachweisen²⁷. Nach Bindung verschiedener Anti-CD20 Antikörper an CD20 kam es durch die Antigenbindenden Fragmente (Fab) der Antikörper zu einer Änderung der Konformation des CD20 Rezeptors. Dadurch haben diese CD20 Rezeptoren eine besonders hohe Affinität zu den lipid rafts und die Umlagerung in die lipidreichen Mikrodomänen ist erleichtert. Die Stimulation mit Rituximab führte also zu einer Rekrutierung der CD20 Moleküle in lipid rafts. Hier werden die rekrutierten CD20 Moleküle aktiviert. Durch die Umlagerung befinden sich die CD20 Rezeptoren dann in enger Nachbarschaft zu den in den rafts lokalisierten Kinasen²⁶. Wie schon beschrieben spielen die lipid rafts eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion. Auch für den monoklonalen Antikörper scheinen diese entscheidend an der Vermittlung des induzierten Zelltodes beteiligt zu sein. Wie wichtig die lipid rafts für die Wirkung von Rituximab sind, soll in der vorliegenden Arbeit näher untersucht werden.

1.5. Substanzen mit Einfluß auf die lipid rafts

1.5.1. Methyl- β -cyclodextrin (M β CD)

Die Substanz Methyl- β -cyclodextrin (M β CD) ist ein methyliertes zyklisches Oligosaccharid, welches aus sieben Glucose Monomeren besteht und eine Ringstruktur mit einer größeren und einer kleineren Öffnung bildet. Hydrophobe Lösungspartner können im Inneren des äußerlich hydrophilen M β CD binden und so in einer wässrigen Umgebung gelöst werden. Die Substanz findet in der Landwirtschaft, der pharmazeutischen und der chemischen Industrie, Verwendung. M β CD bildet auch mit Cholesterin Einschlusskomplexe. Das große und hydrophobe Cholesterin Molekül kann so depletiert werden. Die Depletion ändert die biophysikalischen Eigenschaften der Plasmamembran und macht diese flüssiger ⁸. Die funktionelle und strukturelle Integrität der lipid rafts in biologischen Membranen wird so zerstört ¹¹⁷. Gupta et al. konnten für den B-Zell Rezeptor eine Assoziation mit den lipid rafts nachweisen ⁵². M β CD konnte diese lipid rafts assoziierte Wirkung des B-Zell Rezeptors hemmen ¹. In dieser Arbeit soll M β CD zur Hemmung der lipid rafts verwendet werden.

1.5.2. Azol-Antimykotika

Azol-Antimykotika sind Arzneimittel zur innerlichen und äußerlichen Behandlung von Pilzinfektionen. Unter dem Begriff der Azole werden antimykotische Wirkstoffe, wie Fluconazol, Itraconazol oder Voriconazol zusammengefasst. In dieser Arbeit sollen die im klinischen Alltag am häufigsten verwendeten Antimykotika Fluconazol (FLU), Itraconazol (ITRA) und Voriconazol (VORI) untersucht werden. Fluconazol wird vor allem bei systemischen Infektionen mit Candidastämmen verwendet ¹⁰⁶. Itraconazol wird zur Behandlung der Aspergilleninfektion, sowie schweren Pilzinfektionen bei AIDS, eingesetzt. Voriconazol findet in der Therapie der invasiven Aspergillose und bei schweren invasiven Candida-Infektionen Verwendung ¹⁰⁶. Die Triazol Antimykotika hemmen die 14- α -Demethylase ¹²⁰. Dieses Enzym ist für die Umwandlung von Lanosterol in Ergosterol oder Cholesterin entscheidend ⁴¹. Die Sterol 14- α -Demethylase (CYP 51) ist das am weitesten verbreitete Mitglied der Cytochrom P450 Oxidasen und kommt sowohl auf Prokaryoten, als auch auf Eukaryoten vor ¹⁵¹. Ergosterol dient als Regulator der Membranfluidität und ist für die Integrität der Pilzmembranen notwendig ¹⁰². Auch die Cholesterinsynthese von menschlichen Zellen wird durch die Hemmung der 14- α -Demethylase beeinflusst ^{61 142 143}.

1.6. Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit soll die Bedeutung der lipid rafts für die Wirkung des Antikörpers Rituximab untersucht werden. Dabei wird insbesondere untersucht, inwiefern die lipid rafts für den Rituximab induzierten Zelltod von Bedeutung sind. Weiterhin soll gezeigt werden welcher der Wege der Zytotoxizität durch Hemmung der lipid rafts verändert wird. Zunächst wird ein *in vitro* Modell etabliert werden, welches eine genaue Untersuchung des zytotoxischen Effekts von Rituximab ermöglicht. Dazu wird die Suszeptibilität verschiedener Lymphomzelllinien auf Rituximab getestet werden. Der genaue molekulare Wirkmechanismus des Antikörpers Rituximab ist bis dato nicht vollständig bekannt. Derzeit werden drei unterschiedliche Wirkungsmechanismen diskutiert: Apoptose, ADCC und CDC. Es soll zuerst untersucht werden, welcher der drei Komponenten (ADCC, CDC oder Apoptose) in unserem *in vitro* Modell den wesentlichen Faktor des Rituximab induzierten Zelltods darstellt.

Im nächsten Schritt soll geprüft werden, ob die Oberflächenmarker CD20 oder GM1 sich eignen das Ansprechen der Zellen auf Rituximab vorauszusagen, also als prognostischer Marker dienen können. Dazu werden die selben Zelllinien verwendet und auf ihre CD20-Expression und auf die Expression des Sphingolipids GM1 hin untersucht. Gibt es eine Korrelation der Expression einer dieser Moleküle mit dem Ansprechen auf Rituximab?

Im letzten Teil der Arbeit soll der Einfluss von Antimykotika vom Azoltyp auf die Wirkung von Rituximab untersucht werden. Die Azolantimykotika hemmen die 14- α -Demethylase und verändern so den zellulären Cholesteringehalt. Die Hypothese, ob Rituximab in Anwesenheit von Azol-Antimykotika eine geringere Effektivität hat, soll überprüft werden. Dazu werden Lymphomzellen nach vorheriger Behandlung mit Azol-Antimykotika auf ihre Rituximab-Sensitivität getestet. Darüber hinaus wird überprüft, ob die Rekrutierung von CD20 in lipid rafts durch die gleichzeitige Anwendung von Azolen beeinflusst wird. Kann die Behandlung mit Azol-Antimykotika die molekulare und zytotoxische Wirkung von Rituximab verändern?

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Verwendete Geräte, Computer und Software

Computer, Drucker und Kopierer

Personal Computer	Equium 8000D (Toshiba [Tokio, Japan])
Personal Computer	Amilo Pro V3515 (Fujitsu-Siemens [München])
Drucker	Laserjet 6P, 1200 und 2100 (Hewlett Packard [Palo Alto, USA])
Kopiergerät	KM-2550 (Kyocera [Kyōto, Japan])
Scanner	Perfection 4990 Photo (Epson [Meerbusch])

Software

XL software	Version 1996, Coulter Programm MZB DC FITC/PE mit logSS
MTT- Programm	KC Junior V1.41.6 (Biotek [Bad Friedrichshall])
FlowJo	Version 7.2.4 (Tree Star, Inc. [Ashland, USA])
Microsoft	Excel 2000 und Word 2003 (Microsoft GmbH [Verl])

Laborgeräte

Brutschrank	CO2 Incubator IR Sensor (Sanyo Fisher [München])
Elektronikrührer	Monotherm (Variomag [H+P Labortechnik AG [Oberschleißheim])
Eismaschine	Ziegra (Ziegra Eismaschinen GmbH [Isenhagen])
Kühlschrank	Comfort, Premium und Profiline Eco (Liebherr [Kirchdorf an der Iller])
Kühlschrank	VIP Series -86°C (Sanyo Fisher [München])
Mikroskop	Axiovert 25 (Zeiss [Jena]) und CK40-F200 (Olympus [Hamburg])
Minishaker	MS1 (IKA [Staufen])
Minizentrifuge	DW-41 (Qualitron Inc.[Korea])
Schüttler	WT12 (Biometra Biomedizinische Analytik GmbH [Göttingen])
Schüttler	Polymax 1040 und Rotamax 120 (Heidolph Elektro GmbH [Kelheim])
Sicherheitswerkbank	Hera Safe Type HS18 und HSP18 (Heraeus [Hanau])
Stickstofftank	Chronos und ADUR β (Cryotherm GmbH & Co KG [Kirchen])

Thermocycler	Thermomixer comfort 1,5ml (Eppendorf [Wesseling-Berzdorf])
Ultrazentrifuge	SW 55.1 TI (Beckmann [San Remo, USA])
Vortexgerät	Reax top (Heidolph [Kelheim])
Wasserbad	GFL (Gesellschaft für Labortechnik mbH [Burgwedel])
Wasserbad	Typ WB14 (Mettmert [Schwabach])
Zentrifuge	Megafuge 1.0R (Heraeus [Hanau])
Zentrifuge	Rotanta/P 4542 und Mikro 22R(Hettich [Tuttlingen])

Messgeräte

Messeimer	VITLAB 5000ml, 1000ml und 500ml (VITLAB GmbH [Großostheim])
PH-Meter	Toledo SevenEasy (Mettler-Toledo GmbH [Giessen])
Waage	440-47, 770 und PLJ 2100-2M (Kern & Sohn GmbH [Balingen])
Zählkammer	Neubauer Improved (LO-Laboroptik GmbH [Friedrichsdorf])

2.1.2. Allgemeine Materialien und Verbrauchsmaterialien

Gefäße

Falcon- Tubes	50ml und 15ml (Becton Dickinson & Co.[Franklin Lakes, USA])
Glasbehälter	Schott Duran 1000ml, 2000ml und 5000ml (Schott AG [Mainz])
Safe-Lock Tubes	1,5ml und 2,0ml (Eppendorf [Wesseling-Berzdorf])
Ultrazentrifugentubes	Ultra-Clear Tubes 13x51mm (Beckmann [San Remo, USA])
Zellkultur- Flaschen	25cm ² , 75cm ² und 150cm ² (TPP AG [Trasadingen, Schweiz])
Zellkultur- Platten	6, 12, 24, 96 flach und 96 U (TPP AG [Trasadingen, Schweiz])

Pipetten und Pipettenspitzen

Gelladespitzen	Y419.1 Pipettenspitzen (Carl Roth GmbH+ CO. KG [Karlsruhe])
Glaspipetten	2, 5, 10, 25 und 50ml (Becton Dickinson & Co.[Franklin Lakes, USA])
Mehrkanalpipette	Research 8 Kanal, 30- 300 µl (Eppendorf [Wesseling-Berzdorf])
Multipipette	Multipette plus (Eppendorf [Wesseling-Berzdorf])
Pipette	Research 100-1000 µl, 20-200 µl, 2-20 µl, 0,5-10 µl (Eppendorf [Wesseling-Berzdorf])
Pipette	P1000, P200, P20 (Gilson International [Limburg-Offheim])
Pipettenspitzen	Filter 10 µl M (Eppendorf [Wesseling-Berzdorf])
Pipettenspitzen	epT.I.P.S. Standard 0,1-10 µl (Eppendorf [Wesseling-Berzdorf])

Pipettenspitzen	1000 µl, 200 µl, 10 µl (Sarstedt [Nümbrecht])
Pipettierhilfe	Pipetboy acu (Integra Biosciences GmbH [Fernwald])

2.1.3. Chemikalien und Medikamente

Chemikalien und Medikamente

Acrylamid	Rotiphere Gel 30 (Carl Roth GmbH+ CO. KG [Karlsruhe])
BSA	Albumin bovine serum (Sigma-Aldrich Chemie GmbH [Steinheim])
dH ₂ O	Aqua destilliert DeltaSelect 1000ml (DeltaSelect GmbH [Dreieich])
DMSO	Dimethylsulfoxide (Sigma-Aldrich Chemie GmbH [Steinheim])
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (Carl Roth GmbH+ CO. KG [Karlsruhe])
Ethanol	abs. 99,8% und 70% (Apotheke, Klinikum Rechts der Isar [München])
Fluconazol	Ratiopharm 2mg/ml Infusionsloesung (Ratiopharm GmbH [Ulm])
Glycin	(Carl Roth GmbH+ CO. KG [Karlsruhe])
HCL	(Apotheke des Klinikum Rechts der Isar [München])
Itraconazol	Sempera 10mg/ml 25ml Konzentrat (Ortho Biotech [Neuss])
MβCD	Methyl-β-Cyclodextrin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH [Steinheim])
Milchpulver	Blotting Grade (Carl Roth GmbH+ CO. KG [Karlsruhe])
MES	MES >99% (Sigma-Aldrich Chemie GmbH [Steinheim])
NaCl	(Apotheke des Klinikum Rechts der Isar [München])
NaF	Sodium Fluorid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH [Steinheim])
NaOH	(Apotheke des Klinikum Rechts der Isar [München])
PBS	Instamed 9,55g/l PBS Dulbecco (Biochrom AG [Berlin])
Ponceaurot	Ponceau S Solution (FluKa Biochemika GmbH [Buchs, Schweiz])
PI	Protease Inhibitor Mini tablets (Roche Diagnostics GmbH [Mannheim])
Rituximab	MabThera® 100mg (Roche Pharma AG [Grenzach-Wyhlen])
SDS	Dodecylsulfat (Serva Electrophoresis GmbH [Heidelberg])
Succrose	(Serva Feinbiochemika GmbH & Co. KG [Heidelberg])
Tris	Pufferan (Carl Roth GmbH+ CO. KG [Karlsruhe])
Triton	X 100 (Carl Roth GmbH+ CO. KG [Karlsruhe])
Tween	Tween 20 (Carl Roth GmbH+ CO. KG [Karlsruhe])
Vanadate	Sodium OrthoVanadate (Sigma-Aldrich Chemie GmbH [Steinheim])
Voriconazol	VFEND 200mg Pulver 10mg/ml (Pfizer Pharma GmbH [Karlsruhe])

Sonstige Materialien

Filter (steril) FP 30/0,2 CA-S (Whatman GmbH [Dassel])

Handschuhe Examination Gloves M 7-8 (Sempermed [Wimpasing, Österreich])

Tabelle 1 Verdünnungsreihe Antimykotika

Konzentration	Fluconazol 2mg/ml	Itraconazol 10mg/ml	Voriconazol 10mg/ml
1000 µg / ml	25 ml Fluconazol 2mg/ml + 25ml Medium RPMI	5ml Itraconazol 10mg/ml + 45ml Medium RPMI	5ml Voriconazol 10mg/ml + 45ml Medium
500 µg / ml	25 ml Fluconazol 1mg/ml + 25 ml Medium RPMI	25 ml Itraconazol 1mg/ml + 25ml Medium RPMI	25 ml Voriconazol 1mg/ml + 25ml Medium RPMI
100 µg / ml	10 ml Flu. 500 µg/ml + 40 ml Medium RPMI	10 ml Itra. 500 µg/ml + 40 ml Medium RPMI	10 ml Vori. 500 µg/ml + 40 ml Medium RPMI
50 µg / ml	25 ml Flu. 100 µg/ml + 25 ml Medium RPMI	25 ml Itra. 100 µg/ml + 25 ml Medium RPMI	25 ml Vori. 100 µg/ml + 25 ml Medium RPMI
10 µg / ml	10 ml Flu. 50 µg/ml + 40 ml Medium RPMI	10 ml Itra. 50 µg/ml + 40 ml Medium RPMI	10 ml Vori. 50 µg/ml + 40 ml Medium RPMI
5 µg / ml	25 ml Flu. 10 µg/ml + 25 ml Medium RPMI	25 ml Itra. 10 µg/ml + 25 ml Medium RPMI	25 ml Vori. 10 µg/ml + 25 ml Medium RPMI
1 µg / ml	10 ml Flu. 5 µg/ml + 40 ml Medium RPMI	10 ml Itra. 5 µg/ml + 40 ml Medium RPMI	10 ml Vori. 5 µg/ml + 40 ml Medium RPMI
0,5 µg / ml	25 ml Flu. 1 µg/ml + 25 ml Medium RPMI	25 ml Itra. 1 µg/ml + 25 ml Medium RPMI	25 ml Vori. 1 µg/ml + 25 ml Medium RPMI
0,05 µg / ml	5 ml Flu. 1 µg/ml + 45 ml Medium RPMI	5 ml Itra. 1 µg/ml + 45 ml Medium RPMI	5 ml Vori. 1 µg/ml + 45 ml Medium RPMI

2.1.4. Zelllinien und Materialien für Zellkultur

Zelllinien

DB Typ großzelliges Lymphom
 Spender männlich, 45 Jahre
 Herkunft und Kultur ATCC , CRL-2289, Kulturmedium 10%

EHEB Typ chronische B-Zell Leukämie
 Spender weiblich, 69 Jahre
 Herkunft und Kultur DSMZ, ACC 67, Kulturmedium 10%

GRANTA Typ Mantelzelllymphom in Transformation
 Spender weiblich, 58 Jahre
 Herkunft und Kultur DSMZ, ACC 342, Kulturmedium 20%

JEKO-1	Typ Spender Herkunft und Kultur	Mantelzelllymphom weiblich, 78 Jahre DSMZ, ACC 553, Kulturmedium 20%
MEC-1	Typ Spender Herkunft und Kultur	chronische B-Zell Leukämie männlich, 61 Jahre DSMZ, ACC 497, Kulturmedium 10%
NCEB-1	Typ Spender Herkunft und Kultur	Mantelzelllymphom männlich, 57 Jahre ¹¹⁹ , Kulturmedium 10%
RAJI	Typ Spender Herkunft und Kultur	Burkitt Lymphom männlich, 12 Jahre DSMZ, ACC 319, Kulturmedium 10%
REC-1	Typ Spender Herkunft und Kultur	transformiertes Mantelzelllymphom männlich, 61 Jahre DSMZ, ACC 584, Kulturmedium 10%
SU-DHL-4	Typ Spender Herkunft und Kultur	diffus histiozytisches Lymphom Mann, 38 Jahre DSMZ, ACC 495, Kulturmedium 10%
SU-DHL-10	Typ Spender Herkunft und Kultur	diffus histiozytisches Lymphom Mann, 25 Jahre DSMZ, ACC 576, Kulturmedium 10%

Zellkultur

RPMI 1640	GIBCO (-)L-Glutamine (Invitrogen Corporation [Carlsbad, USA])
FCS	Foetal Bovine Serum (PAA Laboratories GmbH [Pasching, Austria])
Glutamin	L-Glutamine 200mM (Invitrogen Corporation [Carlsbad, USA])
PBS	DPBS (Invitrogen Corporation [Carlsbad, USA])
P/S	Penicillin-Streptomycin (Invitrogen Corporation [Carlsbad, USA])
2-ME	2-Mercaptoethanol 50mM (Invitrogen Corporation [Carlsbad, USA])
Trypanblau	Trypan Blue Stain 0,4% (Invitrogen Corporation [Carlsbad, USA])
Kulturmedium10%	RPMI1640 + 10% FCS + 1% P/S + 1% Glu + 60 µl 2-ME
20%	RPMI1640 + 20% FCS + 1% P/S + 1% Glu + 60 µl 2-ME
Einfriermedium	10% DMSO, 90% FCS

Serum

(HI) humanes Serum von gesunden Spendern, inaktiviert bei 60°C über 1h

(NHI) humanes Serum von gesunden Spendern, aufgetaut bei 37°C

Aus Vollblutspenden von gesunden humanen Spendern wurde Serum gewonnen und mit RPMI 1640 verdünnt. Es bestanden 10% des gesamten Serum- Medium- Gemischs aus Serum (im folgenden als 10% NHI / HI abgekürzt) oder 30% (im folgenden 30% NHI oder HI).

Lysate der Zellen

Lysepuffer 15 ml 1% NP40 + PI(1:20) + Vanadate (1:100) + NaF (1:100)

2.1.5. Spezielle Materialien

Annexin-PI

Annexin-Kit V-FITC Apoptosis Detection KIT I (BD Pharmingen [Heidelberg])

Durchflußzytometer Epics XL (Beckman Coulter Inc. [Fullerton, USA])

PBS DPBS GIBCO (Invitrogen Corporation [Carlsbad, USA])

Annexinpuffer 1X 100ml 10X Annexinpuffer, 900ml dH₂O

Durchflußzytometrie (FACS)

Durchflußzytometer Epics XL (Beckman Coulter Inc. [Fullerton, USA])

Flow-Check Beads Fluospheres (Beckman Coulter Inc. [Fullerton, USA])

FACS- Puffer 1X PBS(9,55g/l), 0,1% Natriumacid, 2% FCS

Reinigungslösung Clenz Cleaning Agent (Beckman Coulter Inc. [Fullerton, USA])

Röhrchen 5ml 12x75mm(Becton Dickinson & Co.[Franklin Lakes, USA])

Verdünnungslösung Isoton II Diluent (Beckman Coulter Inc. [Fullerton, USA])

Antikörper

Anti-CD20-PE (Beckman Coulter Inc. [Fullerton, USA])

GM1-FITC (Beckman Coulter Inc. [Fullerton, USA])

MTT

ELISA-Reader ELx800 Absorptions Microplate Reader (Biotek [Bad Friedrichshall])

MTS-Assay CellTiter96 Cell Proliferation Assay (Promega [Madison, USA])

Proteinbestimmung

Protein- Kit DC Protein Assay (BIORAD [Hercules, USA])

Rafts-Isolation

MBS- Puffer pH 6,5 (1000ml)		4,88g MES (25mM), 30ml NaCl (150mM) 10ml EDTA (5mM), mit HCL auf pH 6,5
Succrose	85%	85g Succrose in 100ml MBS-Puffer
	35%	35g Succrose in 100ml MBS-Puffer
	5%	5g Succrose in 100ml MBS-Puffer
Triton Lysepuffer	10 ml Triton X, 100 µl NaF, 100 µl Vanadate, 1 Tablette PI	
Zell-Douncer	Dounce Tissue Grinder 1ml (Wheaton Industries Inc.[Millville, USA])	

Western Blot und Dot Blot

Blotting Papier	Gel Blotting Papier 1,4mm GB005 (Whatman GmbH [Dassel])	
Frischhaltefolie	(Carl Roth GmbH+ CO. KG [Karlsruhe])	
Folienschweißgerät	Folio (Severin GmbH [Sundern])	
Hebelschneider	1142 (IDEAL Krug & Priester GmbH & Co [Balingen])	
Nitrozellulose	Membran Protran BA85, pore size 0,45 µm (Whatman GmbH [Dassel])	
Entwicklungslösung.	SuperSignal West (ThermoScientific [Rockford, USA])	
Transferkammer	Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (BIORAD [Hercules, USA])	
Spannungsquelle	PowerPac HC (BIORAD [Hercules, USA])	
Gelkammer	Hoefler SE 400 (Amersham Biosciences Corp. [San Francisco, USA])	
Film	CL-Xposure 18x24cm Clear Blue (Thermo Scientific[Rockford , USA])	
Filmentwickler	Hyperprocessor (Amersham Biosciences Corp. [San Francisco, USA])	
Filmkassette	Hypercassette (Amersham Biosciences Corp. [San Francisco, USA])	

Basislösungen und Puffer

Probenpuffer	6X	7ml 4X Tris-SDS- Lsg. (pH 6,8), 3ml Glycerol, 1g SDS, 0,93g DTT, 1,2mg Bromphenolblau
BSA-Lösung 5% (100ml)		5g BSA, 100ml 1X PBS-Lösung
Milchpulverlösung 5% (100ml)		5g Milchpulver, 100ml 1X PBS-Lösung
PBS-Lösung (1l)	10X	1 Packung PBS 9,55g auf 1l mit dH ₂ O auffüllen
	1X	100ml 10X PBS-Lsg., 900ml dH ₂ O, 1ml Tween
SDS-Lösung 10% (500ml)		50mg SDS, mit dH ₂ O bis 500ml

4X Tris-SDS- Lösung pH 6,8 (500ml)		30,25g Tris, 2g SDS, 300ml dH ₂ O, mit HCL bis pH 6,8, dH ₂ O bis 500ml
4X Tris-SDS- Lösung pH 8,8 (500ml)		90,75g Tris (1,5 molar), 20ml 10%SDS-Lösung, mit NaOH auf pH 8,8, dH ₂ O bis 500ml
Laufpuffer (1l)	10X	144g Glycin, 30,2g Tris, bis 1l dH ₂ O
	1X	100ml 10X ' ', 900ml dH ₂ O, 10ml 10% SDS-Lsg.
Transferpuffer (3l)		300ml 10X Laufpuffer, 600ml Ethanol(99,8 %) dH ₂ O auf 3l

Gele

Sammelgel		1,3ml Acrylamid, 2,5ml 4X Tris pH 6,8 6,1ml dH ₂ O, 50µl APS, 10µl Temed
Trenngel	10%	10ml Acrylamid, 7,5ml 4X Tris pH 8,8 12,5ml dH ₂ O, 100µl APS, 20µl Temed
	12%	12ml Acrylamid, 7,5ml 4X Tris pH 8,8 10,5ml dH ₂ O, 100µl APS, 20µl Temed

Marker und Antikörper

Marker	Precision Plus Protein Standards (BIORAD [Hercules, USA])
Anti-β-Actin	A5441, Mouse (Sigma-Aldrich Chemie GmbH [Steinheim])
Anti-Caspase-3	3G2, Mouse (Cell Signaling Technology Inc. [Danvers, USA])
Anti-Caspase-8	Rabbit (R&D Systems [Minneapolis, USA])
Anti-Caspase-9	Rabbit (Cell Signaling Technology Inc. [Danvers, USA])
Anti-CD20	NCL-CD20-7D1 (Novocastra [Newcastle u. Tyne, U.K.])
Anti-GM1	Choleratoxin B (Calbio.-Novabiochem GmbH [Schwalbach])
Anti-LYN	LYN 44 (Santa Cruz Biotechnology Inc. [Santa Cruz, USA])
Anti-Phosphotyrosin	4G10 (Upstate cell signaling solutions [Lake Placid, USA])
Anti-Mouse IgG	AffiniPure ,Goat, Peroxidase-conjugated (Jackson Immuno Research Lab. Inc., [West Grove, USA])
Anti-Rabbit IgG	AffiniPure, Goat, Peroxidase-conjugated (Jackson Immuno Research Lab. Inc., [West Grove, USA])

2.2. Methoden

2.2.1. Apoptose Nachweis mit der Annexin-V-FITC Färbung

Annexin-V-FITC ist ein sensitives Verfahren um apoptotische Zellen zu erkennen und diese zu quantifizieren. Es ist ein etabliertes Verfahren, welches erstmals 1995 von Vermes et al. beschrieben wurde¹⁴⁸. In frühen Stadien der Apoptose verliert die Zellmembran ihre asymmetrische Struktur und das Phospholipid Phosphatidylserin (PS) wird von der inneren auf die äußere Membran umgelagert¹⁴⁴. Annexin V, ein 35kDa-Protein, hat eine hohe Affinität zu PS und bindet kalziumabhängig an Zellen, die es an der Oberfläche zeigen. Durch Fluoreszenzmarkierung des Annexins mit FITC (Fluoresceinisothiocyanat, grüne Fluoreszenz) wird es nun möglich fluoreszierende, apoptotische Zellen, mittels Durchflußzytometrie zu erfassen und von nicht-fluoreszierenden, vitalen Zellen, abzugrenzen. Die Translokation von Phosphatidylserin auf die Membran-außenseite findet allerdings nicht nur während der Apoptose statt, sondern auch bei nekrotischen Zellen. Diese verlieren aber im Gegensatz zu apoptotischen Zellen ihre zelluläre Integrität. Deswegen kann der Farbstoff Propidiumiodid (PI, 350 nm) in die Zellen gelangen und Zellen mit durchlässiger Membran anfärben. So lassen sich apoptotische (FITC+/PI-) von lebenden (FITC-/PI-) und nekrotischen (FITC+/PI+) Zellen unterscheiden.

Zur Durchführung werden in ein 15ml FT. 7ml kaltes PBS vorgelegt, die zu untersuchenden Zellen dazugegeben und zentrifugiert (1500 rpm, 5min). Der Überstand wird verworfen, das Zellpellet mit 7ml PBS resuspendiert, danach erneut zentrifugiert. Dann werden 3ml 1x Annexin Puffer hinzugegeben und die Zellen gemischt. Nachdem die Proben zentrifugiert und der Überstand entfernt wurde, wurde das Pellet in 200µl 1x Annexin Puffer resuspendiert. Davon werden je 100µl in ein FACS Röhrchen pipettiert. Es wurden jeweils 2,5 µl FITC und 2,5 µl PI hinzugegeben, sanft mit Hilfe eines Vortexgeräts geschüttelt und 20min im Dunkeln belassen. Nach Zugabe von 400 µl 1x Annexin Puffer konnten die Proben am Durchflußzytometer gemessen werden. 10 000 Zellen wurden analysiert und ihre Fluoreszenz im Dot-Plot-Diagramm dargestellt. Zur Bestimmung der spontanen Hintergrundapoptoserate der Zelllinien wurden unbehandelte Zellen bei jedem Versuch mitgeführt und als Kontrolle bezeichnet. Die X-Achse erfasst die Fluoreszenz von FITC- markiertem Annexin-V im FL-1-Kanal, die Y-Achse die PI-Fluoreszenz im FL-3-Kanal.

