

Aus der Medizinischen Klinik
mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie, CVK
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

**Veränderungen von B-Zellantigenen unter Rituximab-Therapie:
FMC7 ist Teil des CD20-Antigenkomplexes**

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

Vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Maya Jordanova
aus Sofia, Bulgarien

Dekan: Prof. Dr. Joachim Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. B. Dörken

2. Prof. Dr. I. Schmidt-Wolf

3. Prof. Dr. H. Stein

eingereicht: 09.07.2003

Datum der Promotion: 25.06.2004

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
2	MATERIAL UND METHODEN.....	7
2.1	Material	7
2.1.1	Untersuchte Proben.....	7
2.1.2	Patienten	7
2.1.2.1	Charakteristika	7
2.1.2.2	Rituximab-Behandlung.....	9
2.1.2.3	Probenentnahme.....	9
2.1.3	Kontrollgruppe	10
2.1.4	Zell-Linien	10
2.2	Methoden.....	11
2.2.1	Untersuchungen an peripherem Blut	11
2.2.1.1	Antikörperpanel	11
2.2.1.2	Blutentnahme und Vorbereitung.....	13
2.2.1.3	Erythrozytenlyse.....	14
2.2.1.4	Färbung.....	15
2.2.1.5	Geräteeinstellung, Datenakquisition, Parameterdarstellung	15
2.2.1.6	Auswertung – logische Verknüpfungen	16
2.2.1.7	Auswertung der Lymphozytenpopulationen	18
2.2.1.8	Auswertung der malignen B-Zellpopulation.....	18
2.2.2	Untersuchungen mit Zell-Linien	19
2.2.2.1	Kultivieren der Zellen	19
2.2.2.2	CD20-Plasmid und Transfektion	20

2.2.2.3	Blockierungsexperimente mit B-Zell-Linien	21
2.2.2.4	Aktivierungsexperimente mit PMA	23
2.3	Statistik	23
3	ERGEBNISSE	25
3.1	Mit Rituximab-behandelte Patienten	25
3.1.1.	Leukozytenzahl, Differentialblutbild und Lymphozytenpopulationen.....	25
3.1.1.1	Kurzzeit-Verlauf (24 Stunden)	25
3.1.1.2	Langzeit-Verlauf (4 Applikationen und 8 Wochen danach)	27
3.1.2.	Immunphänotypische Veränderungen der B-Zellpopulation	29
3.1.2.1	Kurzzeit-Verlauf.....	30
3.1.2.2	Langzeit-Verlauf	35
3.2	Kontrollgruppe	36
3.3	Transfektionsexperimente mit der myeloischen K-562 Zell-Linie	37
3.4	Blockierungsexperimente mit B-Zell-Linien	38
3.4.1	Blockierungsexperimente mit den CESS-, DAUDI- und JVM-Zell-Linien unter der Wirkung von CD20- und FMC7-MAK	38
3.4.2	Antigen-Modulationsexperimente mit CESS- und JVM-Zell-Linien unter der Wirkung von CD20- und FMC7-MAK	40
3.5	Aktivierungsexperimente mit der prä-B-Zell-Linie PB-697 unter PMA-Wirkung	40
4.	DISKUSSION	41
5.	ZUSAMMENFASSUNG	53
6.	SCHRIFTENVERZEICHNIS	55

1 EINLEITUNG

Die indolenten B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome (B-Zell-NHL) sind durch maligne Proliferation reifer lymphoider Zellen charakterisiert und weisen bei der Diagnose vorwiegend eine nodale Lokalisation auf oder präsentieren sich als leukämischer Prozess (Chronische lymphatische Leukämie).

Die schnelle durchflusszytometrische Analyse und die gegenwärtige Vielfalt der spezifischen monoklonalen Antikörper (MAK) erlauben die Diagnosestellung am peripheren Blut oder Knochenmark und die präzise Subtypisierung der einzelnen Erkrankungen innerhalb der Gruppe, was prognostische und therapeutische Relevanz hat (1).

Es wurden standardisierte Protokolle und Consensus-Bestimmungskriterien für die immunphänotypische Differenzierung dieser Erkrankungen entwickelt, die auf der spezifischen Expression und/oder Koexpression bestimmter Zellmembranantigene beruhen (2-4). Eine solche vereinfachte Klassifikation ist in Tabelle 1.1 präsentiert (5).

Tabelle 1.1: Immunphänotypische Charakteristika der B-Zell-lymphoproliferativen Erkrankungen.

Antigen	CLL	PLL	HCL	FL	MCL	LP-IC	PCL
slg	+/-w	+s	+s	+s	+s	+s	-
CD5	+	-/+w	-	-	+	+/-	-
CD10	-	-	-	+/-	-	-	-/+
CD11c	+/-w	-/+	+s	-	-	-/+	-
CD19	+	+	+	+	+	+	-
CD20	+	+	+	+	+	+	-
CD23	+	-/+	-	-/+	-	-/+	-
CD38	-	-	-/+w	-/+w	-	+/-	+s
CD103	-	-	+s	-	-	-	-
FMC7	-/+w	+	+	+	+	-/+	-

- Antigen nicht exprimiert; +/- Antigen exprimiert bei weniger als 50% der Patienten; +/- Antigen exprimiert bei der Mehrheit der Patienten; + Antigen exprimiert; w schwache Expression; s starke Expression; FL Follikuläres Lymphoma; HCL Haar-Zell-Leukämie; LP-IC lymphoplasmazytäres Immunocytom; MCL Mantel-Zell-Lymphom; PCL Plasma-Zell Leukämie; PLL Prolymphozyten-Leukämie.

Es existiert eine Überlappung zwischen den Immunphänotypen der verschiedenen nosologischen Entitäten dieser Gruppe bezüglich der Expression einzelner Antigene. Zum Beispiel wird CD5 bei CLL und MCL, Membran-Immunglobuline (slg), CD20 und CD19 bei allen lymphoproliferativen Erkrankungen, CD22 (in der Tabelle nicht dargestellt) und FMC7 bei den meisten dieser Lymphome exprimiert. Neben der Antigenexpression kann die Bestimmung der Expressionsintensität einzelner Antigene (slg, CD20) als zusätzliches quantitatives Unterscheidungskriterium dienen (6).

Bei der relativ schwachen (dim) CD20-Expression wird in der Literatur ein Zusammenhang mit der Differenzierung typischer B-CLL im Gegensatz zu den anderen Non-CLL B-Zell-Lymphomen gesehen (7;8). Eine starke CD20-Fluoreszenzintensität wird mit atypischer morphologischer und klinischer Präsentation sowie dem zytogenetischen Befund einer Trisomie 12 als prognostisch ungünstiges Kriterium verbunden (3;9-11).

Die Expression eines anderen B-Zellmarkers, nämlich FMC7, wurde bei der B-CLL auch als eine Deviation von dem charakteristischen Phänotyp definiert (3;12-14) und damit auch als prognostisch ungünstiges Merkmal betrachtet (15-18). In allen diesen Studien wurden auch solche klinische Fälle als negativ bewertet, bei denen eine gewisse Fraktion der malignen Zellen, allerdings weniger als 30%, positiv für das FMC7-Antigen waren. Die fehlende FMC7-Expression wird als eines der wenigen immunphänotypischen Grundkriterien für die Differenzierung der typischen B-CLL in dem weit verwendeten Scoring-System der Londoner Royal Marsden Hospital-Gruppe empfohlen (s. Tab. 1.2).

Tabelle 1.2: Scoring System für die B-CLL* (19)

Zelloberflächenmarker	Punkte	
	1	0
slg	schwach positiv	mäßig / stark positiv
CD5	positiv	negativ
CD23	positiv	negativ
FMC7	negativ	positiv
CD22	schwach positiv / negativ	mäßig / stark positiv

* Score von maximal 5 bis minimal 0 Punkte

Der Name des Markers FMC7 ist eine Abkürzung von Flinders-Medical-Center, (Bedford Park, South Australia), wo der Antikörper entwickelt und 1981 erstmals beschrieben wurde (20). Dieser Antikörper bindet an ein von der B-Lymphozyten-Linie exprimiertes Antigen, welches noch nicht bis ins letzte Detail charakterisiert ist. Die gleiche Arbeitsgruppe hat das Antigen als ein Membran-Glykoprotein identifiziert, das Rezeptorfunktionen ausübt (21). Das Molekulargewicht des Antigens wurde auf 105 kDa geschätzt, wobei der Nachweis mittels Immunoblotting von der gleichen Arbeitsgruppe erbracht wurde (22). Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen hierzu liegen nicht vor. Der Marker wird sowohl von einem Teil der normalen zirkulierenden B-Lymphozyten als auch bei den indolenten B-Zell-Erkrankungen exprimiert, wobei die Daten bezüglich des Anteils der FMC7-positiven peripheren polyklonalen B-Lymphozyten äußerst widersprüchlich sind. Diese sind einerseits als Minor-Fraktion in mehreren Publikationen beschrieben worden (23-25), andererseits hat man den Marker auf 50% der peripheren slg-exprimierenden B-Zellen gefunden (26). In dem Übersichtsartikel der B-Zell-Sektion des V. Leucocyte Typing Workshops wurde dargestellt, dass 80 bis 100% der peripheren B-Lymphozyten mit dem FMC7-Antikörper reagieren (13).

