Aus der Klinik für Innere Medizin mit Schwerpunkt
Hämatologie und Onkologie
der Medizinischen Fakultät Charitè – Universitätsmedizin Berlin

D I S S E R T A T I O N

In *vivo*- und in *vitro*-Komplementaktivierung durch den monoklonalen CD20-Antikörper Rituximab bei der Behandlung von Non-Hodgkin-Lymphomen

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charitè – Universitätsmedizin Berlin

von

Christian Gerecke
aus der Hansestadt Stralsund

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. D. Huhn
2. Prof. Dr. med. U.W. Knauf
3. Prof. Dr. med. E. Thiel

Datum der Promotion: 27.06.2006

In Gedenken an meine Großmutter

Johanna Bielenberg

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung …….. 4

1.1 Non-Hodgkin-Lymphome ……..... 4

1.2 Die Klassifikation der Non-Hodgkin-Lymphome 5

1.3 Gegenwärtiger Kenntnisstand bei der Therapie
von Non-Hodgkin-Lymphomen 6

1.4 Immunologische Therapiestrategien in der Behandlung von Lymphomen ……. 7

1.5 Das CD20-Oberflächenantigen als Ziel einer Immuntherapie 9

1.6 Rituximab – Struktur und Bedeutung in der Therapie 10

1.7 Das Komplementsystem …..……..…….. 13

1.8 Zielsetzung 15

2. Material und Methoden 16

2.1 Reagenzien 16

2.2 Geräte …..... 17

2.3 Patienten 18

2.4 Zellkultur 20

2.5 Zellzählung 21

2.6 MTT-Proliferationsassay 21

2.7 Der Komplement C3a-desArg-ELISA 22

2.8 Statistik ……..... 23

3. Ergebnisse 25

3.1 Einfluss von Rituximab auf das Wachstum humaner B-Zellinien 25

3.2 Komplementassoziierte Wachstumsinhibition von Rituximab 32

3.3 Rituximab induzierte Komplementaktivierung *in vivo* 36

4. Diskussion 40

4.1 Rituximab – Effekt auf das Wachstumsverhalten humaner B-Zellinien 40

4.2 Einfluss des Komplements auf den auf den wachstumsinhibitorischen Effekt von Rituximab 42

4.3 Aktivierung des Komplementsystems bei Patienten mit niedrigmalignen Non-Hodgkin-Lymphomen ……...…… 44

5. Zusammenfassung …..……..……..…… 46

6. Abkürzungsverzeichnis …...……..…… 48

7. Literaturverzeichnis ……...…… 50

7.1 Bücher ……...……..…… 50

7.2 Zeitschriften ……...…… 50

8. Anhang 60

1. Einleitung

1.1 Non-Hodgkin-Lymphome

Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) bilden eine heterogene Gruppe von Neoplasien des lymphatischen Gewebes, meist ausgehend vom B-Zell-System (B-NHL) oder T-Zell-System (T-NHL). Von den Zellen des lymphatischen Gewebe (B- und T-Zellen, natürliche Killerzellen, Makrophagen, dendritische Zellen, interdigitierende Zellen und plasmozytoide Monozyten) entarten nur die B- und T-Zellen und die natürlichen Killerzellen häufiger. Diese Tumore werden als maligne Lymphome zusammengefasst. Dabei werden Vorläuferneoplasien und reife lymphatische Neoplasien unterschieden. Damit sind Lymphome Tumore des spezifischen Immunsystems, wobei „genetische Unfälle“ bei der Reaktion lymphatischer Zellen gegen spezifische Antigene einen frühen Schritt in der Tumorgenese darstellen [1, 2].

Die malignen Lymphome gehören heutzutage weltweit zu den zehn häufigsten bösartigen Erkrankungen und ihre Häufigkeit hat besonders in der westlichen Welt stark zugenommen [7, 8]. Die Inzidenz der NHL hat sich in den letzten 20-25 Jahren bei der männlichen Bevölkerung praktisch verdoppelt, während sie bei den Frauen um etwa 70 Prozent gestiegen ist. Ein besonders starker Anstieg ist bei den hochmalignen Lymphomen zu verzeichnen, allerdings ist auch beim follikulären Lymphom (FL) eine deutliche Häufung der Inzidenz zu beobachten. Während sich die Inzidenzrate verdoppelte, stieg die Mortalitätsrate um etwa 45 Prozent, wobei die relative Mortalität bei den Männern und bei den Frauen sank [7, 8].

Trotz intensiver Forschung und vieler verschiedener Studien ist die Ätiologie bislang unklar. Gesichert ist, dass das Risiko, ein NHL zu entwickeln, mit der Schwächung des Immunsystems ansteigt. So bei immunsuppressiver Medikation, nach Organtransplantation oder nach HIV-Infektion. Auch eine berufliche Exposition mit Chemikalien, insbesondere mit Herbiziden und organischen Lösungsmitteln, wird als risikosteigernd betrachtet, wie in einer 1999 publizierten Case-Control-Studie gezeigt werden konnte [9]. Auch Tabakrauchen ist assoziiert mit einem 1,4 bis 2,8-fach erhöhtem Risiko für die Entwicklung von NHL [5]. Weiterhin konnten in den letzten Jahren Hinweise dafür gefunden werden, dass bestimmte Viren wie zum Beispiel das Epstein-Barr-Virus oder das humane T-cell-leukemia/lymphoma-virus I (HLTV-1) wahrscheinlich für die Entwicklung von bestimmten Lymphomentitäten verantwortlich sind [10, 11].

Eine weitere mögliche Ursache sind chromosomale Veränderungen (Mutationen), die ebenfalls mit dem Alter ansteigen und häufig bei Patienten mit NHL beobachtet werden. Eine für die Entstehung vieler NHL bedeutende chromosomale Mutation ist die Translokation des bcl-2 Gens (t14; 18) [12].

1.2 Die Klassifikation der Non-Hodgkin-Lymphome

Lange Zeit wurde die Klassifikation der NHL weltweit uneinheitlich geführt und um keine Einteilung gab es soviel Verwirrung wie um die der NHL. Im europäischen Raum wurde seit ihrer Einführung im Jahre 1974 durch Lennert lange Zeit die Kiel-Klassifikation verwendet [13, 14, 15]. Die weit überwiegende Mehrzahl der neoplastischen Zellpopulationen maligner Lymphome entspricht zumindest näherungsweise unterschiedlichen Reifungsstufen der physiologischen Lymphozytenentwicklung in der B- und T-Zell-Reihe.

Innerhalb der Kiel-Klassifikation werden die Lymphome einerseits in B- und T-Zell-Lymphome, anderseits in hochmaligne und niedrigmaligne Lymphome eingeteilt. Sie wurde primär für nodale Lymphome entwickelt und berücksichtigt keine klinischen Aspekte. Im amerikanischen Raum wurde über mindestens zwei Jahrzehnte die Rappaport-Klassifikation verwendet, die primär das Wachstumsmuster und den Grad der Differenzierung der Lymphome beschreibt, ohne auf die sehr vielfältigen zytologischen Details verschiedener Lymphomentitäten einzugehen [16]. Ein weiterer Versuch der Kategorisierung – die Working Formulation – beruht hingegen hauptsächlich auf klinischen Parametern sowie auf konventionell-histologischen Kriterien, so dass eine Einordnung der NHL aufgrund ihres Verlaufes, des Ansprechens auf die Therapie und der Überlebenszeit vorgenommen wird [17].

Die Einführung der Working Formulation 1982 sollte eigentlich als eine Übersetzungshilfe zwischen den verschiedenen Klassifikationen dienen, wurde allerdings in den USA vielfach als neues Klassifikationssystem verwendet. Dabei fehlen einzelne gut definierte Entinitäten sowie die notwendige Unterscheidung zwischen B- und T-Zellneoplasien [17].

Damit standen sich in den letzten zwei Jahrzehnten die Working Formulation und die Kiel-Klassifikation als grundsätzlich miteinander nicht kompatible Einteilungssysteme gegenüber. Diese unbefriedigende Situation wurde 1994 durch die Schaffung einer neuen Klassifikation, der Revised European American Lymphoma (R.E.A.L.)-Klassifikation, überwunden [18].

Die R.E.A.L.-Klassifikation wurde von der aus 19 Pathologen bestehenden Internationalen Lymphomstudiengruppe (ILSG) erarbeitet. Grundlage der neuen Klassifikation war die Einordnung der malignen Lymphome nach ihren histologisch-morphologischen, molekularen und klinischen Merkmalen. Im Gegensatz zur Kiel-Klassifikation berücksichtigt die R.E.A.L.-Klassifikation auch den bevorzugten Ursprungsort der verschiedenen Entitäten und schließt somit die extranodalen Lymphome, die Lymphome des Gastrointestinaltraktes und der Haut mit ein [18].

Noch im selben Jahr schlug die Weltgesundheitsorganisation (WHO) vor, den Konsensus der R.E.A.L.-Klassifikation zu erweitern und das Ergebnis in eine neue WHO-Klassifikation umzusetzen. Im November 1997 stellte dann eine internationale Expertengruppe eine einheitlich anerkannte und akzeptierte neue WHO-Klassifikation vor [19, 20]. In der vorliegenden Arbeit wird die Einteilung der NHL nach der WHO-Klassifikation verwendet.

1.3 Gegenwärtiger Kenntnisstand bei der Behandlung der Non-Hodgkin-Lymphome

Trotz großer Fortschritte auf dem Gebiet der Pathogenese und der Biologie beim Verständnis der NHL waren die Erfolge bei der Behandlung dieser heterogenen Gruppe von bösartigen Erkrankungen in den letzten Jahrzehnten eher gering.

Das therapeutische Vorgehen richtet sich immer nach dem histologischen Subtyp und nach dem Stadium der Erkrankung. Die Klassifikation der NHL erfolgt nach der international einheitlich anerkannten WHO-Einteilung [19, 20], während das Stadium nach den Empfehlungen der Konferenz von Ann Arbor eingeteilt wird [21].

Wichtig ist die Unterscheidung zwischen niedrigmalignen und hochmalignen Lymphomen. Hochmaligne Lymphome machen 30 Prozent der NHL aus und sind meist durch große unreife Zellen gekennzeichnet. Sie stellen Erkrankungen mit hoher Proliferationsaktivität und einem akuten Krankheitsverlauf dar, bei denen bereits mit der ersten, häufig sehr intensiven Behandlung eine Heilung erzielt werden soll. Niedrigmaligne Lymphome wachsen langsam und verlaufen chronisch. Sie machen 70 Prozent aller Lymphome aus und sind morphologisch durch kleine reife Lymphozyten gekennzeichnet. Niedrigmaligne Lymphome sind chronische Krankheiten, die sich durch Behandlung gut zurückdrängen lassen, aber in der Regel nicht heilbar sind.

Für die niedrigmalignen NHL in den seltenen Stadien I und II und zum Teil auch noch im Stadium III ist eine Strahlentherapie mit kurativer Intention die Therapie der Wahl. Mehrere sowohl retrospektiv als auch prospektiv durchgeführte multizentrische Studien ergaben eine Gesamtüberlebensrate von 80-100 Prozent nach fünf Jahren, 60 Prozent nach zehn Jahren sowie rezidivfreie Überlebensraten von 60-70 Prozent nach fünf Jahren und 45 Prozent nach zehn Jahren [22, 23 24]. In den fortgeschrittenen Stadien III und IV ist eine Heilung im Allgemeinen nicht möglich. Grundsätzlich ist deshalb eine abwartende Haltung mit Einsetzen einer palliativen

Therapie bei Auftreten von Beschwerden, Thrombopenie oder Anämie gerechtfertigt. Die palliative Therapie besteht meist aus einer Chemotherapie mit einem oder mehreren Zytostatika. Chemotherapie in Kombination mit einer Immuntherapie sowie Radioimmuntherapie mit oder ohne Chemotherapie werden derzeit in klinischen Studien untersucht. Die deutsche Studiengruppe für niedrigmaligne Lymphome untersucht derzeit die Wertigkeit des monoklonalen Antikörpers Rituximab, zum anderen den Stellenwert der peripheren Stammzelltransplantation nach Hochdosis-Chemotherapie insbesondere mit dem Ziel, die krankheitsfreie Zeit der Patienten zu verlängern [25, 26].
Die hochmalignen Lymphome führen unbehandelt schnell zum Tode, sind aber wegen ihres guten Ansprechens auf Strahlen- und Chemotherapie auch in fortgeschrittenen Stadien heilbar [1, 6]. Die Therapiestrategie bei den 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 Prednison besteht [5]. Neuere Untersuchungen zeigen, dass eine Verkürzung der CHOP-Therapieintervalle bei Patienten über 60 Jahre von 21 auf 14 Tage, sowie eine Kombination mit dem monoklonalen Antikörper Rituximab die Therapieergebnisse signifikant verbessern können [27, 28, 29]. Die Arbeitsgruppe um Pfreundschuh et al. konnte zeigen, dass Patienten unter 60 Jahren durch die zusätzliche Gabe von Etoposid (CHOEP) einen signifikanten Überlebensvorteil haben [28, 29].

1.4 Immunologische Therapiestrategien in der Behandlung von Lymphomen

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 Hämatologie und die internistische Onkologie von enormer Bedeutung war [30]. Lymphome eignen sich dabei besonders gut für eine Behandlung mit Antikörpern, weil maligne lymphatische Zellen eine Vielzahl unterschiedlicher Antigene tragen, die nicht auf allen lymphatischen Zellen des normalen Immunsystems exprimiert werden. Die zytotoxische Wirkung können monoklonale Antikörper auf dreierlei Weise entfalten: Durch eine intrinsische zytotoxische Aktivität, über eine Komplement-vermittelte Zytolyse (CDC) oder eine Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität (ADCC) [4]. Bei der Immunantwort durch CDC kommt es nach Bindung des Antikörpers zur Auslösung der Komplementkaskade.

Voraussetzung dafür ist die Konformationsänderung eines IgM-Moleküls durch Bindung an ein Antigen oder die Bindung von zwei IgG-Molekülen, welche jedoch nicht mehr als 30-40 nm voneinander entfernt liegen dürfen. Die Aktivierung der Komplementkaskade endet in einem Membranangriffskomplex, der aus mehreren Komplementfaktoren besteht und in der Lage ist, wahrscheinlich über Aufhebung des osmotischen Gleichgewichts, die Zielzelle zu zerstören [4]. Bei der ADCC bindet eine mit Antikörpern beladene Zielzelle mit Hilfe der Fc-Regionen der Antikörper an eine Effektorzelle, welche Fc-Rezeptoren trägt. Durch die Bindung kommt es zur Freisetzung lytischer Granula, welche Perforine und Granzyme enthält. Man geht davon aus, dass die Perforine durch Polymerbildung einen Kanal in die Oberfläche der Zielzelle bohren, durch den die Granzyme in das Zellinnere gelangen. Die Zerstörung der Zielzelle erfolgt durch programmierten Zelltod oder Lyse [4].

Außerdem kann der Antikörper auch als „Träger“ eines Immuntoxins oder Radionuklids verwendet werden, wodurch seine Wirkung noch gesteigert werden kann. Als Strukturen für eine gezielte Antikörpertherapie gegen Lymphomzellen sind Oberflächenantigene wie CD5 CD19, CD20, CD25 oder CD52 geeignet [31, 32, 33].

Eine weitere interessante Gruppe für die Behandlung von NHL stellen die Interferone dar. Interferone sind Glycoproteine mit antiviraler, immunregulatorischer und Antitumorwirkung. Bei der Therapie der Haarzell-Leukämie (HZL), einem niedrig malignen NHL der B-Zellreihe, zählen

Purinanaloga wie 2-Chloro-2’-desoxyadenosin (2-CdA, Cladribine) neben Interferon alpha heute zu den wichtigsten Therapieoptionen bei der Behandlung der Haarzell-Leukämie. Die Purinanaloga Pentostatin und Cladribine haben in den letzten Jahren die Therapie mit Interferon alpha weitgehend abgelöst. Gründe dafür sind die kürzere Behandlungsdauer und das Erzielen von höheren, anhaltenden Vollremissionen [110]. Bei aktiven Infektionen oder anderen Kontraindikationen gegen Purinanaloga, stellt die Behandlung mit Interferon alpha jedoch immer noch eine wichtige Behandlungsoption dar [34, 35]. In Studien konnte gezeigt werden, dass Interferon α schon als Monosubstanz bei niedrigmalignen NHL eine Remissionsrate von bis zu 50 Prozent erzielen kann [36, 37]. In großen randomisierten Multicenterstudien wurde gezeigt, dass INF α in Kombination mit antrazyklinhaltigen Chemotherapieregimen das progressionsfreie Überleben bzw. die Remissionsdauer signifikant verlängert [38, 39]. Eine langfristige Erhaltungstherapie mit INF α bewirkte in einer Studie der Deutschen Studiengruppe zur Behandlung niedrigmaligner Non-Hodgkin-Lymphome eine signifikante Verbesserung der Remissionsdauer [40, 41].

1.5 Das CD20-Oberflächenantigen als Ziel einer Immuntherapie

CD20 ist das erste humane Differenzierungsantigen, welches mit Hilfe monoklonaler Antikörper auf der Oberfläche von menschlichen Zellen nachgewiesen werden konnte [42]. CD20 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 antikörperproduzierenden Plasmazelle, so geht es verloren. Das menschliche Gen für das CD20-Antigen ist auf Chromosom 11q12-q13 lokalisiert [44, 47]. 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 extrazellulär [43, 44, 45]. 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. [46, 47].