Zur Messung wurde der Durchflußzytometer Epics XL mit dem Programm Beckman Coulter

XL3 verwendet. Der Dot-Plot wurde in vier Quadranten unterteilt und den einzelnen Fraktionen zugeteilt. Dabei wurden vitale, frühapoptotische und nekrotische bzw. spätapoptotische Zellen unterschieden.

2.2.2. Dot Immunobinding Assay Blot

Der Dot Blot wird auch Dot-Immunobinding genannt und wurde von Hawkes et al. 1981 zum ersten Mal beschrieben⁵⁷.

In dieser Arbeit diente das Verfahren als Maß für die Verteilung des Sphingolipids GM1 in den einzelnen Fraktionen nach Ultrazentrifugation und als Kontrolle für die Lysate.

Zunächst wurde die Nitrozellulosemembran mit Bleistift beschriftet, dann wurden 6 mal 11 Eppendorf Tubes aufgereiht und markiert. In jedes Tube wurden 4 µl Aqua dest. vorgelegt. Die Lysate wurden vorsichtig und langsam auf Eis aufgetaut und je 1 µl in die Eppis gegeben und gemischt. Dabei wurden zu jedem Zeitpunkt Handschuhe getragen, um Verunreinigungen zu vermeiden. Auf die Membran wurde je 1 µl in die vorgesehene Reihe getropft ohne diese zu berühren. Der Dot Blot wurde 12h bei Raumtemperatur getrocknet. Dann kurz angefeuchtet mit PBS-T Lösung und für 1h in 5% Milchpulverlösung geblockt. Die Membran wurde in eine zugeschnittene Prospekthülle gegeben und an 3 Seiten eingeschweißt. Für das Antikörpergemisch: Zu 5ml 5% Milchpulver 2,5 µl Cholera Toxin Subunit B. An der offenen Seite wurde das Antikörpergemisch hineingegeben und unter Ausstreichen der Luftblasen ebenfalls verschweißt. Die Membran mit dem Antikörpergemisch wurde für 1h auf dem Schüttler belassen, danach aus der Folie genommen und 5 mal je 10 min. mit PBS gewaschen. Schließlich wurde die Membran in Entwicklungslösung geschwenkt und in Prospekthüllen gegeben. Danach in eine Filmkassette gelegt und sofort in der Dunkelkammer ein Film aufgelegt. Dabei wurden Belichtungszeiten von 1s, 10s, 1min, 3min, 15min gewählt.

2.2.3. Durchflußzytometrie (FACS)

Die Durchflußzytometrie oder auch FACS-Analyse (FACS = Fluorescence Activated Cell Sorting) dient der Analyse von Einzelzellen in Suspension anhand der Grundlage von Streulicht und Fluoreszenzeigenschaften. Das Verfahren wurde von Wallace Coulter erstmals beschrieben. Der Ausdruck "FACS" ist ein registriertes Markenzeichen der Firma Becton-Dickinson und steht eigentlich für Fluorescence Activated Cell Sorting.

Sie erlaubt für bis zu 10.000 Einzelzellen innerhalb einer Sekunde die gleichzeitige Messung der relativen Zellgröße, der Granularität sowie der verschiedenen Fluoreszenzfarben.

Aufbau und Funktionsweise des Durchflusszytometers

Die in Einzelzellsuspension vorliegenden Zellen werden vom Gerät aufgenommen und unter Druck durch eine Kapillare gepresst. Dabei wird die Zellsuspension durch eine Mantelflüssigkeit beschleunigt, die unter etwas geringerem Druck steht. Die entstehende laminäre Strömung lässt die Zellen nach dem Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung einzeln einen Messpunkt passieren. Auf diesen Punkt ist ein Argonlaserstrahl (Wellenlänge 488 nm) fokussiert. Entsprechend der physikalischen Eigenschaften der Zellen kommt es zur charakteristischen Streuung und Absorption des Lichts. Das absorbierte Vorwärtsstreulicht entspricht der Zellgröße, das 90° zur Seite gestreute Licht der Granularität der ungefärbten Zellen. Fluoreszenzen werden, wie das Seitwärtsstreulicht, in 90°-Richtung aufgenommen. Die mit einem Fluorochrome markierten Antikörper absorbieren je nach Fluorochrome (FITC (Fluoreszein-Isothiocyanat) oder PE (=Phycoerythrin)) zunächst Licht der Wellenlänge von 488 nm. Die Wellenlänge verändert sich durch den Kontakt und wird länger. Mit Hilfe eines Filtersystems können die Fluoreszenzfarben unterschieden werden (grün, rot, u.a.). Das gestreute und emittierte Licht wird durch Photodetektoren gemessen und die digitalisierten Signale durch einen Computer quantitativ ausgewertet.

Um die Messergebnisse darzustellen, wurden die Zellen in einer Graphik, einem sog. Dot-Plot, dargestellt. Dabei wurde auf der x-Achse das Vorwärts- und auf der y-Achse das Seitwärtsstreulicht aufgetragen. In der Fluoreszenzmessung wurde FITC (grün) auf der X-Achse, PE (gelbrot) auf der Y-Achse aufgetragen.

Probenmessung und Datenauswertung

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten erfolgten die Messungen mit einem Durchflusszytometer vom Typ Epics XL der Firma Beckman Coulter. Dieser wurde in regelmäßigen Abständen durch die Firma Beckman Coulter gewartet. Zu Beginn jeder Messung wurde zur optischen Justage und Standardisierung der Fluoreszenzdetektion ein FlowCheck mit Fluorosphere Beads durchgeführt. Vorwärtsstreulicht wurde linear, Seitwärtsstreulicht und die Fluoreszenzen wurden logarithmisch erfasst. Je Probe wurden 10.000 Zellen (1000-2000 Zellen/sec) gemessen. Die Fluorochrome wurden mit einem Argonlaser bei 488 nm angeregt. Die FITC-Fluoreszenz (grün, Emissionsspektrum 515-545 nm) wurde im Kanal 1 (FL1) registriert. PE (rot, Emissionsspektrum 575-620 nm) wurde in Kanal 3 (FL3) gemessen.

2.2.4. Lipid rafts-Fraktionen

Die Rafts wurden, wie von Zhang et al. erstmals beschrieben¹⁵⁸, zunächst lysiert und danach im Succrosegradienten aufgetrennt. Hierzu wurde die Zelllinie Nceb-1 verwendet. Nach Ultrazentrifugation wurden elf Fraktionen entnommen, in Tubes gegeben und bei -80°C für die weiterführenden Versuche gelagert.

Vorbehandlung der Zellen

Es wurden je 20×10^6 Zellen in ein 50 ml FT gegeben, bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert und dann mit je 50ml Medium oder Mediumgemisch resuspendiert. Dabei wurden in zwei 50 ml FT die Zellen mit je 50 ml Kulturmedium, in einem 50 ml FT mit 50 ml Fluconazol [10 $\mu\text{g/ml}$], in einem weiteren mit 50 ml Itraconazol [10 $\mu\text{g/ml}$] und mit 50 ml Voriconazol [10 $\mu\text{g/ml}$] versetzt. Je 25ml des Zellgemischs wurden in 150cm^2 Zellkulturflaschen pipettiert und 24 h bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank inkubiert. Die Vorbehandlung mit M β CD erfolgte für 15×10^6 Zellen am gleichen Tag wie die Fraktionsherstellung. Dabei wurden 0,0396 g M β CD mit 6 ml reinem Medium gemischt, steril filtriert und gekühlt gelagert.

Poolen, Zählen und Einstellen der Zellen

Zusammengehörige Zellkulturflaschen wurden in einem 50ml FT. aufgenommen, gezählt und mit reinem Medium auf 3×10^6 Zellen / ml eingestellt. Je 50 ml FT. wurden 15×10^6 Zellen, also 3ml des Gemischs, eingesetzt.

Zugabe von Rituximab und Lyse

Es erfolgte die Zentrifugation (1500 rpm, 5 min). Dann wurde wie folgt resuspendiert:

Tabelle 2 Resuspension der Zellpellets

N- 0	1,5 ml Kulturmedium
N- R	1,5 ml Kulturmedium
N- M + R	1,5 ml M β CD-Kulturmediumgemisch
N- F + R	1,5 ml Fluconazol [100]-Kulturmediumgemisch
N- I + R	1,5 ml Itraconazol [100]-Kulturmediumgemisch
N- V + R	1,5 ml Voriconazol [100]-Kulturmediumgemisch

Die Proben wurden in entsprechend beschriftete Eppendorf- Tubes hineinpipettiert und sofort auf Eis gelegt. Unter regelmäßigem Schwenken wurden diese 30 min auf Eis belassen.

Dann wurden die Proben N+R, N-M+R, N-F+R, N-I+R, N-V+R mit je 15 µl Rituximab versetzt und 20 min bei 37 °C im Thermocycler (Eppendorf) geschüttelt. Die Kontrolle N-0 wurde ebenfalls beigefügt. Die Proben wurden nun bei 2200 rpm und 4°C für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit jeweils 1ml eiskaltem Triton- Lysepuffer vermischt. Danach unter beständigem Schütteln 30 min auf Eis lysiert.

Zelldouncing

Die Proben wurden in einem Zelldouncer der Firma Wheaton mit dem Glasstößel zehn mal bearbeitet. Nach jeder Probe wurden der Zelldouncer und der Glasspatel mit dH₂O gereinigt. Es erfolgte die Gabe in ein neues Eppendorf- Tube. Um Kernreste und Cytoskelettdebris zu pelletieren wurden die Proben bei 2000 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert.

Succrose schichten

Die Ultrazentrifugenröhrchen wurden mit 1 ml 85% Succrose gefüllt, darauf wurde der Überstand der Proben gegeben und mit der Succrosephase durchmischt. Danach erfolgte die Aufsichtung von 2 ml 35% Succrose und 1ml 5% Succrose.

Ultrazentrifugation

Die Ultrazentrifugenröhrchen wurden in die Zentrifugeneinsätze gestellt und verschlossen. Die Ultrazentrifugation erfolgte bei: 41000 rpm, 4°C, Beschleunigung 3, Bremse 3, und Rotor SW 50.1. Die Dauer betrug 3.33 h.

Abnahme der Fraktionen

Die Zentrifugeneinsätze wurden vorsichtig aus der Ultrazentrifuge entnommen, auf Eis transportiert und vorsichtig geöffnet. Die Ultrazentrifugen-Tubes wurden mit der Pinzette herausgehoben und je 400 µl von oben nach unten kreisend entnommen und in die vorbeschrifteten Eppendorf-Tubes gegeben. Die ersten 400 µl Entnahme wurden als Fraktion 1 bezeichnet, die nächste als Fraktion 2, usw. Die Pipettenspitze wurden dabei nach den Fraktionen 4 und 8 und nach jeder Probe gewechselt.

2.2.5. Proteinbestimmung

Zur Bestimmung des Proteingehaltes wurde ein colorimetrischer Ansatz verwendet, welcher gemäß dem Lowry Assay durchgeführt wurde⁸⁴. Dazu wurde das Protein- Kit DC Protein Assay von BIORAD verwendet.

Der Ansatz basiert auf der Reaktion von Protein mit einer alkalischen Kupfer-Tartrat Lösung und der Reagenz Folin. Zwei Schritte führen dabei zur Farbentstehung: Die Reaktion von Protein und Kupfer in einer alkalischen Lösung und die darauffolgende Reduktion von Folin durch die mit Kupfer behandelten Proteine. Das reduzierte Folin hat eine charakteristische blaue Farbe mit einem Absorptionsmaximum bei 750 nm. Die Proteinkonzentration und die Absorption folgen dabei einem proportionalen Verhältnis.

Durchführung

Zunächst wurde in einer 96 Well Zellkultur- Platte eine Standardverdünnungsreihe (siehe Tabelle 3) angelegt. Daneben wurden 20 µl Lysepuffer als Leerwert pipettiert.

Tabelle 3 Verdünnungsreihe des Standards

ST 0	ST 1	ST 2	ST 3	ST 4	ST 5
20 µl Standard 3mg/ml	20 µl ST 0 + 20µl Lysepuffer	20 µl ST 1 + 20µl Lysepuffer	20 µl ST 2 + 20µl Lysepuffer	20 µl ST 3 + 20µl Lysepuffer	20 µl ST 4 + 20µl Lysepuffer

Aus den zu untersuchenden Lysaten wurden je 5 µl entnommen und mit 25 µl Lysepuffer in einem Tube (Safe-Lock Tubes 1,5ml, Eppendorf) vermischt. Daraus wurden 5 µl in die 96 Well Platte gegeben. In die Wells deren Inhalt Leerwert, Standard und Probenmaterial waren, wurden je 25 µl Reagenz A(alkalische Kupfer-Tartrat Lösung) und 20 µl Reagenz S gefüllt. Jedes befüllte Well erhielt außerdem 200 µl Reagenz B (Folinlösung). Nach 15min erfolgte die Messung mit dem Programm KC Junior im Elisa Reader ELx800 der Firma Biotek. In Abb. 4 sieht man die annähernd lineare Standardkurve.

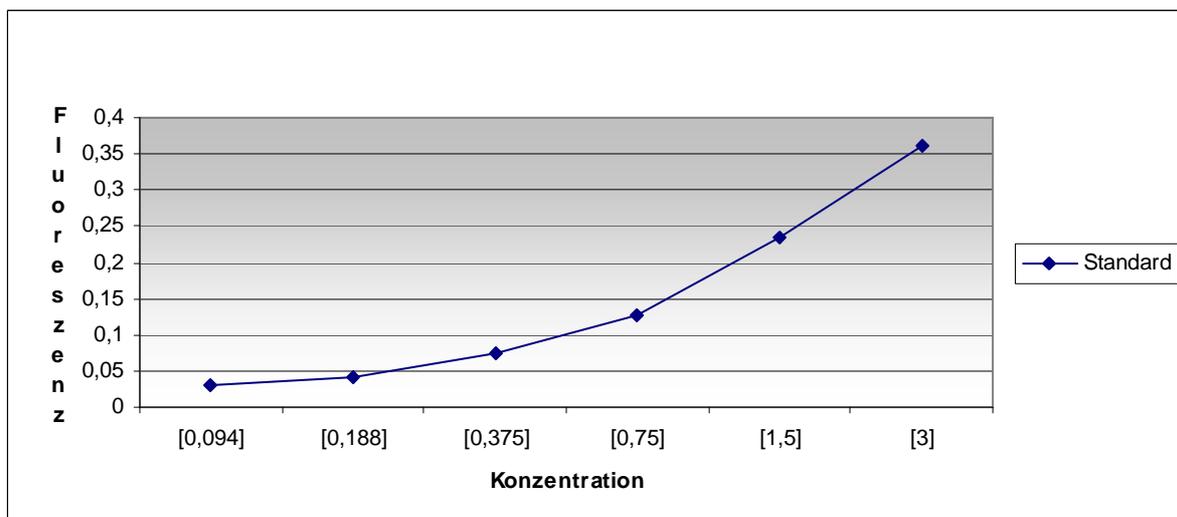


Abb. 4 Standardreihe und Proteinverteilung

2.2.6. Western Blot

In diesem Verfahren werden Proteine zunächst in der SDS-Gelelektrophorese der Größe nach elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und später von einem spezifischen Antikörper gebunden. An den F_c-Teil des 1.Ak. bindet ein Peroxidase konjugierter 2.Ak., der sich durch eine Lumineszenz auf dem Film detektieren lässt.

Probenherstellung für den Western Blot

Dazu wurden die bei -86°C gelagerten Lysate auf Eis aufgetaut. In den 1,5ml Tubes wurden, je nach Proteinbestimmung, 10-40 µl Zellysate, wenn nötig mit LP auf 40 µl Probevolumen aufgefüllt, mit 8µl 6X Probepuffer versetzt. Für die SDS-PAGE unter reduzierenden und denaturierenden Bedingungen wurden die Proben mit 6-fach Probepuffer versetzt, bei 95°C 5min im Thermocycler belassen und in die Taschen des polymerisierten Sammelgels gefüllt.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Durch Zugabe von SDS werden die Ladungsunterschiede der Proteine aufgehoben und die Raumstruktur denaturiert, dadurch können diese unabhängig von ihrer Ladung der Molekülgröße nach aufgetrennt werden. Da viele 100 neg. geladene SDS-Moleküle an die Proteine binden, kann ihre Eigenladung vernachlässigt werden. Das Verfahren geht auf Laemmli zurück⁸⁰. Zunächst wurde die Gelkammer SE 400 aufgebaut, dann das Trenngel bis 4cm unterhalb des Randes zwischen die Glasplatten eingefüllt. Je nach Größe des Proteins wurde die Acrylamid-Konzentration des Gels gewählt. Für 50- 150kDa wurden 7 %, für 30-80kDa 10% und für kleinere Proteine 12% Acrylamid verwendet. Auf das Trenngel wurde 1ml dH₂O gegeben und dann 2h bis zur Polymerisation des Gels gewartet. Dann wurde das dH₂O abgekippt und das Sammelgel lief auf die polymerisierte Trenngelphase auf. Es wurde ein Kamm mit einer Taschengröße von 1,5mm mittig eingelegt und formte 15 Auftragsaschen für die Proben. Die Glasplatten mit den Gelen kamen in die mit 1X Laufpuffer gefüllte untere Pufferkammer der Gelkammer. Der Kamm wurde vorsichtig entfernt und die Taschen mit Hilfe einer Einweg-Kunststoffspritze mit Kanüle luftblasenfrei mit 1X Laufpuffer ausgespült. Für das Eingeben der Proben und des Markers verwendeten wir jeweils Gel Loading Pipettenspitzen. Als Standard der Proteingrößen wurden je 12 µl eines Markers entweder mittig oder links eingegeben. Die vorbereiteten Proben wurden in die Geltaschen gefüllt, die obere Pufferkammer befestigt und mit 1X Laufpuffer befüllt. Nachdem die Verkleidung der Gelkammer angebracht worden war, wurde die Elektrophorese Einheit an eine

Spannungsquelle angeschlossen und lief bei konstant 20mA Stromstärke bis die Proteinbanden die Sammelgelphase passierten. In der Trenngelphase wirkte eine Stromstärke von 40mA stetig auf die Proteine. Nachdem die Bromphenolblaubande die Trenngelphase bis auf etwa 1cm durchlaufen hatten, stoppte die Elektrophorese.

Protein-Transfer durch Western Blot

In der Transferkammer wirkt ein senkrecht zum Gel gerichtetes elektrisches Feld. Die Proteine wandern aus dem Gel auf eine Membran, an der sie aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften und das Muster der elektrophoretischen Auftrennung bleibt erhalten. Dieser quantitative Transfer ribosomaler Proteine von Polyacrylamid- und Harnstoff-Gelen auf Nitrozellulose gelang erstmals 1979¹⁴⁰. Burnette ersetzte den Harnstoff in den Gelen durch SDS und prägte den Namen „Western Blot“⁹ in Anlehnung an die von Southern etablierte Technik für DNA-Fragmente¹²⁸.

Die Glasplatten wurden herausgenommen und die Zwingen gelöst. In eine Wanne wurde die vorbereitete eiskalte Transferlösung geschüttet und zunächst die Gel-Kassette, zwei Faserkissen und schließlich zwei zugeschnittene Gel Blotting Papierquadrate der Firma Whatman zusammengefügt und getränkt. Das Trenn- wurde vom Sammelgel entfernt und auf eines der Papierquadrate gelegt, eine Nitrozellulosemembran luftblasenfrei daraufgestrichen und in der Gelkassette verschlossen. In der mit kaltem Transferpuffer gefüllten Transferkammer erfolgte bei 4°C und 25V ÜN der Proteintransfer vom Gel auf die Membran.

Detektion mit spezifischen Antikörpern

Nach dem Transfer können die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine spezifisch durch Immunreaktionen mit Primärantikörpern (1.Ak) erfasst werden. Diese binden an immobilisierte Antigene auf der Nitrozellulose und können durch speziesspezifische (Anti-Mouse IgG und Anti-Rabbit IgG), an Peroxidase gebundene, 2.Ak erkannt werden.

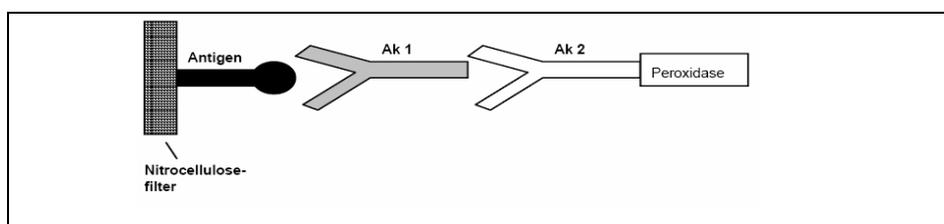


Abb. 5 Detektion mit spezifischen 1. und Peroxidase gekoppelten 2.Antikörpern

Durch die Reagenz Luminol, welche spezifisch für Peroxidase ist, kann das Enzym und dadurch der gesamte Immunkomplex dargestellt werden. Nach katalytischer Umwandlung kann diese Chemoluminiszenz den Röntgenfilme belichten. Nach 24h wurde die Membran

aus der Transferkammer entfernt, in dH₂O gelegt und 3min darin geschwenkt. Das dH₂O wurde ausgegossen und für 10min Ponceaurot dazugegeben. Dadurch erfolgte die Probefärbung des Markers und der Proteinbanden, welche mit Bleistift beschriftet wurden. Die Membran wurde in 1X PBS-Lösung auf dem Schüttler gewaschen. Die Membran wurde zur Sättigung unspezifischer Bindungsstellen 1h in 5% Milchlösung geblockt. In einem FT. wurden 3ml der Milchlösung mit dem 1.AK (siehe Tabelle 4) gemischt und bei 4°C aufbewahrt.

Tabelle 4 Konzentrationen der 1. Antikörper

1. Antikörper	Konzentration	Auf 3 ml	2. Antikörper	
Anti-β-Actin	1:1000	3,0 µl	Anti-mouse	5% Milchpulver
Anti-Caspase 3	1:2000	1,5 µl	Anti-mouse	5% Milchpulver
Anti-Caspase 8	1:1000	3,0 µl	Anti- rabbit	5% Milchpulver
Anti-Caspase 9	1:1000	3,0 µl	Anti- rabbit	5% Milchpulver
Anti-CD20	1:200	15 µl	Anti-mouse	5% Milchpulver
Anti-GM1	1:2000	1,5 µl	HRP-konjugiert	(-)
Anti-Ptyr	1:2000	1,5 µl	Anti-mouse	5% BSA-Lösung

Tabelle 5 Konzentrationen der 2. Antikörper

2. Antikörper	Konzentration	Auf 20 ml
Anti-mouse	1:30.000	0,6 µl
Anti-Rabbit	1:30.000	0,6 µl

Die Membran wurde in eine Dokumentenfolie gelegt, an drei Seiten verschweißt und mit dem Gemisch aus 1.Ak und Milchlösung befüllt. Die Membranvorderseite wurde vollständig benetzt und das Folienquadrat zugeschweißt. Nach 24h bei 4°C wurde die Membran entfernt und fünfmal 10min mit 1X PBS gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem 2. Antikörper. Dafür wurden 20ml der 5% Milchlsg. mit dem passenden 2.Ak.(siehe Tabelle 5) für 1h versetzt, danach fünfmal gewaschen. Zur Detektion der gebundenen Antikörper kamen Entwicklungslösungen der Reihe SuperSignal West von Thermo Scientific zum Einsatz. Die Reagenzien dieser Lösungen erzeugen mit HRPO eine detektierbare Chemolumineszenz. Die Membran wurde 1min mit den Reagenzien inkubiert, in Klarsichtfolie verpackt und ein

Röntgenfilm CL-Xposure Clear Blue bis zu 1h mit der Membran in einer Filmkassette Hypercassette belichtet. Der Film wurde in einem automatischen Entwicklungsgerät Hyperprocessor entwickelt.

Stripping der Immunoblot-Membran

Bereits im Western Blot eingesetzte Membranen können erneut mit anderen Antikörpern entwickelt werden, nachdem die zuvor benutzten Ak. entfernt („gestrippt“) wurden. Nachteil der Methode ist ein Verlust membrangebundener Proteine und die Zunahme unspezifischer Bindungen. Nach der Entwicklung wurde die Membran 5min in dH₂O eingeweicht, dann 20min in 20ml 0,2 mol. NaOH-Lsg. zur Entfernung verbliebener Entwicklungsreagenzien gewaschen. Die Membran wurde dann erneut 5min in dH₂O gereinigt und analog zu oben beschriebenen Protokoll durchgeführt.

2.2.7. Zellproliferationsassay MTS CellTiter 96® AQueous

Der MTS-Proliferationsassay stellt eine einfache und zuverlässige Methode zur Bestimmung der Anzahl lebender Zellen dar und wurde 1983 erstmals von Mosmann beschrieben¹⁰³. Der MTS erkennt lebende, aber nicht tote Zellen und das erzeugte Signal ist abhängig vom Grad der Aktivierung. Diese Methode kann also zum Messen von Zytotoxizität, Proliferation oder Aktivierung verwendet werden. Das Tetrazoliumsalz MTS dringt in Zellen ein und wird durch mitochondriale Dehydrogenasen zu Formazan reduziert, welches einen dunkelblauen kristallinen Niederschlag bildet. Misst man die Extinktion im Photometer, lässt sich das Wachstumsverhalten der Zellen beurteilen. Alle Versuchsansätze wurden zum gleichen Zeitpunkt angesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ über 24h und 48h. Die Ergebnisse wurden mit einem Spektrophotometers (ELISA Reader) bei einer Wellenlänge von 490nm erfasst. Die gemessene Extinktion korreliert dabei mit der Anzahl vitaler Zellen.

Durchführung

Zur Durchführung wurde die MTS Lösung mit der PMS Lösung versetzt und im Kühlschrank bei -20°C gelagert. Die Zellen wurden je nach Experiment behandelt und in die 96 Loch Platte mit Hilfe einer Mehrkanalpipette je sechs Wells mit gleichen Proben befüllt. Nach der vorgesehenen Zeit (24h und 48h) wurde in die Zellkultur Platten mit einer Multipette jeweils 20 µl MTS- Lösung bei 100 µl, oder 40 µl bei 200 µl Füllung zugegeben. Ab da wurde zu verschiedenen Zeitpunkten (meist 0h, 0,5h, 1h, 2h, 3h und 4h) mit dem ELx800 Absorptions Microplate Reader gemessen und mit KC-Junior ausgewertet.

2.2.8. Zellen

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen kultiviert, wuchsen unter aseptischen Bedingungen in exponentiellem Wachstum bei 37°C und 5% CO₂. Alle 2 Tage wurde auf 2 x 10⁵ Zellen/ml umgesetzt. Als Medium wurde 10% oder 20% Kulturmedium verwandt.

Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zu Beginn wurde das Einfriermedium hergestellt und auf Eis gelagert. Es wurden 10⁶ Zellen entnommen, zentrifugiert, zweimal mit kaltem PBS gewaschen und in 1ml Einfriermedium resuspendiert. Sofort wurde das Zellgemisch in die Kryotubes gegeben, für 24h. bei -80 C° gelagert, dann bei -196C° im Stickstoff tiefgefroren. Zum Auftauen wurden die Kryotubes aus dem Stickstoff genommen, 2min bei RT gewärmt und die Zellen in 37 C° warmes Kulturmedium überführt, zweimal gewaschen und 12ml Kulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen überführt und im Brutschrank inkubiert.

Zellzahlbestimmung

Für die Bestimmung der Zellzahl wurde mit Trypanblau, einem sauren Farbstoff, gefärbt. Lebende Zellen stellen sich ungefärbt mit einem Randsaum dar, tote sind wegen ihrer defekten Membran vollständig angefärbt. Es wurden 70µl einer Zelllösung mit 70µl der Trypanblaulösung versetzt, mit einer Pipette gemischt und in die Neubauer-Zählkammer gegeben. Diese besteht aus 3 mal 3 Quadranten, mit jeweils 1mm² Fläche und einer Tiefe von 0,1mm. Die Auszählung erfolgte mit einem Lichtmikroskop bei 40-facher Vergrößerung.

Zellysate

Zunächst wurde der Lysepuffer hergestellt und gekühlt. Die Zellen wurden gepoolt, d.h. alle gleich vorbehandelten und gleich abstammenden zusammengenommen. Die gepoolten Zellen wurden gezählt und auf 3x10⁶ Zellen /ml eingestellt. Es erfolgte die Zentrifugation mit 1500 rpm für 5min. Der entstandene Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1ml reinem Medium (RPMI1640) resuspendiert. Es wurde je 1ml aus dem FT. in ein Safe-Lock Tube pipettiert und bei 6000 rpm für 5min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Zellanteil in 200µl Lysepuffer aufgelöst. Die Lyse erfolgte 30 min auf Eis unter ständigem Schwenken. Nach erneuter Zentrifugation mit 1400 rpm bei 4°C für 10min wurde der Überstand vorsichtig in ein neues Safe-Lock Tube abpipettiert und bei -80°C gelagert.