Die mögliche Rolle des Antigens als Differenzierungsmerkmal oder Aktivierungsmarker wurde in Zusammenhang mit der Expression der B-Zellantigene CD22 und CD23 untersucht (22;27). Die erste Arbeitsgruppe, die eine klare Korrelation zwischen der Expression von CD20 und FMC7 auf der B-Zellpopulation, sowohl bei reaktiven Lymphozytosen, als auch bei neoplastischen Prozessen feststellte, hat die genaue Art des gegenseitigen Einflusses beider Epitope nicht näher erläutert (28). Andere Forscher beobachteten eine Reduktion der Bindung vom FMC7 bei gleichzeitiger Inkubation mit CD20-Antikörper (29).

Im Vergleich zum FMC7 ist das CD20-Antigen ausführlicher beschrieben. CD20 ist ein 33-37 kDa großes, nicht glykosiliertes, 297-Aminosäuren beinhaltendes, integrales Membran-Phosphoprotein, welches ausschließlich von der B-Lymphozytenreihe exprimiert wird. Die B-Zell-Differenzierung wird charakterisiert durch eine konstante CD20-Expression von den prä-B-Vorstufen bis zu Plasmazellen (30).

Die Aminosäuresequenz des Proteins und die molekulargenetische Sequenzierungs-Analyse der isolierten CD20-cDNA weist auf die Struktur und die Position des Moleküls auf der Zellmembran hin (31-33). Das Antigen hat zwei extensive intrazytoplasmatische Carboxy- und Amino-Termini (50% des Moleküls), vier hydrophobe Transmembranregionen (TMR 1-4), eine kurze und eine lange Schleife (35%) und nur eine relativ kurze extrazelluläre Domäne zwischen TMR3 und TMR4 (15%, s. Abb.1.1).

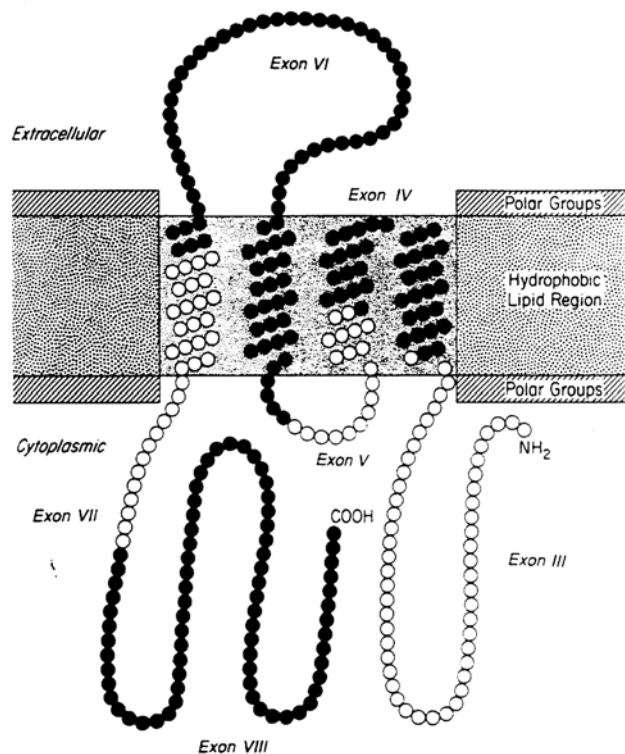


Abb.1.1: Schematische Darstellung der CD20-Antigenstruktur (31)

Die CD20-Epitope, die auf der relativ kurzen extrazellulären Domäne liegen, wurden zum ersten mal mit dem B1-MAK (Prototyp-Antikörper) identifiziert (34). Der CD20-Cluster wurde entsprechend beim „Leukocyte Typing Workshop II“ etabliert.

Die Bindung von MAK an CD20-Epitope moduliert die B-Zell-Proliferation und Differenzierung und beweist damit die Rolle des Moleküls als Transmembran-Signal-Transmitter. Diese Funktion wird der Aktivierung einer Reihe membran-subordinierter, intrazellulärer Kinasen (Phosphokinase C (PKC), Serin/Threonin-Kinasen Src-Familie: Lyn, Fyn, Lck), sowie nachgewiesenen intrazellulären Ca^{2+} Konzentrationsveränderungen zugeschrieben (35-40). Immunpräzipitationsexperimente und elektrophysiologische Untersuchungen legen nahe, dass der Ca^{2+} -Influx durch Konformationsveränderungen des CD20-Moleküls, das größere Membran-Oligomer-Komplexe bilden kann, reguliert wird (41;42). Das Starterereignis der CD20-Signalkaskade nach der Antikörper-Bindung ist die schnelle Umverteilung der CD20-Moleküle zu Plasma-Membran-Mikroinvaginationen (DIGS – detergent-insoluble glycolipid-enriched structures) (37). Diese Membran-Mikrodomänen, wie die bekannten "caveolae", sind reich an Tyrosin-Kinasen, ATP-asen, G-Protein-verbundenen Rezeptoren und GPI-linked Proteinen (43-

45). Durch Mutagenese- und Transfektionsexperimente haben Deans et al. nachgewiesen, dass die dynamische CD20-Translokation von der proximalen Membran-Sequenz des zytoplasmatischen Carboxy-Terminus des Moleküls abhängig ist. Dasselbe Segment kann auch einen Steuerungseffekt bei der von CD20-Antikörpern induzierten Assoziation mit anderen Membran-Proteinen ausüben und eine induzierende Rolle bei dem Oligomerisationsprozess des CD20-Moleküls spielen (46).

Sowohl die CD20-Antigenstruktur als auch die Eigenschaft, in Multimerform als Ionenkanal zu funktionieren, sind anderen Ionenkanalformationen ähnlich (47). Ihre Umverteilungsfähigkeit ist mit anderen Rezeptorstrukturen vergleichbar (Muscarin-Acetylcholin- und Bradykinin-Rezeptors, GPI-verbundene Proteine, hochaffiner IgE-Rezeptor-Fc ϵ RI β) (48;49).

Die einheitliche, stabile und dichte Membran-Expression des CD20-Antigens während der B-Zell-Differenzierung und ihr Nachweis bei mehr als 90% der B-Zell-NHL machte das Molekül zum geeigneten Target der ersten zugelassenen Antikörpertherapie dieser Erkrankungen (50;51).

Rituximab (MabThera) ist ein gentechnisch hergestellter chimärer CD20-Antikörper mit einer variablen Maus-Region (Schwer- und Leichtkette) und einer konstanten humanen Region (IgG₁-Schwer- und κ -Leichtkette (52).

Die Behandlung mit Rituximab verursacht eine unmittelbare B-Zell-Depletion durch antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) und komplementvermittelte Zytolyse (CDC) (51). Der prolongierte Antitumor-Effekt der Antikörperbindung kann zugleich einer Induktion intrinsischer Mechanismen der Apoptose zugeschrieben werden (53). Die Schlüsselmechanismen der CD20-induzierten Apoptose wurden von mehreren Arbeitsgruppen untersucht: eine Vielzahl von intrazellulären Transmittern, Enzymsystemen und Targetproteinen (Protein-Tyrosin-Kinasen Lck und Fyn, Caspase-3-Kaskade, Bcl-2-Familie-Mitglieder Bad, Bax- α und Bax-xL u.a.) sind Teil dieser Signalkaskade. Es ist nachgewiesen, dass die Rituximab-induzierte Apoptose von den gleichen intrazellulären Signalwegen wie der BCR-modulierte Zelltod abhängig ist (54).

Ziele der vorliegenden Arbeit:

Rituximab wird in der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie/Onkologie, Campus Virchow Klinikum seit 1998 bei der Behandlung von Patienten mit B-NHL eingesetzt.