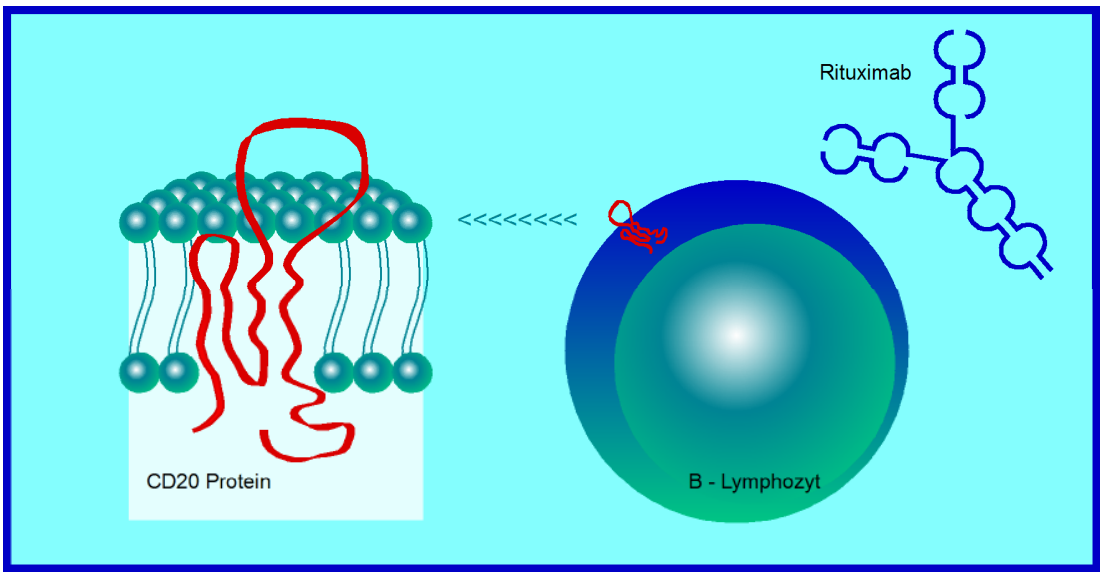

Abb. 1: Darstellung eines CD20 Oberflächenantigen auf B- Lymphozyten

Die Struktur des CD20-Antigens gibt einen Hinweis darauf, dass es sich womöglich um einen Ionenkanal handelt. In den letzten Jahren konnten mehrere Arbeitsgruppen einen Zusammenhang zwischen dem CD20-Antigen und der intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) herstellen [48, 49]. Die Arbeitsgruppe um Genot fand heraus, dass die $[Ca^{2+}]_i$ in HZL-Zellen erhöht ist und

das es einen Zusammenhang zwischen der Hyperphosphorylierung des CD20-Antigens und den Ca^{2+}-Einstrom in die Zelle gibt. Nach Behandlung von HZL mit Interferon α kam es zu einer Downregulation der CD20-Phosphorylierung und zu einem Absinken der $[Ca^{2+}]_i$ in den HZL-Zellen [50]. Die Bindung eines monoklonalen Antikörper an das CD20-Antigen kann eine Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ in den B-Lymphozyten bewirken. Dabei übernimmt das CD20-Rezeptormolekül wahrscheinlich selbst die Funktion eines Ionenkanals [48]. Es konnte gezeigt werden, dass eine Ligation von CD20 mit einem monoklonalen Antikörper zu einer Aktivierung der Tyrosin- und Serin/Tyreonin-Kinasen führt. Diese führen wahrscheinlich zu einer Thyrosinphosphorylierung der Phospholipase Cγ, welche ihrerseits zu einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ führt [51, 52]. Eine niedrige intrazelluläre Calciumkonzentration ist notwendig für einen Übertritt der Zellen aus der G_1 in die S-Phase und damit wahrscheinlich mitverantwortlich für eine klonale Expansion der Zellen. 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 $[Ca^{2+}]_i$ soweit angehoben werden konnte, dass Apoptose – der natürliche Zelltod – eintrat. Durch die Bindung eines monoklonalen Antikörpers wird die $[Ca^{2+}]_i$ gesteigert und so eine weitere Proliferation verhindert [52].
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 [53, 54].

1.6 Rituximab – Struktur und Bedeutung in der Therapie

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 [55].

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 Prozent 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 [56, 93, 96, 101]. Außerdem ist Rituximab in der Lage, in Anwesenheit immunkompetenter humaner Effektorzellen Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität zu vermitteln [56]. Weiterhin konnte demonstriert werden, dass Rituximab bei einigen B-NHL-Zellinien in der Lage ist, direkt Apoptose zu induzieren [57]. Weitgehend ungeklärt ist auch die Tatsache, dass Rituximab in der Lage ist, die Empfindlichkeit primär resistenter humaner Lymphomzellinien gegenüber dem zytotoxischem Effekt von Ricin, VP-16 und Adriamycin zu erhöhen [58, 59].

In einer ersten Phase I-Studie behandelten Maloney et al. 34 Patienten mit fortgeschrittenen rezidivierten niedrigmalignen Lymphomen mit dem Antikörper Rituximab. Bei Verabreichung von Rituximab-Infusionen im wöchentlichen Abstand in einer Dosierung von 375 mg/m^2 zeigte sich eine Gesamtansprechrate von 50 Prozent mit 9 Prozent kompletten Remissionen (CR) und 41 Prozent partiellen Remissionen (PR) [60]. Laut den international anerkannten Beurteilungsrichtlinien des National Cancer Institute ist eine CR durch das vollständige Verschwinden aller Lymphommanifestationen über mindestens 28 Tage definiert. Die PR ist die Abnahme aller messbaren Lymphommanifestationen um mindestens 50 Prozent über einen Zeitraum von 28 Tagen [109].

In einer kontrollierten Phase III-Studie konnten Ansprechraten von 6 Prozent kompletten und 44 Prozent partiellen Remissionen bei der Behandlung von Patienten mit rezidivierten niedrigmalignen Lymphomen (FL) mit Rituximab erzielt werden. Die mittlere Remissionsdauer lag bei 12 Monaten [61]. In den nachfolgenden Studien konnten diese Ergebnisse untermauert werden. Auch hier wurden vier Zyklen Rituximab in einer Dosierung von jeweils 375 mg/m^2 im Abstand von sieben Tagen verabreicht [62-66, 86].

Hainsworth et al. stellten 2002 Daten für Rituximab in der Erstlinien- und Erhaltungstherapie vor. Sie behandelten insgesamt 62 Patienten mit niedrigmalignem Lymphom über einen Zeitraum von 14 Monaten. Alle Patienten bekamen Rituximab wöchentlich in einer Dosierung von 375 mg/m^2 über vier Wochen. Nach sechs Wochen erfolgte eine Zwischenauswertung. Die Ansprechrate lag dabei bei 47 Prozent. Patienten die ein objektives Ansprechen zeigten, bekamen eine Erhaltungstherapie mit Rituximab alle sechs Monate. Dabei konnten Gesamtansprechraten von 73 Prozent mit 37 Prozent CR erreicht werden [67].

Auch der Einsatz von INF α in Kombination mit Rituximab wurde in einer klinischen Phase II-Studie untersucht. Es wurden insgesamt 38 Patienten evaluiert. Dabei lag die Gesamtansprechrate bei 45 Prozent (17 von 38 Patienten), 11 Prozent hatten eine komplette und 34 Prozent eine partielle Remission [68].
Auch die Kombination von Rituximab mit konventioneller Chemotherapie (CHOP-Schema) wurde bei unbehandelten Patienten mit einem fortgeschrittenen hochmalignen NHL in klinischen Studien durchgeführt. Von 33 Patienten erreichten 20 Patienten eine CR, 11 eine PR und bei zwei Patienten schritt die Erkrankung unbeeinflusst fort [69]. Coiffier et al. untersuchten insgesamt 399 Patienten im Alter zwischen 60 und 80 Jahren mit diffus großzelligen B-Zell-Lymphomen (DLCL). Dabei verglichen sie eine Kombination von CHOP und Rituximab mit einer alleinigen CHOP-Chemotherapie. Sie fanden eine signifikant höhere CR bei den Patienten, die mit CHOP und Rituximab behandelt wurden (76 Prozent versus 63 Prozent, $P = 0{,}005$) [27]. In einer weiteren Studie von Czuczman et al. konnte bei Patienten mit niedrigmalignen NHL eine Gesamtansprechrate von 95 Prozent mit 55 Prozent kompletten und 40 Prozent partiellen Remissionen nachgewiesen werden [70].

Die Nebenwirkungen, die mit Rituximab in Verbindung gebracht werden, traten überwiegend während der ersten Infusion auf. Häufig wurden grippeähnliche Symptome wie Fieber, Schüttelfrost und Übelkeit beobachtet, aber auch Kopfschmerzen, Juckreiz und Bronchospasmus traten auf [60, 62]. Erfahrungsgemäß ließen sich diese Nebenwirkungen durch eine Reduktion der Infusionsgeschwindigkeit oder kurzfristiges Pausieren der Infusion bessern [60]. Leider wurden auch Fälle publiziert, wo es unter der Therapie mit Rituximab in der Dosierung mit 375 mg/m^2 zu einem akuten Tumor-Lyse-Syndrom mit lebensbedrohlichen Komplikationen kam [71, 72, 73, 75]. In zwei Fällen starben die Patienten infolge eines Multiorganversagens [72, 73].
Die Ursachen für das Auftreten von Nebenwirkungen sind bisher nicht vollständig geklärt. Winkler et al. untersuchten die Freisetzung von Zytokinen wie Interleukin 6 und Tumor Nekrose Faktor α (TNF α) unter einer Rituximab-Infusion. Sie postulierten, dass eine massive Freisetzung von Zytokinen im Sinne eines „cytokine release Syndroms“ während der Zerstörung CD20-positiverer Zellen verantwortlich für die heftigen Reaktionen bei Erstgabe von Rituximab sind [75]. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass es eine Assoziation zwischen der im Blut zirkulierenden Menge an Tumorzellen und der nach Erstinfusion auftretenden Nebenwirkungen gibt. Danach waren die Nebenwirkungen nach der ersten Infusion mit Rituximab umso stärker, je größer die Zahl der zirkulierenden Tumorzellen war [74]. Jensen et al. berichteten von einer 26-jährigen Frau, welche unter einer Rituximab-Infusion ein akutes

Tumor-Lyse-Syndrom mit lebensbedrohlichen Komplikationen entwickelte [71]. Dabei kam es zu einem massiven Anstieg der Lactatdehydrogenase, zu einem Abfall der Thrombozyten und zu einer Verlängerung der Prothrombinzeit. Sieben Stunden nach Rituximab-Infusion zeigte sich ein Abfall der Komplementfaktoren unter die Nachweisgrenze [71]. Jensen et al. machten eine Komplement-vermittelte Zelllyse für die lebensbedrohlichen Nebenwirkungen verantwortlich [71].

1.7 Das Komplementsystem

Das menschliche Komplementsystem ist ein Teil der humoralen Immunantwort und besitzt die Aufgabe, körperfremde, aber auch körpereigene Fremdstoffe unschädlich zu machen. Es besteht aus vielen verschiedenen hitzeempfindlichen Plasmaproteinen, welche die Komplementkaskade bilden [4]. Durch Bindung eines Antikörpers an einen bestimmten Komplementfaktor wird eine Kaskade von Reaktionen ausgelöst, von denen jede zur Aktivierung der nächsten Komplementkomponente führt [4]. Diese Aktivierung endet in einem Membranangriffskomplex (MAC), der aus mehreren Komplementfaktoren besteht und in der Lage ist, Zellen oder auch Bakterien direkt zu lysieren. Einige spezielle Komplementfaktoren können sich auch direkt an Bakterien oder Fremdstoffe binden und opsonieren sie so für Phagozyten, die Komplementrezeptoren tragen [4].

Das Komplementsystem kann auf zwei unterschiedlichen Wegen aktiviert werden, zum einen auf dem klassischen Weg, zum anderen auf dem alternativen Weg. Der klassische Weg setzt die Bildung humoraler Antikörper voraus, der alternative Weg nicht. Beide Wege münden zusammen in der Bildung einer C3-Konvertase. Diese spaltet die Komponente C3 in die kleine C3a-Untereinheit und in die große C3b-Einheit. C3a gehört zu den Anaphylatoxinen, welche durch Bindung an spezifische Rezeptoren eine Degranulierung von Mastzellen mit Histaminfreisetzung bewirken [77]. Die kurzlebige Komponente C3a wird im menschlichen Körper schnell durch die Carboxypeptidase N in das längerlebige C3a-desArg umgewandelt, welches durch Messung einen Anhalt für eine Komplementaktivierung gibt. Mehrere Studien konnten zeigen, dass die Komplementkomponente C3a wahrscheinlich in die Pathogenese verschiedener Erkrankungen involviert ist. So wurden erhöhte C3a-Konzentrationen bei Patienten mit akuter Pankreatitis, Sepsis und Multiorganversagen beobachtet [78, 79, 80].

Der C1-Komplex bildet den ersten Komplementfaktor bei der Aktivierung der Komplementkaskade im klassischen Weg. Es besteht aus den Komponenten C1q, einem 410 kilodalton schweren Glycoprotein und den beiden Serinproteasen C1r und C1s. Die Bindung von mindestens zwei C1q-Fragmenten an dem Fc-Rezeptor eines Antikörpers löst eine Aktivierung der Komplementkaskade aus [4].

Rituximab ist ein gentechnisch hergestellter, chimärer, monoklonaler Antikörper, welcher aus der variablen Region der schweren und leichten Kette eines Maus Anti-CD20 monoklonalen Antikörpers und der konstanten Region des humanen IgG 1/kappa besteht. Die murine Region bindet spezifisch an das CD20-Antigen, der menschliche macht den Fc-Teil aus. *In vitro*-Versuche haben gezeigt, dass Rituximab humanes Komplement bindet und Fc-Rezeptor-tragende Zellen aktivieren kann [56, 96]. Idusogie et al. fanden heraus, dass sich im Fc-Teil von Rituximab mehrere Regionen befinden, die menschliches C1q binden können [93, 101]. So wird vermutet, dass es nach Bindung von C1q an den Fc-Teil von Rituximab zur Aktivierung der Komplementkaskade und zur Zerstörung der Lymphomzellen kommt [101]. Offen bleibt dabei, ob Rituximab auch *in vivo* in der Lage ist, Komplement zu aktivieren und welche klinischen Auswirkungen damit verbunden sind.

1.8 Zielsetzung

Der genaue Wirkungsmechanismus von Rituximab, der zum Absterben lymphoproliferativer Zellen führt, konnte bisher nicht vollständig geklärt worden. Derzeit werden drei unterschiedliche Wirkungsmechanismen diskutiert: ein direkter zytotoxischer Effekt auf die Tumorzelle (Apoptose), eine Komplement-vermittelte Zytotoxizität (CDC) und eine Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität (ADCC) [42,46].

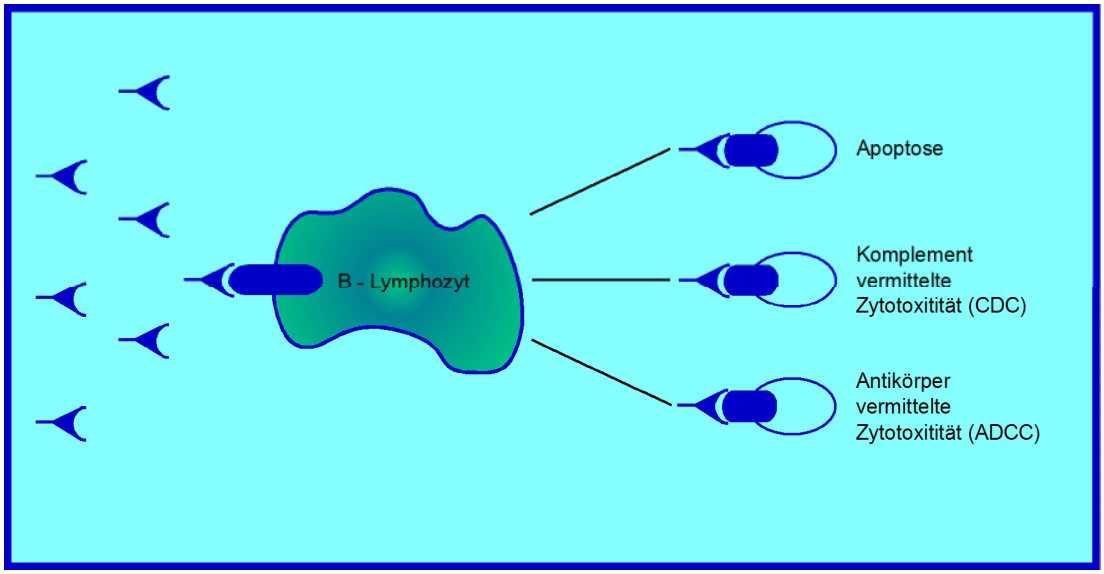

Abb. 2 Wirkungsweise von Rituximab

In der vorliegenden Arbeit wurden *in vitro* die Komplement-vermittelte zelluläre Zytotoxizität von Rituximab an verschiedenen humanen B-Zellinien, sowie die *in vivo*-Komplementaktivierung während einer Rituximab – Infusion untersucht. Es wurden folgende Fragen definiert:

1. Welchen Einfluss hat Rituximab auf das *in vitro*-Wachstumsverhalten maligner humaner B-Zellinien unterschiedlicher Entität?
2. Welche Rolle spielt das Komplement dabei?
3. Gibt es während einer Rituximab-Therapie Veränderungen in der Aktivität des Komplementsystems?
4. Welche Schlussfolgerungen können in Bezug auf die Therapie mit Rituximab gezogen werden?

2. Material und Methoden

2.1 Reagenzien

C3a-desArg-Elisa-Kit	Progen, Heidelberg
Dimethylsulfoxyd	Sigma, München
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid	Sigma, München
Essentielle Aminosäuren	Gibco BRL, Paisley, Schottland
Ethanol	Serva, Heidelberg
Fetales Kälberserum	Biochrom KG, Berlin
HCl-Isopropanol	Fluka, Deisenhofen
Komplement (Meerschweinchen)	Sigma, München
Komplement (Humanes)	Sigma, München
Natriumpyruvat	Gibco BRL, Paisley, Schottland
Penicillin-Streptomycin	Seromed, Berlin
Rituximab	Roche, Hoffmann, La Roche, Grenzlach-Whylen
RMPI 1640	Gibco BRL, Paisley, Schottland
Trypanblau	Merck, Darmstadt

2.2 Geräte

Sterilbank, HBB Lamin Air 2448	Heräus, Hanau
Zentrifuge	Heräus, Hanau
ELISA-Reader Titertek multiscan MCC/340	Labsystem, Frankfurt
Mikroskop	Zeiss, Jena
Zellkultur Brutschrank Cytoperm 2	Heräus, Hanau
Neubauer-Zählkammer	Victor Recker, Berlin
Vortex Genie 2	Scientific Industries, USA
Wasserbad	Köttermann, Uetze-Hänigsen
Einmalpipetten	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe, Pipetus-Standard	Hirschmann, Berlin
96-Lochplatten	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
Zellkulturflaschen	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
Zentrifugationsröhrchen	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Serum-Monovetten	Sarstedt, Nümbrecht

2.3 Patienten

Untersucht wurden Patienten aus dem Universitätsklinikum Charitè, Campus Virchow Klinikum, Abteilung für Hämatologie und Onkologie (Leiter: Prof. Dr. D. Huhn) und aus dem Klinikum Hansestadt Stralsund, Lehrkrankenhaus der Universität Greifswald, Abteilung für Hämatologie und Onkologie (Leiter: Prof. Dr. T. H. Ittel).

Das Kollektiv bestand aus zehn Patienten mit unterschiedlichen Non-Hodgkin-Lymphomen, die mit Rituximab behandelt wurden. Bei allen Patienten befand sich die Erkrankung in einem fortgeschrittenen Stadium.

Die Patienten aus dem Virchow-Klinikum bekamen Rituximab als Monotherapie, wobei die meisten Patienten vorher schon einmal mit Chemotherapie behandelt wurden. Die insgesamt acht Patienten aus dem Virchow-Klinikum erhielten die erste Rituximab-Gabe mit 375 mg/m^2 als Einzelgabe. Allen Patienten wurden vier Gaben in wöchentlichem Abstand verabreicht. Patienten mit einer chronischen lymphatischen Leukämie vom B-Zelltyp (B-CLL) erhielten zudem eine Erhaltungstherapie mit 100 mg Rituximab in zweiwöchigen Abständen.

Die beiden Patienten aus dem Klinikum Stralsund wurden innerhalb einer Studie der ostdeutschen Lymphomstudiengruppe mit einer Kombination aus Chemotherapie bestehend aus Mitoxantron, Cyclophosphamid, Prednison und Rituximab behandelt. Für beide Patienten war es die erste Therapie nach Diagnosestellung. Auch sie bekamen Rituximab in der Dosierung 375 mg/m^2, jedoch in vierwöchigem Abstand und in Kombination mit der Chemotherapie.