3. Ergebnisse

3.1. Rituximab induzierter Zelltod

3.1.1. Rituximab sensible und resistente Zelllinien

Der monoklonale Antikörper Rituximab ist gegen das Oberflächenantigen CD20 gerichtet. Dieses Molekül wird auf reifen B-Zellen und auf den meisten malignen B-Zellen exprimiert. Die Effektivität der Therapie von Non Hodgkin Lymphomen konnte durch die Kombination von Rituximab mit konventionellen Chemotherapieregimen signifikant verbessert werden. Allerdings sprechen einige Non Hodgkin Lymphome auf die Antikörpertherapie nicht an und Rezidive stellen ein relevantes medizinisches Problem dar. Um die primären Resistenzmechanismen auf molekularer Ebene zu charakterisieren, wurde die Wirkung von Rituximab auf das Überleben verschiedener Lymphomzelllinien untersucht. Hierzu wurden 11 Zelllinien mit steigenden Konzentrationen von Rituximab inkubiert. Die Proliferation der Zellen wurde 24h und 48h nach Stimulation mit dem Antikörper Rituximab mit Hilfe eines MTT- Tests bestimmt. Die verschiedenen Lymphomzelllinien zeigten dabei ein unterschiedliches Ansprechen (siehe Tabelle 6). Rituximab induzierte bei einigen Zelllinien eine starke Abnahme der Zellproliferation, andere Zelllinien zeigten eine unverändert hohe Proliferation. Aus diesen Zelllinien wurde je ein Vertreter mit einem guten Ansprechen und eine Linie mit fehlender Rituximab- Sensitivität ausgesucht und für die weiteren Untersuchungen verwendet. Exemplarisch wurden die Zellen der Mantelzell-Lymphomlinie NCEB als Rituximab sensible Zellen ausgewählt und als Beispiel für eine Rituximab resistente Zelllinie wurde die diffus großzellige Lymphomzelllinie DB gewählt.

In Abb. 6 ist die Proliferation der Rituximab sensiblen Zelllinie, NCEB-1, und die der Rituximab resistenten Linie, DB, beispielhaft dargestellt. Nach Stimulation der NCEB Zellen mit 100 µg/ml Rituximab für 24h betrug die Anzahl lebender Zellen nur 1/3 im Vergleich zur unbehandelten Mantelzelllymphomlinie. Bei der diffus großzelligen Lymphomzelllinie DB zeigte die Stimulation selbst mit hohen Konzentrationen von Rituximab keinen Effekt auf die Anzahl lebender Zellen (siehe Abb. 6).

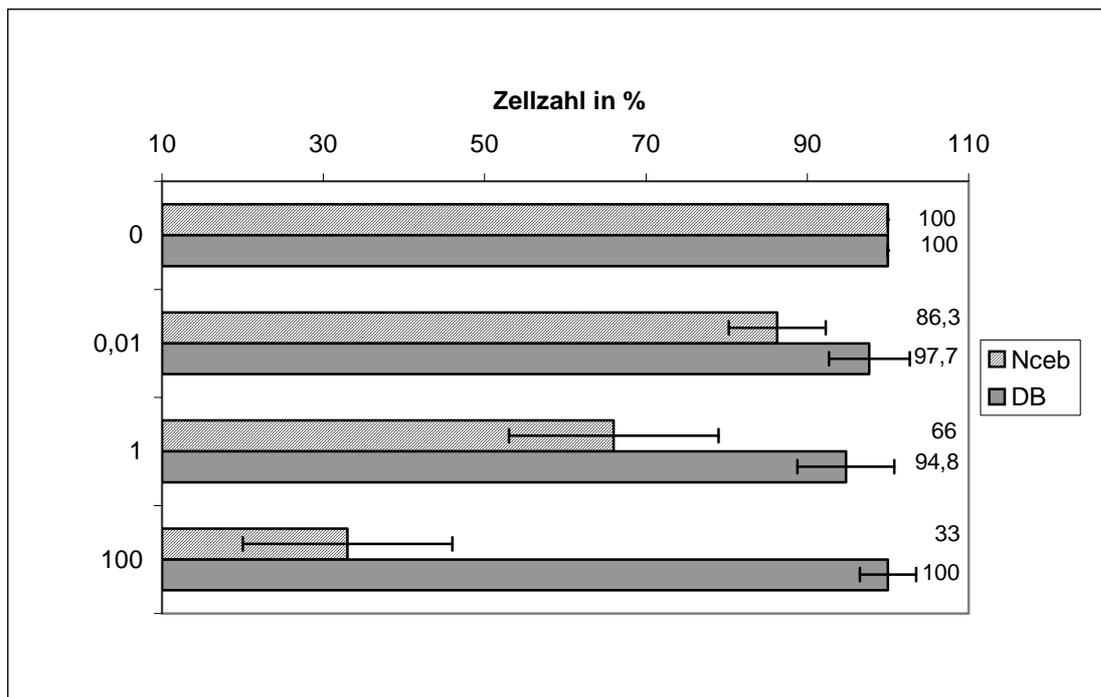


Abb. 6 Rituximab induzierte Hemmung der Proliferation

Die diffus großzellige Lymphomzelllinie DB und die Mantelzell Lymphomzelllinie NCEB wurden mit steigenden Konzentrationen von Rituximab behandelt. 1×10^5 Zellen pro Well wurden für 24h in Kulturmedium mit 0,01µg/ml, 1 µg/ml und 100 µg/ml Rituximab[R] in eine 96-Lochplatte gegeben. Als Kontrolle wurde Kulturmedium zu den Zellen gegeben [0]. Nach 24h wurde die Anzahl lebender Zellen im MTT-Test ermittelt. Es wurden 6-fach Werte drei unabhängiger Versuche zusammengefasst. Auf y-Achse [R]= Konzentration von Rituximab in µg/ml, x-Achse Anzahl der Zellen in %. Die Standardabweichung ist als Balken sichtbar.

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, inwiefern die beobachtete Reduktion der NCEB –Zellen nach Inkubation mit Rituximab tatsächlich auf einer Induktion des Zelltodes beruhte oder eine verminderte Proliferation der Grund für den beobachteten Effekt sein könnte.

Dazu wurden die beiden exemplarisch ausgewählten Zelllinien DB und NCEB in einer Annexin-PI Färbung mittels Durchflußzytometrie analysiert.

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Abb. 7 A dargestellt. Nach 30 minütiger Stimulation der DB-Zellen mit dem monoklonalen Antikörper Rituximab zeigte sich kein vermehrter Zelltod im Vergleich zu den unstimulierten Zellen. Rituximab führte bei den DB Zellen weder zu einer Abnahme der Zellproliferation im MTT-Test, noch wurde der Zelltod induziert. Die Zellen der Linie DB weisen also eine Resistenz gegenüber Rituximab auf.

Im Gegensatz dazu führte die Inkubation mit Rituximab bei den NCEB Zellen zu einer signifikanten Verminderung der Proliferation.

Wie in Abb. 7 B zu sehen, kam es nach Stimulation mit Rituximab auch zur Induktion des Zelltodes. Die Induktion nahm dabei mit steigender Konzentration von Rituximab zu. NCEB Zellen sind also Rituximab sensibel.

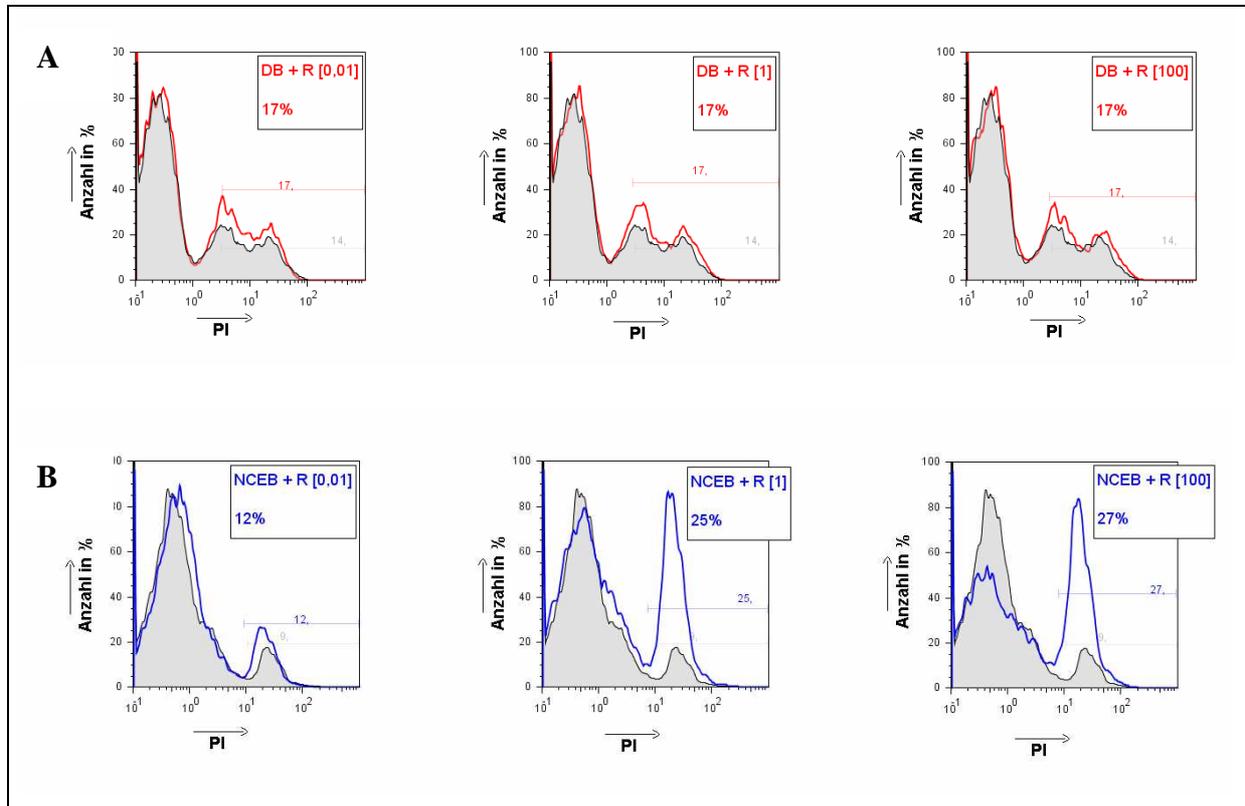


Abb. 7 Rituximab induziert den Zelltod von Nceb, nicht aber von DB

A Die Zelllinie DB zeigte kein Ansprechen auf Rituximab. Für die Versuche wurden die Konzentrationen von 0,01µg/ml, 1µg/ml und 100µg/ml Rituximab in 10% Kulturmedium verwendet. Die Zellen wurden für 30 Minuten mit diesen Konzentrationen stimuliert und anschließend mit einer Standard Annexin-PI Färbung gefärbt. Die Messung erfolgte in einem Durchflußzytometer. Das graue Histogramm stellt die unbehandelten Zellen als Kontrolle dar. In rot ist das Histogramm der DB-Zellen mit steigenden Konzentrationen Rituximab dargestellt. Die Anzahl toter, also PI positiver Zellen ist in % der Gesamtzellzahl angegeben

B Die Zelllinie NCEB ist sensibel auf die Behandlung mit Rituximab. Nach Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen Rituximab (0,01µg/ml, 1µg/ml und 100µg/ml Rituximab) für 30 Minuten zeigten sich vermehrt PI positive Zellen. Nach Färbung der Zellen mit Annexin-PI wurden diese in einem Durchflußzytometer gemessen. In grau sind die unbehandelten Zellen als Kontrolle, in blau die NCEB-Zellen mit steigenden Rituximabkonzentrationen, dargestellt. Die Anzahl toter, also PI positiver Zellen ist in % der Gesamtzellzahl angegeben

3.1.2. CD20 - und GM-1-Expression dieser Zelllinien

Eine mögliche Erklärung für das unterschiedliche Ansprechen der beiden Zelllinien DB und NCEB auf den Antikörper Rituximab könnte die Höhe der CD20-Expression der Lymphomzellen sein. Daher wurde nun im nächsten Schritt untersucht, ob sich Rituximab sensible Zelllinien in der Expression des Oberflächenmoleküls CD20 von den resistenten Zellen unterscheiden. Es wurden die Rituximab resistente Zelllinie DB und die Rituximab sensible Zelllinie NCEB auf ihre CD20-Expression mittels Durchflußzytometrie untersucht. Wie in Abb. 8 A zu sehen, zeigte die Rituximab resistente Zelllinie eine deutlich höhere CD20-Expression als die sensible Zelllinie NCEB. Des Weiteren wurden die elf Zelllinien, die schon auf ihre Sensibilität gegenüber Rituximab hin untersucht worden waren, ebenfalls auf ihre CD20-Expression analysiert (siehe Tabelle 6). Auch diese zeigten keine Korrelation zwischen der CD20-Expression und dem Ansprechen auf Rituximab. Wie in Tabelle 6 zu sehen, wiesen Lymphomzellen, die sehr gut auf eine Behandlung mit Rituximab ansprachen, teilweise eine eher niedrige Expression des Oberflächenantigens CD20 auf. Umgekehrt zeigten Zellen mit sehr hoher CD20- Expression größtenteils kein sehr gutes Ansprechen auf Rituximab. So haben beispielsweise die Zellen der Linie Granta eine hohe CD20 Expression, sprechen jedoch kaum auf Rituximab an. Zellen der Linie SUDHL 10 zeigten kaum eine Expression von CD20 und dennoch ein Ansprechen auf die Stimulation mit dem Antikörper. Für die Weitergabe der zytotoxischen Signale von Rituximab sind spezielle Abschnitte der Zellmembran -lipid rafts- von entscheidender Bedeutung. Diese unterscheiden sich von den restlichen Zellmembranabschnitten durch ihren hohen Gehalt an Sphingolipiden und Cholesterin (siehe S.13, Lipid rafts).

Um zu überprüfen, ob die lipid rafts für die Wirkung von Rituximab entscheidend sind, wurden die folgenden Untersuchungen durchgeführt.

Dabei wurden die Zelllinien, welche bereits auf ihr Ansprechen auf Rituximab und die CD20 Expression hin untersucht worden waren, mittels Durchflußzytometrie auf die Expression von GM-1 analysiert (siehe Tabelle 6). Das Gangliosid GM-1 diente als Marker für die lipid rafts^{101 73}. Wie in Abb. 8 B zu sehen, zeigten die Rituximab resistenten Zellen DB eine signifikant niedrigere GM-1 Expression als die Rituximab sensiblen Zellen NCEB.

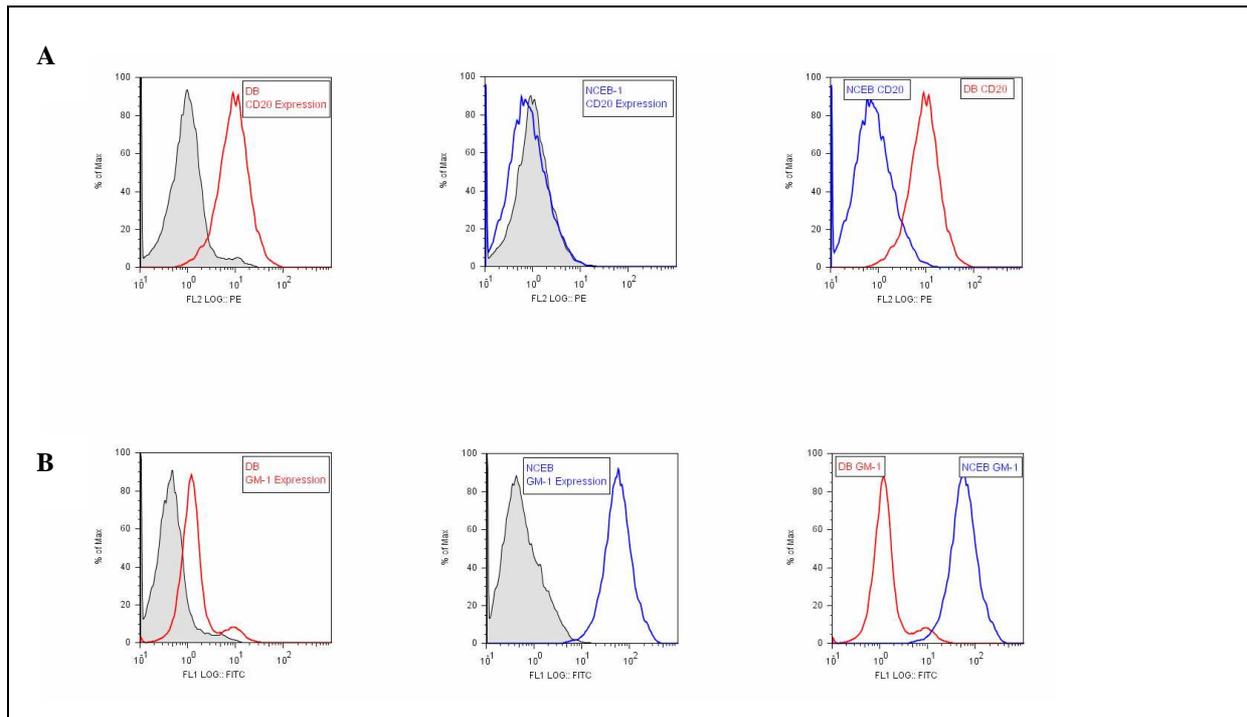


Abb. 8 Oberflächenexpression von CD20 und GM-1 bei DB-Zellen und NCEB-1

Die Zelllinien NCEB (in blau abgebildet) und DB (rot) wurden in 10% Kulturmedium kultiviert. Die Zellen wurden auf die Expression von CD20 (A) und GM-1 (B) in der Durchflußzytometrie (FACS) untersucht. Die Isotypenkontrolle ist in grau dargestellt.

- A** 1×10^6 Zellen mit anti-CD20- PE gekoppelten Antikörper gefärbt.
B 1×10^6 Zellen mit gegen GM-1 gerichteten FITC gekoppelten Choleratoxin B gefärbt.

Um zu überprüfen, ob zwischen der Expression von GM-1 und dem Ansprechen von Lymphomzellen auf Rituximab tatsächlich eine Korrelation besteht, wurden daraufhin auch die anderen elf Zelllinien auf ihre GM-1 Expression hin untersucht. Wie in Tabelle 6 zu sehen, wiesen Zellen mit einem guten Ansprechen auf Rituximab eine hohe Expression von GM-1 auf. So zeigten z.B. die Zellen der Linien Jeko, Rec 1 und SUDHL 10 ein mittleres bis sehr gutes Ansprechen auf Rituximab und eine hohe GM-1 Expression (+++). Zellen, die ein schlechtes Ansprechen oder eine Resistenz gegenüber Rituximab aufwiesen, wie z.B. die Zellen der Linien DB oder Raji A, hatten eine niedrige GM-1 Expression.

Insgesamt korrelierte die Expression des Sphingolipids GM-1 bei allen untersuchten Lymphomzellen mit dem Ansprechen dieser Zellen auf Rituximab.

Tabelle 6 CD20 und GM-1 Expression und Ansprechen auf Rituximab

Zelllinie	Zelltyp	CD20 Expression	GM-1 Expression	Ansprechen auf Rituximab
DB	Diffus großzelliges Lymphom	+++	+	-
Granta	Mantelzell-Lymphom	++++	++	+
Raji A	Burkitt-Lymphom	+++	+	+
MEC 1	chronische B-Zell Leukämie	+++	++	+
EHEB	chronische B-Zell Leukämie	++++	++	+
Raji B	Burkitt-Lymphom	+++	++	++
SUDHL 4	Diffus großzelliges Lymphom	+++++	++	++
SUDHL 10	Diffus großzelliges Lymphom	+	+++	++
Rec 1	Mantelzell-Lymphom	++++	+++	+++
Jeko	Mantelzell-Lymphom	+++	+++	+++
NCEB-1	Mantelzell-Lymphom	+++	++++	+++

Die CD20 Expression wurde mit einem PE gekoppelten anti-CD20 Antikörper, die GM-1 Expression mit FITC gekoppelten Cholera toxin B in der Durchflußzytometrie bestimmt. Das Ansprechen der Zellen auf Rituximab wurde mittels 3-fach Werten im MTT-Test ermittelt. Die Zellen wurden für 24h mit Rituximab 100 µg/ml behandelt. Eine Abnahme der lebenden Zellen um weniger als 5% wurde als kein Ansprechen gewertet und mit dem Symbol – versehen. Induktion von weniger als 10% Abnahme der lebenden Zellen entsprach einem schwachen Ansprechen und ist in der Tabelle als + dargestellt. Wurden weniger als 20% Reduktion erreicht, entsprach das einem mittleren Ansprechen (++) . Eine Reduktion um mehr als 20% der Zellen entsprach einem guten Ansprechen und die Zellen wurden als sensitive Zelllinie bezeichnet (+++).

3.1.3. Wirkung von Rituximab über CDC und Apoptose

Rituximab kann auf verschiedene Weise Zelltod induzieren. Neben der Antikörper vermittelten Zytotoxizität (ADCC) kann Rituximab auch direkt Apoptose induzieren⁹³. Darüber hinaus kann der Antikörper über das Komplementsystem eine Komplement-abhängige Zytolyse (CDC) bewirken¹⁶. Welche Bedeutung die CDC und die Apoptose für die Wirkung des Antikörpers tatsächlich haben, ist unklar und wurde deshalb im folgenden in unserem *in vitro* Modell genauer analysiert. Dazu wurden die Komponenten des Rituximab induzierten Zelltodes isoliert betrachtet. Für die Untersuchung des apoptotischen Effekts wurde hitzeinaktiviertes Serum ohne aktives Komplement verwendet und zur Analyse des komplementabhängigen Effekts von Rituximab, wurde nicht hitzeinaktiviertes Serum benutzt. Dieses Serum enthält aktives Komplement und somit die Voraussetzungen für die CDC.

Zunächst wurde die Wirkung von Rituximab auf die sensible Lymphomzelllinie NCEB untersucht. Dazu wurden die NCEB Zellen für 30 Minuten in hitzeinaktiviertem Medium mit Rituximab stimuliert. Anschließend wurde die Anzahl der lebenden Zellen nach 24 und nach 48 Stunden im MTT Test bestimmt. Wie in Abb. 9 zu sehen, reduzierte Rituximab die Anzahl lebender NCEB Zellen in komplementhaltigem Medium deutlich stärker als im hitzeinaktiviertem Medium. Der Effekt der Antikörper-vermittelten CDC war 24h nach Stimulation mit Rituximab wesentlich stärker als die Zytotoxizität durch die Induktion der Apoptose. Der Antikörper Rituximab konnte das Wachstum der lebenden Lymphomzellen durch die CDC um mehr als 1/4 reduzieren. Der Effekt der CDC war dabei abhängig von der Konzentration des Serums und nahm mit zunehmender Serum- Konzentration zu. Auch nach 48h Inkubation der NCEB Zellen mit Rituximab zeigten sich signifikant weniger lebende Lymphomzellen durch die induzierte Komplement-vermittelte zelluläre Toxizität als durch die reine Apoptose (siehe Abb. 9). Der inhibitorische Einfluss von Rituximab auf die Proliferation der Lymphomzellen ist bei intaktem Komplementsystem *in vitro* vor allem durch die CDC bedingt und nimmt bei steigender Serumkonzentration zu.

Die Anzahl lebender Zellen der Linie NCEB war durch die Zugabe von Rituximab in 30% Serum-Medium Gemisch um mehr als 1/5 vermindert, nach 48h sogar um mehr als 1/4. Im Gegensatz dazu reduzierte sich die Anzahl lebender NCEB -Zellen durch die Rituximab induzierte Apoptose nur um 6,5 %. Nach 48h Inkubation der NCEB Zellen mit Rituximab betrug die Induktion des Zelltodes durch Apoptose 13,7 %.

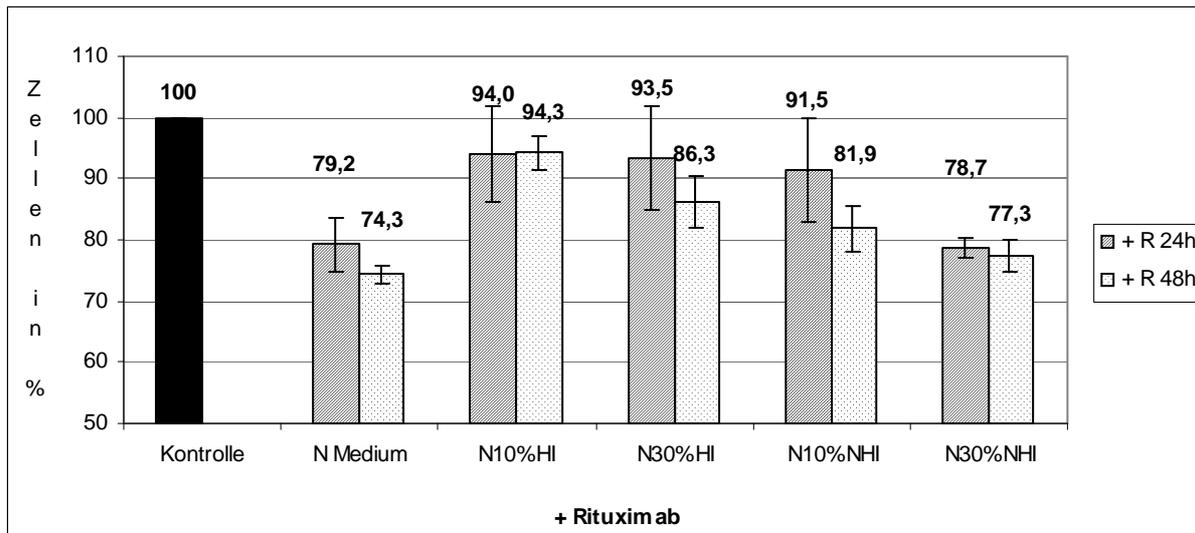


Abb. 9 CDC und Apoptose durch Rituximab

In drei unabhängigen Versuchen gleichen Aufbaus wurden je 1×10^5 Zellen der sensiblen Mantelzelllymphomlinie NCEB in verschiedenen Medien für 24h und 48h mit $100 \mu\text{g/ml}$ Rituximab behandelt. Die Zellen befanden sich dabei in 10% Kulturmedium (Medium), bei 60°C hitzeinaktiviertem Serum in 10% (10%HI) oder in 30% Konzentration (30%HI) oder in nicht hitzeinaktiviertem Medium 10% (10%NHI) oder in 30% Konzentration (30%NHI). Als Kontrolle dienten NCEB Zellen im Kulturmedium ohne Rituximabzugabe in schwarz. Die Anzahl lebender Zellen wurde mittels 6-facher Werte im MTT-Test ermittelt. Dargestellt wird der Mittelwert der Versuche. Die Standardabweichung der Werte ist als Balken dargestellt.

Die Stimulation der sensiblen Lymphomzellen mit Rituximab bewirkte eine verminderte Proliferation der Zellen, vor allem in Gegenwart eines intakten Komplementsystems. Welchen Einfluss Rituximab und die Induktion der CDC bzw. Apoptose auf den Tod der Lymphomzellen haben, wurde mittels einer Annexin-V-FITC Färbung im Durchflußzytometer untersucht. Dazu wurden die sensible Zelllinie NCEB und die resistente Zelllinie DB in komplementhaltigem Medium und in Medium mit inaktiviertem Komplementsystem mit Rituximab stimuliert. Die Zellen der Linie DB erwiesen sich als resistent gegenüber der Wirkung von Rituximab im Kulturmedium (siehe Abb. 7 A). Durch Stimulation der Zelllinie DB mit dem monoklonalen Antikörper Rituximab wurde weder durch CDC noch durch Apoptose eine signifikante Induktion des Zelltodes erreicht.

Im Gegensatz dazu nahm die Anzahl PI positiver Zellen nach Stimulation der NCEB Zellen mit Rituximab im Vergleich mit den nicht stimulierten Zellen zu (siehe Abb. 10). Der monoklonale Antikörper Rituximab zeigte im Medium, welches aktive Komplementanteile enthielt, über die CDC eine signifikante Induktion des Zelltodes der sensiblen NCEB- Zellen. Durch die Apoptose wurden nach Stimulation ebenfalls der Zelltod der NCEB-Zellen induziert, dieser war jedoch signifikant geringer als durch die CDC. In Abb. 10 ist die

Rituximab induzierte CDC und Apoptose der NCEB Zellen in Gegenwart von niedriger oder höher konzentriertem Serum dargestellt. Wie in Abb. 10 B zu sehen, bewirkte Rituximab durch die CDC eine signifikante Induktion des Todes der NCEB Zellen. Dabei starben, je nach Konzentration des komplementhaltigen Serum-Medium Gemisches, durch die Behandlung mit Rituximab 19% bzw. 23% der Mantelzelllymphom- Zellen. Wie in Abb. 10 A zu sehen, induzierte Rituximab durch Apoptose signifikant weniger Zelltod der NCEB Zellen als über die CDC. Durch die Apoptose starben bei niedriger Konzentration des hitzeinaktivierten Serums etwa 9%, bei höherer Konzentration waren es 11% der Zellen (siehe Abb. 10 C).