Die Fragestellungen der vorliegenden Arbeit sind:

- Quantitative und qualitative Veränderungen von B-Zellantigenen unter Rituximab-Therapie
- FMC7-Expression der malignen B-Zell-Population und deren Veränderung unter Rituximab-Therapie
- Untersuchung einer möglichen genetischen Verwandtschaft des CD20- und FMC7-Antigens.

2 MATERIAL und METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Untersuchte Proben

In dieser Arbeit wurden Proben aus Patientenblut und humanen malignen B- und non-B-Zell-Linien bearbeitet. Die Blutzellen wurden einer durchflusszytometrischen Analyse unterzogen, um unter Rituximab-Therapie aufgetretene Veränderungen des Immunphänotyps zu erfassen. Für *In-vitro*-Blockierungsexperimente mit unkonjugierten CD20- und FMC7-Antikörpern, die Aktivierung mit PMA (phorbol12-myristate13-acetate) und für die Untersuchung der *De-novo*-CD20- und -FMC7-Expression nach Transfektion mit CD20-cDNA wurden permanente Zell-Linien eingesetzt.

2.1.2 Patienten

2.1.2.1 Charakteristika

In der vorliegenden Arbeit wurden 12 Patienten mit B-CLL und 10 Patienten mit refraktären indolenten B-NHL, die im Rahmen der Therapie-Studien mit dem humanisierten CD20 Antikörper Rituximab (MabThera®, Hoffman-La Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) behandelt wurden, untersucht. Die detaillierte Patientenbeschreibung ist in Tabelle 2.1 dargestellt. Im Laufe ihrer Erkrankung waren diese Patienten mit einer Chemotherapie behandelt worden, ohne dabei andere immunmodulierende Medikamente erhalten zu haben. Alle Patienten hatten vor der Immuntherapie mit Rituximab durchflusszytometrisch nachweisbare monoklonale B-Zellen im peripheren Blut.

Nach Genehmigung durch die Ethik-Kommission wurden die Patienten mit B-CLL im Rahmen der klinischen Studie "B-CLL und MabThera" (Virchow-Klinikum) behandelt (62). Außerhalb dieser Studie wurden auch Patienten mit progredienten CD20-positiven B-Lymphomen, die auf vorangegangene Chemo- und Strahlentherapien nicht angesprochen oder ein Rezidiv hatten, mit Rituximab behandelt. Die Behandlung erfolgte mit "informed consent".

Tabelle 2.1

Nr.	Patient	Geschl.	Alter	Diagnose	Immunphänotyp (positive Marker)
1.	Z. J. ^{1,2}	M	58	B-CLL	CD19, CD20 ⁺ , FMC7 ⁺ , λ, CD5, CD23
2.	W. H. ^{1,2}	F	64	B-CLL	CD19, CD20 ⁺⁺ , FMC7 ⁺ , λ, CD5, CD22, CD23
3.	St. H. ¹	M	65	MZL	CD19, CD20 ⁺⁺ , FMC7 ⁺ , κ, CD5, CD22, CD23
4.	P. W. ^{1,2}	M	57	B-CLL	CD19, CD20 ⁺ , FMC7 ^{neg} , λ, CD5, CD23
5.	K. I. ^{1,2}	F	62	B-CLL	CD19, CD20 ⁺ , FMC7 ^{neg} , λ, CD5, CD23
6.	H. W. ^{1,2}	M	62	B-CLL	CD19, CD20 ⁺ , FMC7 ⁺ , λ, CD5, CD23
7.	H. A. ^{1,2}	M	49	B-CLL	CD19, CD20 ⁺ , FMC7 ⁺ , κ, CD5, CD23
8.	C. B. ^{1,2}	M	51	B-CLL	CD19, CD20 ⁺ , FMC7 ⁺ , λ, CD5, CD23
9.	E. A. ²	F	63	B-CLL	CD19, CD20 ⁺ , FMC7 ⁺ , κ, CD5, CD23
10.	F. C. ²	F	53	B-CLL	CD19, CD20 ⁺ , FMC7 ^{neg} , λ, CD5, CD23
11.	Z. A. ²	F	64	B-CLL	CD19, CD20 ⁺ , FMC7 ⁺ , λ, CD5, CD23
12.	S. B. ²	M	54	B-CLL	CD19, CD20 ⁺ , FMC7 ^{neg} , κ, CD23
13.	S. E. ^{1,2}	M	51	B-CLL	CD19, CD20 ⁺ , FMC7 ⁺ , λ, CD5, CD23
14.	B. G. ¹	M	59	NHL	CD19, CD20 ⁺⁺ , FMC7 ⁺⁺ , κ, CD5, CD22
15.	C. K. ¹	M	58	FL	CD19, CD20 ⁺⁺⁺ , FMC7 ⁺⁺⁺ , λ, CD5, CD22
16.	G. H. ^{1,2}	M	71	MCL	CD19, CD20 ⁺⁺⁺ , FMC7 ⁺⁺⁺ , λ, CD5, CD22
17.	J. D. ^{1,2}	M	50	MCL	CD19, CD20 ⁺⁺⁺ , FMC7 ⁺⁺⁺ , κ, CD5, CD22, CD23
18.	Z. G. ¹	F	69	FL	CD19, CD20 ⁺⁺⁺ , FMC7 ⁺⁺⁺ , λ, CD22
19.	W. G. ^{1,2}	M	65	MCL	CD19, CD20 ⁺⁺⁺ , FMC7 ⁺⁺⁺ , κ, CD5, CD22
20.	E. S. ^{1,2}	F	60	IC	CD19, CD20 ⁺⁺⁺ , FMC7 ⁺⁺ , κ, CD22
21.	H. K. ¹	M	71	MCL	CD19, CD20 ⁺⁺⁺ , FMC7 ⁺⁺⁺ , κ, CD5, CD22
22.	E. M. ^{1,2}	F	56	FL	CD19, CD20 ⁺⁺ , FMC7 ⁺⁺ , κ, CD22

¹ Patienten mit einer Kurzzeit-Untersuchung bis zur 24. Stunde nach Therapiebeginn; ² Patienten mit einer langfristigen Untersuchung nach Rituximab-Behandlung.

+++ - Hauptpopulation mit starker CD20- oder FMC7-Fluoreszenzintensität. ++ - die Mehrzahl der Zellen exprimiert die Antigene in einer mittleren Stärke. + - schwache Fluoreszenzintensität oder kleine positive Population.

B-CLL – Chronische lymphatische B-Zell-Leukämie; MZL – Marginal-Zell-Lymphom; NHL – Non-Hodgkin Lymphom; FL Follikuläres Lymphom; IC – Immunocytom; MCL – Mantel-Zell-Lymphom.

2.1.2.2 Rituximab-Behandlung

Rituximab wurde in einer Dosis von 375 mg/m^2 (bis zu maximal 500 mg absolut) einmal pro Woche in vier aufeinanderfolgenden Wochen eingesetzt. In der ersten Woche erfolgte die Therapie an drei aufeinander folgenden Tagen in steigender Dosierung. In den Wochen 2 bis 4 konnte die Dosis von 375 mg/m^2 in einer Infusion über 4-5 Stunden unter ambulanten Bedingungen verabreicht werden (s. Tab. 2.2).

Tabelle 2.2: Applikationsschema für die erste Rituximab-Gabe

Tag	Stunde	Dosis (mg/Stunde)	Maximaldosis (mg)
1.	1. und 2.	5	50 mg
	3. und 4.	10	
	5.	20	
2.	Über mindestens 4 Stunden		150 mg
3.	Über mindestens 4 Stunden		Rest der Dosis (ad 500 mg)

2.1.2.3 Probenentnahme

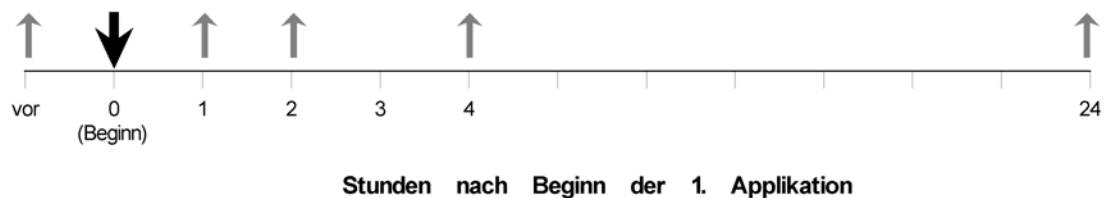
Die durchflusszytometrische Untersuchung von Blutproben der behandelten Patienten erfolgte am ersten Tag vor Therapie sowie nach 1, 2, 4 und 24 Stunden (Kurzzeit-Verlauf). In den folgenden Wochen wurden die Proben jeweils vor Behandlungsbeginn entnommen (Langzeit-Verlauf) (s. Abb. 2.1).