Allen Patienten wurde unmittelbar vor der Therapie und jeweils nach 1h, 2h, 4h, 6h, 9h und 24h Blut aus einer Armvene entnommen und sofort weiterverarbeitet.

Patient	Geschlecht	Alter in Jahren	Diagnose	Stadium	Erstdiagnose	Vortherapie
1	w	62	B-CLL	B	10/97	ja
2	m	56	B-CLL	C	5/95	ja
3	m	58	B-CLL	B	2/97	ja
4	m	50	B-CLL	C	8/95	ja
5	m	53	FL	IV A	3/99	ja
6	w	57	FL	III B	4/99	nein
7	w	55	FL	IV B	5/97	ja
8	m	72	FL	IV A	1/90	ja
9	m	69	FL	IV A	11/98	ja
10	m	71	MCL	IV B	12/97	ja

Tabelle 1: Patientenkollektiv. Die Diagnosestellung erfolgte nach den Kriterien der WHO Klassifikation [20]. Die Stadieneinteilung für die Patienten mit B-CLL erfolgte nach der Binet-Klassifikation. Für alle anderen Patienten wurde das Stadium nach der Ann Arbor-Klassifikation festgelegt.

2.4 Zellkultur

Für die *in vitro*-Versuche wurden sechs verschiedene Zellinien verwendet. Alle Zelllinien stammten aus der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH in Braunschweig.

Zellinie Raji: Diese Zellinie wurde 1963 aus einem Burkitt-Lymphom eines 11 Jahre alten afrikanischen Jungen isoliert.

Zellinie DOHH-2: Die Zellinie entspricht einem follikulären Lymphom (FL), isoliert 1990 bei einem 60 Jahre alten Mann.

Zellinie DAUDI: Diese Zellinie wurde 1967 bei einem 16-jährigen Jungen mit Burkitt-Lymphom isoliert.

Zellinie JVM-2: Isoliert aus dem Blut einer 67 Jahre alten Frau mit B-Prolymphoblastischer Leukämie (PLL).

Zellinie Bonna-12: Diese Zellinie stammt aus der Milz eines 46-jährigen Mannes mit Haarzell-Leukämie (HCL) und wurde im Jahre 1988 isoliert.

Zellinie Granta-519: Isoliert aus einem hochmalignen Lymphom einer 58-jährigen Frau (DLCL).

Alle Zellinien sind Suspensionszellinien, die entweder alleine oder in Clustern wachsen. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen kultiviert und wuchsen unter aseptischen Bedingungen bei 37° C und 5% CO_2 im Inkubator. Die Zellen wurden in expotentiellen Wachstum gehalten und alle zwei Tage auf eine Konzentration von 2 x 10^5 Zellen/ml umgesetzt. Kontrollen und Rituximab-enthaltende Versuchsansätze wurden in gleicher Zusammensetzung mit RMPI und zehn Prozent FCS, 2,5 Prozent Penicillin, 2,5 Prozent Streptomycin, zehn Prozent humanem Komplement, sowie 2 x 10^5 Zellen/ml zum selben Zeitpunkt angesetzt. Alle sechs Zellinien lagen in einer Konzentration von 2 x10^5 Zellen/ml vor und wurden mit 100 µl/ml humanem Komplement und dem monoklonalen Antikörper Rituximab jeweils in der Konzentration 100 ng/ml, 1 µg/ml und 10 µg/ml über einen Zeitraum von 72 Stunden inkubiert. Nach 24, 48 und 72 Stunden erfolgte jeweils die Bestimmung der Zellproliferation.

2.5. Zellzählung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte durch Anfärbung der Zellen mit 0,5-prozentigem Trypanblau. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, der als Anion sehr leicht an Proteine binden kann. Bei der Trypanblaufärbung werden lebende Zellen, deren Membran noch intakt ist nicht angefärbt, während tote Zellen durchgängig angefärbt werden. Die Auszählung erfolgte mit einer Neubauer-Zählkammer, welche aus vier großen Quadranten besteht. Jedes dieser Quadrate hat eine Fläche von $1mm^2$ und eine Tiefe von 0,1mm. Mit einem Lichtmikroskop erfolgte bei 40-facher Vergrößerung die Auszählung der vier Quadranten.

2.6 MTT-Proliferationsassay

Der MTT-Proliferationsassay wurde 1983 von Mosmann beschrieben [76]. Dabei wird die Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen von lebenden Zellen bestimmt. Dieser Prozess ist unabhängig davon, ob die Zellen momentan DNA synthetisieren oder nicht. Das Tetrazoliumbromid MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) dringt in die Zellen ein, dabei wird sein Ring durch mitochondriale Dehydrogenasen aufgebrochen und das MTT zu Formazan reduziert. Das alkohollösliche Formazan bildet einen dunkelblauen kristallinen Niederschlag.

Durch Zugabe von HCl-Isopropanol werden die Zellen aufgebrochen und das Formazan in Lösung gebracht. Durch Messung der Extinktion in einem Photometer können Rückschlüsse auf das Wachstumsverhalten der Zellen gezogen werden.

Die Messungen erfolgten in 96 Loch-Zellkulturplatten jeweils in Form von Quinduplikaten. Jedes Loch wurde mit 10 µl MTT-Lösung in einer Konzentration von 5 mg/ml befüllt. Anschließend wurden 90 µl Zellsuspension der entsprechenden Versuchsansätze zugesetzt. Alle Versuchsansätze wurden zum gleichen Zeitpunkt angesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und fünf Prozent CO_2 über einen Zeitraum von 72 Stunden. Messzeitpunkt war jeweils nach 24, 48 und nach 72 Stunden. Die Messung erfolgte spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 540 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm. Die gemessene Extinktion korreliert dabei mit der Anzahl vitaler Zellen.

2.7 Der Komplement C3a-desArg-ELISA

Dem Prinzip dieser Methode liegt der enzymgekoppelte Immunadsorptionstest (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) zu Grunde. Dieser zeichnet sich dadurch aus, dass ein Enzym chemisch mit einem Antikörper oder Antigen gekoppelt wird. Dabei wird die unmarkierte Komponente an einen festen Träger gebunden. Dies können zum Beispiel Vertiefungen in einer Mikrotiterplatte sein, welche Proteine in gewissem Maße adsorbiert. Bei den meisten heute durchgeführten ELISA's bindet man das Antigen an die Platte und testet die Anlagerung des markierten Antikörpers. Die Antikörperbindung wird dann mit Hilfe einer enzymatischen Reaktion, die ein farbloses Substrat in ein farbiges Produkt umwandelt, dargestellt. Schließlich wird die Extinktion mit einem Photometer (ELISA-READER) bestimmt [4].

Sowohl der klassische Weg als auch der alternative Weg der Komplementaktivierung münden zusammen in der Bildung einer C3-Konvertase. Diese spaltet die Komponente C3 in die kleine C3a-Untereinheit und in die große C3b-Einheit. C3a ist im Serum nur kurzlebig und wird rasch in das stabilere C3a-desArg überführt [83]. Lange Zeit stellte der selektive Nachweis des Komplementfaktors C3a bzw. C3a-desArg durch monoklonale Antikörper ein Problem da. Dies lag zum einen an der geringen Größe von C3a, zum anderen konnten andere Faktoren wie C5a oder C5 nicht sicher abgetrennt werden. Burger et al. stellten 1987 einen ELISA vor, der mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers H13 die Komplementfaktoren C3a und C3a-desArg selektiv nachweisen kann [81].

Um die Rituximab-induzierte Komplementaktivierung *in vivo* zu untersuchen, wurde bei zehn Patienten mit unterschiedlichen NHL der Verlauf der C3a-desArg-Konzentzration vor, während und nach einer Infusion mit Rituximab gemessen. Als Kontrollgruppe diente die Plasmakonzentration von C3a-desArg bei 21 gesunden Probanden.
Die Blutentnahmen erfolgten jeweils vor Rituximabgabe (0h), 1h, 2h, 4h, 9h und nach 24 Stunden. Die Blutproben wurden in einem Na-EDTA Röhrchen abgenommen und sofort nach der Entnahme bei 3000g und 2-8°C 15 min zentrifugiert und dann bei -20°C gelagert.

Für alle Versuche wurde der C3a-Enzymimmunoassay der Firma Progen Biotech (Deutschland), der mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern hochselektiv die Komplementkomponente C3a-desArg bestimmt, benutzt. In einem ersten Schritt erfolgte eine 1:100-Verdünnung des Patien-

tenplasmas. In einem zweiten Schritt erfolgte die Inkubation bei Raumtemperatur in speziellen Mikrotiterstreifen, welche mit einem monoklonalen Antikörper für C3a-desArg beschichtet waren. Nach dem Auswaschen des nicht gebundenen Nativ-C3 erfolgte der C3a-Nachweis mit einem weiteren monoklonalen Antikörper, der mit Peroxidase markiert war. Das überflüssige Peroxidase-Konjugat wurde in einem weiteren Waschschritt entfernt. Anschließend erfolgte die Substratinkubation mit 1, 3, 5-Trinitrobenzen. Nach 15 min wurde die ablaufende Peroxidase-reaktion durch 1 N Salzsäure beendet. Die in diesem Zeitraum umgesetzte Substratmenge ist proportional zur Menge an C3a-desArg und anhand der optischen Dichte quantifizierbar. Die Messung der optischen Dichte (OD) erfolgte in einem Mikrotiterplatten-Photometer bei 450 nm Messwellenlänge und 550 nm Referenzwellenlänge. Die OD-Werte für die C3a-desArg-Standards wurden in ein Auswertschema eingetragen. Über die gemessenen OD-Werte konnte der C3a-desArg Gehalt direkt aus der Eichkurve extrapoliert werden.

2.8 Statistik

Um zu überprüfen, ob die Ergebnisse einer wissenschaftlichen Untersuchung zufällig sind oder nicht, bieten sich unzählige statistische Testverfahren an. Um ein geeignetes Verfahren auszuwählen ist es nötig, die Fragestellung der Untersuchung, das Untersuchungsdesign (Anzahl der Stichproben), das Niveau der erhobenen Daten, die Stichprobengröße und die Annahme zur Verteilung zu beachten. Unter Berücksichtigung dieser Aspekte wurden die entsprechenden Verfahren für die vorliegenden Daten ausgewählt und angewandt. Diese werden nachfolgend kurz erläutert.

Um die aus den Untersuchungen gewonnenen Daten einer statistischen Auswertung zu unterziehen, wurden nonparametrische Verfahren genutzt. Diese werden auch als verteilungsfreie Testverfahren bezeichnet und setzen keine bestimmten Verteilungsmodelle in der Stichprobe (und der Grundgesamtheit) voraus. Dies ist in diesem Fall angezeigt, da nicht von einem bestimmten Verteilungsmodell ausgegangen werden kann. Des Weiteren handelt es sich um ausgesprochen kleine Stichproben, die einer besonderen, diesem Umstand angemessenen Auswertung bedürfen.

Die Untersuchung bestand zum einen aus einem Vergleich der C3a-desArg-Konzentration zwischen der Patientengruppe und einer Kontrollgruppe vor Gabe von Rituximab mit Hilfe des Fisher-Pitmans-Randomisierungstest für zwei unabhängige Stichproben.
Nachfolgend wurde der Patientengruppe Rituximab verabreicht und in Abständen von 0,5, 1, 2, 4, 6, 9 und 24 Stunden die C3a-desArg-Konzentration gemessen. Diese Messwerte sollten mit denen, die vor der Gabe von Rituximab erhoben wurden, verglichen werden. Dazu wurde Fishers Randomisierungstest für abhängige Stichproben genutzt.

Beide Testverfahren gehören zu den Randomisierungstests, die davon ausgehen, dass es sich bei der Stichprobe um ein Abbild der zugehörigen Populationen handelt. Sie werden aufgrund dessen auch als "bedingte" Tests bezeichnet [3]. Für jeden Test werden somit individuelle Prüfverteilungen und somit auch individuelle Prüfgrößen ermittelt, da einer Tabellierung von Prüfgrößen, wie sie bei parametrischen Verfahren üblich sind, nicht möglich ist.

Im ersten Teil der Untersuchung sollte gezeigt werden, ob zwischen der Kontroll- und der Patientengruppe ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der C3a-desArg-Konzentration zum Zeitpunkt 0 h (vor Verabreichung von Rituximab) besteht. Dazu wurde der Fisher-Pitmans-Randomisierungstest für zwei unabhängige Stichproben genutzt [3]. Mit diesem Test prüft man, ob beide Stichproben, deren Daten auf metrischem Niveau vorliegen, aus derselben Population stammen. Neben der Anwendbarkeit ohne Verteilungsbedingung und bei kleinen Stichproben hat dieses Testverfahren noch einen weiteren Vorteil: Es ist auch bei deutlich unterschiedlichen Stichprobengrößen wie in diesem Fall effizient.

Im weiteren Verlauf sollte untersucht werden, ob sich durch die Gabe von Rituximab in der Patientengruppe die C3a-desArg-Konzentration signifikant erhöht.
Dazu war es nötig, die C3a-desArg-Konzentration zum Zeitpunkt 0h mit der Konzentration zu jedem weiteren Messzeitpunkt zu vergleichen. Die Prüfung auf Signifikanz erfolgte mit Hilfe von Fishers Randomisierungstest für zwei abhängige Stichproben [3]. Dieses nonparametrische Testverfahren für metrische Daten bietet sich insbesondere für kleine Stichproben an. Ein Testverfahren für abhängige Stichproben wird immer dann angewandt, wenn Messwerte derselben Personen zu zwei verschiedenen Zeitpunkten bzw. unter zwei verschiedenen Bedingungen verglichen werden sollen. In diesem Fall handelt es sich um einen Vergleich der Konzentration *vor* und zu verschiedenen Zeitpunkten *nach* der Behandlung.

3. Ergebnisse

3.1 Einfluss von Rituximab auf das Wachstum humaner B-Zellinien

In den Abbildungen 1A-F wird der Einfluss von Rituximab auf das Wachstumsverhalten verschiedener humaner B-Zellinien dargestellt. Am deutlichsten zeigt sich der Einfluss bei der Zellinie DOHH-2. Die drei Kurven zeigen die Inhibition der Proliferation durch drei Rituximab-Konzentrationen 100 ng/ml, 1 µg/ml und 10 µg/ml über einen Zeitraum von 72 Stunden. Der wachstumshemmende Effekt betrug nach 24 Stunden in den Antikörperkonzentrationen 1 µg/ml und 10 µg/ml maximal 50 Prozent. Nach 72 Stunden stieg dieser Effekt auf maximal 80 Prozent an. In der Antikörperkonzentration 100 ng/ml wurde am ersten Tag eine 25-prozentige Wachstumshemmung beobachtet. Die maximale Wachstumshemmung von 80 Prozent wurde am dritten Tag der Inkubation erreicht.

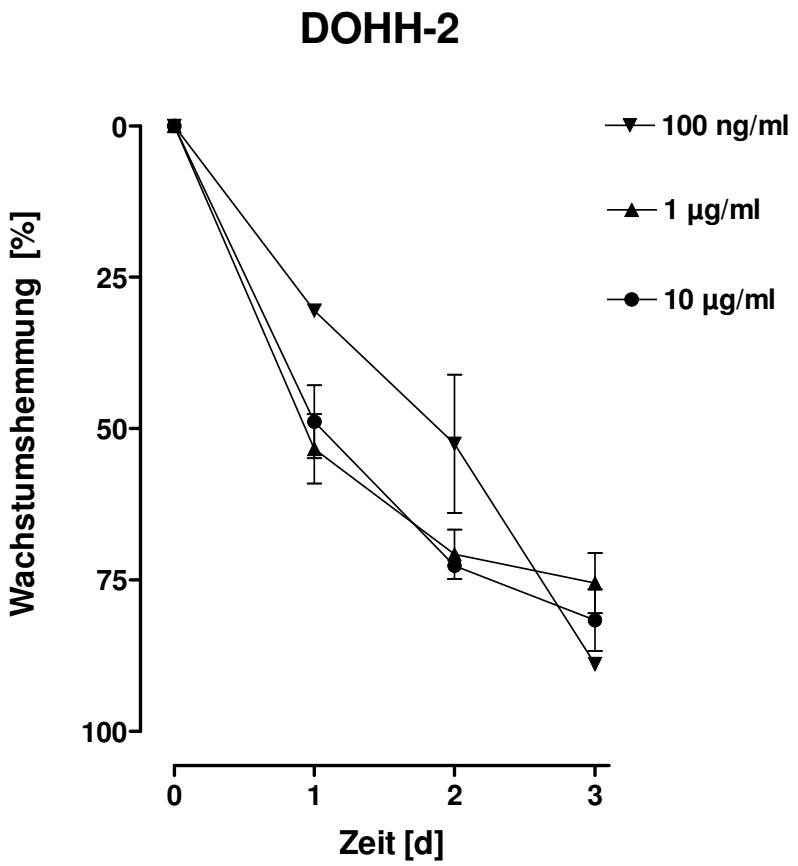

Abbildung 1A: **Einfluss von Rituximab auf das Wachstumsverhalten humaner B-Zellinien.** DOHH-2-Zellen in einer Konzentration von 2 x 10^5 Zellen/ml wurden mit unterschiedlichen Rituximabkonzentrationen, (100 ng/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml) bei 37°C über einen Zeitraum von 72 Stunden inkubiert. Die Zellproliferation wurde mittels MTT-Assay bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten.

In der Abbildung 1B wird das Wachstumsverhalten der Zellinie DAUDI beschrieben. Anhand der einzelnen Kurven wird der Verlauf der Wachstumshemmung durch den Antikörper über drei Tage bei drei verschiedenen Konzentrationen beschrieben. Auch hier lässt sich ein deutlicher Einfluss von Rituximab auf das Wachstum der Zellen feststellen. Zwischen den drei Antikörperkonzentrationen konnten dabei Unterschiede in Bezug auf die Wachstumshemmung beobachtet werden. In den Antikörperkonzentrationen 1 µg/ml und 10 µg/ml betrug der wachstumshemmende Effekt durch Rituximab nach 48 Stunden 25-30 Prozent. In der Antikörperkonzentration 100 ng/ml wurde zu keinem Zeitpunkt ein Effekt durch den Antikörper beobachtet.