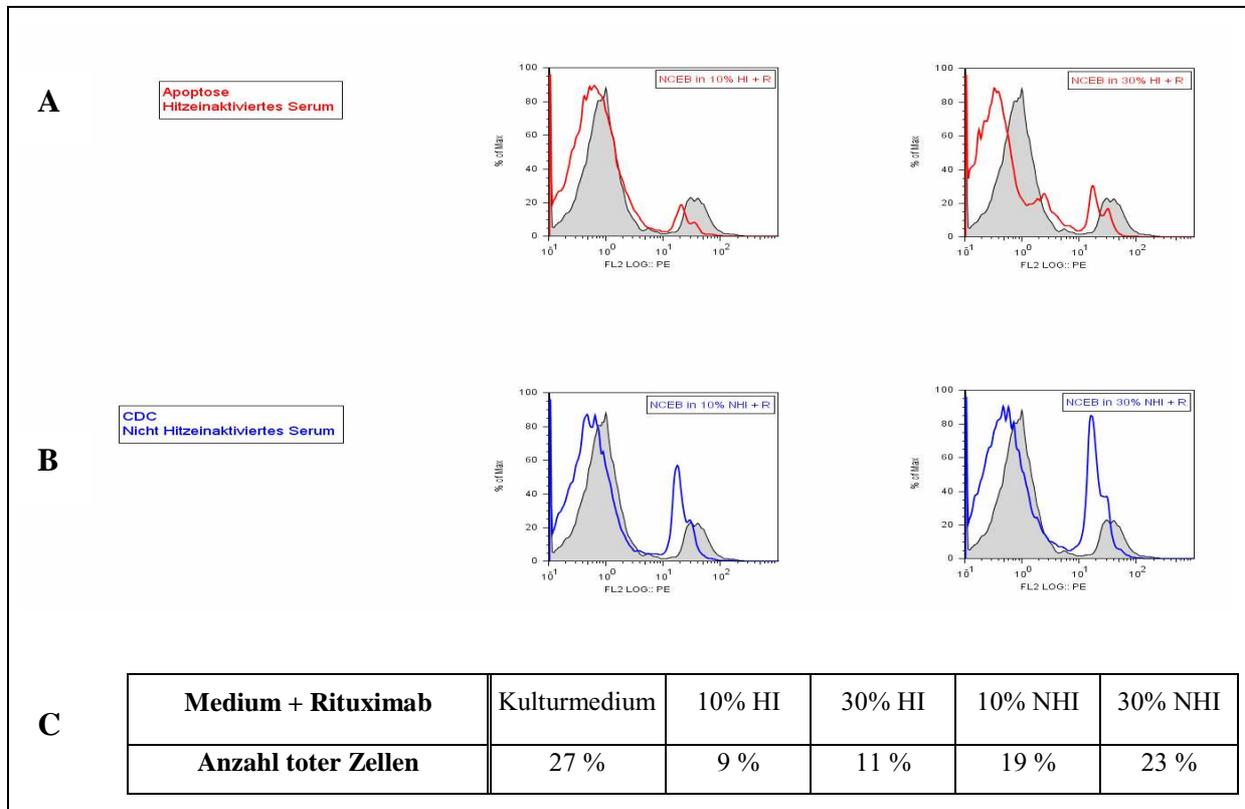


Abb. 10 Rituximab vermittelte CDC und Apoptose bei 10% + 30% Serumkonzentration

Die Mantelzelllymphomlinie NCEB nach Stimulation mit 100µg/ml Rituximab für 24h. Die Auswertung erfolgte mit einer Standard Annexin-PI Färbung im Durchflußzytometer. Dargestellt ist als Histogramm die Zunahme der toten Zellen im Vergleich zur grauen Isotypenkontrolle.

A Apoptose: Je 1×10^6 Zellen wurden für 24h in 10% und 30% bei 60°C hitzeinaktivierten Serum-Medium Gemisch (10%HI und 30%HI) mit 100µg/ml Rituximab inkubiert.

B CDC: Je 1×10^6 Zellen wurden für 24h in 10% und 30% nicht hitzeinaktivierten Serum-Medium Gemisch (10%NHI und 30%NHI) mit 100µg/ml Rituximab inkubiert.

C Tabelle: Anzahl toter Zellen nach Stimulation mit Rituximab in verschiedenen Medien. Die Anzahl für den Farbstoff PI positiver Zellen wurde in Prozent der Gesamtzellzahl angegeben.

Der komplement-vermittelte Zelltod erwies sich in dieser Arbeit als effektiver im Vergleich mit dem isolierten, durch Apoptose vermittelten Zelltod. Durch die CDC kam es zu einer verminderten Proliferation der Lymphomzellen und zu einer direkten Induktion des Zelltodes. In Abwesenheit von aktivem Komplement zeigte sich ein geringer, jedoch substantieller, zytotoxischer Effekt von Rituximab auf die Zellen der Linie NCEB. Die zugrundeliegenden Mechanismen der Rituximab induzierten Apoptose waren unklar und wurden deshalb im folgenden genauer untersucht.

Rituximab aktiviert Apoptose initiiierende Caspasen

Die Apoptose wird von spezifischen Proteasen, den Caspasen, gesteuert und vermittelt. Diese Caspasen bilden Reaktionskaskaden die zum programmierten Zelltod führen. Man unterscheidet einen extrinsischen, der mit der Aktivierung der Caspase 8 assoziiert ist, und einen intrinsischen Weg, welcher über die Caspase 9 reguliert wird. Als Effektor dieser beiden Wege fungiert die aktive Caspase 3. Um die Induktion der Apoptose nach Stimulation mit Rituximab zu untersuchen, wurde der extrinsische Weg- in Form der Caspase 8-, der intrinsische Weg- in Form der Caspase 9- und die Effektor Caspase 3 analysiert.

Zunächst wurde der extrinsische Weg der Apoptoseaktivierung betrachtet. Als wichtigster Vermittler gilt die Caspase 8, deren Aktivierung die Apoptose anstößt. Extrinsische Signale lösen eine Spaltung der inaktiven Prä-Caspase 8 und damit deren Aktivierung aus. Die Prä-Caspase 8 hat eine Molekülgröße von 65kDa und wird in 3 kleinere Fragmente zerteilt. Diese werden dadurch aktiviert und können die Effektor- Caspase 3 ihrerseits spalten und den programmierten Zelltod initiieren. DB und NCEB Zellen wurden mit Rituximab für 5 oder 20 Minuten behandelt und im weiteren auf die Expression von Prä-Caspase 8 untersucht. Nach Stimulation mit Rituximab konnte bei der sensiblen Zelllinie NCEB schon nach 5 min eine Aktivierung der Caspase 8 beobachtet werden. Wie in Abb. 11 zu sehen, nahm die inaktive Präform der Caspase 8 nach Stimulation der sensiblen Zellen deutlich ab.

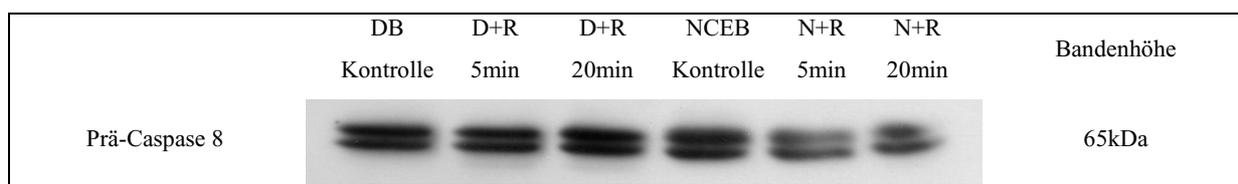


Abb. 11 Rituximab aktiviert die Caspase 8 bei NCEB

Zellen von DB und NCEB wurden mit 10% Kulturmedium (Kontrolle) oder 10% Kulturmedium mit 100µg/ml Rituximab für 5min und 20min auf Eis behandelt. Danach wurde die Zellen lysiert und mit 6X-Probenpuffer versetzt. In einer Gelelektrophorese wurden die Proteine der Größe nach getrennt und im Western Blot mit einem Anti-Caspase 8-Antikörper gefärbt. Gezeigt wird die inaktive Präform der Caspase 8 bei 65kDa.

Dagegen kam es bei der resistenten Linie DB in diesen kurzen Beobachtungszeiträumen zu keinen Veränderungen der Aktivierung der Caspase 8 (siehe Abb. 11).

Um zu untersuchen, ob diese Aktivierung der Apoptose bei den resistenten Zellen DB eventuell erst später einsetzt, und wie lange die Aktivierung der Apoptose bei den sensiblen Zellen andauert, wurden Zellen für bis zu 48h mit Rituximab behandelt (siehe Abb. 12).

Auch bei längeren Inkubationszeiten zeigte sich bei den resistenten Zellen DB nach Stimulation keine Aktivierung der Apoptose über die Caspase 8. Die sensiblen NCEB zeigten schon nach kurzer Stimulation eine Abnahme der inaktiven Form der Caspase 8 und somit indirekt eine Aktivierung der Caspase 8. Diese zunehmende Aktivierung bestand auch noch nach 48h Stimulation mit Rituximab (siehe Abb. 12).

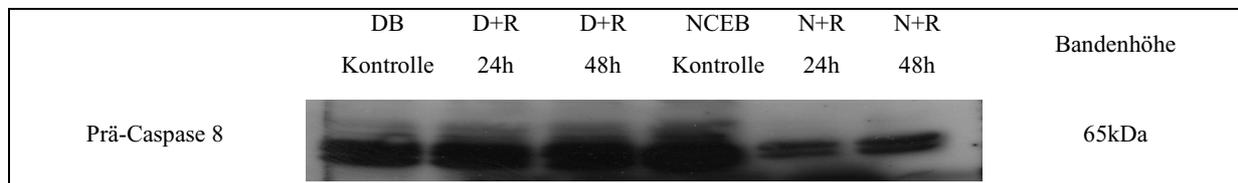


Abb. 12 Rituximab aktiviert die Caspase 8 bei NCEB und nicht bei DB

Zellen von DB und NCEB wurden im 10% Kulturmedium ohne (Kontrolle) oder mit 100µg/ml Rituximab für 24h und 48h behandelt. Danach wurde die Zellen lysiert, mit 6X-Probenpuffer versetzt und in einer Gelelektrophorese aufgetrennt. Im Western Blot wurden die Proben mit einem anti-Caspase 8-Antikörper gefärbt. Gezeigt wird die inaktive Präform der Caspase 8 bei 65kDa.

Rituximab induzierte bei den sensiblen Non Hodgkin Lymphomzellen über den extrinsischen Weg die Apoptose. Die Rituximab resistenten Zellen zeigten dabei keine extrinsische Aktivierung der Apoptose.

Die Apoptose kann neben der Aktivierung via Caspase 8 auch durch den intrinsischen Weg, mittels Caspase 9, aktiviert werden. Auch hier kommt es durch Spaltung der inaktiven Prä-Caspase 9 in zwei aktive Fragmente zur Aktivierung der Caspase. Die aktive Caspase 9 spaltet wiederum die Effektorcaspase 3 in die aktive Form und die Apoptose beginnt. Nach Stimulation der Lymphomzellen mit Rituximab konnte in mehreren Western Blots nur eine nicht signifikante Zunahme der Aktivität der Caspase 9 beobachtet werden. Die DB Zellen zeigten keine Aktivierung der Caspase 9 nach Stimulation. Die Daten werden nicht gezeigt.

Der Protease Caspase 3 kommt eine Schlüsselrolle in der Vermittlung und Ausführung der Apoptose zu. Diese wird von einer inaktiven Prä-Caspase 3, mit 32kDa Molekülgröße, in eine aktive gespaltene Form mit 17kDa und eine mit 11kDa Molekülgröße umgewandelt. Die Aktivierung der Caspase 3 wird unter anderem durch Caspase 8 und Caspase 9 eingeleitet.

Anhand der exemplarisch verwendeten Rituximab resistenten Zelllinie DB und der sensiblen Linie NCEB wurde die Aktivierung der Caspase 3 nach Stimulation mit Rituximab untersucht. Dazu wurden die Zellen für 24, 48, 72 oder 96 Stunden mit Rituximab inkubiert. Danach wurden diese im Western Blot auf die Expression der Prä-Caspase 3 hin untersucht. Wie in Abb. 13 zu sehen, führte Rituximab bei der sensiblen Zelllinie NCEB zu einer deutlichen Abnahme der Bande der inaktiven Prä-Caspase 3 im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle. Bei den Zellen der Rituximab resistenten Lymphomlinie DB ergab sich keine Veränderung der inaktiven Vorläuferform der Caspase 3 nach Stimulation. Mit β -Aktin Antikörpern wurden ungleiche Proteinbeladungsmengen ausgeschlossen. Rituximab induziert also in den stimulierten Zellen der sensiblen Zelllinie NCEB eine Aktivierung der Caspase 3 und somit der Apoptose. Die Stimulation mit Rituximab bewirkte hingegen keine Änderung im Grad der Aktivierung der Caspase 3 bei den Rituximab resistenten Zellen der Linie DB.

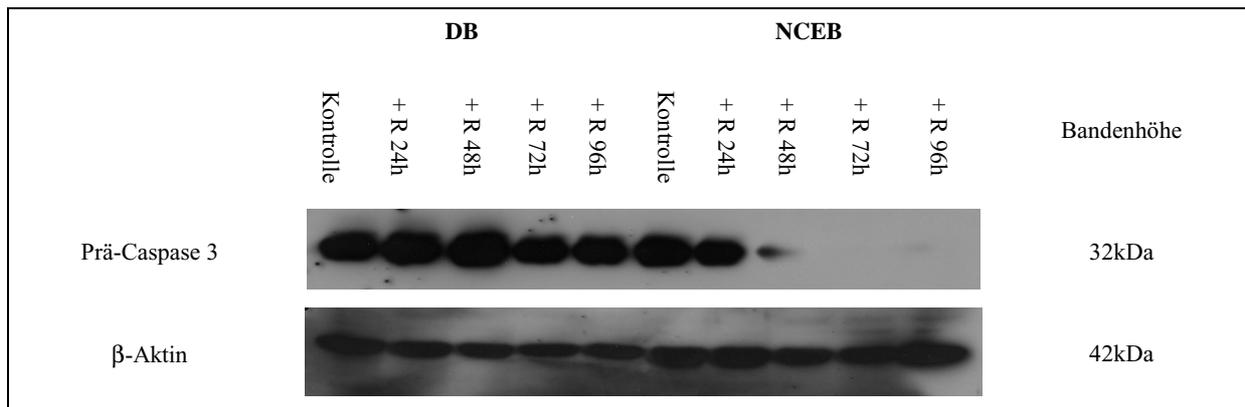


Abb. 13 Rituximab aktiviert Caspase 3 bei NCEB nicht aber bei DB

Je 9×10^6 Zellen DB oder NCEB wurden für 24h, 48h, 72h und 96h in 10% Kulturmedium mit $100 \mu\text{g/ml}$ Rituximab inkubiert. Als Kontrolle wurden die Zellen 24h in 10% Kulturmedium gehalten. Alle Zellen wurden nach der Inkubation lysiert und 1×10^5 Zellen je Probe geoelektrophoretisch aufgetrennt. Im Western Blot Verfahren wurde die Membran mit einem Anti-Caspase 3-Antikörper angefärbt. Die gleiche Proteinbeladung der Proben ist durch die β -Aktin Kontrolle sichtbar. Die inaktive Präform der Caspase 3 wurde als Prä-Caspase 3 benannt.

3.1.4. Lipid rafts sind essentiell für die Wirkung von Rituximab

Wie bereits gezeigt wurde, korrelierte die Expression des Sphingolipids GM-1 der Lymphomzellen mit dem Ansprechen auf die Behandlung mit Rituximab. Sphingolipide sind wichtige Bestandteile der Zellmembran. Besonders reich an Sphingolipiden und Cholesterinmolekülen sind die sogenannten lipid rafts. Lipid rafts sind Abschnitte der Zellmembran die entscheidend an der Signalvermittlung der Zellen beteiligt sind. In der vorliegenden Arbeit soll die Bedeutung der lipid rafts für die Wirkung von Rituximab untersucht werden. Um die lipid rafts von den anderen Zellmembranabschnitten zu unterscheiden wurden die Rituximab sensiblen Lymphomzellen NCEB mit Hilfe des Succrosegradienten in unterschiedliche Fraktionen aufgetrennt (siehe S. 20). Die Fraktionen 2-5 enthalten die lipidreichen Membrandomänen- lipid rafts- und werden als Raft Fraktionen zusammengefasst. Die Fraktionen 7-11 werden als Non Raft Fraktionen bezeichnet.

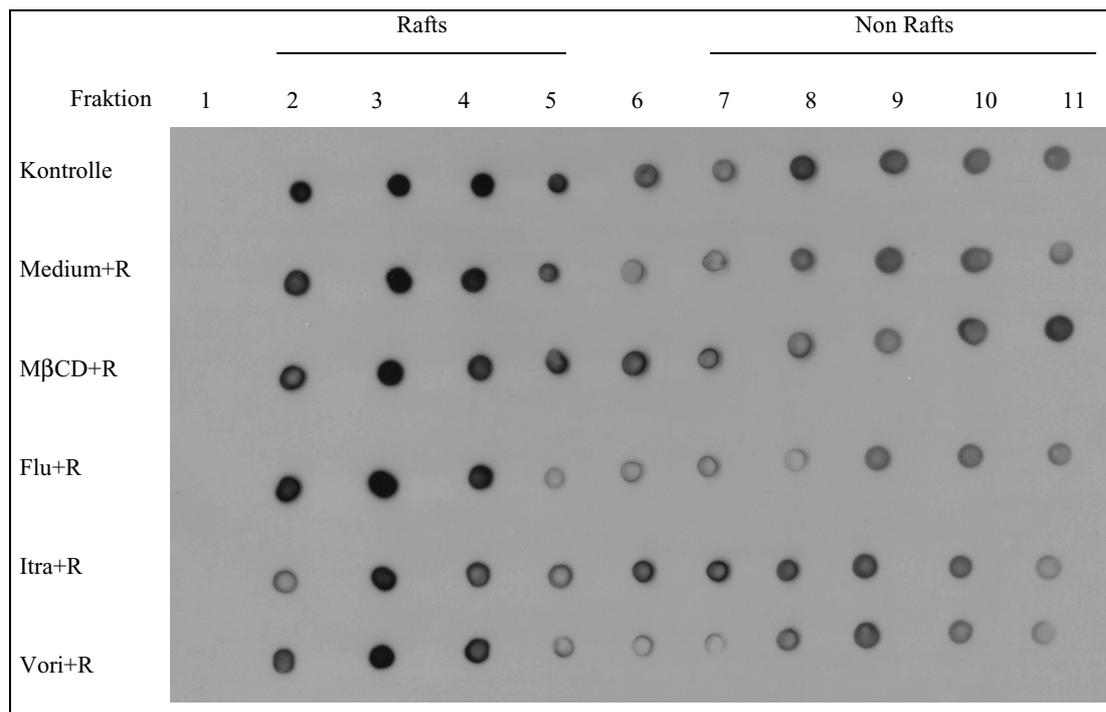


Abb. 14 Die fraktionierten Lysate besitzen die gleiche Verteilung von GM-1 im Dot Blot

Je 9×10^6 Zellen/ml der Mantelzelllymphomlinie NCEB wurden für 24h in 10% Kulturmedium ohne Zusätze oder mit 5mM MβCD, 10μg/ml Fluconazol, 10μg/ml Itraconazol oder 10μg/ml Voriconazol behandelt. Zu den Zellen wurden für 30min 100 μg/ml Rituximab gegeben. Die Zellen wurden lysiert und in einem Succrosegradienten mittels Ultrazentrifugation fraktioniert. Die Fraktionen wurden in 400μl Schritten entnommen und nummeriert. Fraktion 1 bezeichnet dabei die ersten 400 μl Abnahme. Je 1μl der fraktionierten Lysate wurde mit 4μl Aqua dest. auf eine Nitrozellulosemembran getropft und mit Cholera toxin Subunit B, einem anti-GM1-Antikörper, angefärbt. Die Fraktionen 2-5 werden als Raft Region, die Fraktionen 6-11 als Non-Rafts bezeichnet.

Um die erfolgreiche raft Präparation zu überprüfen, wurden die Lysate mittels eines Dot Blots (siehe S. 23) kontrolliert. In Abb. 14 ist beispielhaft die Verteilung von GM-1 eines untersuchten Zelllysats gezeigt. Der Marker GM-1 konnte vor allem in den Raft Fraktionen nachgewiesen werden. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den vorbehandelten Proben und der Kontrolle. Alle in dieser Arbeit verwendeten fraktionierten Lysate wurden mittels Dot Blot auf die Verteilung von GM-1 kontrolliert.

Rituximab rekrutiert CD20 in die lipid rafts

Die Zielstruktur von Rituximab, das Oberflächenantigen CD20, liegt als Monomer in der Zellmembran vor und ist nicht lipid raft assoziiert ¹¹⁰. Im folgenden wurde die Lokalisation des CD20 Antigens innerhalb der Zellmembran nach Stimulation der Zellen mit Rituximab untersucht. Dazu wurde die Fraktionierung im Succrosegradienten nach Deans et al. ²⁸ verwendet. Wie in Abb. 15 zu sehen, zeigte sich nach Stimulation der sensiblen Zellen mit Rituximab eine Rekrutierung der CD20-Moleküle. Dabei bewirkte die Stimulation mit Rituximab eine signifikante Translokation des CD20 Antigens aus den Non Raft Abschnitten der Zellmembran in die lipidreichen Mikrodomänen, die Raft Fraktionen.

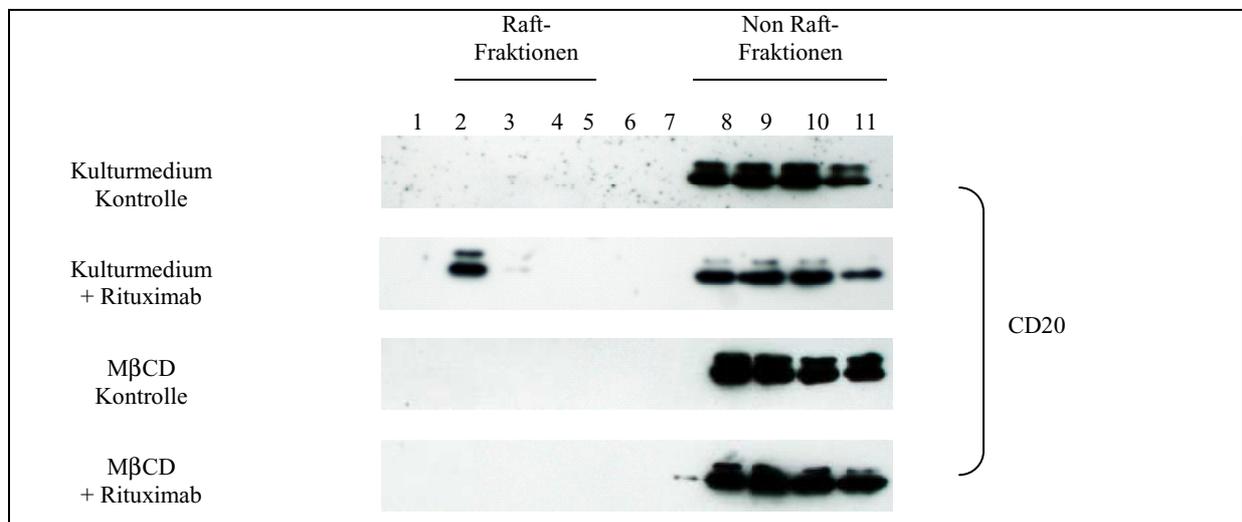


Abb. 15 Rituximab rekrutiert CD20 in die lipid rafts

NCEB-Zellen wurden im 10%Kulturmedium ohne oder mit 10mM MβCD für 30min auf Eis inkubiert. Nach 3-maligem Waschen mit reinem Medium wurden die Zellen entweder für 20min mit 100 µg/ml Rituximab stimuliert oder unbehandelt gelassen. 3×10^7 Zellen wurden lysiert und im Succrosegradienten mittels Ultrazentrifugation fraktioniert. Die Fraktionen wurden nach Gelelektrophorese im Western Blot mit einem anti-CD20-Antikörper behandelt. Fraktionen 2-5 repräsentieren die lipid rafts, Fraktionen 8-11 wurden als Non Rafts bezeichnet.

Die Substanz Methyl- beta-Cyclodextrin (M β CD) ist bekannt dafür, dass sie zelluläres Cholesterin depletiert und somit die funktionelle Integrität der lipid rafts verändert. Daher wurde diese zur Hemmung der lipid rafts für die folgenden Versuche verwendet. Nach Vorbehandlung der Zellen mit M β CD zeigte sich nach Stimulation der vorbehandelten Zellen mit Rituximab keine Rekrutierung der CD20 Moleküle in die lipidreichen Mikrodomänen. Die CD20-Rekrutierung durch Rituximab fand nur bei funktionell und strukturell intakten lipid rafts statt.

Der zytotoxische Effekt von Rituximab wird durch M β CD gehemmt

Der monoklonale Antikörper Rituximab führte auf molekularer Ebene zu einer Rekrutierung von CD20 in die lipid rafts, welche durch M β CD gehemmt wurde. Um zu untersuchen, ob die Hemmung des molekularen Ereignisses von funktioneller Bedeutung für die Wirksamkeit des Antikörpers Rituximab ist, wurde der Effekt von M β CD auf den zytotoxischen Effekt von Rituximab untersucht. Die bereits bekannte sensible und die resistente Zelllinie wurden dazu in einem Standard MTT-Test nach Vorbehandlung mit M β CD untersucht (siehe Abb. 16).

Wie bereits gezeigt, kam es nach Stimulation der NCEB Zellen mit Rituximab zu einer verminderten Zellproliferation. Nach Vorbehandlung mit M β CD war der Effekt von Rituximab auf die sensiblen Zellen jedoch vollständig aufgehoben. Die Stimulation der NCEB-Zellen mit dem Antikörper führte bei intakten lipid rafts zu einer Abnahme der lebenden Zellen um 37,5%. Nach Depletion des zellulären Cholesterins mittels M β CD bewirkte der Antikörper, trotz gleicher Konzentration, keine Änderung des Wachstums der Lymphomzellen NCEB. Rituximab zeigte also, nach Depletion des zellulären Cholesterins, keinen zytotoxischen Effekt mehr auf die Anzahl lebender NCEB Zellen. Die Rituximab resistente Zelllinie DB zeigte nach Stimulation mit dem Antikörper nur eine geringe Reduktion der Zahl lebender maligner Zellen. Die lebenden DB Zellen wurden durch die Stimulation lediglich um 10% vermindert. Die Vorbehandlung der DB Zellen mit M β CD führte erwartungsgemäß zu keiner Änderung des Ansprechens der Zellen auf Rituximab.

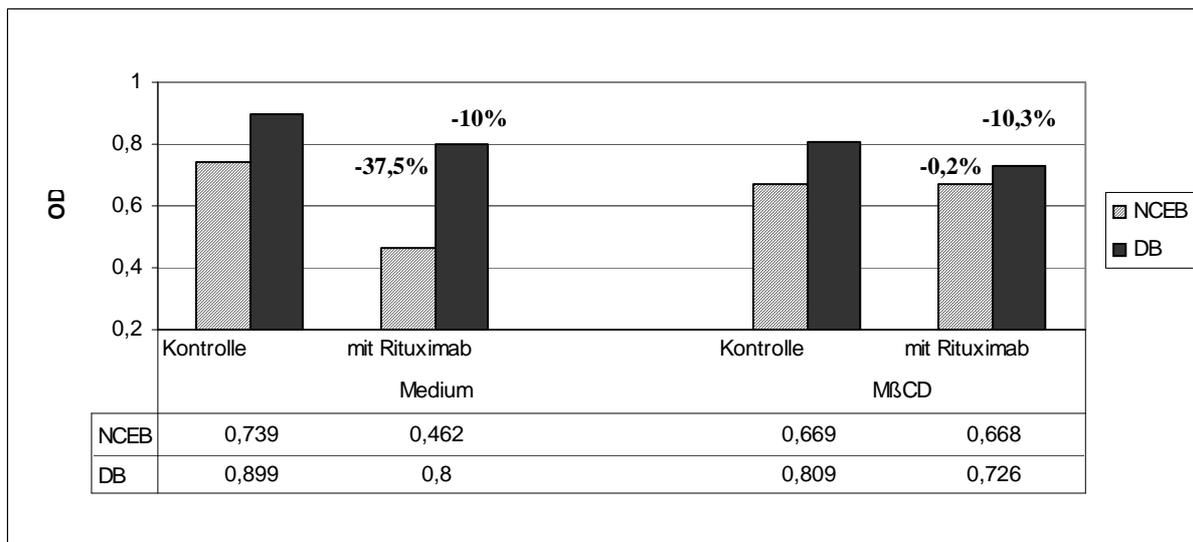


Abb. 16 MβCD hemmt den zytotoxischen Effekt von Rituximab

Die Rituximab sensible Zelllinie NCEB und die resistente Linie DB wurden für 30min mit 5mM MβCD auf Eis oder 20min im reinen Medium auf Eis behandelt. Danach dreimal gewaschen und im 10% Kulturmedium gelöst. In eine 96-Loch Zellkulturplatte wurden 1×10^3 Zellen/Loch gegeben und mit 100μg/ml Rituximab für 24h stimuliert oder unbehandelt belassen. Die Anzahl lebender Zellen wurde in einem Standard MTT-Test photometrisch ermittelt. Angegeben ist die Optical Density (OD) und in % die Abnahme lebender Zellen nach Stimulation.