Die Kurzzeitkinetik-Patientengruppe umfasste 18 Patienten, darunter 10 mit B-NHL und 8 mit B-CLL, bei denen insgesamt 19 Verlaufsuntersuchungen durchgeführt wurden. Bei einem CLL-Patienten (Nr.5 in der Tab.2.1) wurde die Untersuchung auch im zweiten Rituximab-Therapiezyklus nach 3 Monaten wiederholt.

Daten zum Langzeit-Verlauf liegen bei 17 Patienten vor. Hierbei wurden alle 4 Applikationen des Therapiezyklus sowie der Verlauf 1, 5 und 8 Wochen nach Ende der Therapie von durchflusszytometrischen Kontrollen begleitet. Die Anzahl der zu jedem Zeitpunkt gemessenen Proben ist bei der Ermittlung der Ergebnisse in Klammern gezeigt.

Die Zeitintervalle der durchflusszytometrischen Untersuchungen im Zusammenhang mit den Rituximab-Applikationen sind in Abbildung 2.1 schematisch dargestellt.

A



B

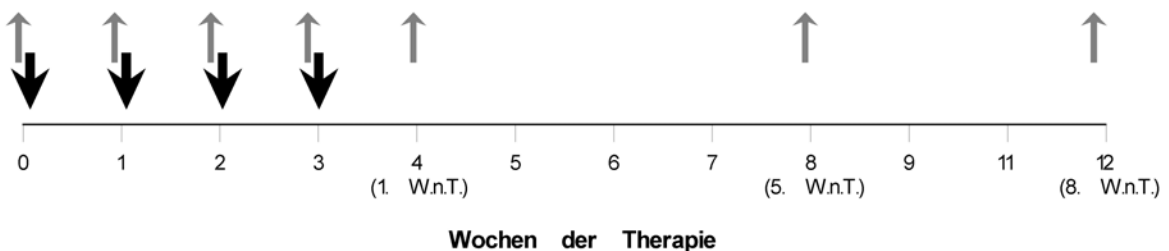


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Rituximab-Applikationen (↓) und der Probenentnahmen (↑):
A - Kurzzeit-Beobachtung (bis 24. Std.)
B - Langzeit-Beobachtung (bis 8. Woche nach Therapie - W.n.T.)

2.1.3 Kontrollgruppe

Es wurden zusätzlich Blutproben von 40 zufällig ausgewählten Patienten untersucht, die keine onkologischen oder hämatologischen Erkrankungen hatten. Die Untersuchungen erfolgten an Restblut nach Routineblutbild. Zusätzliche Blutentnahmen ausschliesslich zu Forschungszwecken waren nicht erforderlich.

2.1.4 Zell-Linien

Für die *In-vitro*-Blockierungsexperimente mit unkonjugierten CD20- und FMC7-Antikörpern, die Aktivierung mit PMA sowie für die Untersuchung einer CD20-Expression nach Transfektion mit CD20-cDNA wurden folgende Zell-Linien eingesetzt (s. Tab. 2.3):

Tabelle 2.3: Verwendete Zell-Linien

Bezeichnung	Zelltyp (alle human)	Expression*		Von
		CD20	FMC7	
Daudi	Burkitt-Lymphom	+	Neg.	DSMZ
JVM-2	B-CLL	+	+	DSMZ
CESS	lymphoblastoide	+	+	DSMZ
K-562	myeloische	Neg	Neg	ATCC
PB-697	Prä-B-ALL	Neg	Neg	ATCC

* konstitutive CD20-Expression (vorgegebene Zellcharakteristik). Die FMC7-Expression wurde in den Vor-experimenten der Arbeit untersucht.

2.2 Methoden

Hauptuntersuchungsmethode bei allen quantitativen und qualitativen Untersuchungen an Patientenblut und Zell-Linien war die Durchflusszytometrie.

2.2.1 Untersuchungen an peripherem Blut

2.2.1.1 Antikörperpanel

In dieser Studie wurden direkt konjugierte monoklonale Antikörper (MAK) benutzt, die in einem Inkubationsschritt an die jeweiligen Zellepitope binden. Die durch die Hersteller empfohlenen chargenbezogenen Antikörperkonzentrationen wurden vor Beginn der Studie laborintern durch Titration überprüft. Die benutzten MAK für die Färbung von etwa 1×10^6 Leukozyten sind in Tabelle 2.4 aufgelistet. Die benötigten Mengen an Antikörpern pro Ansatz wurden in separaten Gefäßen gemischt und daraus pipettiert, womit die Gefahr des Pipettierens ungleicher Mengen an Antikörpern pro Aliquot im Verlauf der gesamten Untersuchungszeit minimiert wurde.

Es wurde der Anteil der B- (CD45/CD19-positiv) und T-Lymphozyten (CD45/CD3-positiv) als auch der T-Lymphozyten-Subpopulationen (CD4/CD3-positiv T-Zellen,

CD8/CD3-positive T-Zellen und CD56/CD16 positive und gleichzeitig CD3 negative NK-Zellen) bestimmt.

Tabelle 2.4: Liste der verwendeten monoklonalen Antikörper.

Anti-gen	Klon	Klas-se	Fluoro-chrom	Vol. (µl)	Detektion von	Hersteller
CD3	SK7	IgG ₁	PE	5	Pan-T-Zellen	BD, Heidelberg
CD3	UCHT1	IgG ₁	APC	10	Pan-T-Zellen	B-C, München
CD4	13B8.2	IgG ₁	FITC	10	T-Helferzellen	Fertigkombination –
CD8	B9.11	IgG ₁	PE		T-Supressorzellen	B-C
CD5	BL1a	IgG _{2a}	FITC	10	Pan-T-Zellen	B-C
CD3	UCHT1	IgG ₁	FITC	15	NK-Zellen	Fertigkombination – B-C
CD16	3G8	IgG ₁	PE			
CD56	N901/NKH-1	IgG ₁	PE			
CD19	J4.119	IgG ₁	PE	10	Pan-B-Zellen	B-C
CD20	B9E9 (HRC20)	IgG _{2a}	FITC	10	Pan-B-Zellen	B-C
CD22	SJ10.1H11	IgG ₁	FITC	10	Pan-B-Zellen	B-C
CD23	9P25	IgG ₁	FITC	10	B-Zellen	B-C
CD45	2D1	IgG ₁	FITC	10	Pan-Leukozyten	BD
FMC7	FMC7	IgM	FITC	10	B-Zellen	B-C
λ-Kette	Polyklonal	IgG ₁	FITC	20	B-Zellen, Leichtketten	Fertigkombination – B-C
CD19	J4.119	IgG ₁	PE			
κ-Kette	Polyklonal	IgG ₁	FITC	20	B-Zellen, Leichtketten	Fertigkombination – B-C
CD19	J4.119	IgG ₁	PE			

FITC – Fluoreszeinisothiozyanat, PE- Phycoerythrin; APC – Allophycoerythrin; B-C – Beckman-Coulter

Die B-Zellpopulation wurde durch die Expression des CD19-Antigens definiert, die Marker für die weitere immunphänotypische Charakterisierung der monoklonalen B-Zell-Population waren: CD5, CD20, CD22, CD23 und FMC7. Die Untersuchung wurde jeweils als Zweifarbenfluoreszenzmessung durchgeführt. Zur Zeit der Ausgangsuntersuchungen war der Anteil der durchflusszytometrisch nachweisbaren monoklonalen Zellen bei den meisten Proben höher als 90% der gesamten B-Zellpopulation. Der Anteil der

monoklonalen B-Zell-Population wurde bei der Mehrheit der Patienten mit CLL oder MCL (s. Tab. 2.1), durch die charakteristische Koexpression von CD5 bestimmt. Bei allen Patienten wurde auch die Ig-Leichtkettenexpression (λ oder κ) als Merkmal der Monoklonalität ausgewertet. Die exakte Zusammensetzung des Panels ist in Tabelle 2.5 dargestellt:

Tabelle 2.5: Antikörperkombinationen für die Charakterisierung der Zellpopulationen

Nr.	Zwei-oder Dreiparameterkombination	Zellpopulation
1	CD45 vs CD19	B-Zellen
2	CD45 vs CD3	T-Zellen
3	CD16 und CD56 vs CD3	NK-Zellen
4	CD5 vs CD19	T-Zellen, maligne CLL/MCL-Zellen
5	CD20 vs CD19	B-Zellen
6	CD22 vs CD19	B-Zellen
7	CD23 vs CD19	B-Zellen
8	FMC7 vs CD19	B-Zellen
9	κ vs CD19	B-Zellen
10	λ vs CD19	B-Zellen
11	CD4 vs CD8 vs CD3	T-Helfer- und T-Suppressor-, T-Zellen

Bei den Blutproben von Patienten der Kontrollgruppe (ohne hämatologisch-onkologische Erkrankungen) wurde ausschließlich die CD20- und FMC7-Expression der CD19-positiven Zellpopulation untersucht.