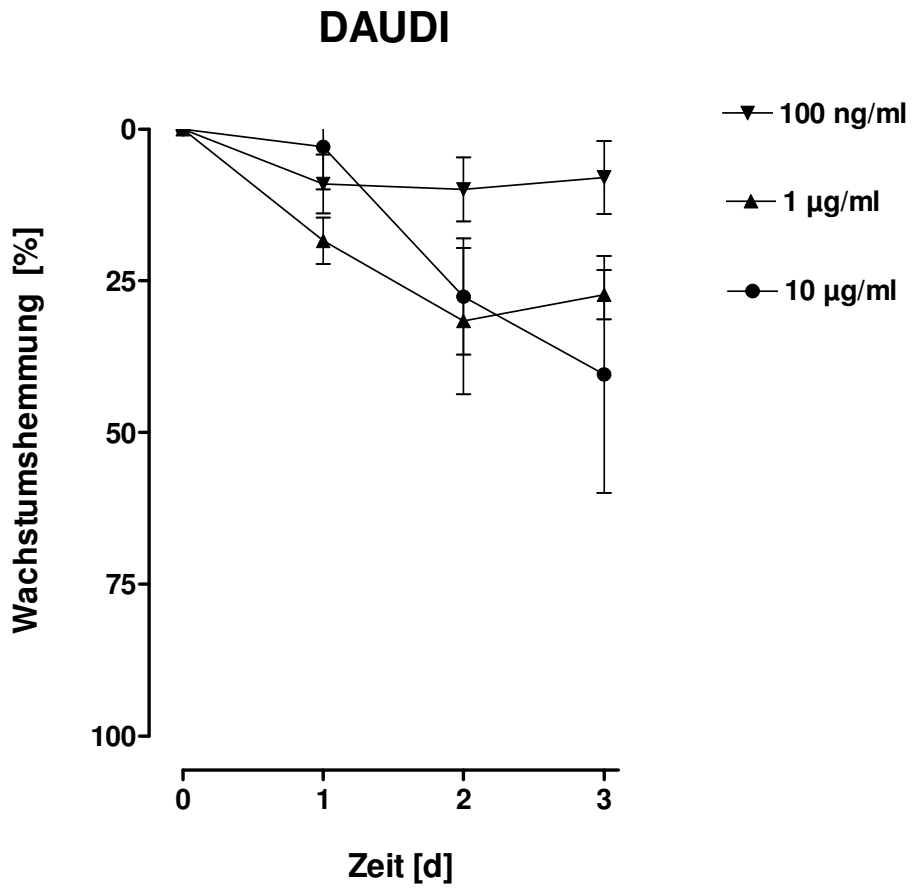

Abbildung 1B: Einfluss von Rituximab auf das Wachstumsverhalten humaner B-Zellinien. DAUDI-Zellen in einer Konzentration von 2 x 10^5 Zellen/ml wurden mit unterschiedlichen Rituximabkonzentrationen, (100 ng/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml) bei 37°C, über einen Zeitraum von 72 Stunden inkubiert. Die Zellproliferation wurde mittels MTT-Assay bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten.

Die Abbildung 1C zeigt die Inhibition der Proliferation in Gegenwart der drei Rituximab-Konzentrationen 100 ng/ml, 1 µg/ml und 10 µ/ml bei der Zellinie Granta-519. Wie in der Abbildung zu erkennen ist, konnte kein Effekt durch den Antikörper beobachtet werden. Unterschiede zwischen den verschiedenen Antikörperkonzentrationen gab es nicht.

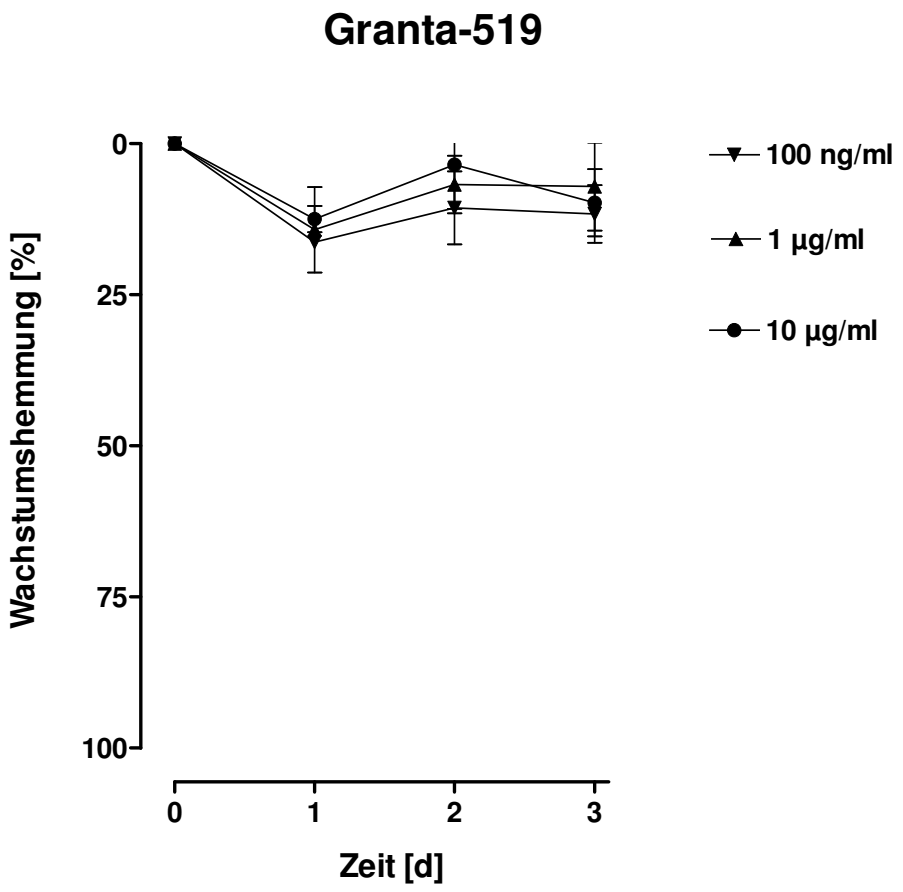

Abbildung 1C: Einfluss von Rituximab auf das Wachstumsverhalten humaner B-Zellinien. Granta-519-Zellen in einer Konzentration von 2 x 10^5 Zellen/ml wurden mit unterschiedlichen Rituximabkonzentrationen, (100 ng/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml) bei 37°C über einen Zeitraum von 72 Stunden inkubiert. Die Zellproliferation wurde mittels MTT-Assay bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten.

Abbildung 1D zeigt das Wachstumsverhalten der Zellinie Raji unter drei verschiedenen Antikörperkonzentrationen von Rituximab über einen Zeitraum von 72 Stunden. Wie bereits bei der Zellinie Granta-519 zu beobachten war, konnte auch bei Raji bei keiner der drei Antikörperkonzentrationen ein Effekt nachgewiesen werden.

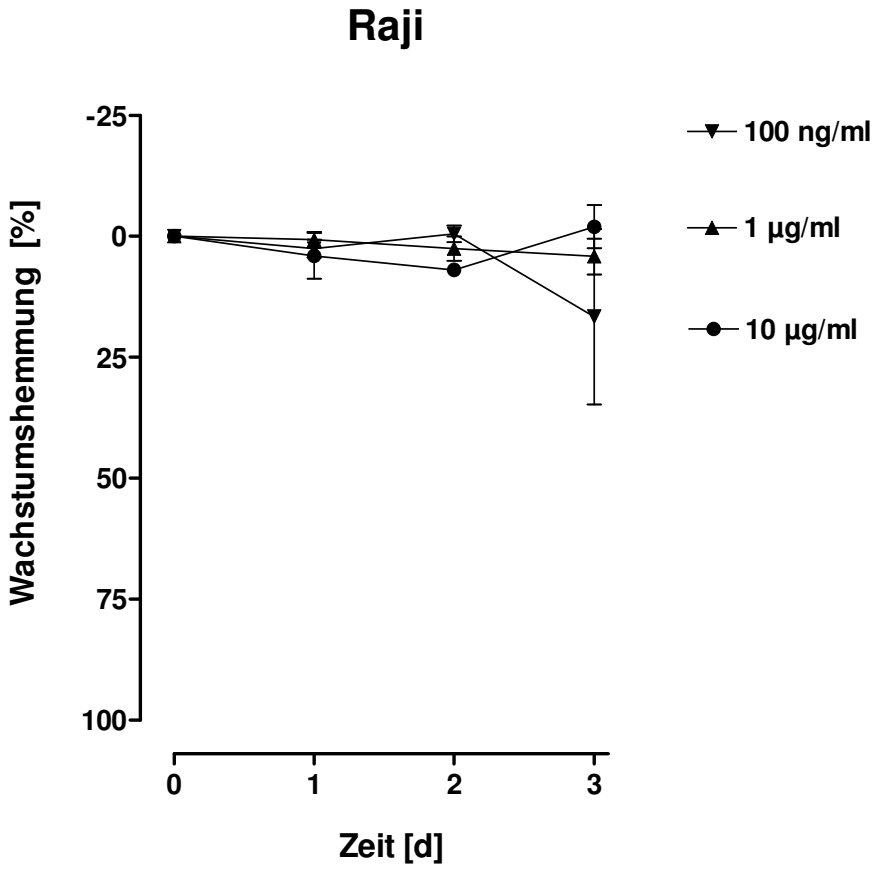

Abbildung 1D: Einfluss von Rituximab auf das Wachstumsverhalten humaner B-Zellinien. Raji-Zellen in einer Konzentration von 2 x 10^5 Zellen/ml wurden mit unterschiedlichen Rituximabkonzentrationen, (100 ng/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml) bei 37°C über einen Zeitraum von 72 Stunden inkubiert. Die Zellproliferation wurde mittels MTT-Assay bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten.

Abbildung 1E zeigt den Einfluss von Rituximab auf das Wachstumsverhalten der Zellinie Bonna-12. Wiederum wurde der Antikörper in drei verschiedenen Konzentrationen über einen Zeitraum von 72 Stunden mit Bonna-12-Zellen inkubiert. Es konnte kein Effekt durch den Antikörper beobachtet werden. Unterschiede zwischen den verschiedenen Antikörperkonzentrationen gab es nicht.

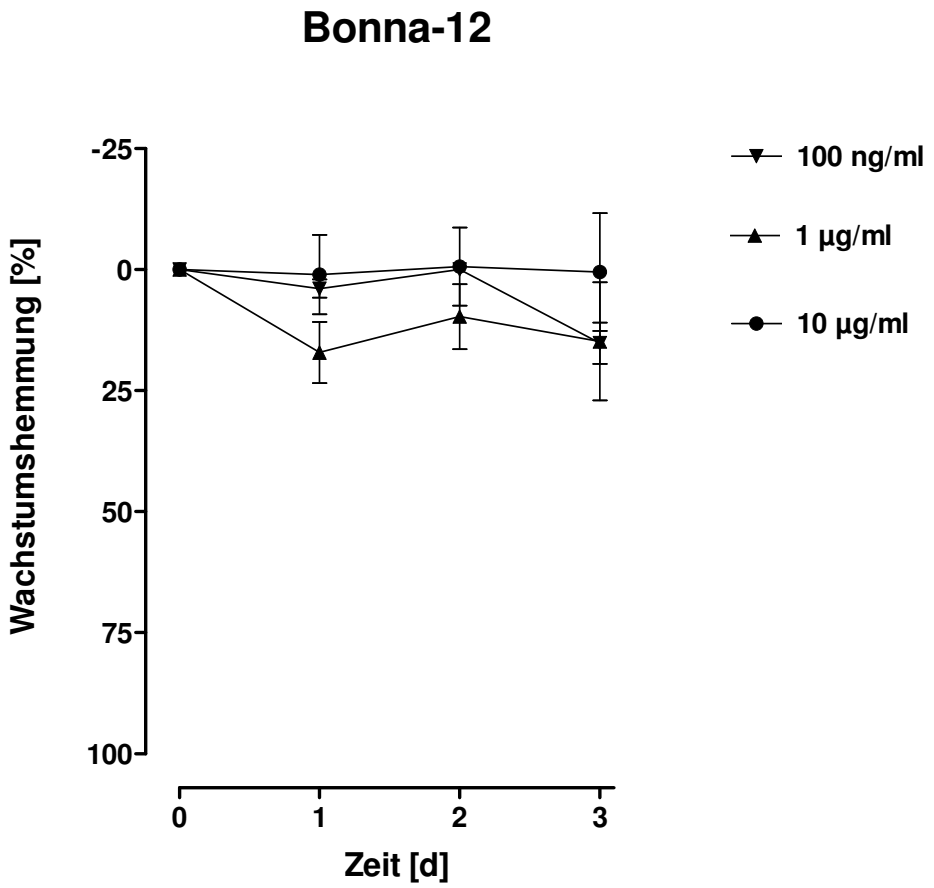

Abbildung 1E: Einfluss von Rituximab auf das Wachstumsverhalten humaner B-Zellinien. Bonna-12-Zellen in einer Konzentration von 2 x 10^5 Zellen/ml wurden mit unterschiedlichen Rituximabkonzentrationen, (100 ng/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml) bei 37°C über einen Zeitraum von 72 Stunden inkubiert. Die Zellproliferation wurde mittels MTT-Assay bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten.

Abbildung 1F zeigt den Einfluss des Antikörpers auf das Wachstumsverhalten der Zellinie JVM-2 an drei aufeinanderfolgenden Tagen. Auch hier konnte in den verschiedenen Antikörperkonzentrationen kein Einfluss auf das Wachstum der Zellen beobachtet werden.

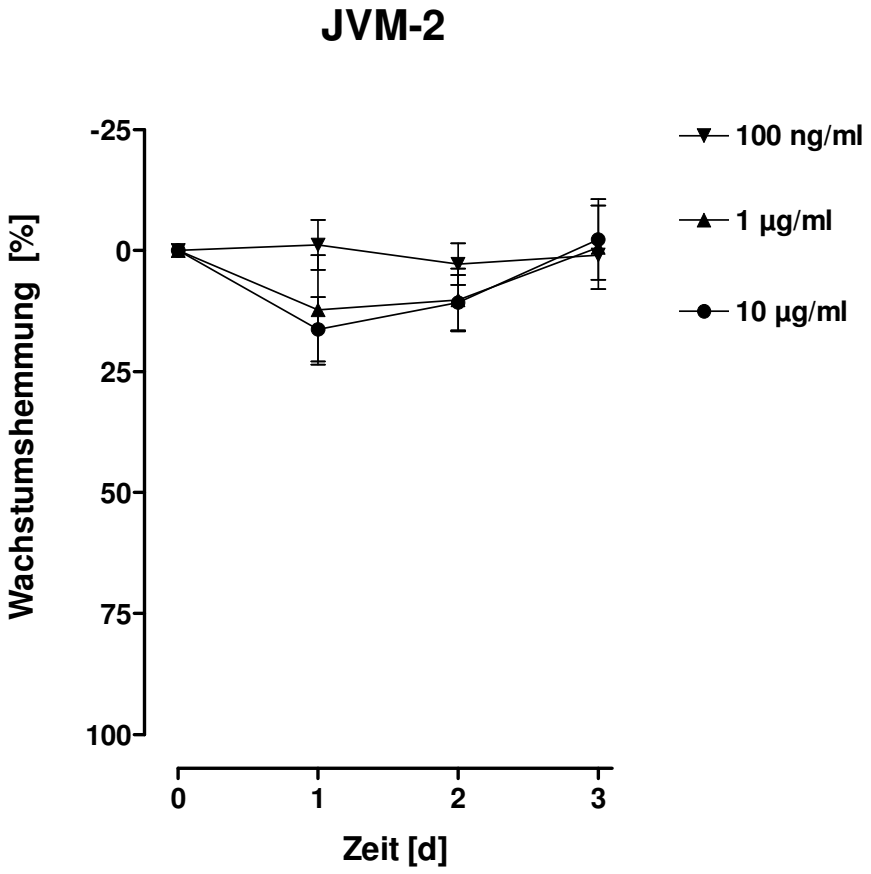

Abbildung 1F: Einfluss von Rituximab auf das Wachstumsverhalten humaner B-Zellinien. JVM-2-Zellen in einer Konzentration von 2 x 10^5 Zellen/ml wurden mit unterschiedlichen Rituximabkonzentrationen, (100 ng/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml) bei 37°C über einen Zeitraum von 72 Stunden inkubiert. Die Zellproliferation wurde mittels MTT-Assay bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten.

Zwischen den sechs verschiedenen humanen B-Zellinien gab es Unterschiede in Bezug auf das Wachstumsverhalten unter Rituximab: Bei den Zellinien DOHH-2 und DAUDI konnte eine deutliche Wachstumshemmung beobachtet werden. Dabei betrug der antiproliferative Effekt von 1 µg/ml Rituximab auf die Zellinie DOHH-2 nach 72 Stunden 75 Prozent. Bei der Zellinie DAUDI konnte in der Antikörperkonzentration 1 µg/ml nach 72 Stunden eine Wachstumshemmung von 30 Prozent beobachtet werden. Die anderen vier Zellinien zeigten keine Reaktion im Wachstumsverhalten. Für alle weiteren Versuche wurden zwei Zellinien mit deutlicher Wachstumshemmung unter Antikörpereinfluss und zwei Zellinien ohne Reaktion auf den Antikörper ausgewählt. Der Übersicht halber wird in Abbildung 2 nochmals der Vergleich zwischen den vier Zellinien in bezug auf das Wachstumsverhalten unter Rituximab 1 µg/ml dargestellt.

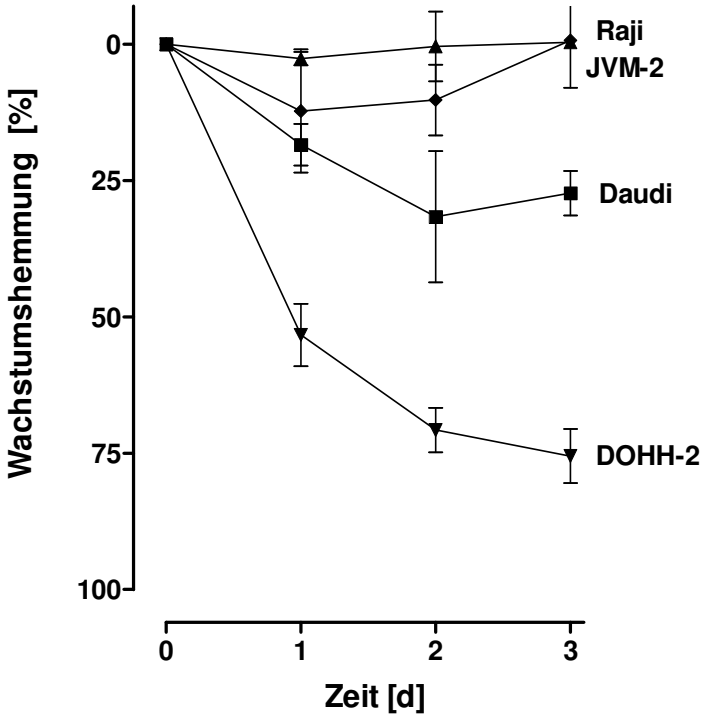

Abbildung 2: Einfluss von Rituximab auf das Wachstumsverhalten humaner B-Zellinien.

Vier verschiedene humane B-Zellinien in einer Konzentration von 2 x 10^5 Zellen/ml wurden mit einer Antikörperkonzentration von 1 µg/ml inkubiert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C über einen Zeitraum von 72 Stunden. Die Zellproliferation wurde mittels MTT-Assay bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten.