Die Depletion des zellulären Cholesterins mittels MβCD bewirkte eine Verminderung des antiproliferativen Effekts von Rituximab. Wie in Abb. 21 zu sehen, inhibierte MβCD ebenfalls die Rituximab induzierte Zytotoxizität. In der Annexin-PI Färbung ergaben sich nach Stimulation mit Rituximab 31% tote Lymphomzellen. Nach Cholesterindepletion mittels MβCD induzierte Rituximab lediglich 1% tote Zellen. Durch Zerstörung der funktionellen lipid rafts mittels MβCD verlor der monoklonale Antikörper Rituximab also seine antiproliferative und seine zytotoxische Wirkung.

3.2. Antimykotika vom Azoltyp und Rituximab

Die beschriebenen Untersuchungen unterstreichen die Rolle der lipid rafts für den Rituximab induzierten Zelltod. Neben M β CD haben auch andere Stoffe und Medikamente Einfluss auf die Integrität der Lipide. Somit ist eine Veränderung der Funktion und Struktur der lipid rafts auch durch andere Stoffe, die Einfluss auf den Cholesteringehalt der Zellen haben, möglich. Patienten mit hämatologischen Erkrankungen haben ein signifikant höheres Risiko für systemische Pilzkrankungen als die Normalbevölkerung ³³. Diese Pilzinfektionen werden häufig mit Antimykotika vom Triazol-Typ behandelt. Diese bewirken neben der Hemmung der Ergosterolsynthese eine Abnahme des zellulären Cholesteringehaltes und somit eine Veränderung der lipid rafts. Möglicherweise führt diese Veränderung zu einer Hemmung des durch Rituximab induzierten Zelltodes, analog zum Effekt von M β CD. Um dieser Frage nachzugehen, wurden die Effekte der Triazol-Antimykotika auf Rituximab im folgenden genauer untersucht.

3.2.1. Ermittlung nicht toxischer Konzentrationen der verwendeten Antimykotika

Um die Konzentration zu ermitteln, in der die Antimykotika nicht toxisch auf die eingesetzten Lymphomzellen wirken, wurden zu Beginn der Untersuchungen Titrationsreihen verschiedener Konzentrationen der Antimykotika vom Triazol-Typ Fluconazol, Itraconazol, und Voriconazol angesetzt. Da sowohl die kurzfristige Interaktion der Antimykotika mit den lipid rafts und dem Antikörper Rituximab, als auch die Effekte einer längeren Behandlung mit diesen Medikamenten untersucht werden sollten, wurden die Zellen für 30 min und 24 h mit den verschiedenen Antimykotika inkubiert. Es wurde die Konzentration gesucht, welche keinen toxischen Effekt auf die Zellen aufweist, gleichzeitig aber hoch genug ist, um eventuelle Wechselwirkungen mit Rituximab zu zeigen.

Konzentrationsbestimmung für 30 min. Inkubationszeit

Die Zellen NCEB wurden für 30 min mit steigenden Konzentrationen von 10 μ g/ml bis zu 500 μ g/ml (siehe Tabelle 1) der Antimykotika Fluconazol, Itraconazol, und Voriconazol inkubiert. Anschließend wurde die Anzahl der NCEB Zellen im MTT Test bestimmt. Die

Ergebnisse sind in Abb. 17 B dargestellt. Das Antimykotikum Fluconazol zeigte toxische Effekte auf die Lymphomzellen ab einer Konzentration von über 100 µg/ml. Itraconazol war ab einer Konzentration von 100 µg/ml ebenfalls zytotoxisch. Voriconazol wirkte erst ab Konzentrationen von über 500 µg/ml toxisch auf die untersuchten Zellen. Die Konzentration von 100 µg/ml wurde für die folgenden Versuche ausgewählt.

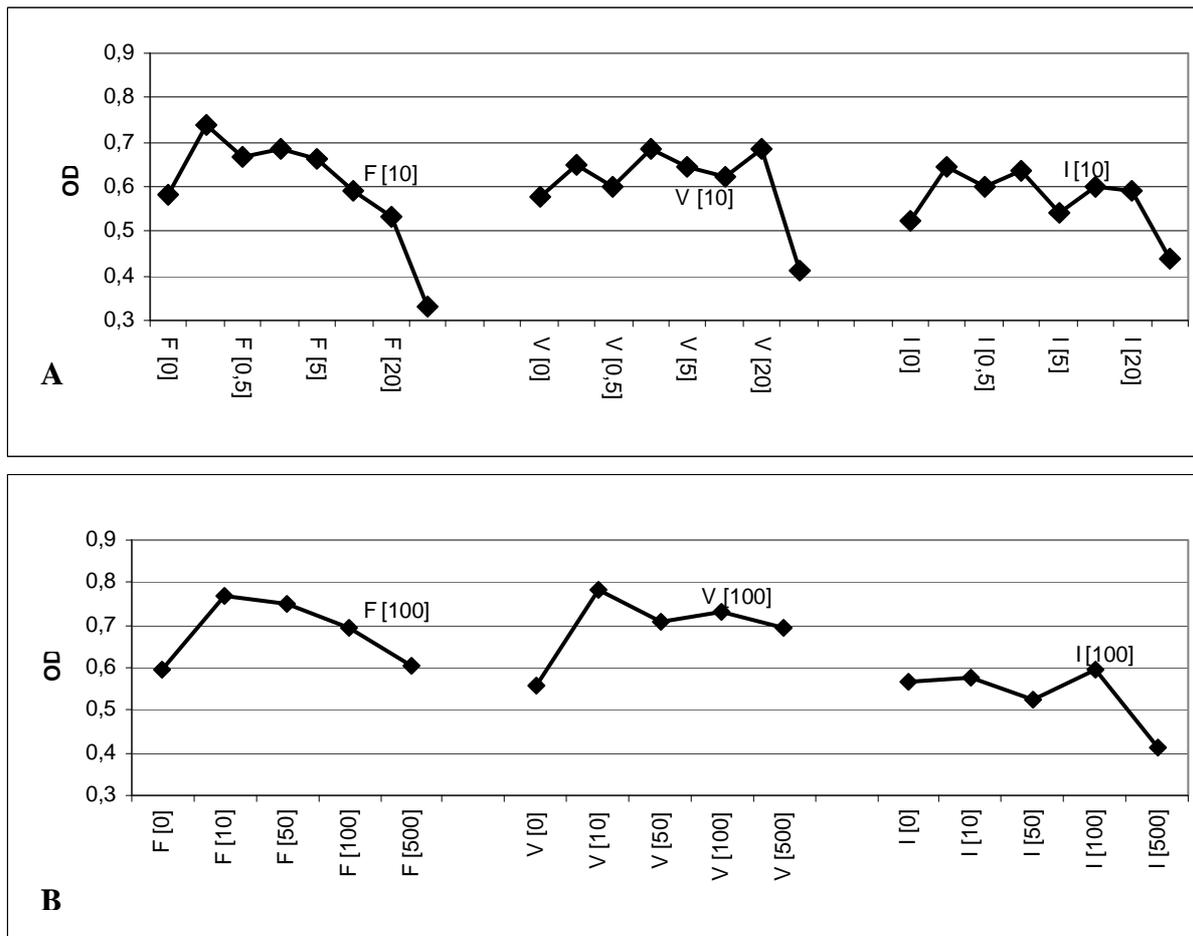


Abb. 17 Titration der höchsten nicht-toxischen Konzentration der Antimykotika

A Zellen der sensiblen Zelllinie NCEB wurden mit steigenden Konzentrationen der Antimykotika Fluconazol (F), Voriconazol (V) und Itraconazol (I) für 24 h behandelt.

B Zellen der sensiblen Zelllinie NCEB wurden mit steigenden Konzentrationen der Antimykotika Fluconazol (F), Voriconazol (V) und Itraconazol (I) für 30 min behandelt.

A + B Nach 3-maligem Waschen und Resuspension im 10% Kulturmedium wurden je 1×10^5 Zellen in ein Well der Zellkulturtestplatte gegeben. Nach 24 h erfolgte die Messung der lebenden Zellen in einem Standard MTT-Test. Die Konzentrationen sind in µg/ml angegeben; [0] bezeichnet die Kontrolle im 10% Kulturmedium ohne Zusatz. Angegeben ist die Optical Density (OD) der Messungen.

Konzentrationsbestimmung für 24 h Inkubationszeit

Da der Effekt der Antimykotika auf das Enzym der 14- α -Demethylase erst nach einiger Zeit einsetzt, wurden zusätzlich zu der Behandlung für 30 min auch Inkubationen über 24 h durchgeführt. Für diese Versuche wurde ebenfalls die höchste nicht toxische Konzentration der entsprechenden Antimykotika gesucht. NCEB- Zellen wurden für 24 h mit steigenden Konzentrationen der Antimykotika Fluconazol, Voriconazol und Itraconazol (siehe Tabelle 1) von 0,05 $\mu\text{g/ml}$ bis zu 50 $\mu\text{g/ml}$ für 24 h versetzt. Die Zahl lebender Zellen wurde in einem Standard MTT-Test ermittelt. Die höchste nicht toxische Konzentration für die 24 h Inkubationszeit betrug 10 $\mu\text{g/ml}$ (siehe Abb. 17 A). Diese Konzentration wurde im weiteren für die 24-stündige antimykotische Vorbehandlungen der Lymphomzellen verwendet.

3.2.2. CD20-Rekrutierung in lipid rafts wird durch Triazol-Antimykotika gehemmt

Bei Rituximab sensiblen Zellen führte die Stimulation mit Rituximab zu einer Rekrutierung von CD20 in lipid rafts. Die Cholesterindepletion mittels M β CD verhinderte dieses molekulare Ereignis. Im weiteren wurde untersucht, ob die Antimykotika ebenfalls die Rituximab abhängige CD20 Rekrutierung verändern. Dazu wurden die sensiblen Lymphomzellen NCEB vor der Stimulation mit Rituximab mit den entsprechenden Antimykotika inkubiert. Nach 30 minütiger Stimulation wurden die Zellen mittels Ultrazentrifugation im Succrosegradienten in einzelne Fraktionen aufgetrennt. Die korrekte Auftrennung wurde mittels Dot Blot Verfahren getestet.

Abb. 18 zeigt im Western Blot den Effekt der Antimykotika auf die Rituximab induzierte Rekrutierung von CD20. Die Rituximab Stimulation der NCEB Zellen führte zu einer Umlagerung der CD20 Moleküle in die Raft- Fraktionen. Wurden die Zellen mit M β CD vorbehandelt, fehlte diese. Bei den Zellen, die mit den Antimykotika Itraconazol und Voriconazol inkubiert wurden, konnte ebenfalls keine signifikante Rekrutierung von CD20 in die lipid rafts nachgewiesen werden. Das Antimykotikum Fluconazol hatte dagegen keinen Einfluss auf die CD20-Rekrutierung durch Rituximab.

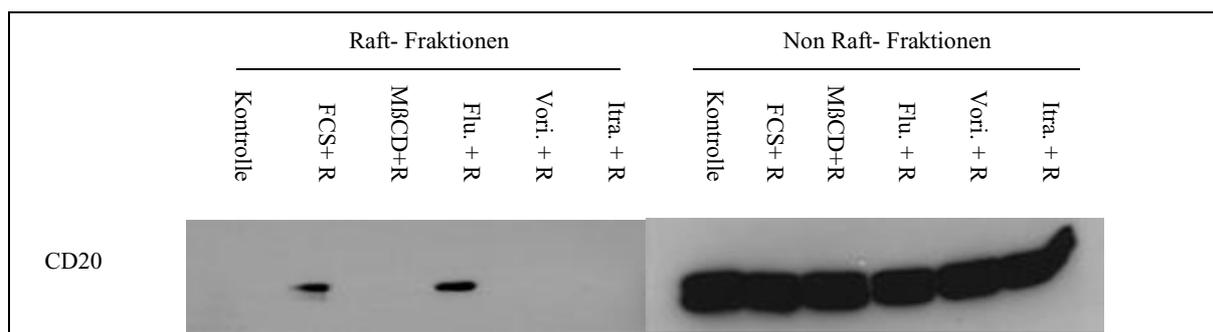


Abb. 18 CD20-Rekrutierung durch Rituximab nach Behandlung mit Triazol-Antimykotika

NCEB-Zellen wurden in verschiedenen Medien für 30min auf Eis inkubiert. Als Kontrolle wurde reines Medium verwendet. Zellen wurden mit 10mM MβCD, 100 µg/ml Fluconazol, 100 µg/ml Voriconazol oder 100 µg/ml Itraconazol versetzt. Danach wurden diese dreimal gewaschen und dann entweder für 20min mit 100 µg/ml Rituximab stimuliert oder unbehandelt belassen (Kontrolle). 3×10^7 Zellen wurden lysiert und im Succrosegradienten mittels Ultrazentrifugation fraktioniert. Nach Fraktionierung wurden die Fraktionen 2-5 als Rafts zusammengefasst und die Fraktionen 8-11 als Non Raft Fraktionen. Diese wurden nach Gelelektrophorese im Western Blot mit einem anti-CD20-Antikörper behandelt.

In Abb. 19 sind alle 11 Fraktionen der Lysate der Rituximab sensiblen Zellen NCEB aufgetragen. Die nicht vorbehandelten Zellen zeigten nach Stimulation eine signifikante CD20 Rekrutierung in die Fraktionen 2 und 3. Eine Vorbehandlung mit MβCD verhinderte diese. Als Antimykotikum wurde beispielhaft das Antimykotikum Itraconazol ausgewählt. Nach Stimulation zeigten die mit Itraconazol vorbehandelten Zellen nur eine geringe Rekrutierung der CD20 Moleküle in die Fraktion 2 und 3. Gleichzeitig wurden die fraktionierten Proben mit einem Antikörper gegen die Tyrosinkinase Lyn gefärbt. Dieser Vertreter der Src- Kinasen Familie ist konstitutiv in den lipid rafts lokalisiert.

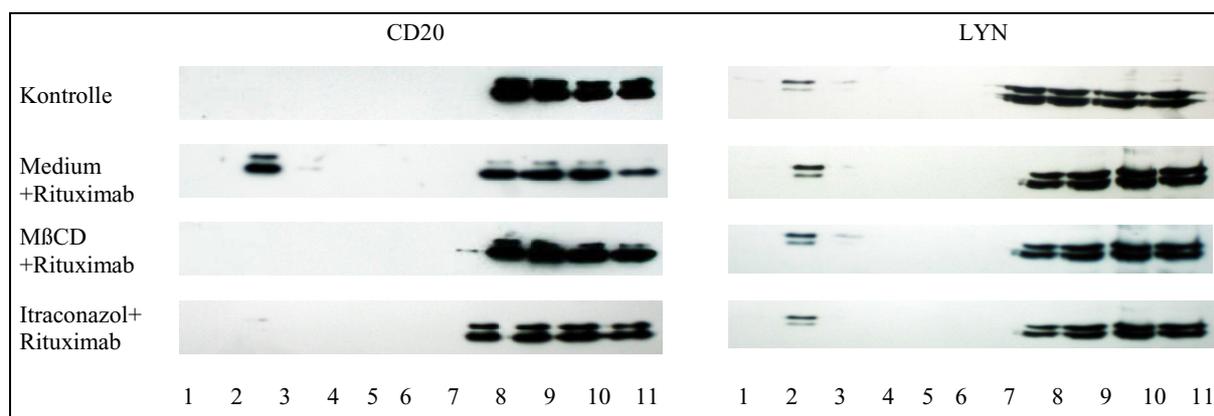


Abb. 19 Rituximab vermittelte Rekrutierung von CD20 nach Behandlung mit Itraconazol

NCEB-Zellen wurden in 10% Kulturmedium, 10mM MβCD oder 100 µg/ml Itraconazol für 30min auf Eis inkubiert. Danach wurden diese dreimal gewaschen und dann entweder für 20min mit 100 µg/ml Rituximab stimuliert oder unbehandelt gelassen (Kontrolle). 3×10^7 Zellen wurden lysiert und im Succrosegradienten mittels Ultrazentrifugation fraktioniert. Die Fraktionen 1-11 wurden in die Gele gegeben. Diese wurden nach Gelelektrophorese im Western Blot mit einem anti-CD20-Antikörper oder einem anti-LYN-Antikörper behandelt.

Wie in Abb. 19 rechts zu sehen, zeigten die einzelnen Proben keine Unterschiede in der Expression von Lyn.

Die für die zytotoxische Wirkung von Rituximab wichtige Rekrutierung der CD20-Moleküle in die lipidreichen Abschnitte der Zellmembran, wird durch die Medikamente vom Triazol-Typ Itraconazol und Voriconazol gehemmt. Die Hemmung durch die Antimykotika ist mit dem Effekt durch eine Vorbehandlung mit M β CD vergleichbar.

3.2.3. Die Wirkung von Rituximab wird durch Triazol- Antimykotika herabgesetzt

Die Antimykotika Itraconazol und Voriconazol inhibierten, analog zu M β CD, die Rituximab induzierte Rekrutierung von CD20. Im folgenden wurde der Einfluss der Antimykotika auf den antiproliferativen und zytotoxischen Effekt des Antikörpers Rituximab untersucht. Insbesondere wurde analysiert, ob sich die veränderte Rekrutierung der CD20 Moleküle nach Inkubation der Zellen mit Antimykotika vom Azoltyp auf die Induktion des Zelltodes durch Rituximab auswirkt.

Dazu wurden die Mantelzellymphomzellen NCEB für 30min mit den verschiedenen Antimykotika inkubiert. Nach Stimulation der Zellen mit Rituximab wurden diese für 24 oder 48 h inkubiert. Anschließend wurde die Anzahl lebender NCEB-Zellen in einem MTT-Test bestimmt. Der Effekt von Rituximab auf die sensible Zelllinie NCEB mit und ohne antimykotische Vorbehandlung ist in Abb. 20 dargestellt. Die Hemmung der Cholesterinsynthese durch die Antimykotika Fluconazol, Itraconazol und Voriconazol führte zu einer Hemmung des Rituximab induzierten Zelltodes. Rituximab sensible Zellen zeigten in Anwesenheit der Antimykotika ein signifikant vermindertes Ansprechen auf den monoklonalen Antikörper Rituximab. Dabei zeigte sich, dass der antiproliferative Effekt von Rituximab auf die Lymphomzellen nach Behandlung mit den Antimykotika hochsignifikant (p-Wert 0,00054) vermindert war im Vergleich zur Stimulation im Medium. Wie in der Abbildung zu sehen, reduzierte Rituximab die lebenden NCEB Zellen im Kulturmedium um ca. 30%. Hingegen war der Effekt von Rituximab bei den antimykotisch vorbehandelten Zellen deutlich geringer. So verminderte der Antikörper Rituximab die lebenden NCEB Zellen nach Vorbehandlung dieser mit Itraconazol nur um 8% und nach Vorinkubation mit Voriconazol nur um 13%. Durch M β CD konnte der Rituximab induzierte Effekt beinahe vollständig gehemmt werden. Nach 48-stündiger Inkubationszeit der Zellen mit den

entsprechenden Antimykotika zeigte sich nach der Behandlung mit Rituximab ebenfalls eine signifikant (p-Wert 0,00482) höhere Zellzahl als nach Stimulation im Medium.

Die Vorbehandlung der Lymphomzellen mit den Triazol-Antimykotika reduzierte den Effekt von Rituximab auch noch nach 48 h. Der antiproliferative Effekt des Antikörpers konnte ähnlich wie durch M β CD aufgehoben werden.

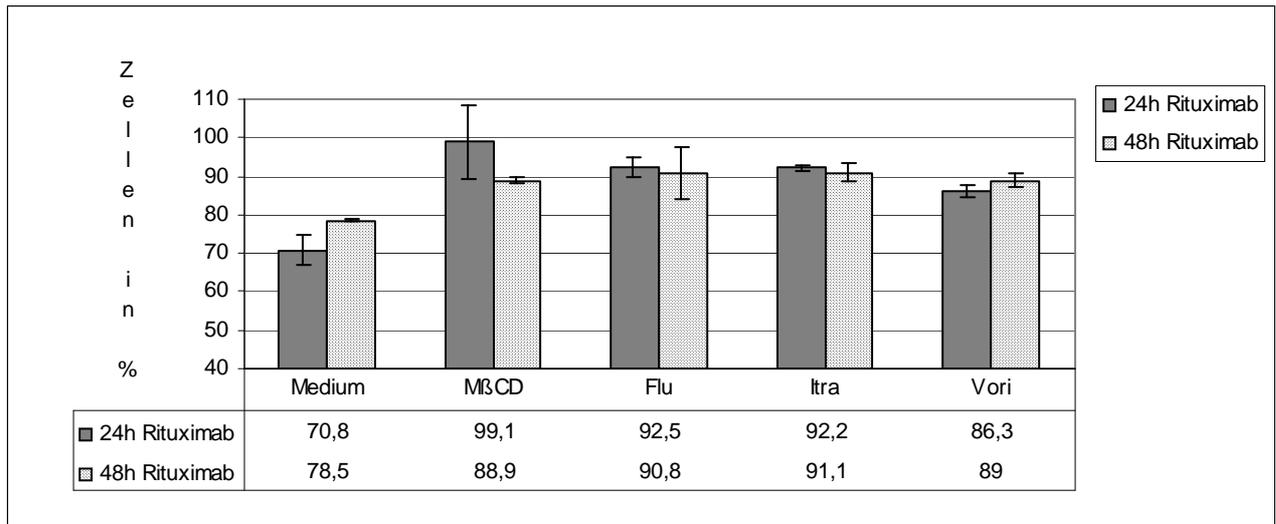


Abb. 20 Antimykotika vom Triazol-Typ hemmen die Wirkung von Rituximab

Die Zellen des Mantelzelllymphoms NCEB wurden 30min auf Eis mit M β CD oder 30min auf Eis mit 100 μ g/ml Fluconazol (Flu), 100 μ g/ml Itraconazol (Itra) oder 100 μ g/ml Voriconazol (Vori) behandelt. Die Kontrolle wurde 30min auf Eis im Kulturmedium gehalten. Dann wurden die Zellen für 30min auf Eis mit 100 μ g/ml Rituximab stimuliert oder mit reinem Medium (Kontrolle) behandelt. Die Zellen wurden dreimal gewaschen und je 1×10^5 Zellen in ein Well der 96 Loch-Zellkulturplatte gegeben. Nach 24 h Inkubation wurde die Anzahl lebender Zellen im Standard MTT-Test ermittelt Nach 48 h erneute Messung der Anzahl lebender Zellen. Auf der y-Achse ist in % die Anzahl lebender Zellen angegeben. Die Standardabweichung ist als Balken dargestellt.

Der Effekt der Antimykotika auf den Rituximab induzierten Zelltod wurde im folgenden untersucht (siehe Abb. 21). Im gleichen Ansatz wurden dabei Rituximab sensible Zellen für 30 min mit dem Antimykotikum Itraconazol inkubiert und danach mit Rituximab stimuliert. Die Anzahl lebender und toter Zellen wurde mittels Annexin- PI-Färbung bestimmt. Durch Rituximab starben bis 31% der Lymphomzellen im Medium. Nach Vorbehandlung mit Itraconazol kam es durch Rituximab zu keiner relevanten Induktion des Zelltodes. Auch hier hatte Itraconazol dabei einen mit M β CD vergleichbaren Einfluss auf die Rituximab induzierte Zytotoxizität.

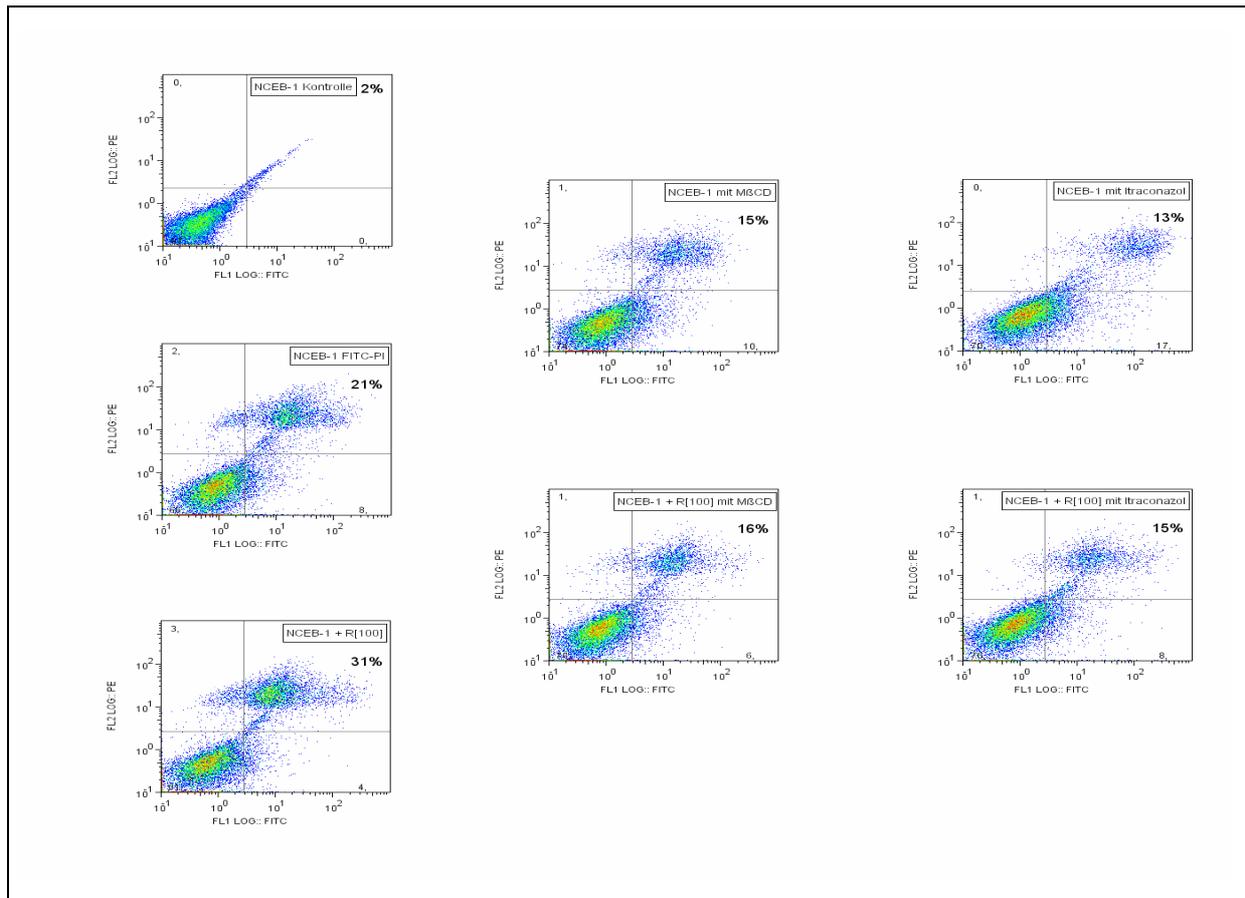


Abb. 21 Effekt von Rituximab nach Behandlung mit MβCD oder Itraconazol

Je 1×10^6 Zellen des Mantelzelllymphoms NCEB wurden auf Eis für 30min entweder im 10% Kulturmedium, im 5mM MβCD oder in 100 μg/ml Itraconazol (Itra) inkubiert. Die Zellen wurden dreimal gewaschen, dann für 30min mit 100 μg/ml Rituximab oder reinem Medium versetzt. Nach 24h wurden die Proben mit einer Annexin-PI Färbung behandelt und im Durchflußzytometer gemessen. In % ist die Anzahl der für die Fluoreszenz PI positiven Zellen angegeben.

3.2.4. Antimykotika hemmen die Rituximab vermittelte CDC und Apoptose

Als nächstes sollte der Effekt der Antimykotika auf den Rituximab induzierten Zelltod genauer betrachtet werden, insbesondere ob eine Hemmung der Rituximab vermittelten CDC oder Apoptose stattfindet. NCEB Zellen wurden beispielhaft mit dem Antimykotikum Itraconazol oder als Kontrolle in Kulturmedium inkubiert. Dann erfolgte die Stimulation mit Rituximab im Serum mit intaktem Komplementsystem oder mit inaktivierten Komplementsystem. Die Ergebnisse sind in Abb. 22 dargestellt.