Bei den vorliegenden durchflusszytometrischen Experimenten wurden die Autofluoreszenzen der für den bestimmten Marker negativen mononukleären Zellen als „interne“ Negativkontrolle benutzt. Es wurden daher keine Isotypkontrollen verwendet.

2.2.1.2 Blutentnahme und Vorbereitung

Alle Vollblutproben der Patienten wurden in 2,7 ml K-EDTA S-Monovetten (Sarstedt, Nümbrecht) abgenommen und bis zur Aufarbeitung für maximal 10 Stunden bei Raum-

temperatur gelagert. Die Zellzahl und das Differentialblutbild wurden mit hämatologischen Analyseautomaten bestimmt (Cell-Dyn 3500, Abbott GmbH Diagnostics, Bayer Technicon H3, Bayer Diagnostics GmbH).

Alle Proben mit einer Leukozytenzahl über 10.000 Leukozyten/ μl wurden vor der weiteren Verarbeitung durch PBS-Verdünnung (Dulbeco's PBS, ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} , Gibco BRL) auf eine Zellkonzentration von ca. 10.000 Leukozyten/ μl eingestellt (s. Punkt 2.2.1.1 zur Begründung).

2.2.1.3 Erythrozytenlyse

Bei dem gesamten Vollblutmaterial wurde die „Lyse vor der Färbung“ - Präparationsmethode angewandt. Somit wurden die quantitativen Verhältnisse der einzelnen Zellpopulationen im Material gewahrt und eine Bestimmung der Leichtkettenexpression auf den B-Zellen ermöglicht.

Entsprechend des für die erwünschte Immunphänotypisierung ausgewählten Panels, wurden einzelne Röhrchen (4,5 ml, Falcon, BD) vorbereitet, beschriftet und mit jeweils 100 μl Blutvolumen pro Ansatz gefüllt (s. Punkt 2.2.1.1). Das pro Röhrchen anzusetzende Volumen an Untersuchungsmaterial mit einer absoluten Zellzahl von ca. 1×10^6 Leukozyten pro Ansatz wurde während des ganzen Untersuchungsprozesses konstant gehalten.

Die Erythrozyten wurden wie folgt lysiert:

- Zugabe von 2 ml der Lyse-Gebrauchslösung (Ortho™ ad 100 ml mit Aqua dest. verdünnt, Ortho-Clinical Diagnostics, Johnson & Johnson Co.) zu jedem Ansatz;
- Vortexen und danach für 12 Min. bei Raumtemperatur Inkubieren;
- Zwei Waschschrte zur Entfernung der Lyselösung mittels Zentrifugation für 4 Min. bei 250 g und Raumtemperatur (Megafuge 1.0, Haereus Seratech), anschliessend Absaugen des Überstandes und Resuspendieren des Sediments mit 2 ml PBS (Dulbeco's PBS, ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} , Gibco BRL);
- Erneute Zentrifugation unter den o.g. Bedingungen;

- Resuspendieren des Zellpellets mit 100 µl PBS (Dulbecco's PBS, ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} , Gibco BRL).

2.2.1.4 Färbung

Die Zellen wurden mit den entsprechenden MAK-Kombinationen wie folgt markiert:

- Pipettieren der entsprechenden Mengen Antikörper aus den vorbereiteten Kombinationen in die jeweiligen Röhrchen (s. Tabelle 5);
- Mischen für ca. 2 Sek. mittels Vortex-Gerät;
- Inkubieren für 20 Min. bei Raumtemperatur;
- Ein Waschschrift zur Entfernung der ungebundenen Antikörper unter den beschriebenen Bedingungen (s. Punkt. 2.2.1.3);
- Resuspendieren des Zellpellets mit 200 µl PBS zum Messen.

Die Proben wurden innerhalb von 2 Stunden nach der Aufbereitung, ohne Fixation, gemessen.

2.2.1.5 Geräteeinstellung, Datenakquisition, Parameterdarstellung

Die Datenakquisition bestand aus einer gleichzeitigen Messung von Forward-Scatter (FSC), Side-Scatter (SSC) und von bis zu 3 getrennten Fluoreszenzsignalen der gebundenen Fluorochrom-konjugierten MAK. Für die Immunfluoreszenzanalysen stand ein Durchflusszytometer vom Typ FACSCalibur™ (BD) zur Verfügung. Das Durchflusszytometer war mit zwei Lasern ausgestattet: ein 488 nm Argonlaser für die Fluorochrome FITC und PE und ein 635 nm Red-diode Laser für das Fluorochrom APC. Dadurch wurde eine simultane Messung dieser Dreifarben-Kombinationen ermöglicht.

Die Grundeinstellung der Fluoreszenzsignalverstärkung und der Fluoreszenzkompensation wurde durch Messung von standardisierten herstellereinspezifischen Testpartikeln (CaliBRITE™ 3 und CaliBRITE™ APC, BD) mit einem automatisierten Software-Programm (FACSCComp™, BD), d.h. Software-gesteuert, regelmässig überprüft. Dadurch wurde das Gerät kalibriert.

Die korrekte Einstellung der FSC- und SSC-Detektoren (im linearen Modus) ermöglichte die Erfassung aller Leukozyten und die deutliche Abgrenzung ihrer Subpopulationen (Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten). Die Verstärkung der Fluoreszenzdetektoren (im logarithmischen Modus) war anhand der Autofluoreszenzintensität nicht gefärbter Lymphozyten so gewählt, dass alle negativen Zellen sich innerhalb der ersten Dekade der Verstärkung befanden. Die Farbkompensation erfolgte durch die Messung einer zweifarbigen, sich gegenseitig ausschließenden Zellmarkerkombination (CD3-FITC/CD19-PE). Die Kompensation wurde für die Fluoreszenz des CD19-Antigens optimiert. Da das Gerät eine gute Stabilität der Messcharakteristika zeigte, blieben die ausgewählten Verstärkungs- und Kompensationsparameter über die Periode der Untersuchungen gleich. Dadurch ließen sich die Akquisitionsdaten der verschiedenen Patienten zu unterschiedlichen Zeitpunkten weitgehend miteinander vergleichen.

Die Messungen wurden mit CellQuest™ (Version 3.1, BD), bei einer mittleren Durchflussrate und einer 256 Kanal-Auflösung durchgeführt.

Während der Datenaufnahme wurden 4 Akquisitions-Standardfenster (Acquisition Dot-plots) auf dem Bildschirm präsentiert: FSC/SSC, FL1/FL2, SSC/FL1, SSC/FL2. Anhand des FSC konnte die diskriminierende Grenze (threshold) zwischen den in die Auswertung eingehenden Zellen (Leukozyten) und dem Debris so gesetzt werden, dass mit Sicherheit alle Lymphozyten in die Messung eingeschlossen wurden, ohne dabei zu viel Verunreinigungsereignisse aufzunehmen. Bei jeder Messung wurden die Daten von 25.000 Zellen registriert, ohne einen Vorauswahl-Speicherparameter zu benutzen, und in Listenmodus gespeichert.