3.2 Komplementassoziierte Wachstumsinhibition von Rituximab

Abbildung 3 zeigt das Wachstumsverhalten der Zellinie DOHH-2 unter Zugabe von 1 µg/ml Rituximab und 100 µl/ml humanem Komplement. Dabei wird deutlich, dass der alleinige Antikörpereffekt durch die Zugabe von humanem Komplement verstärkt wird. Am ersten Tag der Inkubation konnte ohne humanes Komplement kein Effekt beobachtet werden. Nach Zugabe von humanem Komplement betrug die Hemmung des Zellwachstums 30 Prozent.
Nach drei Tagen Inkubation betrug der wachstumshemmende Einfluss von Rituximab ohne Komplement 30 Prozent. Die Hemmung des Zellwachstums in Anwesenheit von humanem Komplement lag bei 56 Prozent.

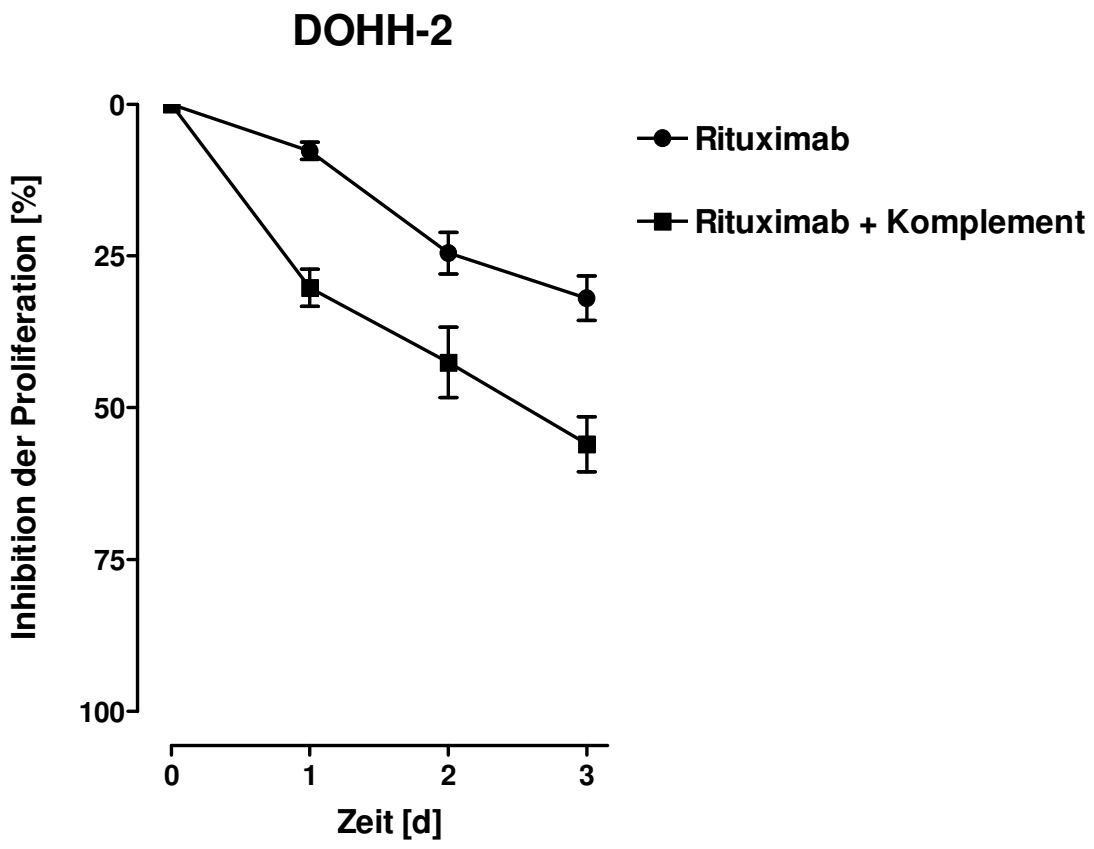

Abbildung 3: Komplement-vermittelte Wachstumshemmung durch Rituximab. DOHH-2-Zellen in einer Konzentration von 2 x 10^5 Zellen/ml wurden mit 1 µg/ml Rituximab und 100 µl/ml hitzeinaktiviertem (•) oder intaktem humanem Komplement (o) über einen Zeitraum von 72 Stunden inkubiert. Die Zellproliferation wurde mittels MTT-Assay bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von unabhängigen Experimenten.

Abbildung 4 zeigt das Wachstumsverhalten der Zellinie DAUDI unter Zugabe von 1 µg/ml Rituximab und 100 µl/ml humanem Komplement. Auch hier konnte ein deutlicher Anstieg der Wachstumshemmung durch humanes Komplement gezeigt werden. Ohne humanes Komplement konnte an keinem der drei Tage ein Effekt durch den Antikörper beobachtet werden. Nach Zugabe von humanem Komplement betrug die Hemmung des Zellwachstums schon am ersten Tag 53 Prozent, stieg am zweiten Tag auf 65 Prozent an und betrug nach drei Tagen Inkubation 56 Prozent.

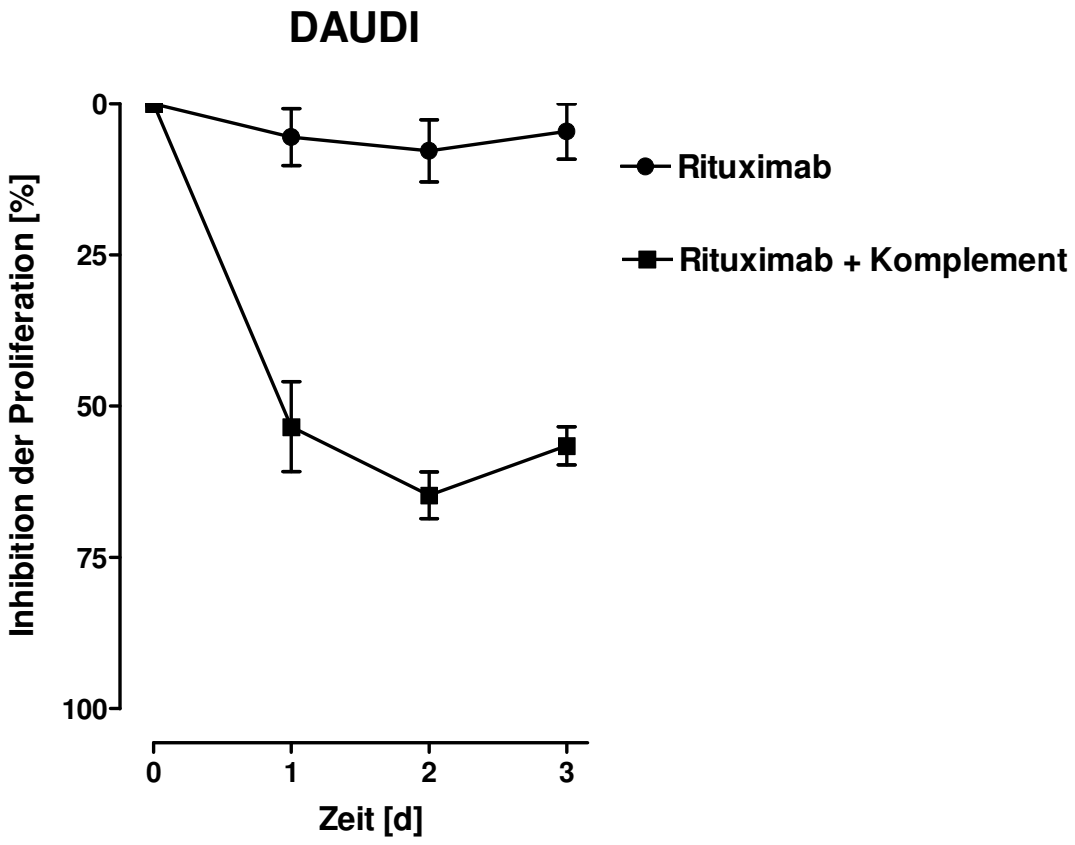

Abbildung 4: Komplement-vermittelte Wachstumshemmung durch Rituximab. DAUDI-Zellen in einer Konzentration von 2 x 10^5 Zellen/ml wurden mit 1 µg/ml Rituximab und 100 µl/ml hitzeinaktiviertem (•) oder intaktem humanem Komplement (o) über einen Zeitraum von 72 Stunden inkubiert. Die Zellproliferation wurde mittels MTT-Assay bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von unabhängigen Experimenten.

Abbildung 5 zeigt das Wachstumsverhalten der Zellinie JVM-2 unter Zugabe von 1 µg/ml Rituximab und 100 µl/ml humanem Komplement. Nach 72 Stunden Inkubation konnte weder mit, noch ohne Zugabe von humanem Komplement ein Effekt auf das Wachstum der Zellen beobachtet werden.

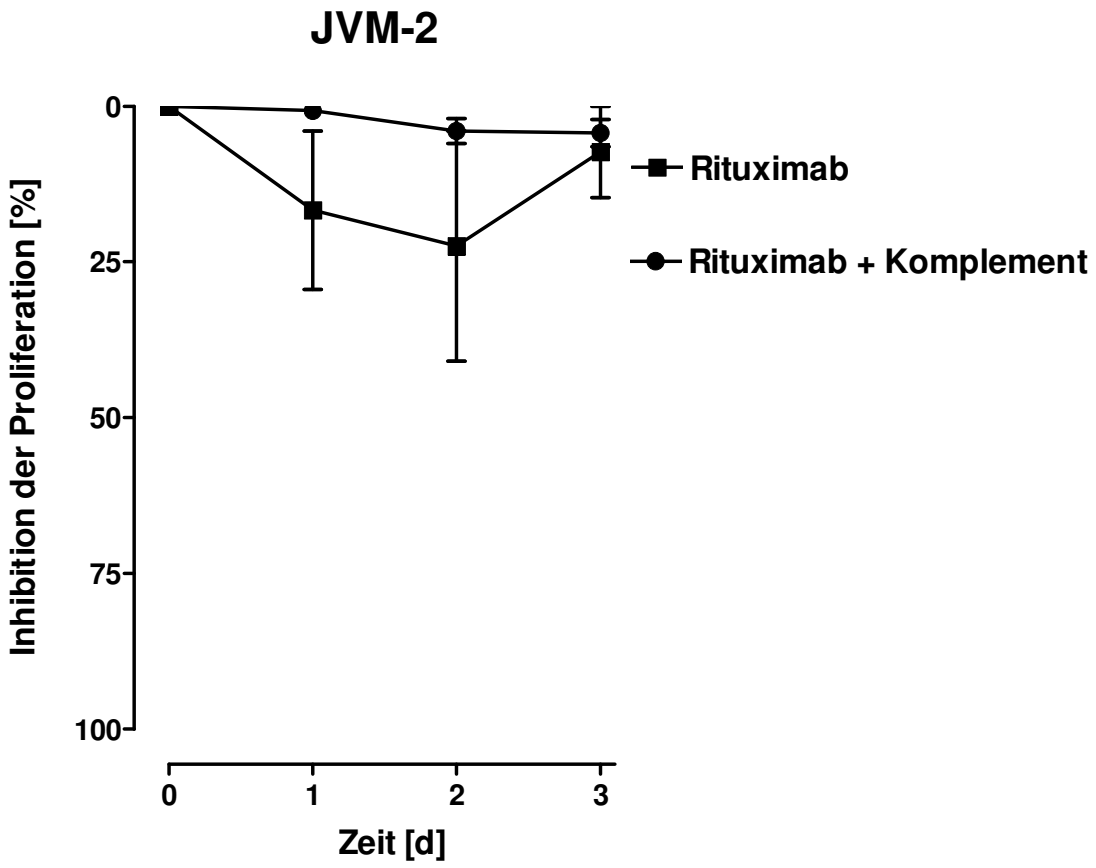

Abbildung 5: Komplement-vermittelte Wachstumshemmung durch Rituximab. JVM-2-Zellen in einer Konzentration von 2 x 10^5 Zellen/ml wurden mit 1 µg/ml Rituximab und 100 µl/ml hitzeinaktiviertem (•) oder intaktem humanem Komplement (o) über einen Zeitraum von 72 Stunden inkubiert. Die Zellproliferation wurde mittels MTT-Assay bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von unabhängigen Experimenten.

Abbildung 6 zeigt das Wachstumsverhalten der Zellinie RAJI unter Zugabe von 1 µg/ml Rituximab und 100 µl/ml humanem Komplement. Wie auch bei der Zellinie JVM-2 erkennbar war, konnte weder durch den Antikörper alleine, noch durch Zugabe von humanem Komplement eine Wachstumshemmung erreicht werden.

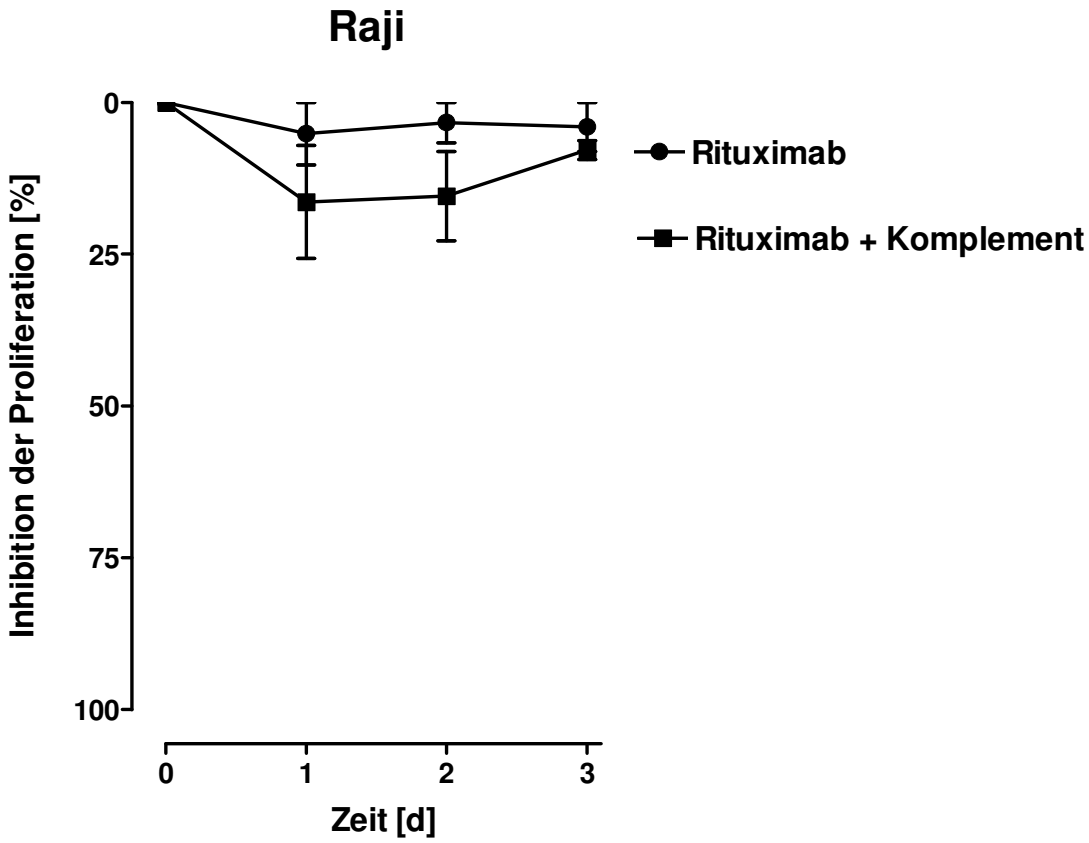

Abbildung 6: Komplement-vermittelte Wachstumshemmung durch Rituximab. Raji-Zellen in einer Konzentration von 2 x 10^5 Zellen/ml wurden mit 1 µg/ml Rituximab und 100 µl/ml hitzeinaktiviertem (•) oder intaktem humanem Komplement (o) über einen Zeitraum von 72 Stunden inkubiert. Die Zellproliferation wurde mittels MTT-Assay bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von unabhängigen Experimenten.

3.3 Rituximab-induzierte Komplementaktivierung *in vivo*

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Wirkung des monoklonalen Antikörpers Rituximab und dem menschlichen Komplementsystem herzustellen, wurde bei zehn Patienten mit unterschiedlichen Non-Hodgkin-Lymphomen der Verlauf der C3a-desArg-Konzentration vor, während und nach einer Infusion mit Rituximab gemessen.

Die Kontrollgruppe definierte sich dabei wie folgt:

Sie war sehr heterogen, da das Alter von 27-52 Jahren variierte, sie acht männliche und dreizehn weibliche Probanden umfasste und die C3a-desArg Konzentration im Median zwischen 50-142 ng/ml lag. Infektionen, chronische Erkrankungen oder Allergien bestanden anamnestisch bei den Probanden nicht. In der Literatur konnten keine Hinweise für einen Zusammenhang zwischen Alter, Geschlecht und der Höhe der C3a-desArg Konzentration in Gesunden gefunden werden. Im Median wurde eine C3a-desArg Konzentration von 77 ng/ml für die Kontrollgruppe ermittelt. In der Literatur wurden vergleichende Konzentrationen für C3a-desArg bei gesunden Probanden ermittelt [83]. Tabelle 1 und 2 geben einen Überblick über das Patientenkollektiv und die Kontrollgruppe. Tabelle 3 zeigt den Vergleich der C3a-desArg-Konzentration von Kontroll- und Patientengruppe vor einer Rituximab-Infusion.

Tab.1: Kontrollgruppe

	Kontrollgruppe
Anzahl, n	21
Alter, Median (Range)	42 (27-52)
männlich / weiblich	8/13
C3a-desArg-Level; Median (Range)	77 (50-142)

Tab. 2: Patientengruppe

	FL	B-CLL	MCL	Total
Patienten	5	4	1	10
Alter, Median (Range)	63 (53-72)	57 (50-62)	71	57,5 (50-72)
männlich / weiblich	3/2	3/1	1/0	7/3

Tab. 3: Vergleich der C3a-desArg-Konzentration vor Rituximabgabe mit der Kontrollgruppe

	C3a-desArg-Konzentration Median (Range), [ng/ml]	*P**
Normalkollektiv, n = 21	77 (50-142)	
NHL-Patienten, n = 10	148,5 (96-726)	0,05

Die Abbildung 8 zeigt den Verlauf der Komplementaktivierung bei vier Patienten mit einer B-CLL unter Therapie mit Rituximab. Bei drei dieser Patienten konnte ein kontinuierlicher Anstieg der C3a-desArg-Konzentration im Plasma beobachtet werden. Dabei lag die maximale Konzentration bei den Patienten 1 und 3 bei 630 ng/ml und wurde sechs Stunden nach Infusionsbeginn gemessen. Bei Patient 4 betrug die C3a-desArg-Konzentration vor der Rituximab-Infusion 141 ng/ml und stieg innerhalb von vier Stunden nach Beginn der Infusion auf einen Wert von 800 ng/ml an. Bei Patient 2 konnte keine Komplementaktivierung festgestellt werden, die C3a-desArg-Konzentration schwankte um den Bereich der Kontrollgruppe.