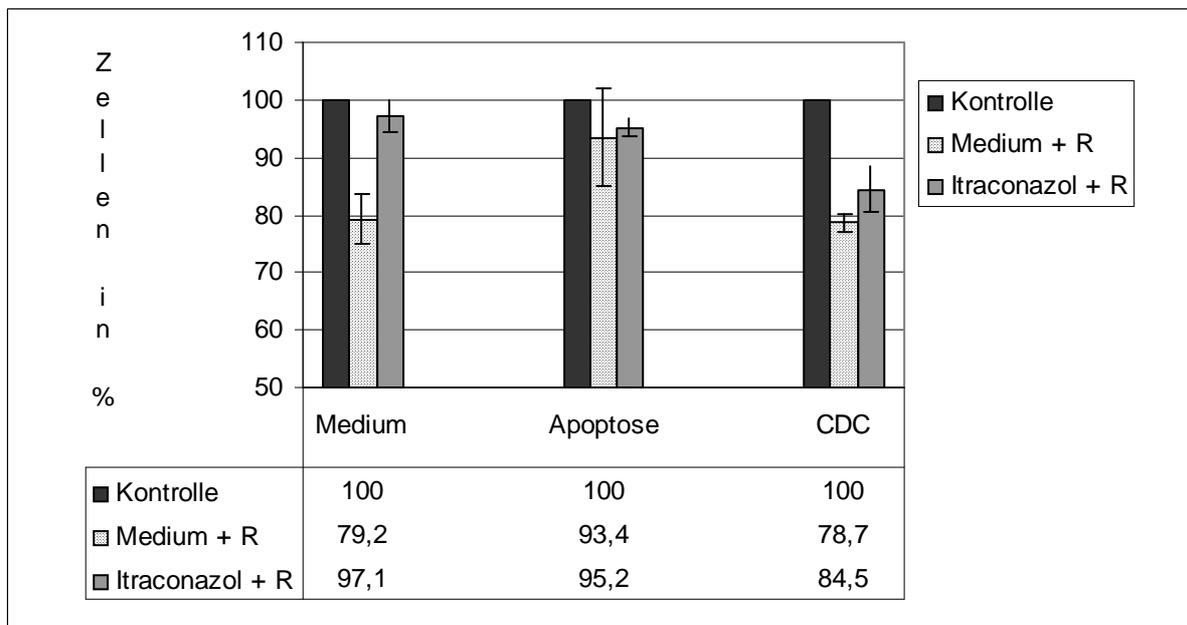


Abb. 22 Itraconazol hemmt die Rituximab vermittelte CDC und die Apoptose

Die Lymphomzellen NCEB wurden für 30min mit 100µg/ml Itraconazol vorbehandelt. Als Kontrolle dienten NCEB Zellen im Kulturmedium. In drei unabhängigen Versuchen gleichen Aufbaus wurden Zellen der sensiblen Mantelzelllymphomlinie NCEB in verschiedenen Medien für 24h mit 100µg/ml Rituximab behandelt. Die Zellen befanden sich dabei in 10% Kulturmedium (Medium), bei 60°C hitzeinaktiviertem Serum in 30% Konzentration (Apoptose) oder in nicht hitzeinaktiviertem Medium 30% Konzentration (CDC). Je 1×10^5 Zellen/ Well wurden in einer 96 Loch-Zellkulturplatte gegeben. Nach 24h wurde die Anzahl lebender Zellen in 6-fach Werte im MTT-Test ermittelt. In % : Mittelwert lebender Zellen ; Balken: Standardabweichung der Werte.

Die Rituximab induzierte komplementabhängige Zytotoxizität und die Apoptose konnten jeweils durch die Vorbehandlung der Zellen mit dem Antimykotikum Itraconazol reduziert werden. Nach Stimulation der Zellen mit Rituximab im Kulturmedium zeigten sich bei den unbehandelten Zellen 21% weniger lebende Zellen. Durch eine antimykotische Vorbehandlung reduzierte sich der antiproliferative Effekt von Rituximab auf 3 %. Die Rituximab induzierte Apoptose fiel durch die antimykotische Vorbehandlung um 2% geringer aus. Die CDC wurde durch die Inkubation mit Itraconazol um etwa 6 % vermindert.

In einem ähnlichen Versuchsansatz wurden die antimykotisch vorbehandelten NCEB Zellen parallel zu nicht vorbehandelten Zellen mit Rituximab stimuliert und in einer Annexin-V-PI Färbung untersucht (siehe Abb. 23). Die Vorbehandlung der Zellen mit Itraconazol resultierte in einem signifikant niedrigeren zytotoxischen Effekt von Rituximab. Das Antimykotikum Itraconazol bewirkte im Kulturmedium eine Reduktion des Rituximab induzierten Zelltodes von 33% toter Zellen auf nur 12% toter Zellen nach Stimulation.

Die Rituximab induzierte CDC konnte durch die Antimykotika bedingte Störung der Lipidsynthese von 36% toter Zellen auf 17% reduziert werden. Itraconazol verminderte ebenfalls die Rituximab induzierte Apoptose um mehr als die Hälfte von 28% auf 12% in 30% hitzeinaktiviertem Serum.

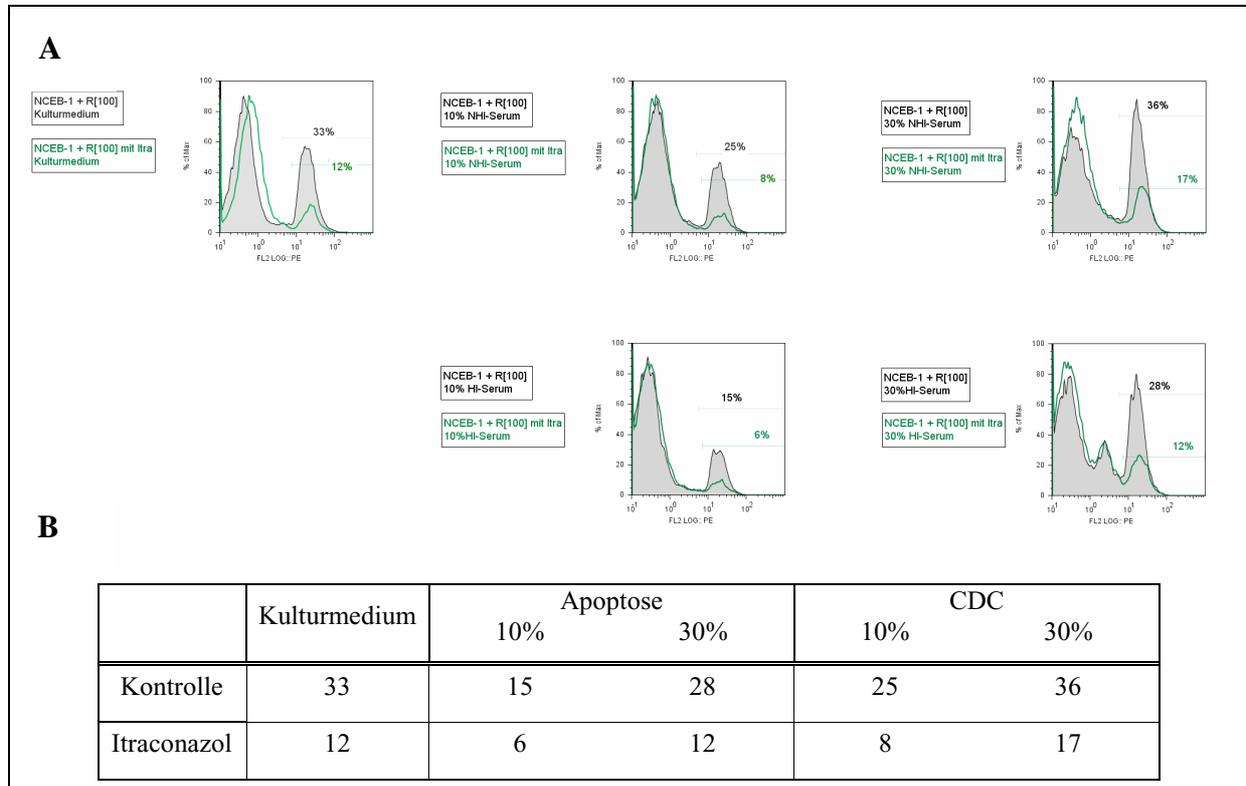


Abb. 23 Rituximab induzierte CDC und Apoptose nach Vorbehandlung mit Itraconazol

Je 1×10^5 Zellen der Rituximab sensiblen Zelllinie NCEB wurden für 30min mit 10% Kulturmedium (Medium), bei 60°C hitzeinaktivierten Serum in 10% oder in 30% Konzentration (Apoptose) oder in nicht hitzeinaktiviertem Medium in 10% oder in 30% Konzentration (CDC) auf Eis inkubiert. Je 1×10^5 Zellen der Rituximab sensiblen Zelllinie NCEB wurden für 30min in den gleichen Medien gehalten, allerdings wurden diese mit 100µg/ml Itraconazol auf Eis behandelt. Danach wurden alle Proben für 30min mit 100µg/ml Rituximab versetzt. Die Kontrollen wurden im jeweiligen Medium bei gleicher Temperatur für 30min belassen. Nach 24h wurden die Proben mit einer Annexin-PI Färbung im Durchflußzytometer gemessen.

- A** Als Histogramm dargestellt sind die für die Fluoreszenz PI positiven Zellen
 Grau= Medium ohne Antimykotikum; grün= Vorbehandlung mit Antimykotikum
- B** Angegeben ist in % der Gesamtzellzahl die Zunahme der für die Fluoreszenz PI positiven Zellen im Vergleich zur Kontrolle ohne Stimulation mit Rituximab.

In Zusammenschau aller Ergebnisse, inhibierte die Vorbehandlung der Zellen mit Antimykotika vom Triazoltyp den Rituximab induzierten Zelltod signifikant. Durch die Antimykotika kam es in Gegenwart von Rituximab zu einer verminderten Induktion der komplement-vermittelte Zytotoxizität und auch der Apoptose.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der monoklonale Antikörper Rituximab nach Bindung zu einer Umlagerung von CD20 in die lipid rafts führt. In Rafts assoziieren sich die CD20 Moleküle zu Komplexen aus Heterodimeren und es kommt zur Induktion der CDC und der Apoptose und konsekutivem Zelltod. Das Ausmaß des Zelltodes und somit die Wirksamkeit des Therapeutikums Rituximab korrelierte *in vitro* mit der Expression des Gangliosids GM-1 und nicht mit der Menge an CD20. Weiterhin erwiesen sich funktionell intakte lipid rafts als essentiell für den anti-CD20-Antikörper Rituximab. Veränderungen der Struktur der lipid rafts, z.B. durch eine Cholesterindepletion mittels M β CD, führten zu einer Verminderung des therapeutischen Effektes des eingesetzten Antikörpers Rituximab. Es konnte gezeigt werden, dass die funktionelle Integrität der lipid rafts auch durch die klinisch häufig angewendeten Antimykotika vom Azoltyp gestört wird. So führte die Hemmung der 14- α -Demethylase durch Antimykotika vom Azoltyp zur Veränderung der lipid rafts, fehlender Rekrutierung von CD20 nach Stimulation der Zellen mit Rituximab und zu einem Verlust des zytotoxischen Effektes von Rituximab.

4.1. Rituximab induzierter Zelltod

Gegenstand der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit war der Rituximab induzierte Zelltod. Für den Rituximab induzierten Zelltod sind neben der Antikörper abhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC), der Komplement abhängige Zelltod (CDC) und die Apoptose entscheidend. In der Literatur wird der relative Anteil der verschiedenen Effektorwege ADCC, CDC und Apoptose am Gesamteffekt des anti- CD20-Antikörpers Rituximab kontrovers diskutiert ¹³. In unserem *in vitro* Modell mit verschiedenen Lymphomzelllinien konnte gezeigt werden, dass der Rituximab vermittelte komplementabhängige Zelltod effektiver ist als der induzierte apoptotische Zelltod. Um die Rituximab induzierte CDC und Apoptose in den Versuchen abzugrenzen, wurden durch Hitzeinaktivierung aktive Komplementbestandteile im Serum eliminiert oder belassen. Der zytotoxische Effekt von Rituximab erwies sich dabei als unterschiedlich stark, je nachdem welcher Induktionsweg aktiviert wurde. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass neben der Apoptose vor allem die CDC für den zytotoxischen Effekt von Rituximab verantwortlich ist.

Die Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Cittera kommen zu den gleichen Ergebnissen ¹⁵. In einem *in vivo* Modell konnte sie zeigen, dass das Komplementsystem für die therapeutische Aktivität des Antikörpers notwendig ist. Wurde das Komplementsystem der athymischen Mäuse durch Zugabe des Cobra Venom Faktors (CVF) inaktiviert, so zeigte sich kein antitumoröser Effekt von Rituximab auf die verwendeten BJAB Lymphomzellen. Bei intaktem Komplementsystem hingegen ließ sich nach Behandlung mit Rituximab kein Lymphombefall mehr nachweisen. Auch Golay et al. zeigten in einem *in vivo* Modell mit murinen B-Lymphomzellen mit konstanter Expression von CD20, dass nach Depletion des Komplementsystems mit Cobra Venom Faktor der therapeutischen Effekt des anti-CD20 Antikörpers aufgehoben war ⁴⁶. Der Effekt von Rituximab auf die Lymphomzellen und die Hemmung der Wirkung nach Depletion des Komplementsystems durch CVF waren dabei unabhängig von der Lokalisation des Tumors. Durch die Therapie mit Rituximab zeigten sich sowohl die lymphonodulären als auch die subkutanen Tumormanifestationen deutlich regredient.

Diese Daten werden von den Untersuchungen von Gaetano et al. ³²unterstützt, welche die elementare Rolle des Komplementsystems in der Vermittlung des Rituximab induzierten Zelltodes betonen. In einem *in vivo* Modell mit syngenen Mäusen, denen das Initiator-molekül des klassischen Weges der CDC C1q fehlte, konnte kein therapeutischer Effekt von Rituximab auf die murine Lymphomlinie EL4 mehr nachgewiesen werden. Bei intaktem Komplementsystem konnte bei den EL4 erkrankten Mäusen nach einmaliger Rituximabgabe immunhistochemisch und mittels PCR keine CD20 positiven Zellen mehr detektiert werden. Bei fehlendem C1q war die Überlebenskurve und die Tumorgröße trotz Behandlung mit Rituximab vergleichbar mit den unbehandelten Tieren. Die geschilderten Ergebnisse der Arbeit von Gaetano stehen also im Einklang mit den Untersuchungen der hier vorliegenden Arbeit und betonen die Rolle der CDC als den wichtigsten Mechanismus des Rituximab induzierten Zelltodes.

Im Gegensatz dazu postulieren andere Arbeitsgruppen, wie Maloney et al. und Hernandez et al., die ADCC als den wichtigsten Mechanismus der Rituximab vermittelten Wirkung ⁹⁰. Die Gruppe um Hernandez-Ilizaliturri beobachtete, dass nach Depletion der NK-Zellen und der neutrophilen Granulozyten der Antikörper Rituximab keinen Effekt mehr zeigte ⁵⁸. Der Verlust der Wirkung von Rituximab nach Hemmung der ADCC zeigte sich jedoch nicht, wenn nur die Natürlichen Killerzellen depletiert wurden und nicht auch die neutrophilen Granulozyten.

In Gegenwart intakter neutrophiler Granulozyten war die Überlebensrate der mit Rituximab behandelten Mäuse, trotz fehlender ADCC aufgrund depletierter NK-Zellen, hoch. Eine Erklärung für die unterschiedliche Bewertung der Rolle der ADCC könnte die in den Untersuchungen von Hernandez-Ilizalitturi verwendete Zelllinie sein. Die Zellen der Linie Raji zeigten in der vorliegenden Arbeit nur ein sehr geringes Ansprechen auf Rituximab (siehe Tabelle 6). Ein Grund dafür könnte die fehlende Simulation der ADCC in dieser Arbeit sein. Möglicherweise induziert Rituximab bei den Burkitt Lymphomzellen der Linie Raji *in vivo* eher die ADCC. Hernandez-Ilizalitturi et al. betrachteten die Rolle der CDC in ihrem Modell allerdings nicht. Deswegen sind Rückschlüsse auf das relative Gewicht der ADCC und der CDC aus dieser Arbeit nicht möglich. Eine Studie von Clynes et al. unterstützt ebenfalls die wichtige Rolle der ADCC in der Vermittlung des Effektes von Rituximab ¹⁶. In dem Modell von Clynes et al. verlor Rituximab seine volle therapeutische Aktivität gegen das humane B-Zell Lymphom, das als Xenograft den Mäusen subkutan injiziert wurde, wenn die Fc γ R γ -Kette fehlte. Diese ist ein wesentlicher Bestandteil von Fc γ R1 und Fc γ R3 und somit entscheidend an der Vermittlung der ADCC beteiligt. Aus diesen Beobachtungen folgerten Clynes und Kollegen, dass eine intakte ADCC für die Zytotoxizität des Antikörpers benötigt wird. Insgesamt besteht jedoch weiter Unklarheit bezüglich der Rolle der ADCC. Die Rolle der ADCC wurde in der vorliegenden Arbeit in unserem *in vitro* Modell nicht untersucht. Trotzdem wurde durch Rituximab ein starker Effekt erzielt, so dass die ADCC in den durchgeführten Untersuchungen eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint. Dies wird durch die Beobachtungen von Gaetano et al. und Cittera et al. unterstützt, welche trotz Depletion der NK-Zellen und der neutrophilen Granulozyten einen unverändert starken therapeutischen Effekt des Antikörpers Rituximab beobachteten ¹⁵.

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Bewertung der Rolle der ADCC bzw. CDC liegt in den verschiedenen Mausmodellen. Die Gruppe um Di Gaetano injizierte intravenös murine Lymphomzellen, während Clynes et al. humane Lymphomzellen als Xenograft subkutan verabreichten. Bei dem Xenograft Modell müssen die humanen Lymphomzellen bei der Inokulation in sehr großer Zahl vorkommen, um bei langsamen Wachstum die benötigte Tumorgöße zu erreichen. Zudem ist der Tumor durch subkutane Injektion lokal begrenzt. Da das Gewebe um die Lymphomzellen Einfluss hat auf die therapeutische Effektivität von Rituximab ist der induzierte Zelltod zwischen subkutanem Befall und systemischer Ausbreitung der NHL- Zellen nicht zu vergleichen ⁵⁰. Des Weiteren besteht möglicherweise eine Interaktion der Aktivierung des Komplementsystems, und dadurch der CDC, mit der Aktivierung der ADCC über den Fc-Rezeptor. So konnten kürzlich Zusammenhänge

zwischen dem Komplementfaktor C3b und der ADCC dargestellt werden ¹⁴⁶. Somit könnten die Veränderungen des FcγR auch einen Einfluss auf die Komplement vermittelte Lyse haben. Neben CDC und ADCC gilt die Apoptose als ein weiterer Mechanismus des Rituximab induzierten Zelltodes. In der vorliegenden Arbeit erzielte Rituximab auch nach Inaktivierung der Komplementfaktoren einen geringen zytotoxischen Effekt. Nach Stimulation mit Rituximab kam es zu einer Aktivierung der Caspasen. Diese sind Enzyme, welche die Induktion der Apoptose steuern. Untersucht wurden in dieser Arbeit die Caspasen 3, 8 und 9. Die Stimulation der Lymphomzellen vom Mantelzelltyp mit Rituximab führte zu einer Aktivierung der Caspase 8 und in geringerem Maße der Caspase 9. Die Caspase 8 ist Bestandteil des extrinsischen Aktivierungsweges der Apoptose. Diese Aktivierung resultierte in der Umwandlung der inaktiven Vorläuferform der Caspase 3 in die Effektorprotease 3 der Apoptose.

Pedersen et al. sahen nach Stimulation von Zellen einer chronisch lymphatischen B-Zell Leukämie mit Rituximab ebenfalls eine Induktion der Apoptose ¹⁰⁷. Wie schon gezeigt wurde, hatte Rituximab in der vorliegenden Arbeit vor allem den extrinsischen Weg der Apoptose, also die Caspase 8, aktiviert. In einer Arbeit von Tepper und Kollegen konnte durch einen Hemmstoff der Caspase 8, Carbobenzoxy-Val-Ala-Asp-Fluoromethylketon, nach Stimulation der Zellen keine Apoptose mehr nachgewiesen werden ¹³⁸. Diese Untersuchungen bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit bezüglich der Rituximab induzierten Aktivierung der Caspase 8. Mathas et al. zeigten für den anti-CD20 Antikörper Rituximab ebenfalls eine starke Induktion der Apoptose ⁹³. Der Gruppe um Byrd gelang es diese Induktion der Apoptose *in vivo* im Patientenblut, kurz nach Infusion des Antikörpers Rituximab, nachzuweisen. Es zeigte sich eine Aktivierung der Caspasen und eine Induktion der Apoptose kurz nach Stimulation ¹⁰. Welcher genaue Mechanismus der Einleitung der Apoptose durch Rituximab zu Grunde liegt ist unklar. Resistenzen einiger Zellen bzw. Zelllinien sind bekannt, so konnte bei den Zellen Daudi und BJAB keine Induktion der Apoptose beobachtet werden ⁴⁷. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte bei der resistenten Zelllinie DB keine Induktion der Apoptose nach Stimulation mit Rituximab nachgewiesen werden.

Die Mechanismen dieser Resistenz gegenüber Rituximab sind ungeklärt. Neben den bereits diskutierten Effektormechanismen sind nach Bindung des anti-CD20 Antikörpers am Zielrezeptor CD20 eine Reihe weiterer Vorgänge von Bedeutung. So kommt es nach Bindung des Antikörpers an CD20 zu einer Vernetzung der Antikörper (Crosslinking). In dieser Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass nach Stimulation der Zellen mit Rituximab eine Translokation der CD20 Rezeptoren in lipidreiche Mikrodomänen stattfindet. Gefolgt wird

diese Umlagerung von einer Aktivierung der SRC-Familie der Tyrosinkinasen^{62 29}. Das Crosslinking von CD20 führt zu einer vermehrten Produktion von Bax, Änderungen der RNA-Level von c-myc und weiteren Veränderungen^{93 27 4}. Unterschiede in diesen Mechanismen könnten auch zu einer relevanten Änderung des Ansprechens der Zellen auf Rituximab führen und mögliche Gründe für Resistenzen gegen Rituximab sein. Um die Rolle dieser Mechanismen bei Resistenzen gegen Rituximab zu bewerten, sind weitere Untersuchungen notwendig. Fraglich ist, inwieweit sich die *in vitro* Versuche dieser Arbeit auf die Situation *in vivo* übertragen lassen, und inwieweit die Tiermodelle auf den Menschen transferiert werden können.

4.1.1. Expression von GM-1 korreliert mit Ansprechen auf Rituximab

Der monoklonale Antikörper Rituximab hat sich für die Therapie maligner Erkrankungen der B-Zelle als sehr wirksam erwiesen^{20 19 24}. Der Antikörper richtet sich gegen das Oberflächenantigen CD20, welches auf reifen B-Zellen exprimiert wird. Es sind sowohl primäre als auch sekundäre Resistenzen gegen den Antikörper beschrieben, deren Ursache bislang unklar ist. Trotz breiter und erfolgreicher klinischer Anwendung existiert bisher kein prädiktiver Faktor, um das Ansprechen einer Therapie mit Rituximab vorauszusagen. Naheliegend ist die Vermutung, dass die Expression der Zielstruktur des Antikörpers, CD20, eine direkte Korrelation mit dem Ansprechen der Lymphomzellen auf Rituximab zeigt. Darum wurden in dieser Arbeit verschiedene Lymphomzelllinien auf ihr Ansprechen auf Rituximab und die Expression von CD20 untersucht. Bei den untersuchten Zelllinien handelte es sich um diffus großzellige Lymphomzellen, Mantelzell-Lymphome, Burkitt-Lymphome und chronisch lymphatische Leukämiezellen. In der vorliegenden Arbeit fand sich jedoch keine Korrelation der Expression von CD20 und dem Ansprechen dieser Lymphomzellen auf Rituximab. Somit besteht zumindest *in vitro* keine Korrelation zwischen der Expression von CD20 und dem Rituximab induzierten Zelltod. Die Ergebnisse einer Untersuchung von Perz et al. bestätigen diese Resultate. Die Expression von CD20 und das Ansprechen von Patienten mit refraktärer CLL, oder einem Rezidiv der Erkrankung, wurden verglichen. Auch hier korrelierte die CD20 Expression der Leukämiezellen nicht mit der Effektivität einer Rituximabtherapie¹⁰⁸.

Die Expression von CD20 eignet sich also nicht als prädiktiver Marker für das Ansprechen von B-Non Hodgkin Lymphomzellen oder B-CLL Zellen für die Rituximabtherapie. Eine Erklärung für das schlechte Ansprechen auf die Therapie mit dem monoklonalen Antikörper könnte möglicherweise ein verändertes Bindungsverhalten am CD20 Antigen sein. Eine Ursache für Änderungen der Bindung zwischen Antigen und Antikörper könnte das Vorliegen einer Mutationen oder eines Polymorphismus des Gens, welches für CD20 codiert, sein.

In einer Analyse von Sar et al. wurden Patienten, welche an einem diffus großzelligem Lymphom erkrankt waren und ein schlechtes Ansprechen auf die Therapie mit Rituximab zeigten, auf solche genetischen Veränderungen hin untersucht ¹²¹. Es fand sich jedoch keine Häufung von Mutationen oder Polymorphismen des CD20 Rezeptors. Die Gruppe um Terui et al. konnte 2009 erstmals Mutationen am C-Terminus des CD20 Gens als Ursache einer verminderter Expression des CD20 Moleküls an der Oberfläche der Lymphomzellen nachweisen ¹³⁹. Retrospektiv zeigten die Patienten mit einer Mutation am C-Terminus von CD20 nur zu 25% komplette Remissionen, während die Wildtypgruppe mit etwa 50% ansprach. Das Patientenkollektiv war jedoch mit 50 Patienten eher klein und weitere Untersuchungen zur Relevanz dieser Entdeckungen sind sicher notwendig. Weder die CD20- Expression noch Mutationen am C-Terminus von CD20 scheinen also fehlendes Ansprechen auf Rituximab sicher vorauszusagen.

Vor dem Hintergrund, dass bei der Vermittlung der Wirkung von Rituximab die lipid rafts eine große Rolle zu spielen scheinen ²⁷, wurden die gleichen Zelllinien auch auf die Expression des Sphingolipids GM-1 hin untersucht. Sphingolipide sind keine passiven Bestandteile der Zellmembran, sondern nehmen eine wichtige Funktion in der Vermittlung biologischer Prozesse, wie Proliferation, Entzündung, Adhäsion und Differenzierung ein ⁹⁹. In Form der Ganglioside, einer Gruppe von Sialinsäure-haltigen Glykosphingolipiden, spielen diese eine entscheidende Rolle bei der Stabilisierung der lipid rafts ^{70 104}. Das Gangliosid GM-1 wird allgemein als Marker für die lipid rafts angesehen ^{125 157}. In der vorliegenden Arbeit zeigten Zelllinien, die gut auf den Antikörper Rituximab ansprachen, hohe GM-1 Expressionen, während die Zellen mit schlechtem Ansprechen eine niedrige Expression aufwiesen. In unserem *in vitro* Modell zeigte sich also, dass der therapeutische Effekt von Rituximab auf die unterschiedlichen Lymphomzellen mit der Expression von GM-1 dieser Zellen korrelierte. Die Ergebnisse werden unter anderem durch die Arbeiten der Gruppe um Bennett bekräftigt. Diese beschrieben für den Lymphomsubtyp der Marginal-Zonen- Lymphome eine besonders hohe GM-1 Expression und zeigten gleichzeitig, dass diese ein hervorragendes Ansprechen auf Rituximab aufwiesen ².

Neben den Marginal-Zonen- Lymphomzellen profitieren auch Patienten mit follikulärem Lymphom von einer Erhaltungstherapie mit Rituximab ⁴⁴. Die chronisch lymphatische Leukämie hingegen, weist ein schlechtes Ansprechen auf eine Rituximabtherapie auf. Liegt allerdings ein Subtyp der Chronisch lymphatischen Leukämiezellen mit einer hohen Expression von GM-1 vor, so reagierten diese Zellen *in vitro* signifikant besser als die Subtypen mit einer niedrigen Expression des Sphingolipids ⁹⁸. Da die Untersuchungen bisher nur *in vitro* durchgeführt wurden, sollten diese in retrospektiven Studien oder mit kleineren klinischen Kollektiven verifiziert werden.

GM-1 könnte also dazu dienen die Subgruppe von Patienten zu identifizieren, welche von der Therapie mit Rituximab profitiert. Das wäre vor allem wichtig, da die CD20-Expression nicht als Marker für das Ansprechen auf Rituximab geeignet ist und ein anderer Marker bisher fehlt. Insbesondere für die an CLL erkrankten Patienten wäre ein prädiktiver Marker, wie GM-1, von größtem Wert für die Entscheidung zu einer Therapie mit Rituximab.