2.2.1.6 Auswertung – logische Verknüpfungen

Die gespeicherten Messdaten wurden mit dem gleichen Software Programm (Cell-Quest™) ausgewertet. Bei der Analyse der Ergebnisse wurde die Expression der untersuchten B-Zellantigene ausschliesslich auf der pathologischen Lymphomzellpopulation berücksichtigt. Es wurde ein graphisches Auswerteprotokoll ausgearbeitet, in dem die

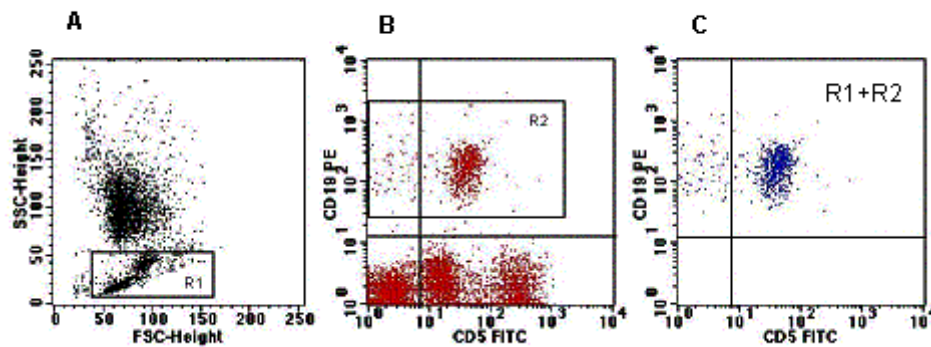


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Probenauswertung. R1 - Lymphozyten, bzw. mononukleäre Zellen (**A**); R2 – CD19-positive Zellen (**B**); R1+R2 – CD19-positive Zellen im Lymphozytengate; CD5-Koexpression von CD19-positiven Zellen im Lymphozytengate (**C** – oberer rechter Quadrant)

Streulicht- und Fluoreszenzsignale der Ziel-Zellpopulation in Form von zweiparametrischen Dot-Plots präsentiert und durch die im Programm definierten Analyseregionen und Quadrantenstatistik ausgewertet wurden (s. Abb. 2.2). Die statistische Angabe der % positiver Zellen bezog sich sowohl auf die Gesamtzahl der gemessenen Zellen, als auch auf die Population der eingegrenzten („Gate“) Zielzellen. Das geometrische Mittel wurde für die Darstellung der Prozentanteile genommen. Zusätzlich wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI auf Anzahl Kanäle bezogen) für den Vergleich der verschiedenen Expressionsstärken benutzt.

Die maligne Zellpopulation ließ sich durch ihre lymphozytenähnlichen Streulichtcharakteristika und die gleichzeitige Expression mehrerer B-Zellantigene identifizieren. Daraufhin wurde zuerst eine Region als Lymphozytengate (R1) hinsichtlich der beiden Streulichtparameter definiert. Da die deutliche Abgrenzung der lymphoiden Population nicht immer möglich war, wurde diese Region zunächst hinsichtlich des SSC z.T. breiter gesetzt, so dass sie die ganze mononukleäre Zellpopulation erfasste.

Die Definition einer zweiten B-Lymphozytenregion („Region 2“ – R2) auf den CD19-positiven Zellen erfolgte bei der graphischen Wiedergabe der Fluoreszenzen der CD5/CD19-Messung. Bei den meisten untersuchten Patienten, die die Diagnosen "CLL" oder "MCL" hatten, ließ sich die maligne Zellpopulation anhand der CD5-Koexpression am besten unterscheiden (2).

Nach einer elektronischen Verknüpfung der beiden bereits definierten Regionen (R1 und R2), wurde ein drittes logisches Fenster („Gate 3“ – R1+R2) erstellt, so dass die Zielzellpopulation über mehrere Eingrenzungskriterien (Streulichtparameter der Lymphozyten, CD19-Expression, CD5-Expression) zugeordnet werden konnte. So sollten alle durchflusszytometrisch nachweisbaren B-Zellen innerhalb von R3 erfasst werden. Die durch R3 definierten Messergebnisse wurden auf einem neuen FSC-SSC-Dot-Plot durch sog. „Back-Gating“ präsentiert und mußten eine einheitliche Population im Bereich der mononukleären Zellen bilden.

2.2.1.7 Auswertung der Lymphozytenpopulationen

Die Bestimmung des relativen Anteils der B-, T- und NK-Zellen, und auch der T-Lymphozytensubpopulationen (T-Helfer- und T-Suppressorzellen) erfolgte bezogen auf die gesamte gemessene Leukozytenpopulation. Die Lymphozytenpopulation wurde in den Messungen CD45-FITC/CD19-PE und CD45-FITC/CD3-PE als CD45-positiv definiert. Die T-Zellsubpopulationen wurden innerhalb der CD3-positiven Zellen mit einer Dreifarben-Kombination (CD4-FITC/CD8-PE/CD3-APC) bestimmt. Die NK-Zellen wurden mit dem CD3-FITC/CD16-PE/CD56-PE Ansatz als CD3-negativ und CD16/CD56-positiv quantifiziert.

Die absolute Zellzahl der verschiedenen Populationen wurde anhand der mit dem Zellzählautomaten gemessenen Leukozytenzahl und dem Differentialblutbild ermittelt.

2.2.1.8 Auswertung der malignen B-Zellpopulation

Bei der Analyse der untersuchten B-Zellantigene wurden nur solche Ereignisse berücksichtigt, die innerhalb von Gate 3 lagen.

Die Fluoreszenzen der jeweiligen Antigene auf der B-Zellpopulation wurden in korrelierenden Zweiparameter-Dot-Plots präsentiert. Die Positionierung der Quadrantendiskriminatoren zur Abgrenzung doppelt positiver Zellen orientierte sich generell an der Ver-

teilung der Autofluoreszenz der für den jeweiligen Marker negativen Zellen (s. Abb. 2.2). Für alle Messanalysen des gleichen Patienten wurde die Position der Quadrantenmarker während der Verlaufsbeobachtung beibehalten.

Die simultane graphische Präsentation der Fluoreszenzsignale sowohl auf der B-Zellpopulation im Gate 3, als auch auf den gesamten Zellereignissen im Lymphozytengate (R1) erlaubte einen Vergleich der Fluoreszenzintensitäten für bestimmte Antigene zwischen den verschiedenen Zellpopulationen in diesem Bereich (T-Lymphozyten, Monozyten, Zielzell-Population).

2.2.2 Untersuchungen mit Zell-Linien

Die Zell-Linien wurden für *In-vitro*-Blockierungsexperimente mit unkonjugiertem CD20- und FMC7-Antikörper, für Aktivierungsversuche mit PMA und für Untersuchungen zur *De-novo*-Antigen-Expression nach CD20-Transfektion benutzt. Bei den Blockierungsexperimenten wurde die stark CD20- und FMC7-exprimierende B-Zell-Linie CESS verwendet. Für die Transfektionsuntersuchungen wurde die myeloische K-562-Zell-Linie gewählt, die keine endogene CD20-Expression aufweist. Die PMA-Aktivierungsexperimente wurden mit der CD20-/FMC7-negativen prä-B-Zell-Linie PB-697 durchgeführt. Die Medium-Herstellung, Aliquotierung und Kultivierung der Zell-Linien wurden unter Sterilbedingungen durchgeführt (Sterile Werkbank – Cytoperm, Heraeus Instruments).

2.2.2.1 Kultivieren der Zellen

Die Zell-Linien wurden für die Untersuchungsperiode in komplettem Medium (s.u.) und in exponentieller Wachstumsphase gehalten. Das Medium hatte folgende Zusammensetzung (alles von Gibco BRL): RPMI-1640 mit GlutaMax™; 10% FKS (fötales Kälberserum), 1% Penicillin-G/Streptomycin Sulfat (10 µg/ml und 25 µg/ml Endkonzentration) und 1% Natriumpyruvat. Die Zellen wurden wie folgt kultiviert:

- Auftauen der eingefrorenen Zell-Linien bei 37°C im Wasserbad;

- Zwei Waschschriffe zur Entfernung des Kryoprotektors (DMSO) durch Resuspendieren in Medium und Zentrifugation für 10 Min. bei Raumtemperatur und 400 g;
- Resuspendieren des Zellpellets in Medium;
- Überführen in Zellkulturflaschen (BD, Heidelberg) und Inkubation bei 37°C, 5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank
- Weiterhin permanentes Aussäen – in einer den optimalen Aussaatbedingungen entsprechenden Zelldichte.

Dabei wurde die Zellzahl mittels Analyseautomat und die Vitalität mittels Trypanblau-Färbung unter Lichtmikroskop kontrolliert. Die für die einzelnen Experimente benötigten Zellmengen wurden nach Zellzahlbestimmung, einem Waschschriff mit Medium und Resuspendieren des Pellets in der entsprechenden Menge Medium vorbereitet.

2.2.2.2 CD20-Plasmid und Transfektion

Das bei den beschriebenen Transfektionsexperimenten verwendete CD20-Plasmid wurde von Prof. David Mason (Dept. of Cellular Science, University of Oxford, John Radcliffe Hospital, UK) zur Verfügung gestellt. Es hatte die Struktur des bekannten CD20-cDNA Klonen pB1-21A-29 (33).