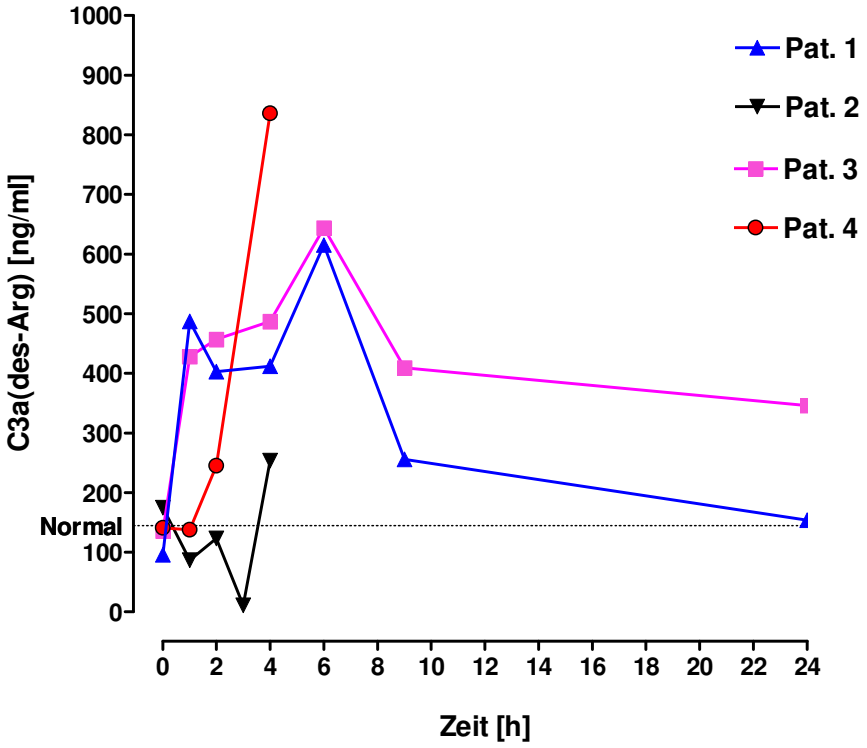

Abbildung 8: *In vivo*- Komplementaktivierung durch Rituximab bei Patienten mit B-CLL. Beginn der Rituximab-Infusion zur Zeit = 0h. Die Messungen bei den Patienten 2 und 4 erfolgte zum Zeitpunkt 0h, 1h, 2h, 4h, bei Pat. 1 und 3 auch bei 6h, 9h, und 24h. Dargestellt ist der C3a-desArg Plasmakonzentrationsverlauf über 24h.

Bei den Patienten 5-9 handelte es sich um Patienten mit einem follikulären Lymphom II°-III°. Insgesamt konnten unterschiedliche C3a-desArg-Konzentrationen vor, während und nach einer Rituximab-Infusion beobachtet werden. Dabei entsprachen bei den Patienten 5 und 6 alle gemessenen C3a-desArg-Konzentrationen sowohl vor, während als auch danach, denen der Kontrollgruppe. Bei Patient 7 lag die Konzentration vor der Rituximab-Infusion bei 331 ng/ml und damit über der des Normalkollektivs. Während der Infusion stieg die C3a-desArg-Konzentration auf 3390 ng/ml an und fiel danach kontinuierlich wieder ab. Bei Patient 8 stieg die maximale Konzentration nach vier Stunden auf 303 ng/ml. Allerdings lag schon die initiale Konzentration mit 286 ng/ml außerhalb des Normalbereichs, so dass eine Komplement-aktivierung eher unwahrscheinlich erscheint. Auch bei dem Patient 9 lag die initiale C3a-desArg-Konzentration mit 726 ng/ml außerhalb des Normalbereichs und stieg im Verlauf von 24 Stunden nur noch auf einen maximalen Wert von 800 ng/ml an.

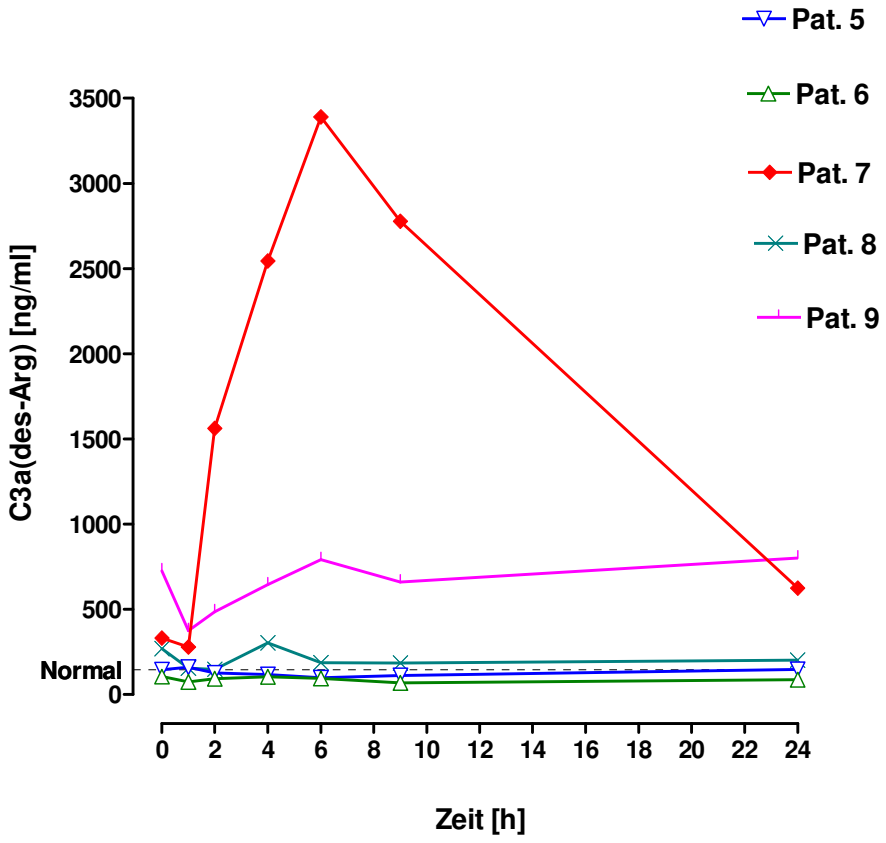

Abbildung 9: In vivo- Komplementaktivierung durch Rituximab bei Patienten mit einem follikulären Lymphom Grad II°-III°. Beginn der Rituximab-Infusion zur Zeit = 0h. Die Messungen erfolgten zum Zeitpunkt 0h, 1h, 2h, 4h, 6h, 9h und 24h. Dargestellt ist der C3a-desArg Plasmakonzentrationsverlauf über 24h.

Bei dem in der Abbildung 10 dargestellten Patienten mit einem Mantelzell-Lymphom lag die im Plasma gemessene C3a-desArg-Konzentration vor der Rituximab-Infusion mit 152 ng/ml im Bereich des Normalkollektivs. Nach Beginn der Rituximab-Infusion konnte ein deutlicher Anstieg der C3a-desArg-Konzentration bis auf einen maximalen Wert von 2518 ng/ml vier Stunden nach Beginn der Infusion beobachtet werden. Auch nach 24 Stunden lag die gemessene Konzentration an C3a-desArg mit 1073 ng/ml weit außerhalb des Bereichs der Kontrollgruppe.

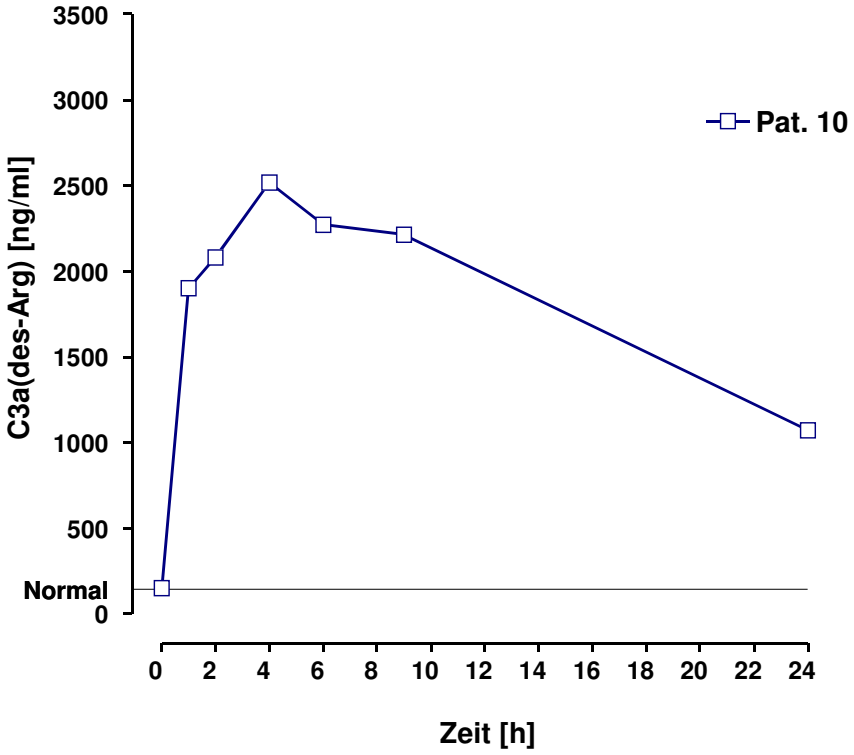

Abbildung 10: *In vivo-* Komplementaktivierung durch Rituximab bei einem Patienten mit einem Mantelzellymphom. Beginn der Rituximab-Infusion erfolgte zur Zeit = 0h. Die Messungen erfolgten zum Zeitpunkt 0h, 1h, 2h, 4h, 6h, 9h und 24h. Dargestellt ist der mittlere C3a-desArg Plasmakonzentrationsverlauf über 24h.

4. Diskussion

4.1 Rituximab – Effekt auf das Wachstumsverhalten humaner B-Zellinien

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der monoklonale Antikörper Rituximab unterschiedliche Auswirkungen auf das Wachstum humaner B-Zellinien hat. Insgesamt wurden sechs verschiedene humane B-Zellinien untersucht. Alle Zelllinien sind für das CD20-Oberflächenantigen positiv und entsprechen einer bestimmten Lymphomentität.

Eine besonders starke Inhibition der Proliferation konnte bei der Zellinie DOHH-2 beobachtet werden. Diese Zellinie wurde 1990 aus dem follikulären Lymphom (FL) eines 60-jährigen Mannes isoliert. In der Antikörperkonzentration 1 µg/ml betrug der wachstumshemmende Einfluss nach drei Tagen Inkubation 80 Prozent.
In vitro-Versuche mit humanen B-NHL-Zellinien wurden auch von anderen Arbeitsgruppen durchgeführt: Die Arbeitsgruppe um Schmidt-Wolf untersuchte unter anderem die Lymphomzellinie SU-DHL-4 (FL). Dabei betrug die Wachstumsinhibition der Zellinie durch 1 µg/ml Rituximab 82 Prozent ± 25 Prozent [85].
Bei den Lymphomzellinien DAUDI und Raji ließ sich ein unterschiedlicher Effekt von Rituximab auf das Wachstum der Zellen beobachten. Beide Zellinien stammen ursprünglich von Patienten mit einem Burkitt-Lymphom ab, welches zu den hochmalignen NHL gerechnet wird. Durch Zugabe von 1µg/ml Rituximab konnte bei der Zellinie DAUDI eine 25-30-prozentige Wachstumsinhibition nach zwei Tagen Inkubation beobachtet werden. Bei der Zellinie Raji konnte nach drei Tagen Inkubation mit derselben Konzentration des Antikörpers kein Effekt ausgelöst werden. Die Arbeitsgruppe um Shan führte ebenfalls Versuche mit drei verschiedenen Burkitt-Zellinien (Ramos, DAUDI, Raji) durch. Dabei konnte durch die monoklonalen CD20-Antikörper 1F5 und B1 eine Proliferationsinhibition von 53 Prozent an den neoplastischen B-Zellinien nachgewiesen werden [52]. Zuvor hatten auch Maloney, Smith und Appelbaum einen antiproliferativen Effekt mit verschiedenen monoklonalen CD20-Antikörpern und verschiedenen humanen B-Zellinien (Ramos, Raji, DHL-4, FL-18) beschrieben [57].
Die Arbeitsgruppe um Schmidt-Wolf konnte bei der Lymphomzellinie DAUDI eine Wachstumsinhibition durch Rituximab von 25 Prozent beobachten, was den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit entspricht. Der Einfluss von Rituximab auf das Wachstumsverhalten der Zellinie Raji lag bei 26 Prozent [85]. Dies konnte in den Ergebnissen dieser Arbeit nicht gezeigt werden.

Bei den Zellinien Granta-519 (Mantelzell-Lymphom = MCL) und Raji (Burkitt-Lymphom), konnte kein Effekt durch den monoklonalen Antikörper beobachtet werden.
Ähnliche Ergebnisse konnte eine japanische Arbeitsgruppe zeigen, welche den Antikörper Rituximab ebenfalls an verschiedenen Lymphomzellinien untersuchte: An zwei Zellinien (FL) konnte eine starke Wachstumsinhibition beobachtet werden, an zwei anderen Zellinien (MCL und DLCL) konnte nur eine geringe Inhibition der Proliferation beschrieben werden [87]. Bei den beiden Zellinien Bonna-12 (Haarzell-Leukämie) und JVM-2 (Prolymphoblastische Leukämie = PLL) konnte ebenfalls kein spezifischer Effekt von Rituximab nachgewiesen werden. Flieger et al. beschrieben vergleichbare Untersuchungen mit der Zellinie JVM-13 (PLL). Auch hier konnte in Bezug auf die Wachstumsinhibition durch Rituximab kein direkter zytotoxischer Effekt gezeigt werden [85].
Die Arbeitsgruppe um Emil Montserat untersuchte den Einfluss von Rituximab auf Haarzell-Leukämiezellen *in vitro*. Dabei konnte kein Effekt auf das Wachstum von HCL-Zellen beobachtet werden [88].
In vitro-Untersuchungen mit Rituximab an Haarzell-Leukämiezellen wurden in der Literatur bisher selten beschrieben, so dass ein Vergleich mit den Ergebnissen dieser Arbeit keine relevanten Schlussfolgerungen zulässt. In mehreren klinischen Studien wurde jedoch der Effekt von Rituximab an Patienten mit fortgeschrittener HCL untersucht. Dabei konnten Ansprechraten von bis zu 50 Prozent beobachtet werden [88, 90, 91, 92].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Rituximab *in vitro* eine unterschiedliche Wirksamkeit bei unterschiedlichen Lymphomzellinien aufweist. Da alle sechs Zellinien das CD20-Oberflächenantigen auf ihrer Oberfläche exprimieren, muss die Ursache des differenzierten Effektes in zelltypischen Strukturen begründet sein. Diskutiert wird außerdem eine unterschiedlich starke CD20-Expression auf den B-Lymphozyten bzw. eine unterschiedlich starke Bindung an das CD20-Oberflächenantigen, welche die Wirkung von Rituximab abschwächen könnte.
Einige Arbeitsgruppen postulieren, dass es weder einen Zusammenhang zwischen der Antigenexpression, noch der Antigenbindungskapazität und der Wachstumsinhibition humaner B-NHL-Zellinien durch Rituximab gibt [96, 99]. So wurde interessanterweise bei Patienten, die eine CR ihrer Erkrankung nach Behandlung mit Rituximab zeigten, zuvor eine niedrigere CD20-Expression gemessen, als bei Patienten, die nur partiell ansprachen [99]. Taji et al. konnten in Ihren Versuchen zeigen, dass das CD20-Oberflächenantigen zwar wichtig, aber nicht allein ausschlaggebend für die Wachstumsinhibition durch Rituximab ist [87]. Dafür untersuchten sie

die Wachstumsinhibition durch Rituximab bei sechs verschiedenen B-Zellinien mit unterschiedlich starker CD20-Expression. Vier Zellinien mit starker CD20-Expression zeigten eine signifikante Wachstumsinhibition, bei den anderen beiden Zellinien mit geringerer Expression von CD20 konnte keine Wachstumshemmung beobachtet werden. Bei den vier Zellinien mit starker CD20-Expression zeigte eine Zellinie, trotz höherer CD20-Expression, eine geringere Wachstumsinhibition als zwei andere Zellinien [87].

4.2 Einfluss des Komplements auf den wachstumsinhibitorischen Effekt von Rituximab

Das Komplementsystem spielt als Teil der unspezifischen Immunantwort eine große Rolle bei der Bekämpfung körperfremder Stoffe. Als ein möglicher Wirkungsmechanismus von Rituximab wird die Komplement-vermittelte Zytotoxizität (CDC) angenommen. In der vorliegenden Arbeit wurden vier humane Lymphomzellinien auf eine Komplement-vermittelte Zytotoxizität durch Rituximab untersucht. Dabei wurde humanes Komplement verwendet. Bei zwei der Zellinien konnte der antiproliferative Effekt von Rituximab verstärkt werden. Bei der Zellinie DAUDI konnte eine starke Inhibition der Proliferation durch humanes Komplement beobachtet werden. Die maximale Wachstumshemmung durch 1µg/ml Rituximab lag in Anwesenheit von humanem Komplement bei 65 Prozent. Durch die alleinige Zugabe des Antikörpers konnte kein Effekt beobachtet werden.

Bei der Zellinie DOHH-2 konnte der antiproliferative Effekt von Rituximab weiter verstärkt werden. Während ohne Komplement nur eine maximale Wachstumsinhibition von 30 Prozent erreicht werden konnte, betrug der antiproliferative Effekt in Anwesenheit von humanem Komplement 56 Prozent. Bei den Zellinien Raji und JVM-2 konnte kein Effekt nachgewiesen werden. Der deutliche Effekt, der bei den Zellinien DAUDI und DOHH-2 beobachtet werden konnte, spricht für eine Beteiligung des Komplementsystems an der durch Rituximab vermittelten Wirkung. Mehrere Studien belegen die Bindung des Komplementfaktors C1q an den Fc-Teil der IgG1-Untereinheit von Rituximab und somit eine Aktivierung des Komplementsystems [56, 93, 96, 101].

Am Verlauf der Komplementaktivierung sind zudem weitere Faktoren beteiligt. Ein Grund für das verschiedenartige Ansprechen der Zellinien könnte eine unterschiedlich starke Expression von CD55 und CD59 auf den Zielzellen sein. Beide Oberflächenantigene sind Regulatorproteine des Komplementsystems. Sie befinden sich auf allen hämatopoetischen und

nichthämatopoetischen Zellen und spielen eine entscheidende Rolle bei der Steuerung des Komplementsystems [94]. CD55, auch decay accelerating factor (DAF) genannt, inhibiert die C3/C5-Konvertase, welche für die weitere Aktivierung des Komplementsystems von großer Bedeutung ist [95]. Die vollständige Aktivierung des Komplementsystems endet im Membranangriffskomplex (MAC), der aus den Faktoren C5b, C6, C7, C8 und C9 gebildet wird. Dieser ist in der Lage – wahrscheinlich über die Aufhebung des osmotischen Gleichgewichtes – die Zielzelle zu lysieren. CD59 verhindert durch Anlagerung an C8 und C9 die endgültige Zusammenlagerung des MAC und damit die Zerstörung der Zielzelle [4].