4.1.2. Die Rekrutierung von CD20 in lipid rafts ist essentiell für die therapeutische Wirkung von Rituximab

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach Stimulation mit Rituximab das Oberflächenantigen CD20 in die lipidreichen Membranabschnitte- lipid rafts- rekrutiert wird. Weiterhin zeigte sich bei fehlender Rekrutierung von CD20 in die lipid rafts, nach Depletion des zellulären Cholesterins, eine signifikant verminderte Wirkung des Antikörpers auf die untersuchten Lymphomzellen (siehe Abb. 15).

Die Rekrutierung von CD20 in die lipid rafts wurde bereits von Deans et al. beschrieben ²⁷. Nach Bindung verschiedener Anti-CD20 Antikörper an CD20 kam es durch die Antigenbindenden Fragmente (Fab) der Antikörper zu einer Änderung der Konformation des CD20 Rezeptors. Dadurch hatten diese CD20 Rezeptoren eine besonders hohe Affinität zu den lipid rafts und die Umlagerung in die lipidreichen Mikrodomänen war erleichtert. Nach der Rekrutierung der CD20 Moleküle in die Rafts kommt es zu einer Aktivierung von CD20. Durch die Umlagerung befinden sich die CD20 Rezeptoren dann in enger Nachbarschaft zu den in den rafts lokalisierten Kinasen ²⁶. Wie schon gezeigt wurde, zeigte die absolute Expression von CD20 keine Korrelation mit dem therapeutischen Effekt von Rituximab.

Allerdings korrelierte die Menge der in die lipid rafts rekrutierten CD20 Moleküle *in vitro* mit dem Ansprechen der untersuchten Zellen auf den Antikörper Rituximab ⁹⁸. Auch *in vivo* fanden einige Autoren einen Zusammenhang zwischen der Menge von in die lipid rafts rekrutierten CD20 Rezeptoren und der Rituximab induzierten Zytotoxizität. Wie schon dargestellt wurde induzierte Rituximab neben der ADCC vor allem die CDC und die Apoptose.

Cragg et al. zeigten, dass die Fähigkeit eines Anti-CD20 Antikörpers CD20 in die lipid rafts zu rekrutieren, mit der Stärke der Induktion der CDC zusammenhängt. Somit ist die Rekrutierung von CD20 für die Induktion der CDC durch Rituximab und die Stärke dieser bedeutend ²³. Auch für die Rituximab induzierte Apoptose ist die Rekrutierung der CD20 Moleküle bedeutsam. So konnte in den Untersuchungen von Janas et al. nachgewiesen werden, dass die Rituximab induzierte Apoptose die Translokation von CD20 in die lipid rafts benötigt ⁷². Die lipid rafts spielen laut Janas eine entscheidende Rolle für die CD20 vermittelte Aktivierung der Caspasen. Entgegen den Untersuchungen von Janas und Cragg, konnten die Versuche von Chan et al. keinen Zusammenhang zwischen der Wirksamkeit von Rituximab und der Rekrutierung von CD20 belegen ¹⁴. Die Gruppe um Chan et al. zeigte allerdings auch, dass die CD20 vermittelte Wirkung unabhängig von der Rekrutierung in lipid rafts abläuft. Dabei wurden mehrere NHL Zelllinien mit dem monoklonalen anti-CD20 Antikörper B1 behandelt. Die Induktion der Apoptose durch den Antikörper war dabei unabhängig von der Menge der rekrutierten CD20 Moleküle. Außerdem konnten Chan et al. trotz Inhibition der Caspasen eine starke Apoptose beobachten und postulierten, dass die Induktion der Apoptose durch einen Anti-CD20 Antikörper nicht über die Aktivierung der Caspasen geschieht. Diese gegensätzlichen Ergebnisse lassen sich durch den Gebrauch verschiedener Anti-CD20 Antikörper erklären. In den Untersuchungen von Janas et al. und Cragg et al. wurde jeweils der monoklonale Antikörper Rituximab verwendet. Bei dem *in vitro* Modell von Chan wurde der anti-CD20 Antikörper B1 benutzt.

Die verschiedenen Antikörper gegen den CD20 Rezeptor zeigen ein sehr unterschiedliches Bindungsverhalten. Teeling et al. fanden verschiedene charakteristische Bindungsstellen an CD20, welche von den anti-CD20 Antikörpern gebunden werden ¹³⁷. Für die verwendeten Antikörper ergaben sich dabei deutliche Unterschiede im Bindungsverhalten. In einer aktuellen Arbeit zeigte die Gruppe um Cragg, dass die Anti- CD20 Antikörper Rituximab und 1F5 beide zu einer Umlagerung von CD20 in die lipid rafts führen und über die Bindung des Komplementfaktors C1q die CDC aktivieren.

Hingegen führte der Anti- CD20 Antikörper B1 zu keiner signifikanten Rekrutierung von CD20 in die rafts. B1 vermittelte seinen zytotoxischen Effekt hauptsächlich über eine Induktion der Apoptose²².

Für die verschiedenen Anti-CD20-Antikörper ergaben sich also voneinander abweichende Ergebnisse, so dass Ergebnisse eines speziellen Anti-CD20-Antikörpers nur bedingt auf andere Anti-CD20-Antikörper übertragbar sind. Klinisch wird derzeit überwiegend der monoklonale Anti-CD20- Antikörper Rituximab verwendet. Aufgrund der Unterschiede zwischen den einzelnen Anti- CD20 Antikörpern, eignet sich deswegen Rituximab zur Simulation der realen Effekte der klinischen Therapie am Menschen. In dieser Arbeit wurden deshalb alle Versuche ausschließlich mit Rituximab durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass intakte lipid rafts für den Rituximab induzierten komplementabhängigen Zelltod und die Apoptose essentiell sind. Wurden die Zellen mit M β CD vorbehandelt konnte eine Depletion des zellulären Cholesterins und somit eine Aufhebung der funktionell intakten Rafts erreicht werden. Die Behandlung der sensiblen Zellen mit Rituximab nach Depletion führte zu einem signifikant verminderten zytotoxischen Effekt (siehe Abb. 16). Die lipid rafts sind also unabdingbar für die Funktion des Antikörpers.

4.2. Antimykotika vom Azoltyp modulieren den Effekt von Rituximab

Rituximab benötigt für die Vermittlung des zytotoxischen Effektes lipidreiche Membranabschnitte. Nach Depletion des zellulären Cholesterins durch die Substanz M β CD nahm der Rituximab vermittelte Zelltod signifikant ab. Dabei war sowohl der zuvor beobachtete Komplement-vermittelte Zelltod, als auch die Apoptose signifikant vermindert. Neben M β CD haben auch andere Substanzen Einfluss auf den Cholesteringehalt von Zellmembranen. Dazu zählen auch die in den Kliniken häufig angewendeten Antimykotika vom Azoltyp. Insbesondere bei immunkompromittierten Patienten, z.B. im Rahmen einer zytostatischen Therapie, werden diese häufig verwandt und sogar prophylaktisch zur Vermeidung von Pilzinfektionen verabreicht. Daher ist auch die Frage nach einer möglichen Modulation des Effektes von Rituximab durch Antimykotika von großer klinischer Relevanz. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die klinisch gebräuchlichen Antimykotika Antimykotika Fluconazol, Itraconazol und Voriconazol die wichtige

Umlagerung des CD20 Antigens durch Rituximab größtenteils verhindern. Vor allem konnte durch eine Vorbehandlung der sensiblen Zellen mit den Antimykotika vom Azoltyp die Wirkung von Rituximab signifikant vermindert werden (siehe Abb. 20).

Antimykotika hemmen die 14- α -Demethylase⁴¹, ein Enzym, welches für die Umwandlung von Lanosterol in Ergosterol oder Cholesterin entscheidend ist. Die Sterol 14- α -Demethylase (CYP 51) ist das am weitesten verbreitete Mitglied der Cytochrom P450 Oxidasen und kommt sowohl auf Prokaryoten, als auch auf Eukaryoten vor¹⁵¹. Neben der Cholesterinsynthese der Pilzorganismen wird auch die Synthese des Cholesterins von Säugetieren durch die Azolantimykotika auf Stufe der 14- α -Demethylase geblockt. Für einen gleichen Effekt auf die Cholesterinsynthese der Säugetiere sind allerdings höhere Dosen nötig als für das mykotische Enzym^{61 142}. Hitchcock et al. zeigten, dass die 50% Hemmkonzentration der 14- α -Demethylase von Voriconazol einer Rattenleber bei 7,4mM lag, während die gegen das mykotische Enzym nur 0,03mM war⁶⁰. Voriconazol ist also um bis zu 250 mal aktiver gegen das Enzym der Pilze. Um die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf den Menschen zu übertragen, müssten ähnlich hohe Plasmakonzentrationen wie *in vitro* erreicht werden. In dieser Arbeit wurden Konzentrationen zwischen 10 μ g/ml und 100 μ g/ml der Antimykotika gewählt. Diese Konzentrationen waren nicht toxisch *in vitro* und zeigten gleichzeitig eine Abschwächung des zytotoxischen Effektes von Rituximab. In einer Studie von Maesaki et al. konnten mittlere Plasmakonzentrationen von Itraconazol von 622 ng/ml, bei Patienten die weniger als 4 mg/kg Körpergewicht, und 1352 ng/ml bei Patienten, die mehr als 4 mg/kg Itraconazol erhielten, ermittelt werden⁸⁵. Diese Patientengruppe erreichte also annähernd die antimykotische Plasmakonzentration wie in den beschriebenen Experimenten. Bei systemischen Mykosen wird Itraconazol üblicherweise in einer Dosis von täglich zweimal 200 mg verwendet⁸⁶. Bei einem 70 kg schweren Patienten entspricht das einer Tagesdosis von 400 mg, also 5,7 mg/kg Körpergewicht. Eine Behandlung mit der Standarddosis der Antimykotika könnte also bereits zu einer Hemmung der Cholesterinsynthese der B-Zellen führen. Die Modulation der Funktion der lipid rafts, die in dieser Arbeit im *in vitro* Modell beobachtet wurde, kann also auch *in vivo* Einfluss auf die Vermittlung der Rituximab induzierten Signale über die rafts nehmen.

Eine Medikamentengruppe, welche ebenfalls die Lipidsynthese beeinflusst, sind die HMG-CoA Reduktase Hemmer. Diese Substanzgruppe ist auch als Cholesterinsyntheseenzymhemmer (CSE-Hemmer) bekannt, weil sie die 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzym A Reduktase (HMG-CoaReduktase) hemmen. Diese Reduktase ist

das limitierende Enzym des Mevalonat Synthesewegs, welcher für die Bildung von Isoprenoiden wie z.B. Cholesterin nötig ist. Wie schon beschrieben wurde, sind diese Isoprenoide wichtig für die Ganglioside und somit für die Funktion der lipid rafts. Untersuchungen von Winiarska et al. zeigten kürzlich, dass eine Behandlung Rituximab sensibler Zellen mit Statinen den zytotoxischen Effekt von Rituximab abschwächt^{152 21}. Somit waren die Rituximab-vermittelte CDC und ADCC vermindert und weniger Zellen starben nach der Antikörpertherapie¹⁵². Außerdem konnten in Anwesenheit von Statinen Änderungen in der Konformation des CD20-Oberflächenantigens beobachtet werden¹⁵². Diese sterischen Änderungen führten zu einer schlechteren Bindung des therapeutisch eingesetzten Antikörpers an den Rezeptor CD20.

Auch bei den Versuchen von Winiarska et al. entsprachen die *in vitro* verwendeten Konzentrationen der Statine den Plasmakonzentrationen *in vivo*. Die von Winiarski et al. verwendeten Konzentrationen lagen mit 10 µmol Lovastatin sogar unterhalb der von Holstein et al. gemessenen Plasmakonzentration von 12 µmol der mit CSE-Hemmern behandelten Patienten⁶³. Ein hoher Gehalt an zellulärem Cholesterin, und somit eine große Viskosität der Zellmembran, korrelierte auch bei menschlichen Erythrozyten mit einer höheren Empfindlichkeit für die Zytolyse¹⁷. Dabei erleichtert Cholesterin, wie andere Lipide auch, die Formierung des Membranangriffs-komplexes und die Penetration der Membran durch diesen. Der Gehalt an Cholesterin spielt also eine entscheidende Rolle für die Vermittlung der zellulären Lyse und des Antikörper vermittelten Zelltodes. Die Modulation der Rituximab vermittelten CDC durch die Statine war durch Zugabe von Cholesterin zu den mit Lovastatin vorbehandelten Zellen reversibel¹⁵². Der Gehalt an Cholesterin der Zellen ist also für die volle therapeutische Wirksamkeit des Antikörpers bedeutsam. Eine Veränderung des Cholesteringehaltes der Lymphomzellen durch Antimykotika oder Statine kann die therapeutische Wirkung von Rituximab herabsetzen.

4.2.1. Substanzen mit Einfluss auf die lipid rafts modulieren die Effizienz einer Antikörpertherapie

Der therapeutische Effekt von Rituximab wird durch die Antimykotika oder Statine entscheidend verändert. Um die Chancen für Patienten, von einer Therapie mit Rituximab maximal zu profitieren, zu gewährleisten sollte die beschriebene Modulation des Effektes sehr genau bedacht werden.

Weiterführende Untersuchungen, welche diesen Effekt *in vivo* simulieren, sollten folgen. Neben dem monoklonalen Antikörper Rituximab wirken auch andere therapeutisch eingesetzte Antikörper über die lipid rafts.

Ein wichtiger Vertreter der Antikörper ist das gegen das Molekül CD52 gerichtete Alemtuzumab. Das Protein CD52 ist ein Bestandteil der Zellmembran mit bisher unklarer Funktion. Es befindet sich auf normalen B- und T-Zellen, Monozyten, Makrophagen und einer Reihe von malignen Zellen, wie z.B. der CLL⁴⁵. Der humanisierte Antikörper Alemtuzumab® wird in der Therapie der CLL angewendet. Wie Mone et al. mit Hilfe der Fluoreszenz Mikroskopie zeigten, kommt es auch bei Alemtuzumab nach Bindung zu einer Rekrutierung des CD52 Moleküls in die lipid rafts¹⁰⁰. Durch Depletion des zellulären Cholesterins konnte auch für Alemtuzumab eine Reduktion des zytotoxischen Effektes beobachtet werden¹⁰⁰. Somit ist die CD52 Rekrutierung in lipid rafts mit dem zytotoxischen Effekt von Alemtuzumab verbunden.

Auch der therapeutische Antikörper Trastuzumab benötigt die lipid rafts für seine Wirkung. Trastuzumab ist gegen den Wachstumsfaktor Rezeptors Her-2/neu (human epidermal growth factor receptor 2) gerichtet. Dieser stimuliert die Zellproliferation und hemmt die Apoptose über den mTOR-Signalweg.^{65 105} Her-2/neu ist eine Tyrosin Kinase, die an der Entstehung vieler Malignome, wie Brust- und Magenkrebs beteiligt ist^{118 155}. An Brustkrebs erkrankte HER2-positive Patientinnen profitieren von einer Therapie mit dem humanisierten Antikörper Trastuzumab (Herceptin®)^{141 65}. Dennoch sprechen einige trotz Überexpression von Her-2/neu kaum auf Trastuzumab an. Auch hier werden primäre Resistenzen vermutet⁵¹. Für die Vermittlung von Signalen müssen Her-2/neu und $\beta 1$ Integrine in den Rafts lokalisiert und benachbart sein, so dass die Rekrutierung von Her-2/neu in die lipid rafts wichtig ist⁶⁴. Funktionell intakte Rafts sind auch für Trastuzumab von essentieller Bedeutung. Bisher fehlen Untersuchungen zur Wirksamkeit von Trastuzumab in Anwesenheit von Statinen oder Azolen. Vom molekularen Mechanismus wären Interaktionen mit diesen Substanzen möglich. Neben den bereits erwähnten Antikörpern, ist möglicherweise auch die Wirkung des Antikörpers Cetuximab mit den lipid rafts assoziiert. Cetuximab blockiert die Aktivierung des EGF-Rezeptors ErbB1, welcher sich bei vielen nicht hämatologischen Malignomen mit schlechter Prognose in Überexpression nachweisen lässt⁶⁷. Durch den Antikörper Cetuximab werden Tumorzellen am Fortschreiten des Zellzyklus gehindert und Überlebenssignalwege gehemmt^{95 92 83}. Ringerike et al. fanden nach Cholesterindepletion mit MBCD die Anzahl der EGF-Rezeptoren erhöht und in einem hyperaktivierten Zustand.

Der zelluläre Cholesteringehalt hat also direkten Einfluss auf die Aktivierung der EGF-Rezeptoren¹¹⁶. Yoon et al. konnten eine direkte Steuerung der Tyrosinkinase der EGF-Rezeptoren durch Ganglioside, wie GM-1 oder GM-3, nachweisen¹⁵⁶. Demnach spielt der Gehalt an Cholesterin und die Menge an Gangliosiden in der Membran eine entscheidende Rolle für den Zustand der EGF-Rezeptoren. Allerdings ist bisher unklar, wie sich diese Rolle in Bezug auf die einzelnen Subtypen verhält. ErbB2 zeigte, wie oben beschrieben, eine klare Assoziation der Wirkungsmechanismen mit den lipid rafts. Für die Subfamilie ErbB1 und insbesondere den Antikörper Cetuximab fehlen bisher Untersuchungen, die eine solche Verbindung mit den lipidreichen Mikrodomänen beweisen.

Die Lipid rafts spielen also bei einer Reihe verschiedener klinisch eingesetzter Antikörper, wie Rituximab, Alemtuzumab, Trastuzumab und möglicherweise Cetuximab, eine wichtige Rolle in der Vermittlung des therapeutischen Effekts. Eine Verminderung des therapeutischen Effekts dieser Antikörper durch die Antimykotika vom Triazoltyp oder durch Statine ist also wahrscheinlich.

Um die Effizienz und das therapeutische Potential der klinisch eingesetzten Antikörper nicht zu gefährden, sind genauere Untersuchungen des Effektes der Antimykotika auf die Wirkung und Wirksamkeit dieser Antikörper von großer Bedeutung. Daher sollte in weiterführenden Untersuchungen überprüft werden, ob der therapeutische Effekt der Antikörper durch Medikamente, wie Antimykotika vom Azoltyp oder Statine, vermindert wird.

5. Zusammenfassung

In den letzten Jahren hat sich die Therapie der Non Hodgkin Lymphome entscheidend verbessert. Dies ist vor allem dem Einsatz des monoklonalen Antikörpers Rituximab zuzuschreiben. Dieser ist gegen das Oberflächenantigen CD20 gerichtet, das von den meisten malignen Lymphomen exprimiert wird. Der Antikörper entfaltet seine zytotoxische Wirkung auf verschiedene Weise (CDC, ADCC und Apoptoseinduktion). Der genaue molekulare Wirkmechanismus ist nicht vollständig bekannt. Ebenso ist unklar, warum eine Subpopulation von Patienten nicht auf die Therapie mit Rituximab anspricht. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass lipidreiche Abschnitte der Zellmembran- lipid rafts- für die Wirkung von Rituximab notwendig sind. Diese bestehen aus Sphingolipiden und Cholesterol. In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung der lipid rafts für den zytotoxischen Effekt von Rituximab weiter untersucht. Zunächst wurde ermittelt, ob die Höhe der Expression des Sphingolipids GM1 mit dem Ansprechen auf den monoklonalen Antikörper korreliert. Dazu wurden elf verschiedene NHL Zelllinien auf ihre GM1 - und CD20- Expression und ihr Ansprechen auf Rituximab untersucht. In der Tat konnte GM1 *in vitro* als prognostischer Marker für das Ansprechen auf Rituximab identifiziert werden. Die CD20 Expression zeigte hingegen keine Korrelation. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass nach Bindung des Antikörpers eine Umlagerung von CD20 in die lipid rafts stattfindet. Wurde diese CD20-Rekrutierung durch Zerstörung der funktionellen Integrität der lipid rafts gehemmt, war die Wirkung von Rituximab signifikant vermindert. Lipid rafts sind also essentiell für den Rituximab vermittelten Zelltod.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluss der Azolantimykotika auf die Wirkung von Rituximab untersucht. Diese verändern über die Hemmung der 14- α -Demethylase den zellulären Cholesteringehalt. Die Hypothese, dass Rituximab in Anwesenheit von Azol-Antimykotika eine geringere Effektivität hat, konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. So war die CD20-Rekrutierung in die lipid rafts bei vorheriger Gabe von Itraconazol blockiert. Darüber hinaus inhibierten die Azolantimykotika den zytotoxischen Effekt von Rituximab. Sowohl die Rituximab vermittelte CDC als auch die Apoptose waren signifikant vermindert. Sollten sich diese Beobachtungen *in vivo* bestätigen, hätte das entscheidende klinische Bedeutung. NHL-Patienten, die gleichzeitig an einer Pilzerkrankung leiden, wäre eine sequentielle Therapie zu empfehlen, um die therapeutische Wirkung von Rituximab nicht zu vermindern.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 CHOP vs. R-CHOP bei Diffus großzelligen Lymphomen ²⁰	6
Abb. 2 Wege des Rituximab induzierten Zelltodes.....	7
Abb. 3 Biologische Membran mit lipid raft	10
Abb. 4 Standardreihe und Proteinverteilung	27
Abb. 5 Detektion mit spezifischen 1. und Peroxidase gekoppelten 2.Antikörpern	29
Abb. 6 Rituximab induzierte Hemmung der Proliferation	34
Abb. 7 Rituximab induziert den Zelltod von Nceb, nicht aber von DB.....	35
Abb. 8 Oberflächenexpression von CD20 und GM-1 bei DB-Zellen und NCEB-1	37
Abb. 9 CDC und Apoptose durch Rituximab	40
Abb. 10 Rituximab vermittelte CDC und Apoptose bei 10% + 30% Serumkonzentration....	41
Abb. 11 Rituximab aktiviert die Caspase 8 bei NCEB	42
Abb. 12 Rituximab aktiviert die Caspase 8 bei NCEB und nicht bei DB.....	43
Abb. 13 Rituximab aktiviert Caspase 3 bei NCEB nicht aber bei DB.....	44
Abb. 14 Die fraktionierten Lysate besitzen die gleiche Verteilung von GM-1 im Dot Blot ..	45
Abb. 15 Rituximab rekrutiert CD20 in die lipid rafts	46
Abb. 16 M β CD hemmt den zytotoxischen Effekt von Rituximab.....	48
Abb. 17 Titration der höchsten nicht-toxischen Konzentration der Antimykotika.....	50
Abb. 18 CD20-Rekrutierung durch Rituximab nach Behandlung mit Triazol-Antimykotika	52
Abb. 19 Rituximab vermittelte Rekrutierung von CD20 nach Behandlung mit Itraconazol..	52
Abb. 20 Antimykotika vom Triazol-Typ hemmen die Wirkung von Rituximab.....	54
Abb. 21 Effekt von Rituximab nach Behandlung mit M β CD oder Itraconazol.....	55
Abb. 22 Itraconazol hemmt die Rituximab vermittelte CDC und die Apoptose	56
Abb. 23 Rituximab induzierte CDC und Apoptose nach Vorbehandlung mit Itraconazol.....	57

Literaturverzeichnis

1. Awasthi-Kalia M, Schnetkamp PP, Deans JP. Differential effects of filipin and methyl-beta-cyclodextrin on B cell receptor signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;287:77-82.
2. Bennett M, Sharma K, Yegena S, Gavish I, Dave HP, Schechter GP. Rituximab monotherapy for splenic marginal zone lymphoma. *Haematologica.* 2005;90:856-858.
3. Bohana-Kashtan O, Ziporen L, Donin N, Kraus S, Fishelson Z. Cell signals transduced by complement. *Mol Immunol.* 2004;41:583-597.
4. Bonavida B. Rituximab-induced inhibition of antiapoptotic cell survival pathways: implications in chemo/immunosensitivity, rituximab unresponsiveness, prognostic and novel therapeutic interventions. *Oncogene.* 2007;26:3629-3636.
5. Bonavita S, Conforti R, Russo A, Sacco R, Tessitore A, Gallo A, Della Corte M, Monsurro MR, Tedeschi G. Infratentorial progressive multifocal leukoencephalopathy in a patient treated with fludarabine and rituximab. *Neurol Sci.* 2008;29:37-39.
6. Brown DA, London E. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem.* 2000;275:17221-17224.
7. Bubien JK, Zhou LJ, Bell PD, Frizzell RA, Tedder TF. Transfection of the CD20 cell surface molecule into ectopic cell types generates a Ca²⁺ conductance found constitutively in B lymphocytes. *J Cell Biol.* 1993;121:1121-1132.
8. Burger K, Gimpl G, Fahrenholz F. Regulation of receptor function by cholesterol. *Cell Mol Life Sci.* 2000;57:1577-1592.
9. Burnette WN. "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.* 1981;112:195-203.
10. Byrd JC, Kitada S, Flinn IW, Aron JL, Pearson M, Lucas D, Reed JC. The mechanism of tumor cell clearance by rituximab in vivo in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: evidence of caspase activation and apoptosis induction. *Blood.* 2002;99:1038-1043.
11. Byrd JC, Waselenko JK, Maneatis TJ, Murphy T, Ward FT, Monahan BP, Sipe MA, Donegan S, White CA. Rituximab therapy in hematologic malignancy patients with circulating blood tumor cells: association with increased infusion-related side effects and rapid blood tumor clearance. *J Clin Oncol.* 1999;17:791-795.
12. Cartron G, Dacheux L, Salles G, Solal-Celigny P, Bardos P, Colombat P, Watier H. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor Fcγ3 gene. *Blood.* 2002;99:754-758.
13. Cartron G, Watier H, Golay J, Solal-Celigny P. From the bench to the bedside: ways to improve rituximab efficacy. *Blood.* 2004;104:2635-2642.

14. Chan HT, Hughes D, French RR, Tutt AL, Walshe CA, Teeling JL, Glennie MJ, Cragg MS. CD20-induced lymphoma cell death is independent of both caspases and its redistribution into triton X-100 insoluble membrane rafts. *Cancer Res.* 2003;63:5480-5489.
15. Cittera E, Leidi M, Buracchi C, Pasqualini F, Sozzani S, Vecchi A, Waterfield JD, Introna M, Golay J. The CCL3 family of chemokines and innate immunity cooperate in vivo in the eradication of an established lymphoma xenograft by rituximab. *J Immunol.* 2007;178:6616-6623.
16. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med.* 2000;6:443-446.
17. Cohen AM, Shinitzky M. Modulation of complement lysis of human erythrocytes by the membrane lipid viscosity. *Vox Sang.* 1982;43:23-27.
18. Coiffier B. Increasing chemotherapy intensity in aggressive lymphomas: a renewal? *J Clin Oncol.* 2003;21:2457-2459.
19. Coiffier B, Haioun C, Ketterer N, Engert A, Tilly H, Ma D, Johnson P, Lister A, Feuring-Buske M, Radford JA, 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.* 1998;92:1927-1932.
20. 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.* 2002;346:235-242.
21. Cragg MS. The potential effect of statins on rituximab immunotherapy. *PLoS Med.* 2008;5:e77.
22. Cragg MS, Glennie MJ. Antibody specificity controls in vivo effector mechanisms of anti-CD20 reagents. *Blood.* 2004;103:2738-2743.
23. Cragg MS, Morgan SM, Chan HT, Morgan BP, Filatov AV, Johnson PW, French RR, Glennie MJ. Complement-mediated lysis by anti-CD20 mAb correlates with segregation into lipid rafts. *Blood.* 2003;101:1045-1052.
24. Czuczman MS. CHOP plus rituximab chemoimmunotherapy of indolent B-cell lymphoma. *Semin Oncol.* 1999;26:88-96.
25. Czuczman MS, Grillo-Lopez AJ, White CA, Saleh M, Gordon L, LoBuglio AF, Jonas C, Klippenstein D, Dallaire B, Varns C. Treatment of patients with low-grade B-cell lymphoma with the combination of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody and CHOP chemotherapy. *J Clin Oncol.* 1999;17:268-276.
26. Deans JP, Kalt L, Ledbetter JA, Schieven GL, Bolen JB, Johnson P. Association of 75/80-kDa phosphoproteins and the tyrosine kinases Lyn, Fyn, and Lck with the B cell molecule CD20. Evidence against involvement of the cytoplasmic regions of CD20. *J Biol Chem.* 1995;270:22632-22638.
27. Deans JP, Li H, Polyak MJ. CD20-mediated apoptosis: signalling through lipid rafts.

Immunology. 2002;107:176-182.