Das 1,2-kb CD20-cDNA Insert ist unter Kontrolle eines CMV-Promotors in dem Plasmid-Vektor pCDM8 subkloniert. Das Konstrukt hat eine Größe von 8000 bp, ist Kanamycin resistent und wurde in der Literatur als effektiv bei der Transfektion von T-Zell-Linien (COS-1) beschreiben (56).

Bei den vorliegenden Experimenten mit der myeloischen K-562-Zell-Linie wurde eine transiente CD20-cDNA-Transfektion mittels Elektroporation erreicht. Diese Transfektionsmethode basiert auf der Möglichkeit, die Zellmembran mittels hochintensiver elektrischer Pulse kurzfristig zu destabilisieren und so eine Permeabilität für die exogenen DNA-Moleküle zu erzielen. Die optimalen DNA-Mengen wurden im Laufe der Experimente anhand der durchflusszytometrisch gemessenen Transfektionseffizienz bestimmt, sie lagen zwischen 2 und 5 µg Plasmid-DNA/1x10⁶ myeloische Zellen.

Die benötigte Zellsuspension wurde sedimentiert, in 500 µl Medium resuspendiert und in 4 mm-Elektroporationsküvetten (ECU-104, PEQLAB) überführt. Zu jeder Probe wurde die entsprechende Menge vom Plasmid oder dem pCDM8 Mock-Vektor als Kontrolle zugegeben. Die Elektroporation erfolgte durch das EquiBio-System (Boughton Monchelsea Kent, UK) unter folgenden technischen Bedingungen: 1050 microfarads (µF), 260V. Anschließend wurden die Zellen schnell in 10 ml komplettem Medium resuspendiert, für 120-Stunden weiter inkubiert und analysiert.

Die *De-novo*-CD20-Expression wurde in 24-Stunden-Intervallen durchflusszytometrisch überprüft, wobei die transfizierten Zellen zunächst sedimentiert, in RPMI 1640 mit 10% FKS zu einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/mL resuspendiert und schließlich mit der entsprechenden Antikörperkombination gefärbt wurden.

Die benutzten Mengen an Antikörper sowohl bei der Transfektionseffizienz-Überprüfung als auch bei den Blockierungsexperimenten sind in Tabelle 2.6 aufgelistet. Es wurden die gleiche Färbetechnik und die gleichen Prinzipien der Geräteeinstellung bei den durchflusszytometrischen Messungen wie in Punkt 2.2.1.4 beschrieben, verwendet.

2.2.2.3 Blockierungsexperimente mit B-Zell-Linien

Bei den B-Zell-Linien CESS, JVM und DAUDI wurden die Veränderungen der CD20- und FMC7-Antigenexpression nach einer Präinkubation mit den entsprechenden unkonjugierten Antikörpern untersucht.

Die benötigte Zellsuspension wurde sedimentiert und in einer Zellkonzentration von 1×10^6 /ml in RPMI-1640 Medium resuspendiert. Nach der Messung der für jede Zelllinie charakteristischen konstitutiven CD20- und FMC7-Expression (CD20-FITC/CD19-PE, FMC7-FITC/CD19-PE) wurden im ersten Schritt die Zellen mit unkonjugiertem CD20(B1)- und FMC7-Antikörper, sowie mit irrelevantem MAK (5 µg des unkonjugierten MAK pro 1×10^6 Zellen) für 60 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Im zweiten Inkubationsschritt folgte eine separate Färbung von je drei 100 µl Ansätzen jeder vorinkubierten

B-Zell-Linie mit den folgenden Antikörperkombinationen: CD45-FITC/CD20-PE, FMC7-FITC/CD19-PE und irrelevanten IgM-Antikörpern (s. 2.2.1.4).

Bei der CESS-Zell-Linie, die eine konstitutive CD23-Expression aufwies, wurden zusätzlich 4-stündige Blockierungsversuche bei 37°C im Wasserbad mit den Prototyp CD20(B-1), FMC7 und irrelevanten Kontrollantikörpern, entsprechend der von Borget et al. beschriebenen Methode durchgeführt. (57) Bei den Experimenten wurden die Modulationseffekte der Vorinkubation auf die CD23-Expression mit der MAK-Kombination CD23-FITC/CD19-PE untersucht. Die Ergebnisse der MFI von vier solchen Experimenten wurden analysiert.

Die durchflusszytometrische Analyse der Blockierungsexperimente erfolgte über alle 20000 Zellen, die ohne einen Vorauswahl-Speicherparameter bei jeder Messung registriert wurden. Es wurden die mittleren Fluoreszenzintensitäten ausgewertet.

Die verwendeten Klone und Antikörperkonjugate sowie die Antikörpermengen pro Ansatz sind in der nachfolgenden Tabelle 2.6 dargestellt.

Tabelle 2.6: Liste und Charakteristika der für die Blockierungsexperimente verwendeten MAK.

Antigen	Klon	Klasse	Fluorochrom	Vol. (µl)*	Katalog-Nr. Hersteller
CD20	B1-Coulter Clone H299 (b1)	IgG _{2a}	unkonjugiert	10	B-C, München
FMC7	FMC7	IgM	unkonjugiert	10	Biozol, Serotec, Oxford, UK
irrelevant	κ MOPC 21	IgG ₁	unkonjugiert	10	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
irrelevant	GC323	IgM	FITC	10	B-C
irrelevant	u.727	IgG _{2a}	PE	10	B-C
CD20	B9E9 (HRC20)	IgG _{2a}	FITC	10	B-C
FMC7	FMC7	IgM	FITC	10	B-C
CD19	J4.119	IgG ₁	PE	10	B-C
CD19	J4.119	IgG ₁	FITC	10	B-C
CD45	2D1	IgG ₁	FITC	10	BD, Heidelberg
CD23	9P25	IgG ₁	FITC	10	B-C

Tabelle 2.6: Liste und Charakteristika der für die Blockierungsexperimente verwendeten MAK.

Antigen	Klon	Klasse	Fluorochrom	Vol. (μ l)*	Katalog-Nr. Hersteller
CD20	B9E9	IgG _{2a}	PE	10	B-C
CD20	IDEC-C2B6 MabThera®	Maus, humanisiert	unkonjugiert	5% (1:10 Verd.)	Hoffman la Roche, Bazel

*pro Ansatz von 10^5 Zellen; FITC – Fluoreszeinisothiozyanat, PE- Phycoerythrin;; B-C – Beckman-Coulter; BD – Beckton-Dickinson

2.2.2.4 Aktivierungsexperimente mit PMA

Die CD20/FMC7-negative prä-B-Zell-Linie PB-697 wurde in komplettem Medium mit und ohne Zugabe von 5 ng PMA (Phorbol12-myristate13-acetate; Sigma, Taufkirchen) pro ml (ca. 5×10^5 Zellen) kultiviert. 100 μ l-Aliquote der behandelten und der Kontroll-Suspension wurden mit den Antikörperkombinationen CD20B1-FITC/CD19-PE, FMC7-FITC/CD19-PE und Kontroll-IgM-Antikörper unter den beschriebenen Bedingungen inkubiert (2.2.1.4). Die gefärbten Proben wurden für eine induzierte Antigenexpression durchflusszytometrisch bis zur 36. Stunde der PMA-Inkubation analysiert.

2.3 Statistik

Die während der kurz- und langfristigen Patientenbeobachtung untersuchten Parameter wurden für die gesamte Gruppe der behandelten Patienten analysiert. Da es Unterschiede im Immunphänotyp und daher in der Positivität und Expressionsintensität für bestimmte Antigene (CD5, CD22, CD23) zwischen den verschiedenen Erkrankungen gab, wurden nur Antigen-positive Fälle für die folgende statistische Analyse herangezogen.

Es wurden die prozentualen Anteile der verschiedenen Zellsubpopulationen ermittelt.

Die Antigen-Expression wurde als relative Fluoreszenzintensität vom geometrischen Mittelwert der Kanalzahlen präsentiert.

Alle ermittelten Absolut- und Prozentzahlen bei den entsprechenden Untersuchungen sind als Medianwerte mit entsprechenden Minima und Maxima dargestellt, da keine Normalverteilung vorlag.

Für die statistische Bearbeitung des Datenmaterials wurden sowohl deskriptive als auch konfirmatorische Methoden verwendet. Die Daten wurden zuerst auf Normalverteilung (Gaus'sche) untersucht (Kolmogorov-Smirnov-Test). Da die überwiegende Mehrzahl der Variablen keine Normalverteilung aufwies, wurden für die Darstellung und den Vergleich folgende statistische Methoden eingesetzt: Median, Minimum und Maximum für die deskriptive Analyse; Mann-Whitney-U, Wilcoxon-W-Test für den Vergleich ($p < 0,05$ wurde als signifikant gewählt) und der Pearson-Korrelationstest.