Harjunpää et al. veröffentlichten im Jahr 2000 eine Arbeit, in der die Blockierung von CD55 und CD59 auf zwei Lymphomzellinien zu einer starken Zunahme der CDC-vermittelten Wachstumshemmung durch Rituximab führte [82]. Dabei lag die Inhibition der Proliferation durch Rituximab und Komplement auf die Zellinie Raji bei 16 Prozent, und auf die Zellinie HF-1.3.4. (FL) bei 48 Prozent, was den Ergebnissen dieser Arbeit entspricht. Durch Zugabe eines Antikörpers gegen CD59 konnte der Effekt auf 80 Prozent gesteigert werden. Diese Ergebnisse werden durch zwei weitere Publikationen bestätigt, in denen ebenfalls humane B-Zellinien auf die CDC-induzierte Wachstumsinhibition durch Rituximab untersucht wurden. Golay et al. konnten bestätigen, dass die Expression von CD55, aber auch die von CD59 auf den Zielzellen wichtig ist für die Komplement-vermittelte Lyse [96]. Treon et al. untersuchten *in vitro* die Expression von CD20, CD46, CD55 und CD59 in verschiedenen NHL und Multiples Myelom-Zellinien auf eine CDC, induziert durch Rituximab. Sie fanden heraus, dass in den Zellinien, in denen das CD59-Oberflächenantigen nur schwach oder gar nicht exprimiert wurde, der Effekt der Komplement-vermittelten Lyse durch Rituximab um ein Vielfaches stärker war [97].

In einer klinischen Studie wurde untersucht, ob eventuell CD55 und CD59 für die Resistenz von B-CLL-Zellen gegenüber Rituximab verantwortlich sind. Dabei konnte keine signifikante Korrelation zwischen der CD55- und CD59-Expression und der Ansprechrate auf die Rituximab-Therapie gefunden werden. Jedoch wurde bei Patienten, bei denen es zu keiner Reduktion von B-CLL-Zellen im Blut kam, eine höhere Genexpression gemessen als bei Patienten bei denen es zu einem deutlichen Abfall der B-CLL-Zellen im Blut kam [98]. Diese Hypothese konnten Weng und Levy nicht bestätigen. Sie untersuchten 29 Patienten mit follikulärem Lymphom auf einen Zusammenhang zwischen der Genexpression von CD46, CD55 und CD59 und dem Ansprechen auf Rituximab. Es gab keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der Expression der drei Komplementinhibitoren und der klinischen Ansprechrate unter Rituximab. Die CD59-Expression war zwar bei Patienten mit CR niedriger, jedoch war die Expression von CD46 und CD55 höher als bei Patienten mit PR [99].

Auch Bellosillo et al. untersuchten *in vitro* den Effekt von Rituximab bei 55 Patienten mit B-Zell-lymphoproliferativen Erkrankungen (B-CLL, FL, MCL HZL) auf eine CDC-vermittelte Wachstumsinhibition. Dabei konnte alleinig durch den Antikörper kein Effekt beobachtet werden. In Anwesenheit von humanem Komplement konnte bei 31 von 55 Patienten (56 Prozent) eine Rituximab-induzierte CDC beobachtet werden [89].

Die Ergebnisse sprechen zwar für eine Beteiligung des Komplementsystems, zeigen jedoch auch, dass es neben der Komplement-vermittelten Lyse weitere Komplement-unabhängige Mechanismen geben muss. Dabei spielt vermutlich die Apoptose – der natürliche Zelltod – eine wichtige Rolle. Verschiedene Arbeitsgruppen untersuchten *in vitro* den Aspekt der Apoptose-induzierten Wirkung von Rituximab [52, 100]. Es konnte gezeigt werden, dass Rituximab Apoptose induzieren kann, jedoch waren die apoptotischen Effekte unterschiedlich stark ausgeprägt [52, 57, 82, 87, 96, 100].
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es in allen vier Zellinien zu einer unterschiedlich starken Aktivierung des Komplementsystems gekommen ist. Bei zwei von vier Zellinien konnte der monoklonale Antikörper Rituximab eine Komplement-vermittelte Zytotoxizität induzieren.

4.3 Aktivierung des Komplementsystems bei Patienten mit niedrig malignen NHL

Um der Frage nach einer Komplementaktivierung durch Rituximab weiter nachzugehen, wurde *in vivo* die C3des-Arg-Plasmakonzentration bei zehn Patienten mit niedrigmalignen NHL unterschiedlicher Entität untersucht. Das Patientenkollektiv bestand aus Männern und Frauen im Alter zwischen 50 und 72 Jahren (Tabelle 2). Dabei lag die C3a-desArg-Konzentration bei den Patienten mit NHL schon vor der Rituximab-Infusion signifikant ($p = 0,05$) höher als in der Kontrollgruppe (Tabelle 3). Diese Beobachtung bestätigt eine Studie, welche die Konzentration von verschiedenen Komplementkomponenten bei Patienten mit unterschiedlichen hämatologischen Erkrankungen untersuchte. Dabei fand sich eine erhöhte Konzentration von C3a bei Patienten mit NHL, Morbus Hodgkin und akuter Leukämie [84].

Bei den *in vivo* untersuchten Patienten konnte ein deutlicher Anstieg der C3a-desArg-Konzentration während der Rituximab-Infusion beobachtet werden. Bei drei von vier Patienten mit B-CLL kam es zu einem Komplementanstieg innerhalb von 24 Stunden (Abb. 8) Die C3a-

desArg-Konzentration war gegenüber der Kontrollgruppe um das sechsfache erhöht. Bei den Patienten mit FL war der Verlauf der C3a-desArg-Konzentration uneinheitlich. Während bei zwei von fünf Patienten ein starker Anstieg von C3a-desArg im Plasma unter Rituximab zu beobachten war, zeigten die anderen Patienten keinen Effekt. Ob diese erhöhte C3a-desArg-Konzentration ein Ausdruck der CDC durch Rituximab ist, bleibt ungeklärt.

Erhöhte Plasmakonzentrationen von C3a-desArg wurden auch bei Patienten mit Sepsis und Multiorganversagen festgestellt. C3a gehört zu den Anaphylatoxinen. Es besitzt chemotaktische Wirkung auf eosinophile und basophile Granulozyten und bewirkt durch Degranulation die Freisetzung von Histamin. C3a induziert die Freisetzung von Prostaglandin E_2 in humanen Makrophagen und reguliert die IL-1 und TNF-α in PBMC [102]. Auch bei der Synthese von IL-6 scheint C3a stimulierend zu wirken [103]. Es wäre also denkbar, dass der durch Rituximab induzierte Anstieg von C3a-desArg im Plasma nicht nur für therapeutische Effekte verantwortlich ist, sondern auch für die *in vivo*-beobachteten Nebenwirkungen ausschlaggebend ist.

Warum einige der Patienten eine erhöhte C3a-desArg-Konzentration als Zeichen einer Komplementaktivierung unter Rituximab aufweisen und andere hingegen nicht, lässt sich nur mutmaßen. Wichtig wäre in diesem Zusammenhang zu untersuchen, ob es eine Verbindung zwischen der Höhe der C3a-desArg-Konzentration und dem Ansprechen auf die Rituximabtherapie gibt. Die Rolle des Komplementsystems von Patienten mit hämatologischen Neoplasien wird in der Wissenschaft immer noch sehr unterschiedlich diskutiert. Zwei Studien berichten über eine verminderte Aktivität des Komplementsystem in Korrelation mit einer niedrigen Überlebensrate bei Patienten mit B-CLL [104, 105]. Bannerji et al. untersuchten die globale Komplementaktivität (CH50) und die C3-Konzentration bei Patienten mit B-CLL am Tag 1 und 3 sowohl vor als auch nach der Gabe von Rituximab. Dabei kam es zum Abfall sowohl der CH50 als auch der C3-Konzentration nach der Gabe von Rituximab [98].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es bei sechs von zehn Patienten mit unterschiedlichen Lymphomentitäten zu einer Aktivierung des Komplementsystems kam. Dabei gab es keine signifikante Korrelation zwischen den einzelnen Entitäten. Um diese Ergebnisse zu bestätigen oder zu widerlegen, müssen weitere Untersuchungen mit größeren Patientenzahlen folgen.

5. Zusammenfassung

Rituximab (IDEC C2B8) ist ein chimärer monoklonaler Antikörper, der gegen das CD20-Antigen auf B-Lymphozyten gerichtet ist. In klinischen Studien konnten Ansprechraten von 50 Prozent bei Patienten mit niedrigmalignen NHL erzielt werden [61, 62]. Bei den hochmalignen NHL waren die Ansprechraten geringer, doch auch hier konnte eine therapeutische Wirksamkeit von Rituximab nachgewiesen werden [108]. Der genaue Wirkungsmechanismus, durch welchen Rituximab seinen therapeutischen Effekt erzielt, ist weiterhin nicht vollständig geklärt. Hauptsächlich werden dabei Apoptose, Komplement-vermittelte zelluläre Zytotoxizität (CDC) und die Antikörper-vermittelte Zytotoxizität (ADCC) diskutiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde *in vitro* die Proliferationsinhibition und die Komplement-vermittelte zelluläre Zytotoxizität durch Rituximab an verschiedenen humanen B-Zellinien geprüft. Anschließend wurde die *in vivo*-Komplementaktivierung während einer Rituximab-Infusion untersucht.

Zusammenfassend können die in der Einleitung gestellten Fragen wie folgt beantwortet werden:

1. Welchen Einfluss hat Rituximab auf das *in vitro*-Wachstumsverhalten maligner humaner B-Zellinien unterschiedlicher Entität?

Es konnte gezeigt werden, dass Rituximab *in vitro* eine unterschiedliche Wirksamkeit bei verschiedenen Lymphomzellinien aufweist.

2. Welche Rolle spielt das Komplement dabei?

Durch Zugabe von humanem Komplement konnte bei zwei Zellinien eine Rituximab-induzierte CDC beobachtet werden.

3. Gibt es während einer Rituximab-Therapie Veränderungen in der Aktivität des Komplement-systems?

Bei sechs von zehn Patienten mit unterschiedlichen NHL wurde *in vivo* ein Anstieg der C3a-desArg-Konzentration im Plasma beobachtet.

4. Welche Schlussfolgerungen können in Bezug auf die Therapie mit Rituximab gezogen werden?

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass das Komplementsystem ein wichtiger Mechanismus für die Wirkung von Rituximab zu sein scheint. Die klinischen Erfolge sind viel versprechend,

zeigen jedoch auch, dass der therapeutische Nutzen von Rituximab als Monotherapie begrenzt ist. Derzeit laufende prospektive Studien untersuchen die Wirksamkeit von Rituximab in Kombination mit verschiedenen Chemotherapeutika [106, 107]. Erste Ergebnisse sind viel versprechend, doch es bleibt abzuwarten, ob sich diese Ergebnisse auch langfristig in einer Verbesserung der Überlebensrate widerspiegeln.

6. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
B-CLL	B-Cell-Chronic Lymphozytic Leukemia = Chronisch lymphatische Leukämie vom B-Zelltyp
Bcl-2	B-Cell leukemia/lymphoma = B-Zell-Leukämie/Lymphom 2
CD	Cluster of Differentiation
CDC	Complement Dependent Cytotoxizität = Komplement-vermittelte Zytotoxizität
CR	Complete Response = komplette Remission
CVI	Common Variable Immundeficiency = Einfacher variabler Immundefekt
DLCL	Diffuse Large Cell Lymphoma = Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom
ADCC	Antibody Dependent Cellular Cytotoxizität = Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität
EDTA	Ethylenediaminetetraacetate = Ethylendiamintetraessigsäure
FL	Follicular Lymphoma = Follikuläres B-Zell-Lymphom
HCL	Hairy Cell Leukemia = Haarzell-Leukämie
h	Stunde
IgG	Immunglobulin G
IL-2	Interleukin 2
INF α	Interferon alpha
MAC	Membran Attack Complex = Membranangriffskomplex
MCL	Mantle Cell Lymphoma = Mantelzell-Lymphom
Ml	Milliliter
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenytetrazoliumbromid
min	Minute
µl	Mikroliter
nm	Nanometer
ng	Nanogramm
OD	Optische Dichte
PLL	Prolymphozytenleukämie
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear cells
PR	Partial Response = partielle Remission

RMPI	Rosewell Park Memorial Institute
R.E.A.L.	Revised European and American Lymphom Classification = Überarbeitete Europäische und Amerikanische Lymphom-klassifikation
Tab.	Tabelle
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor-alpha
α,β-TCR	T-Zell-Rezeptor α und β
WHO	World Health Organization = Weltgesundheitsorganisation

8. Anhang

7.1 Bücher

1. Fauci A.S., Braunwald E., Isselbacher K.J., Wilson J.D., Martin J.B., Kasper D.L., Hauser S.L., Longo D.L. (1999): Harrisons Innere Medizin. 14. Auflage McGraw-Hill Internatinal (UK) Ltd.
2. Fuchs R. (1997): Diagnostik und Therapie lymphatischer Neoplasien.
3. Bortz J., Lienert G.A. (1998): Kurzgefasste Statistik für die klinische Forschung. Heidelberg: Springer
4. Janeway C.A., Travers P., Walport M., Capra J.D. (1999): Immunobiologie. 4. Auflage, New York
5. Schmoll H.-J., Höffken K., Possinger K. (1999): Kompendium Internistische Onkologie 3. Auflage, Springer Verlag
6. Paumgartner G.: Therapie innerer Krankheiten. 9. Auflage, Springer Verlag

7.2 Zeitschriften

7. Devesa S.S., Fears T. (1992) Non-Hodgkin`s Lymphoma Time Trends: United States and International Data. Cancer Research 52 (Suppl.19): 5432-5440
8. Devesa S.S., Blot W.J., Stone B.J., Miller B.A., Tarone R.E., Fraumeni F., Jr. (1995) Resent Cancer Trends in the United States. Journal National Cancer Institut 87: 175-182
9. Hardell L., Ericsson M. (1999) A case- control study of non-Hodgkin lymphoma and exposure to pesticides. Cancer 85(6): 1353-1360
10. Khorana A.A., Rosenblatt J.D., Young F.M. (2001): Immunopathogenesis of HIV and HTLV-1 infection: mechanisms for lymphomagenesis. Cancer Treatment Research 104: 19-74
11. Du M.Q., Diss T.C., Liu H. et al. (2002) KSHV- and EBV-associated germinotropic lymphoproliferative disorder. Blood 100(9):3415-3418
12. Le Beau M.M. (1990) Chromosomal abnormalities in non-Hodgkin’s lymphomas. Seminars in Oncology 17: 20-29
13. Gerhard-Marchant R., Hamlin I., Lennert K., Rilke F., Stansfeld A., van Unnik J.(1974) Classification of non-Hodgkin lymphomas. Lancet 2: 406-408
14. Stansfeld A., Diebold J., Kapanci Y., et al. (1988) Updated Kiel classification for lymphomas. Lancet 1: 292-293

15. Lennert K., Feller A. (1992) Histopathology of Non-Hodgkin's Lymphomas. New York: Springer Verlag
16. Rappaport H. (1966) Atlas of tumor pathology, section III, fascicle 8. Armed Forces Institute of Pathology.
17. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project: National Cancer Institute sponsored study of classification of Non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a Working Formulation for clinical usage. (1982) Cancer 49: 2112-2135
18. Harris N.L., Jaffe E.S., Stein H. et al. (1994) A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. (1994) Blood 84: 1361-1392
19. Jaffe E.S., Harris N.L., Diebold J., Müller-Hermelink H.K. (1998) World Health Organisation Classification of lymphomas: A work in progress. Annals of Oncology 9 (suppl.5): 25-30
20. Stein H., Hiddemann W. (1999) Die neue WHO-Klassifikation der malignen Lymphome Deutsches Ärzteblatt 96, Heft 49 A3168-3176
21. Carbone P.P., Kaplan H.S., Musshoff K., Smithers D.W., Tubina M. (1971) Report of the committee on Hodgkin's disease staging classification. Cancer Research 31: 1860-1861
22. Stuschke M., Hoederath A., Sack H., Potter R., Müller R.P., Schulz U., Karstens J., Makoski H.B. (1997) Extended field and total central lymphatic radiotherapy in the treatment of early stage lymph node centroblastic-centrocytic lymphomas: results of a prospective multicenter study. Cancer 80: 2273-2284
23. MacManus M.P., Hoppe R.T. (1996) Is radiotherapy curative for stage I or II low-grade follicular lymphoma? Results of a long-term follow-up study of patients treated at Stanford University. Journal of Clinical Oncology 14: 1282-1290
24. Vaughan-Hudson B., Vaughan-Hudson G., MacLennan K.A. (1994) Clinical stage I non-Hodgkin's lymphoma: Long-term follow-up of patients treated by the British National Lymphoma Investigation with radiotherapy alone as initial therapy. British Journal of Cancer 69: 1088-1093
25. Hiddemann W., Dreyling M., Unterhalt M. (2001) Aktuelle Entwicklungen in der Therapie follikulärer Keimzentrumslymphome. Der Onkologe 7: 969-981
26. Biermann P., Vose J.M., Anderson J.R., Bishop M.R. Kessinger A., Armitage J.O. (1997) High-dose therapy with autologous hematopoietic rescue for follicular low-grade non-Hodgkin's lymphoma. Journal of clinical Oncology 15: 445-450

27. Coiffier B., Lepage E., Brière J. et al. (2002) CHOP-Chemotherapie plus Rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. New England Journal of Medicine 346: 235-242
28. Pfreundschuh M., Truemper L., Schmits R. (2002) 2-weekly vs. 3-weekly CHOP with and without Etoposide in Young Patients with Low-Risk (low LDH) Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma: Results of the Completed NHL-B-1 Trial of the DSHNHL. ASH 2002; Abstract #340
29. Wunderlich A., Kloess M., Reiser M. et al. (2003) Practicability and acute haematological toxicity of 2- and 3-weekly CHOP and CHOEP chemotherapy for aggressive non-Hodgkin's lymphoma: results from the NHL-B trial of the German High-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma Study Group (DSHNHL). Annals of Oncology 14(6): 881-893
30. Köhler G., Milstein C., (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of pre-defined specificity. Nature 256: 652-661
31. Press O.W., Appelbaum F., Ledbetter J.A. et al. (1987) Monoclonal antibody 1F5 (anti-CD20) serotherapy of human B cell lymphomas. Blood 69(2): 584-591
32. Foon K.A. (2000) Monoclonal Antibody Therapies for lymphomas. The Cancer Journal 6(5): 273-277
33. Coiffier B. (1999) Monoclonal antibodies in the treatment of non-Hodgkin’s lymphoma. Haematologica 84 (14-18)
34. Quesada J.R., Reuben J., Manning J.T., Hersh E.M., Gutterman J.U. (1984) Alpha interferon for induction of remission in hairy cell leukaemia. New England Journal of Medicine 310: 15-28
35. Golomb H.M., Jacobs A., Fefer A. et al. (1986) α-2-interferon therapy of hairy-cell leukemia: a multicenter study of 64 patients. The Journal of Clinical Oncology 4: 900-905
36. Mantovani L., Guglielmi C., Martelli M., Chierichini A. et al. (1989) Recombinant alpha interferon in the treatment of low- grade non-Hodgkin’s lymphoma: results of a cooperative phase II trial in 31 patients. Haematologica 74(6) 571-5
37. Hagenbeek A., Carde P., Meerwaldt J.H., Somers R. et al. (1998) Maintenance of remission with human recombinant interferon alpha-2a in patients with stages III and IV low-grade malignant non Hodgkin’s lymphoma. European Organization for Research and Treatment of Cancer Lymphoma Cooperative Group. Journal of Clinical Oncology 16(1) 41-47