28. Deans JP, Robbins SM, Polyak MJ, Savage JA. Rapid redistribution of CD20 to a low density detergent-insoluble membrane compartment. *J Biol Chem.* 1998;273:344-348.
29. Deans JP, Schieven GL, Shu GL, Valentine MA, Gilliland LA, Aruffo A, Clark EA, Ledbetter JA. Association of tyrosine and serine kinases with the B cell surface antigen CD20. Induction via CD20 of tyrosine phosphorylation and activation of phospholipase C-gamma 1 and PLC phospholipase C-gamma 2. *J Immunol.* 1993;151:4494-4504.
30. Demidem A, Lam T, Alas S, Hariharan K, Hanna N, Bonavida B. Chimeric anti-CD20 (IDEC-C2B8) monoclonal antibody sensitizes a B cell lymphoma cell line to cell killing by cytotoxic drugs. *Cancer Biother Radiopharm.* 1997;12:177-186.
31. Devesa SS, Fears T. Non-Hodgkin's lymphoma time trends: United States and international data. *Cancer Res.* 1992;52:5432s-5440s.
32. Di Gaetano N, Cittera E, Nota R, Vecchi A, Grieco V, Scanziani E, Botto M, Introna M, Golay J. Complement activation determines the therapeutic activity of rituximab in vivo. *J Immunol.* 2003;171:1581-1587.
33. Donhuijsen KP, Peter; Schmid, Kurt Werner, MEDIZIN: Originalarbeit. Trendwende in der Mykosefrequenz bei hämatologischen Neoplasien: Obduktionsergebnisse von 1976 bis 2005. *Dtsch Arztebl* 2008; 105(28-29): 501-6. 2008;DOI: 10.3238/arztebl.2008.0501.
34. Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2005;37:719-727.
35. 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.* 2005;23:4117-4126.
36. Feuring-Buske M, Kneba M, Unterhalt M, Engert A, Gramatzki M, Hiller E, Trumper L, Brugger W, Ostermann H, Atzpodien J, Hallek M, Aulitzky E, Hiddemann W. IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 antibody treatment in relapsed advanced-stage follicular lymphomas: results of a phase-II study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Ann Hematol.* 2000;79:493-500.
37. Fischer L, Penack O, Gentilini C, Nogai A, Muessig A, Thiel E, Uharek L. The anti-lymphoma effect of antibody-mediated immunotherapy is based on an increased degranulation of peripheral blood natural killer (NK) cells. *Exp Hematol.* 2006;34:753-759.
38. Fisher RI, Gaynor ER, Dahlborg S, Oken MM, Grogan TM, Mize EM, Glick JH, Coltman CA, Jr., Miller TP. Comparison of a standard regimen (CHOP) with three intensive chemotherapy regimens for advanced non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med.* 1993;328:1002-1006.
39. Foon KA. Monoclonal antibody therapies for lymphomas. *Cancer J.* 2000;6:273-278.
40. Freim Wahl SG, Folvik MR, Torp SH. Progressive multifocal leukoencephalopathy in a lymphoma patient with complete remission after treatment with cytostatics and rituximab:

case report and review of the literature. *Clin Neuropathol.* 2007;26:68-73.

41. Geber A, Hitchcock CA, Swartz JE, Pullen FS, Marsden KE, Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Deletion of the *Candida glabrata* ERG3 and ERG11 genes: effect on cell viability, cell growth, sterol composition, and antifungal susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39:2708-2717.
42. Genot E. Interferon alpha and intracytoplasmic free calcium in hairy cell leukemia cells. *Leuk Lymphoma.* 1994;12:373-381.
43. Ghielmini M, Schmitz SF, Cogliatti S, Bertonni F, Waltzer U, Fey MF, Betticher DC, Schefer H, Pichert G, Stahel R, Ketterer N, Bargetzi M, Cerny T. Effect of single-agent rituximab given at the standard schedule or as prolonged treatment in patients with mantle cell lymphoma: a study of the Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK). *J Clin Oncol.* 2005;23:705-711.
44. Ghielmini M, Schmitz SF, Cogliatti SB, Pichert G, Hummerjohann J, Waltzer U, Fey MF, Betticher DC, Martinelli G, Peccatori F, Hess U, Zucca E, Stupp R, Kovacsovics T, Helg C, Lohri A, Bargetzi M, Vorobiof D, Cerny T. Prolonged treatment with rituximab in patients with follicular lymphoma significantly increases event-free survival and response duration compared with the standard weekly x 4 schedule. *Blood.* 2004;103:4416-4423.
45. Ginaldi L, De Martinis M, Matutes E, Farahat N, Morilla R, Dyer MJ, Catovsky D. Levels of expression of CD52 in normal and leukemic B and T cells: correlation with in vivo therapeutic responses to Campath-1H. *Leuk Res.* 1998;22:185-191.
46. Golay J, Cittera E, Di Gaetano N, Manganini M, Mosca M, Nebuloni M, van Rooijen N, Vago L, Introna M. The role of complement in the therapeutic activity of rituximab in a murine B lymphoma model homing in lymph nodes. *Haematologica.* 2006;91:176-183.
47. Golay J, Zaffaroni L, Vaccari T, Lazzari M, Borleri GM, Bernasconi S, Tedesco F, Rambaldi A, Introna M. Biologic response of B lymphoma cells to anti-CD20 monoclonal antibody rituximab in vitro: CD55 and CD59 regulate complement-mediated cell lysis. *Blood.* 2000;95:3900-3908.
48. Golay JT, Clark EA, Beverley PC. The CD20 (Bp35) antigen is involved in activation of B cells from the G0 to the G1 phase of the cell cycle. *J Immunol.* 1985;135:3795-3801.
49. Golomb HM, Jacobs A, Fefer A, Ozer H, Thompson J, Portlock C, Ratain M, Golde D, Vardiman J, Burke JS, et al. Alpha-2 interferon therapy of hairy-cell leukemia: a multicenter study of 64 patients. *J Clin Oncol.* 1986;4:900-905.
50. Gong Q, Ou Q, Ye S, Lee WP, Cornelius J, Diehl L, Lin WY, Hu Z, Lu Y, Chen Y, Wu Y, Meng YG, Gribling P, Lin Z, Nguyen K, Tran T, Zhang Y, Rosen H, Martin F, Chan AC. Importance of cellular microenvironment and circulatory dynamics in B cell immunotherapy. *J Immunol.* 2005;174:817-826.
51. Gonzalez-Angulo AM, Morales-Vasquez F, Hortobagyi GN. Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2007;608:1-22.
52. Gupta N, DeFranco AL. Lipid rafts and B cell signaling. *Semin Cell Dev Biol.* 2007;18:616-626.

53. H. Stein¹(1) K-uRfL-uHalfP, Universitätsklinikum Benjamin Franklin, Freie Universität Berlin, XX Die neue WHO Klassifikation der malignen Lymphome Nach „REAL“ ein weiterer Schritt auf dem Weg zu einem weltweiten Konsens
Nach „REAL“ ein weiterer Schritt auf dem Weg zu einem weltweiten Konsens. *Der Pathologe*, Verlag Springer Berlin / Heidelberg. 2000;Volume 21, Number 2 / April 2000:Seiten 101-105
54. Hainsworth JD, Burris HA, 3rd, Morrissey LH, Litchy S, Scullin DC, Jr., Bearden JD, 3rd, Richards P, Greco FA. Rituximab monoclonal antibody as initial systemic therapy for patients with low-grade non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2000;95:3052-3056.
55. Hainsworth JD, Litchy S, Burris HA, 3rd, Scullin DC, Jr., Corso SW, Yardley DA, Morrissey L, Greco FA. Rituximab as first-line and maintenance therapy for patients with indolent non-hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. 2002;20:4261-4267.
56. Hardell L, Eriksson M. A case-control study of non-Hodgkin lymphoma and exposure to pesticides. *Cancer*. 1999;85:1353-1360.
57. Hawkes R, Niday E, Gordon J. A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Anal Biochem*. 1982;119:142-147.
58. Hernandez-Ilizaliturri FJ, Jupudy V, Ostberg J, Oflazoglu E, Huberman A, Repasky E, Czuczman MS. Neutrophils contribute to the biological antitumor activity of rituximab in a non-Hodgkin's lymphoma severe combined immunodeficiency mouse model. *Clin Cancer Res*. 2003;9:5866-5873.
59. 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 HE, Freund M, Wormann B, Fuchs R, Planker M, Schimke J, Eimermacher H, Trumper L, Aldaoud 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*. 2005;106:3725-3732.
60. Hitchcock CA, Barrett-Bee KJ, Russell NJ. The lipid composition and permeability to azole of an azole- and polyene-resistant mutant of *Candida albicans*. *J Med Vet Mycol*. 1987;25:29-37.
61. Hitchcock CA, Dickinson K, Brown SB, Evans EG, Adams DJ. Interaction of azole antifungal antibiotics with cytochrome P-450-dependent 14 alpha-sterol demethylase purified from *Candida albicans*. *Biochem J*. 1990;266:475-480.
62. Hofmeister JK, Cooney D, Coggeshall KM. Clustered CD20 induced apoptosis: src-family kinase, the proximal regulator of tyrosine phosphorylation, calcium influx, and caspase 3-dependent apoptosis. *Blood Cells Mol Dis*. 2000;26:133-143.
63. Holstein SA, Knapp HR, Clamon GH, Murry DJ, Hohl RJ. Pharmacodynamic effects of high dose lovastatin in subjects with advanced malignancies. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2006;57:155-164.

64. Hommelgaard AM, Lerdrup M, van Deurs B. Association with membrane protrusions makes ErbB2 an internalization-resistant receptor. *Mol Biol Cell*. 2004;15:1557-1567.
65. Hudis CA. Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med*. 2007;357:39-51.
66. Hugli TE, Muller-Eberhard HJ. Anaphylatoxins: C3a and C5a. *Adv Immunol*. 1978;26:1-53.
67. Humblet Y. Cetuximab: an IgG(1) monoclonal antibody for the treatment of epidermal growth factor receptor-expressing tumours. *Expert Opin Pharmacother*. 2004;5:1621-1633.
68. Idusogie EE, Presta LG, Gazzano-Santoro H, Totpal K, Wong PY, Ultsch M, Meng YG, Mulkerrin MG. Mapping of the C1q binding site on rituxan, a chimeric antibody with a human IgG1 Fc. *J Immunol*. 2000;164:4178-4184.
69. Idusogie EE, Wong PY, Presta LG, Gazzano-Santoro H, Totpal K, Ultsch M, Mulkerrin MG. Engineered antibodies with increased activity to recruit complement. *J Immunol*. 2001;166:2571-2575.
70. Inokuchi JI, Uemura S, Kabayama K, Igarashi Y. Glycosphingolipid deficiency affects functional microdomain formation in Lewis lung carcinoma cells. *Glycoconj J*. 2000;17:239-245.
71. Jaffe ES, Henson DE, Stein H, Vardiman JW. World Health Organization Classification of Tumours: Tumours of the Haemopoietic and Lymphoid Tissues. . IARC Press 2001.
72. Janas E, Priest R, Wilde JI, White JH, Malhotra R. Rituxan (anti-CD20 antibody)-induced translocation of CD20 into lipid rafts is crucial for calcium influx and apoptosis. *Clin Exp Immunol*. 2005;139:439-446.
73. Janes PW, Ley SC, Magee AI. Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via the T cell antigen receptor. *J Cell Biol*. 1999;147:447-461.
74. Janeway C.A. TP, Walport M., Capra J.D. ed *Immunobiologie* 4 Auflage. New York; 1999
75. Jensen M, Winkler U, Manzke O, Diehl V, Engert A. Rapid tumor lysis in a patient with B-cell chronic lymphocytic leukemia and lymphocytosis treated with an anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8, rituximab). *Ann Hematol*. 1998;77:89-91.
76. Joshi T, Ganesan LP, Cheney C, Ostrowski MC, Muthusamy N, Byrd JC, Tridandapani S. The PtdIns 3-kinase/Akt pathway regulates macrophage-mediated ADCC against B cell lymphoma. *PLoS One*. 2009;4:e4208.
77. Khorana AA, Rosenblatt JD, Young FM. Immunopathogenesis of HIV and HTLV-1 infection: mechanisms for lymphomagenesis. *Cancer Treat Res*. 2001;104:19-74.
78. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975;256:495-497.
79. Korade Z, Kenworthy AK. Lipid rafts, cholesterol, and the brain. *Neuropharmacology*.

2008;55:1265-1273.

80. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680-685.

81. Le Beau MM. Chromosomal abnormalities in non-Hodgkin's lymphomas. *Semin Oncol*. 1990;17:20-29.

82. Lenz G, Dreyling M, Hoster E, Wormann B, Duhren 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*. 2005;23:1984-1992.

83. Liu B, Fang M, Schmidt M, Lu Y, Mendelsohn J, Fan Z. Induction of apoptosis and activation of the caspase cascade by anti-EGF receptor monoclonal antibodies in DiFi human colon cancer cells do not involve the c-jun N-terminal kinase activity. *Br J Cancer*. 2000;82:1991-1999.

84. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:265-275.

85. Maesaki S, Hashiguchi K, Tomiyama Y, Sasaki E, Miyazaki H, Miyazaki Y, Higashiyama Y, Tomono K, Tashiro T, Kohno S. [Correlations between drug plasma concentration and adverse effects in patients treated with itraconazole for pulmonary aspergilloma]. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi*. 1999;37:875-879.

86. Majstorovic PRR, . *Behandlung systemischer Mykosen, Evidenz und Ethik. Pharmakritik* 25. März 1997;Jahrgang 18.

87. Maloney D.G. SB, Appelbaum F.R. . The anti-tumor effect of monoclonal anti-CD20 antibody therapy includes direct anti-proliferative activity and induction of apoptosis in CD20 positive non-Hodgkin's lymphoma cell lines. *Blood* 1996;88

88. Maloney DG, Grillo-Lopez AJ, Bodkin DJ, White CA, Liles TM, Royston I, Varns C, Rosenberg J, Levy R. IDEC-C2B8: results of a phase I multiple-dose trial in patients with relapsed non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. 1997;15:3266-3274.

89. Maloney DG, Grillo-Lopez AJ, White CA, Bodkin D, Schilder RJ, Neidhart JA, Janakiraman N, Foon KA, Liles TM, Dallaire BK, Wey K, Royston I, Davis T, Levy R. IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. 1997;90:2188-2195.

90. Maloney DG, Smith B, Rose A. Rituximab: mechanism of action and resistance. *Semin Oncol*. 2002;29:2-9.

91. Manches O, Lui G, Chaperot L, Gressin R, Molens JP, Jacob MC, Sotto JJ, Leroux D, Bensa JC, Plumas J. In vitro mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas. *Blood*. 2003;101:949-954.

92. Mandal M, Adam L, Mendelsohn J, Kumar R. Nuclear targeting of Bax during

apoptosis in human colorectal cancer cells. *Oncogene*. 1998;17:999-1007.

93. Mathas S, Rickers A, Bommert K, Dorken B, Mapara MY. Anti-CD20- and B-cell receptor-mediated apoptosis: evidence for shared intracellular signaling pathways. *Cancer Res*. 2000;60:7170-7176.

94. McKelvey EM, Gottlieb JA, Wilson HE, Haut A, Talley RW, Stephens R, Lane M, Gamble JF, Jones SE, Grozea PN, Gutterman J, Coltman C, Moon TE. Hydroxyldaunomycin (Adriamycin) combination chemotherapy in malignant lymphoma. *Cancer*. 1976;38:1484-1493.

95. Mendelsohn J. Blockade of receptors for growth factors: an anticancer therapy--the fourth annual Joseph H Burchenal American Association of Cancer Research Clinical Research Award Lecture. *Clin Cancer Res*. 2000;6:747-753.

96. Meusers P, Hense J, Brittinger G. Mantle cell lymphoma: diagnostic criteria, clinical aspects and therapeutic problems. *Leukemia*. 1997;11 Suppl 2:S60-64.

97. Mey U, Strehl J, Gorschluter M, Ziske C, Glasmacher A, Pralle H, Schmidt-Wolf I. Advances in the treatment of hairy-cell leukaemia. *Lancet Oncol*. 2003;4:86-94.

98. Meyer zum Buschenfelde C, Feuerstacke Y, Gotze KS, Scholze K, Peschel C. GM1 expression of non-Hodgkin's lymphoma determines susceptibility to rituximab treatment. *Cancer Res*. 2008;68:5414-5422.

99. Miljan EA, Bremer EG. Regulation of growth factor receptors by gangliosides. *Sci STKE*. 2002;2002:RE15.

100. Mone AP, Cheney C, Banks AL, Tridandapani S, Mehter N, Guster S, Lin T, Eisenbeis CF, Young DC, Byrd JC. Alemtuzumab induces caspase-independent cell death in human chronic lymphocytic leukemia cells through a lipid raft-dependent mechanism. *Leukemia*. 2006;20:272-279.

101. Montixi C, Langlet C, Bernard AM, Thimonier J, Dubois C, Wurbel MA, Chauvin JP, Pierres M, He HT. Engagement of T cell receptor triggers its recruitment to low-density detergent-insoluble membrane domains. *Embo J*. 1998;17:5334-5348.

102. Morita T, Nozawa Y. Effects of antifungal agents on ergosterol biosynthesis in *Candida albicans* and *Trichophyton mentagrophytes*: differential inhibitory sites of naphthiomate and miconazole. *J Invest Dermatol*. 1985;85:434-437.

103. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65:55-63.

104. Nagafuku M, Kabayama K, Oka D, Kato A, Tani-ichi S, Shimada Y, Ohno-Iwashita Y, Yamasaki S, Saito T, Iwabuchi K, Hamaoka T, Inokuchi J, Kosugi A. Reduction of glycosphingolipid levels in lipid rafts affects the expression state and function of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins but does not impair signal transduction via the T cell receptor. *J Biol Chem*. 2003;278:51920-51927.

105. Olayioye MA. Update on HER-2 as a target for cancer therapy: intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members. *Breast Cancer Res*. 2001;3:385-389.

106. Österreichische Gesellschaft für Antimikrobielle Chemotherapie S. INFEKTIONSNETZ ÖSTERREICH (www.infektionsnetz.at) In: Österreichische Gesellschaft für antimikrobielle Chemotherapie, A-1150 Wien M-R-S eds: Universimed New Media GmbH.
107. Pedersen IM, Buhl AM, Klausen P, Geisler CH, Jurlander J. The chimeric anti-CD20 antibody rituximab induces apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells through a p38 mitogen activated protein-kinase-dependent mechanism. *Blood*. 2002;99:1314-1319.
108. Perz J, Topaly J, Fruehauf S, Hensel M, Ho AD. Level of CD 20-expression and efficacy of rituximab treatment in patients with resistant or relapsing B-cell prolymphocytic leukemia and B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2002;43:149-151.
109. Pike LJ. The challenge of lipid rafts. *J Lipid Res*. 2009;50 Suppl:S323-328.
110. Polyak MJ, Tailor SH, Deans JP. Identification of a cytoplasmic region of CD20 required for its redistribution to a detergent-insoluble membrane compartment. *J Immunol*. 1998;161:3242-3248.
111. Press OW, Farr AG, Borroz KI, Anderson SK, Martin PJ. Endocytosis and degradation of monoclonal antibodies targeting human B-cell malignancies. *Cancer Res*. 1989;49:4906-4912.
112. Press OW, Howell-Clark J, Anderson S, Bernstein I. Retention of B-cell-specific monoclonal antibodies by human lymphoma cells. *Blood*. 1994;83:1390-1397.
113. Ravetch JV, Clynes RA. Divergent roles for Fc receptors and complement in vivo. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:421-432.
114. Reed JC. Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol*. 1999;17:2941-2953.
115. Reff ME, Carner K, Chambers KS, Chinn PC, Leonard JE, Raab R, Newman RA, Hanna N, Anderson DR. Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood*. 1994;83:435-445.
116. Ringerike T, Blystad FD, Levy FO, Madshus IH, Stang E. Cholesterol is important in control of EGF receptor kinase activity but EGF receptors are not concentrated in caveolae. *J Cell Sci*. 2002;115:1331-1340.
117. Rodal SK, Skretting G, Garred O, Vilhardt F, van Deurs B, Sandvig K. Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Mol Biol Cell*. 1999;10:961-974.
118. Roskoski R, Jr. The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;319:1-11.
119. Saltman DL, Cachia PG, Dewar AE, Ross FM, Krajewski AS, Ludlam C, Steel CM. Characterization of a new non-Hodgkin's lymphoma cell line (NCEB-1) with a chromosomal (11:14) translocation [t(11:14)(q13;q32)]. *Blood*. 1988;72:2026-2030.
120. Sanati H, Belanger P, Fratti R, Ghannoum M. A new triazole, voriconazole (UK-109,496), blocks sterol biosynthesis in *Candida albicans* and *Candida krusei*. *Antimicrob*

Agents Chemother. 1997;41:2492-2496.

121. Sar A, Perizzolo M, Stewart D, Mansoor A, Difrancesco LM, Demetrick DJ. Mutation or polymorphism of the CD20 gene is not associated with the response to R-CHOP in diffuse large B cell lymphoma patients. *Leuk Res.* 2008.
122. Schmoll H, Possinger ed *Kompandium Internistischer Onkologie*. In: Schmoll ed. Vol. 1. Heidelberg: Springer Verlag; 2006.
123. Schulz H, Bohlius JF, Trelle S, Skoetz N, Reiser M, Kober T, Schwarzer G, Herold M, Dreyling M, Hallek M, Engert A. Immunochemotherapy with rituximab and overall survival in patients with indolent or mantle cell lymphoma: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2007;99:706-714.
124. Shan D, Ledbetter JA, Press OW. Apoptosis of malignant human B cells by ligation of CD20 with monoclonal antibodies. *Blood.* 1998;91:1644-1652.
125. Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000;1:31-39.
126. Singer SJ, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science.* 1972;175:720-731.
127. Smith MR. Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene.* 2003;22:7359-7368.
128. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* 1975;98:503-517.
129. Stashenko P, Nadler LM, Hardy R, Schlossman SF. Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen. *J Immunol.* 1980;125:1678-1685.
130. Stuschke M, Hoederath A, Sack H, Potter R, Muller RP, Schulz U, Karstens J, Makoski HB. Extended field and total central lymphatic radiotherapy in the treatment of early stage lymph node centroblastic-centrocytic lymphomas: results of a prospective multicenter study. *Study Group NHL-fruhe Stadien. Cancer.* 1997;80:2273-2284.
131. Swerdlow SH, Campo E, Harris N.L., Jaffe E.S., Pileri S.A., Stein H., Thiele J., Vardiman, J.W. WHO Classification of Tumours, 4th Edition
IARC WHO Classification of Tumours, No 2
IARC
2008;Volume 2:439 pages
132. Tedder TF, Boyd AW, Freedman AS, Nadler LM, Schlossman SF. The B cell surface molecule B1 is functionally linked with B cell activation and differentiation. *J Immunol.* 1985;135:973-979.
133. Tedder TF, Distèche CM, Louie E, Adler DA, Croce CM, Schlossman SF, Saito H. The gene that encodes the human CD20 (B1) differentiation antigen is located on chromosome 11 near the t(11;14)(q13;q32) translocation site. *J Immunol.* 1989;142:2555-2559.
134. Tedder TF, Engel P. CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes.

Immunol Today. 1994;15:450-454.

135. Tedder TF, Forsgren A, Boyd AW, Nadler LM, Schlossman SF. Antibodies reactive with the B1 molecule inhibit cell cycle progression but not activation of human B lymphocytes. *Eur J Immunol.* 1986;16:881-887.

136. Tedder TF, Klejman G, Schlossman SF, Saito H. Structure of the gene encoding the human B lymphocyte differentiation antigen CD20 (B1). *J Immunol.* 1989;142:2560-2568.

137. Teeling JL, Mackus WJ, Wiegman LJ, van den Brakel JH, Beers SA, French RR, van Meerten T, Ebeling S, Vink T, Slootstra JW, Parren PW, Glennie MJ, van de Winkel JG. The biological activity of human CD20 monoclonal antibodies is linked to unique epitopes on CD20. *J Immunol.* 2006;177:362-371.

138. Tepper AD, de Vries E, van Blitterswijk WJ, Borst J. Ordering of ceramide formation, caspase activation, and mitochondrial changes during CD95- and DNA damage-induced apoptosis. *J Clin Invest.* 1999;103:971-978.

139. Terui Y, Mishima Y, Sugimura N, Kojima K, Sakurai T, Mishima Y, Kuniyoshi R, Taniyama A, Yokoyama M, Sakajiri S, Takeuchi K, Watanabe C, Takahashi S, Ito Y, Hatake K. Identification of CD20 C-terminal deletion mutations associated with loss of CD20 expression in non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2009;15:2523-2530.

140. 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.* 1979;76:4350-4354.

141. Untch MJ, Christian; Thomssen, Christoph; Nitz, Ulrike; Minckwitz, Gunter von; Kaufmann, Manfred. Adjuvante Therapie mit Trastuzumab bei Mammakarzinompatientinnen
Adjuvant Treatment with Trastuzumab in Patients with Breast Cancer
Dtsch Arztebl 2006; 103(50): A-3406 / B-2961 / C-2841
2006;103.

142. Van den Bossche H, Ruyschaert JM, Defrise-Quertain F, Willemsens G, Cornelissen F, Marichal P, Cools W, Van Cutsem J. The interaction of miconazole and ketoconazole with lipids. *Biochem Pharmacol.* 1982;31:2609-2617.

143. Van den Bossche H, Willemsens G, Cools W, Cornelissen F, Lauwers WF, van Cutsem JM. In vitro and in vivo effects of the antimycotic drug ketoconazole on sterol synthesis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1980;17:922-928.

144. van Engeland M, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP. A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry.* 1996;24:131-139.

145. van Meer G, Simons K. Lipid polarity and sorting in epithelial cells. *J Cell Biochem.* 1988;36:51-58.

146. van Spriel AB, van Ojik HH, Bakker A, Jansen MJ, van de Winkel JG. Mac-1 (CD11b/CD18) is crucial for effective Fc receptor-mediated immunity to melanoma. *Blood.* 2003;101:253-258.

147. Vaughan Hudson B, Vaughan Hudson G, MacLennan KA, Anderson L, Linch DC.

Clinical stage 1 non-Hodgkin's lymphoma: long-term follow-up of patients treated by the British National Lymphoma Investigation with radiotherapy alone as initial therapy. *Br J Cancer*. 1994;69:1088-1093.

148. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*. 1995;184:39-51.

149. Vose JM, Link BK, Grossbard ML, Czuczman M, Grillo-Lopez A, Gilman P, Lowe A, Kunkel LA, Fisher RI. Phase II study of rituximab in combination with chop chemotherapy in patients with previously untreated, aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. 2001;19:389-397.

150. Wang SY, Racila E, Taylor RP, Weiner GJ. NK-cell activation and antibody-dependent cellular cytotoxicity induced by rituximab-coated target cells is inhibited by the C3b component of complement. *Blood*. 2008;111:1456-1463.

151. Waterman MR, Lepesheva GI. Sterol 14 alpha-demethylase, an abundant and essential mixed-function oxidase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;338:418-422.

152. Winiarska M, Bil J, Wilczek E, Wilczynski GM, Lekka M, Engelberts PJ, Mackus WJ, Gorska E, Bojarski L, Stoklosa T, Nowis D, Kurzaj Z, Makowski M, Glodkowska E, Issat T, Mrowka P, Lasek W, Dabrowska-Iwanicka A, Basak GW, Wasik M, Warzocha K, Sinski M, Gaciong Z, Jakobisiak M, Parren PW, Golab J. Statins impair antitumor effects of rituximab by inducing conformational changes of CD20. *PLoS Med*. 2008;5:e64.

153. Winkler U, Jensen M, Manzke O, Schulz H, Diehl V, Engert A. Cytokine-release syndrome in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia and high lymphocyte counts after treatment with an anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab, IDEC-C2B8). *Blood*. 1999;94:2217-2224.

154. Yang H, Rosove MH, Figlin RA. Tumor lysis syndrome occurring after the administration of rituximab in lymphoproliferative disorders: high-grade non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol*. 1999;62:247-250.

155. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2:127-137.

156. Yoon SJ, Nakayama K, Hikita T, Handa K, Hakomori SI. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase is modulated by GM3 interaction with N-linked GlcNAc termini of the receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:18987-18991.

157. Zambello R, Cabrelle A, Trentin L, Agostini C, Semenzato G, Viola A. The raft marker GM1 identifies functional subsets of granular lymphocytes in patients with CD3+ lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. *Leukemia*. 2004;18:771-776.

158. Zhang W, Tribble RP, Samelson LE. LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation. *Immunity*. 1998;9:239-246.

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. C. Peschel für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Abteilung unter hervorragenden wissenschaftlichen Arbeitsbedingungen durchzuführen zu können. Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Labors in der Trogerstr. 32, die mir bei meiner Arbeit zur Seite gestanden haben, bedanken. Ihre Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit trugen wesentlich zur angenehmen und konstruktiven Arbeitsatmosphäre bei.

Frau Yvonne Feuerstacke danke ich für ihre geduldige und kompetente Art bei der Einarbeitung in die technische Durchführung der Experimente, für Ratschläge und viele hilfreiche Anregungen und für die äußerst gute Zusammenarbeit während der gesamten Dissertation.

Ganz besonders danken möchte ich Herrn PD Dr. C. Meyer zum Büschenfelde. Seine exzellente Betreuung während der experimentellen Phase der Arbeit und seine kritische Beurteilung des Manuskripts waren für die Entstehung dieser Arbeit ganz entscheidend. Weiterhin möchte ich ihm für die zahlreichen Ideen, Vorschläge und Anregungen, die mit in diese Arbeit eingeflossen sind, danken.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie für die Unterstützung und Förderung während des Studiums und bei dieser Arbeit bedanken.