38. Anderson J.W., Smalley R.V. (1993) Interferon alpha plus chemotherapy for non-Hodgkin's lymphoma: five year follow-up. New England Journal of Medicine 329: 1821-1822
39. Solal-Celigny P., Lepage E., Brousse N., et al. (1993) Recombinant interferon alpha-2b combined with a regimen containing doxorubicin in patients with advanced follicular lymphoma. New England Journal of Medicine 329: 1608-1614
40. Unterhalt M., Hermann R., Koch P., Trümper L. et al. for the German Low Grade NHL Study Group (1996) Long term interferon alpha maintenance prolongs remission duration in advanced low grade lymphomas and is related to the efficacy of initial cytoreductive chemotherapy. Blood 88 (Suppl.1): 453a
41. Hiddemann W., Griesinger F., Unterhalt M. (1998) Interferon alpha for the treatment of follicular lymphomas. The Cancer Journal from Scientific American; 4 (Suppl. 2): 13-18
42. Stashenko P., Nadler L.M., Hardy R., Schlossman S.F. (1980) Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen. The Journal of Immunology 125(4): 1678-1685
43. Tedder T.F., Klejman G., Disteche C.M., Adler D.A., Schlossman S.F., Saito H. (1988) Cloning of a complementary DNA encoding a new mouse B lymphocyte differentiation antigen, homologous to the human B1(CD20) antigen, and localization of the gene to chromosome 19. The Journal of Immunology 141(12): 4388-4394
44. Tedder T.F., Disteche C.M., Louie E., Adler D.A., Croce C.M., Schlossman S.F., Saito H. (1989) The gene that encodes the human CD20 (B1) differentiation antigen is located on chromosome 11 near the t(11;14)(q13;q32) translocation site. The Journal of Immunology 142(7): 2555-2559
45. Tedder T.F., Klejman G., Schlossman S.F., Saito H. (1989) Structure of the gene encoding the human B lymphocyte differentiation antigen CD20 (B1) The Journal of Immunology 142(7): 2560-2568
46. Tedder T.F., Boyd A.W., Freedman A.S., Nadler L.M., Schlossman A.F.(1985) The B-cell surface molecule B1 is functionally linked with B-cell activation and differentiation. The Journal of Immunology 135(2): 973-979
47. Tedder T.F. and P. Engel (1994) CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes. Immunology Today 15(9): 450-454
48. Bubien J.K., Zhou L.J., Bell D., Frizzell R.A. and T.F. Tedder (1993) Transfection of the CD20 cell surface molecule into ectopic cell types generates a Ca^{2+} conductance found constitutively in B lymphocytes. The Journal of Cell Biology 121(5): 1121-1132

49. Elisabeth Genot (1994) Interferon alpha and intracytoplasmic free calcium in hairy cell leukaemia cells Leukemia and Lymphoma 12:373-381
50. Genot E., Bismuth G., Degos L., Sigaux F., Wietzerbin J. (1992) Interferon alpha downregulates the abnormal intracytoplamic free calcium concentration of tumor cells in hairy cell leukemia. Blood 80(8): 2060-2065
51. Deans J.P., Schieven G.L., Shu G.L., Valentine M.A., Gilliland L.A., Aruffo A., Clark E.A., Ledbetter J.A. (1993) Association of tyrosine and serine kinases with the B cell surface antigen CD20. The Journal of Immunology 151(9) 4494-4504
52. Shan D., Ledbetter J.A. and Oliver W. Press (1998) Apoptosis of malignant human B cells by Ligation of CD20 with monoclonal antibodies Blood 91(5): 1644-1652
53. Golay T.J., Clark A.E., Beverley P.C.L. (1985) The CD20 (Bp35) antigen is involved in activation of B cells from the G_0 to the G_1 phase of the cell cycle. The Journal of Immunology 135(6): 3795-3801
54. Tedder T.F., Forsgren A., Boyd A.W., Freedman A.S., Nadler L.M., Schlossman S.F. (1986) Antibodies reactive with the B1 molecule inhibit cell cycle progression but not activation of human B-lymphocytes. European Journal of Immunology 16:881-887
55. Winkler U., Schnell R., Engert A. (1999) Einsatz monoklonaler und bispezifischer Antikörper in der Tumortherapie. Der Onkologe 5: 679-687
56. Reff M.E., Carner K., Chambers K.S., Chinn P.C., Leonard J.E., Raab R., Newman R.A., Hanna N., Anderson D.R. (1994) Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. Blood 83(2): 435-445
57. Maloney D.G., Smith B., Appelbaum F.R. (1996) 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 88 (Suppl.):637a
58. Demidem A., Hanna N., Hariharan H., Bonavida B. (1995) Chimeric anti-CD20 antibody (IDEC C2B8) is apoptotic and sensitizes drug-resistant human B-cell lymphoma and AIDS-related lymphomas to the cytotoxic effect of CDDP, VP-16 and toxins. FASEB Journal 9: A206
59. Demidem A., Lam T., Alas S., Hariharan K., Hanna N., Bonavida B. (1997) Chimeric anti-CD20 (IDEC C2B8) monoclonal antibody sensitizes a B cell lymphoma cell line to cell killing by cytotoxic drugs. Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals 12(3): 177-186

60. Maloney D.G., Grillo-Lopez A.J., Bodkin D.J., White C.A., Liles T.M., Royston I., Varns C., Rosenberg J., Levy R. (1997) IDEC C2B8: results of a phase I multiple- dose trial in patients with relapsed non-Hodgkin's lymphoma. Journal of Clinical Oncology 15(10):3266-3274
61. Maloney D.G., Grillo-Lopez A.J., White C.A., Bodkin D., Schilder R.J., Neidhart J.A., Janakiraman N., Foon K.A., Liles T.M., Dallaire B.K., Wey K., Royston I. Davis T., Levy R. (1997) IDEC C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin' lymphoma. Blood 90(6): 2188-2195
62. McLaughlin P., Grillo-Lopez A.J., Link B.K., Levy R., Czuczman M.S. et al. (1998) Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. The Journal of Clinical Oncology 16(8): 2825-2833
63. Feuring-Buske M., Kneba M., Unterhalt M., Engert A. et al. (2000) 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. Annals of Hematology 79:493-500
64. Hainsworth J.D., Burris III H.A., Morrissey L.H., Litchy S. et al. (2000) Rituximab monoclonal antibody as initial systemic therapy for patients with low-grade non-Hodgkin lymphoma. Blood 95(10): 3052-3056
65. Tobinai K., Kobayashi Y., Narabayashi M., Ogura M. and members of the IDEC C2B8 study group (1998) Feasibility and pharmacokinetic study of a chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC C2B8) in relapsed B cell lymphoma. Annals of Oncology 9: 527-534
66. Foran J.M., Gupta R.K., Cunningham D. et al. (2000) A UK multicentre phase II study of rituximab (chimaeric anti-CD20 monoclonal antibody) in patients with follicular lymphoma, with PCR monitoring of molecular response. British Journal of Haematology 109: 81-88
67. Hainsworth J.D., Litchy S., Burris H.A. 3rd et al. (2002) Rituximab as first-line and maintenance therapy for patients with indolent non-hodgkin's lymphoma. The Journal of Clinical Onkology 20(20): 4261-4267
68. Davis T.A., Maloney D.G., Grillo-Lopez A.J., White C.A., Williams M.E., Weiner G.J., Dowden S., Levy R. (2000) Combination immunotherapy of relapsed or refractory low-grade or follicular non-Hodgkin's lymphoma with Rituximab and Interferon alpha 2a. Clinical Cancer Research 6:2644-2652

69. Vose J.M., Link B.K., Grossbard M.L., Czuczman M., Grillo-Lopez A.J., Gilman P., Lowe A., Kunkel L.A., Fisher R.I. (2001) Phase II study of Rituximab in combination with CHOP chemotherapy in patients with previously untreated, aggressive non-Hodgkin' lymphoma. The Journal of Clinical Oncology 19(2): 389-397
70. Czuczman M.S., Grillo-Lopez A.J., White C.A. et al. (1999) Treatment of patient with low grade B-cell lymphoma with the combination of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody and CHOP chemotherapy. The Journal of Clinical Oncology 17: 268-276
71. Jensen M., Winkler U., Manzke O., Diehl V., Engert A. (1998) Rapid tumor lysis in a patient with B-cell chronic lymphocytic leukemia and lymphocytosis treated with an anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8, Rituximab). Annals of Hematology 77:89-91
72. Yang H., Rosove M.H., Figlin R.A. (1999) Tumor lysis syndrome occurring after the administration of rituximab in lymphoproliferative disorders: high-grade non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia. American Journal of Hematology 62: 247-250
73. Kunzmann V., Ruediger T., Hallek M., et al. (2001) Tumor cell agglutination and not solely cytokine release as mechanism of adverse reactions during anti-CD20 monoklonal antibody (IDEC-C2B8, rituximab) treatment. Blood 98: 1991-1992
74. Byrd J.C., Waselenko J.K. Maneatis T.J., Murphy T., Ward F.T., Monahan B.P., Sipe M.A., Donegan S., White C.A. (1999) Rituximab therapy in hematologic malignancy patients with circulating blood tumor cells: side effects and rapid blood tumor clearance. The Journal of Clinical Oncology 17(3): 791-795
75. Winkler U., Jensen M., Manzke O. (1999) Cytokine-release syndrome in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia and high lymphocyte counts after treatment with an anti-CD20 monoclonal antibody. Blood 94: 2217-2224
76. Mosman T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. The Journal of Immunological Methods 6:55
77. Hugli T.E. and Müller-Eberhard H.J. (1978) Anaphylatoxins: C3a and C5a. Advances in Immunology 26: 1-53
78. Solomkin J.S., Cotta L.A., Satoh P.S., Hurst J.M., Nelson R.D. (1985) Complement activation and clearance in acute illness and injury: evidence for C5a as a cell-directed mediator of the adult respiratory distress syndrome in man. Surgery 97(6): 668-678
79. Heidemann M., Hugli T.E. (1984) Anaphylatoxin generation in multisystem organ failure. Journal of Trauma 24(12): 1038-1043

80. Goldstein I.M., Cala D., Radin A., Kaplan H.B., Horn J., Ranson J. (1978) Evidence of complement catabolism in acute pancreatitis. American Journal of Medicine Science
81. Burger R., Bader A., Kirschfink M., Rother U., Schrod L., Wörner I., Zilow G. (1987) Functional analysis and quatification of the complement C3 derived anaphylatoxin C3a with a monoclonal antibody. Clinical and experimental Immunology 68: 703-711
82. Harjunpää A., Junnikkala S. and Meri S. (2000) Rituximab (anti-CD20) therapy of B-cell lymphomas: direct complement killing is superior to cellular effector mechanisms. Scandinavian Journal of Immunology 51: 634-641
83. Zilow G., Naser W., Rutz R., Burger R. (1989) Quantitation of the anaphylatoxin C3a in the presence of C3 by novel sandwich ELISA using monoclonal antibody. Journal of Immunological Methods 121: 261-268
84. Batlle Fonrodona F.J., Lopez Fernandez M.F., Vicente Garcia V. et al. (1979) Complement in hematological neoplasias. Allergologia et Immunopathologia.(Madr) 7(1): 39-46
85. Flieger D., Renoth S., Beier I., Sauerbruch T., Schmidt-Wolf I. (2000) Mechanism of cytotoxicity induced by chimeric mouse human monoclonal antibody IDEC C2B8 in CD20-expressing lymphoma cell lines. Cellular Immunology 204: 55-63
86. Colombat P., Salles G., Brousse N., Eftekhari P., Soubeyran P. et al. (2001) Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) as single first-line therapy for patients with follicular lymphoma with a low tumor burden: clinical and molecular evaluation. Blood 97(1): 101-106
87. Taji H., Kagami Y., Okada Y., Andou M., Nishi Y., Saito H., Seto M., Morishima Y. (1998) Growth inhibition of CD20-positive B lymphoma cell lines by IDEC-C2B8 anti-CD20 monoclonal antibody. Japan Journal of Cancer Research 89:748-756
88. Lauria F., Lenoci M., Annino L., Raspadori D. et al. (2001) Efficacy of anti-CD20 monoclonal antibodies (Mabthera) in patients with progressed hairy cell leukemia. Haematologica 86:1046-1050
89. Bellosillo B., Villamor N., Lopez-Guillermo A., Marcè S., Esteve J., et al. (2001) Complement-mediated cell death induced by rituximab in B-cell lymphoproliferative disorders is mediated in vitro by caspase-independent mechanism involving the generation of reactive oxygen species. Blood 98:2771-2777
90. Hagberg H., Lundholm L. (2001) Rituximab, a chimeric anti-CD20 monoclonal antibody, in the treatment of hariy cell leukaemia. British Journal of Haematology 115(3):609-611

91. Thomas D.A., O'Brien S., Bueso-Ramos C., Faderl S., Keating M.J., et al. (2003) Rituximab in relapsed or refractory hariy cell leukaemia. Blood Jun 19, printed
92. Nieva J., Bethel K., Saven A. (2003) Phase 2 study of Rituximab in the treatment of cladribine-failed patients with hariy cell leukaemia. 102 (3):810-813
93. Idusogie E.E., Presta L.G., Gazzano-Santoro H., Totpal K., Wong P.W., Ultsch M., Meng G. Mulkerrin M.G. (2000) Mapping of the C1q binding site on rituxan, a chimeric antibody with a human IgG1 Fc. The Journal of Immunology 164: 4178-4184
94. Morgan B.P., Meri S. Membrane proteins that protect against complement lysis. (1994) Springer Seminars in Immunpathology 15: 369-96
95. Nicholson-Weller A., Burge J., Fearon D.T. et al. (1982) Isolation of a human erythrocyte membrane glycoprotein with decay-accelerating activity for C3 convertase of the complement system. The Journal of Immunology 129: 184-189
96. Golay J., Zaffaroni L., Vaccari T., Lazzari M., Boleri G.M., Bernasconi S., Tedesco F., Rambaldi A., Introna M. (2000) Biologic response of B lymphoma cells to anti-CD20 monoclonal antibody Rituximab in vitro: CD55 and CD59 regulate complement-mediated cell lysis. Blood 95(12): 3900-3908
97. Treon S.P., Mitsiades C., Mitsiades N., Young G., Doss D., Schlossman R., Anderson K.C. (2001) Tumor cell expression of CD59 is associated with resistance to CD20 serotherapy in patients with B-cell malignancies. The Journal of Immunology 24(3): 265-271
98. Bannerji R., Pearson M., Flinn I.W., Shinn C.A., Goodrich A., Lucas M., Byrd J.C. (2000) Cell surface complement inhibitors CD55 and CD59 may mediate chronic lymphocytic leukemia resistance to Rituximab therapy. Blood 96 (suppl.1): Abstract:706
99. Weng W.K. and R. Levy (2001) Expression of complement inhibitors CD46, CD55 and CD59 on tumor cells does not predict clinical outcome after Rituximab treatment in follicular non-Hodgkin lymphoma. Blood 98(5): 1352-1357
100. Mathas S., Rickers A., Bommert K., Dörken B., Mapara M.Y. (2000) Anti-CD20 and B-cell receptor-mediated apoptosis: evidence for shared intracellular pathways. Cancer Research 60: 7170-7176
101. Idusogie E.E., Wong P.Y., Presta L.G., Santoro H.G., Totpal K., Ultsch M., Mulkerrin M.G. (2001) Engineered antibodies with increased activity to recruit complement. The Journal of Immunology 166: 2571-2575

102. Takabayashi T., Vannier E., Clark B.D. et al. (1996) A new biologicrole for C3a and C3a-desArg: regulation of tumor necrosis factor α and interleukin 1β synthesis. The Journal of Immunology 156: 3455-3460
103. Takabayashi T., Vannier E., Burke J.F., Tomkins R.G., Gelfand J.A. Clark B.D. (1998) Both C3a and C3a-desArg regulate interleukin-6 synthesis in human peripheral blood mononuclear cells. The Journal of Infectious Diseases 177: 1622-1628
104. Lugassy G. and Schlesinger M. (1996) The complement system in chronic lymphocytic leukemia: a possible role in autoimmune manifestations. Leukemia and Lymphoma 21: 501-503
105. Varga L., Czink E., Miszlai Z.S., Paloczi K., Banyai A., Szegedi G., Füst G. (1995) Low activity of the classical complement pathway predicts short survival of patients with chronic lymphocytic leukemia. Clinical and experimental Immunology 99: 112-116
106. Czuczman M.S., Fallon A., Acarpace A. et al. (2000) Phase II study of rituximab in combination with fludarabin in patients with low grade or follicular B-cell lymphoma. Blood 96 (suppl.1): Abstract 3154
107. Simonelli C., Tirelli U., Spina M., Vaccher E., Jaeger U., Sparano J. (2001) Pilot trial of infusional cyclophosphamide, doxorubicin, and etoposid (CDE) plus the anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab) in HIV-associated non-Hodgkins lymphoma. Preliminary results of an international multicenter trial. ECCO 2001: Abstract: 71
108. Coiffier B., Haioun, N., Ketterer A., Engert H., Tilly D., et al. (1998) Rituximab (anti CD20 monoclonal antibody) for the treatment of patients with relapsing or refractory aggressive lymphoma: a multicenter phase II study. Blood 92(6): 1927-1932
109. National Cancer Institute: Recommendation of Representatives of the NCI's Clinical Cooperative Groups and the Cancer Treatment Evaluation Program. Bethesda, 1988
110. Mey U., Strehl J., Gorschlüter M. et al. (2003) Advances in the treatment of hairy cell leukaemia. The Lancet Oncology 4: 86-94

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe und auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt.

Berlin den 05.03.2006

Christian Gerecke

Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Dieter Huhn, danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Abteilung durchgeführt haben zu können.

Meinem Betreuer, Herrn Dr. Ingo Schwaner danke ich recht herzlich für die Überlassung des aktuellen Themas dieser Dissertation. Weiterhin möchte ich ihm für die zahlreichen Ideen, Vorschläge und Anregungen, die mit in diese Arbeit eingeflossen sind, danken. Ohne seine Motivation, sowie die oftmals kritische Diskussionsbereitschaft, wäre diese Arbeit sicher nicht zustande gekommen. Auch seine differenzierten Anmerkungen bei der Durchsicht des Manuskriptes waren mir stets sehr hilfreich.

Für ihre Ratschläge und hilfreichen Anregungen möchte ich mich außerdem bei Beatrice Kuhn und Anne Herrmann bedanken.

Schließlich möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Labors, die mir bei meiner Arbeit zur Seite gestanden haben, bedanken. Ihre Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit trugen wesentlich zu einer angenehmen und konstruktiven Arbeitsatmosphäre bei.

Nicht zuletzt möchte ich besonders meinen Eltern danken, die mir dieses Studium erst ermöglicht haben und mich jederzeit unterstützt, gefördert und motiviert haben.