3 ERGEBNISSE

3.1 Mit Rituximab-behandelte Patienten

3.1.1. Leukozytenzahl, Differentialblutbild und Lymphozytenpopulationen

3.1.1.1 Kurzzeit-Verlauf (24 Stunden)

Schon 60 Min. nach Beginn der Rituximab-Infusion war eine erhebliche Reduktion der Leukozytenzahl festzustellen, die über die nachfolgenden Messintervalle bis zur 24. Stunde signifikant blieb (s. Abb. 3.1).

Die Auswertung der Differentialblutbilder zeigte, dass diese Zelldepletion am stärksten die Lymphozytenpopulation betraf, deren Prozentanteil von 60% auf 16,6% ($p=0,01$) nach 2 Stunden fiel und am Infusionsende um 33,1% niedriger als vor der Therapie war (s. Abb. 3.2).

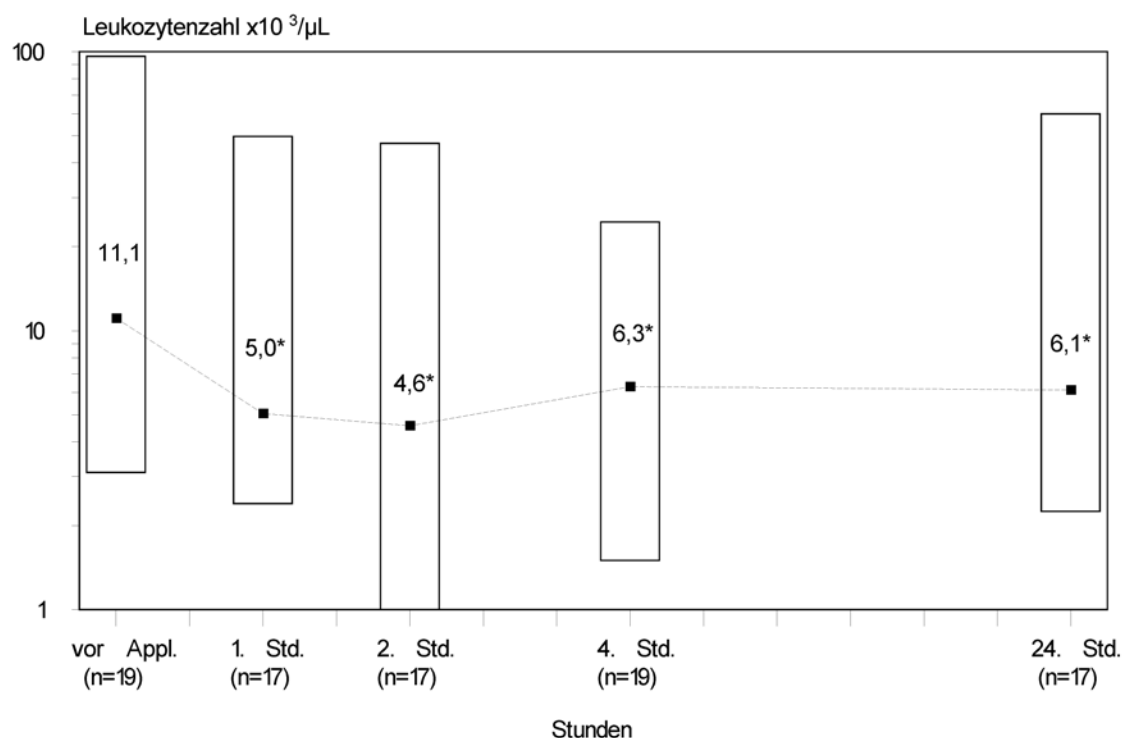


Abb. 3.1: Veränderungen der Leukozytenzahl (Median, Streuung) während der Kurzzeit-Beobachtung.
* - signifikante Veränderungen zum Ausgangswert ($p < 0,05$)

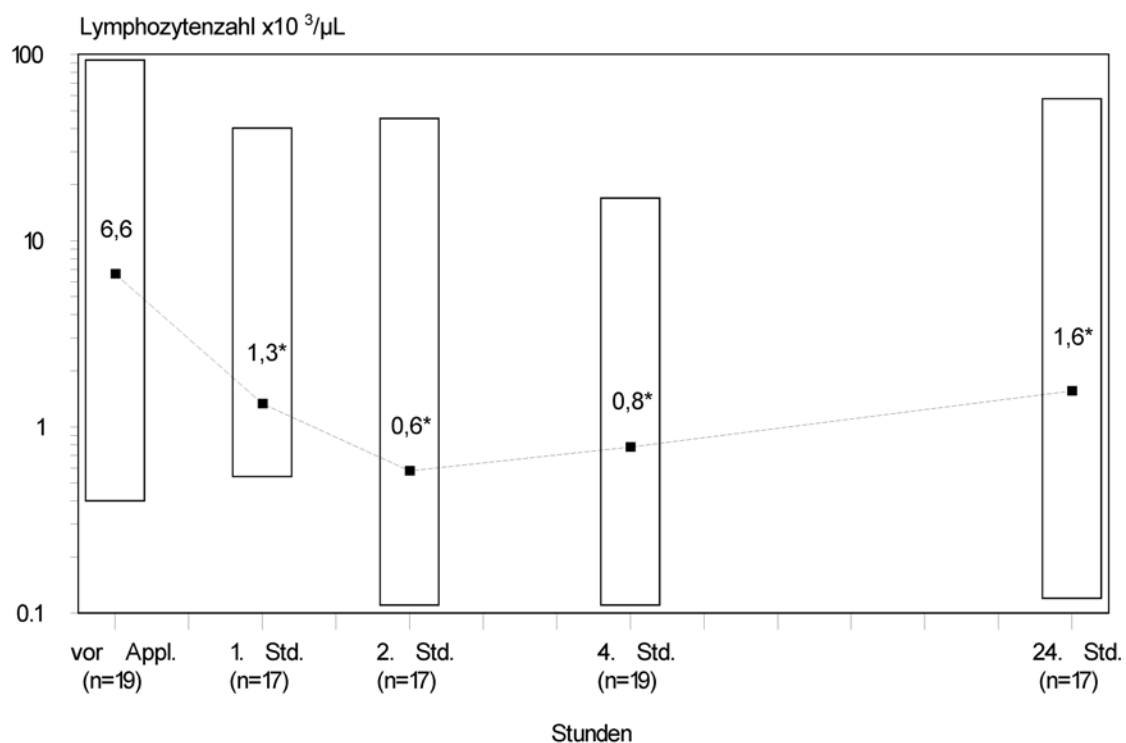


Abb. 3.2: Veränderungen der Lymphozytenzahl (Median, Streuung) während der Kurzzeit-Beobachtung.
* - signifikante Veränderungen zum Ausgangswert ($p < 0,05$)

Zu denselben Zeitpunkten wurde entsprechend des veränderten Differentialblutbildes ein relativer Anstieg im Prozentanteil der Neutrophilen festgestellt, wobei sich die Werte nach der 2. Stunde verdoppelten ($p=0,02$), nach der 4. Stunde noch signifikant erhöht waren ($p=0,02$) und bis zum Endpunkt der Untersuchung um 17% (n.s.) erhöht blieben. Der prozentuale Anteil der Monozyten verringerte sich auf weniger als die Hälfte bis zur 2. Stunde ($p=0,007$) und kehrte danach wieder zu den Ausgangswerten zurück.

Die signifikante Lymphozytenreduktion war vor allem auf eine B-Zelldepletion zurückzuführen, wie die durchflusszytometrische Zellpopulationsanalyse bewies. Der Prozentanteil der CD19-positiven Zellen (41,3%) verringerte sich nach einer Stunde auf weniger als die Hälfte (14,5%) und blieb 24 Stunden nach der Applikation fast zehnfach niedriger (4,22%, $p=0,044$) als der Ausgangswert (s. Abb. 3.3).

Der T-Lymphozytenanteil (CD3-positive Zellen) zeigte zu jedem Untersuchungszeitpunkt einen relativen Anstieg innerhalb der gesamten Lymphozytenpopulation. Die CD4:CD8-Ratio blieb im Referenzintervall stabil (0,8-2,7). Die NK-Zellbestimmung (CD56/16-positiv und CD3-negativ) zeigte eine geringe Abnahme im Prozentanteil, die

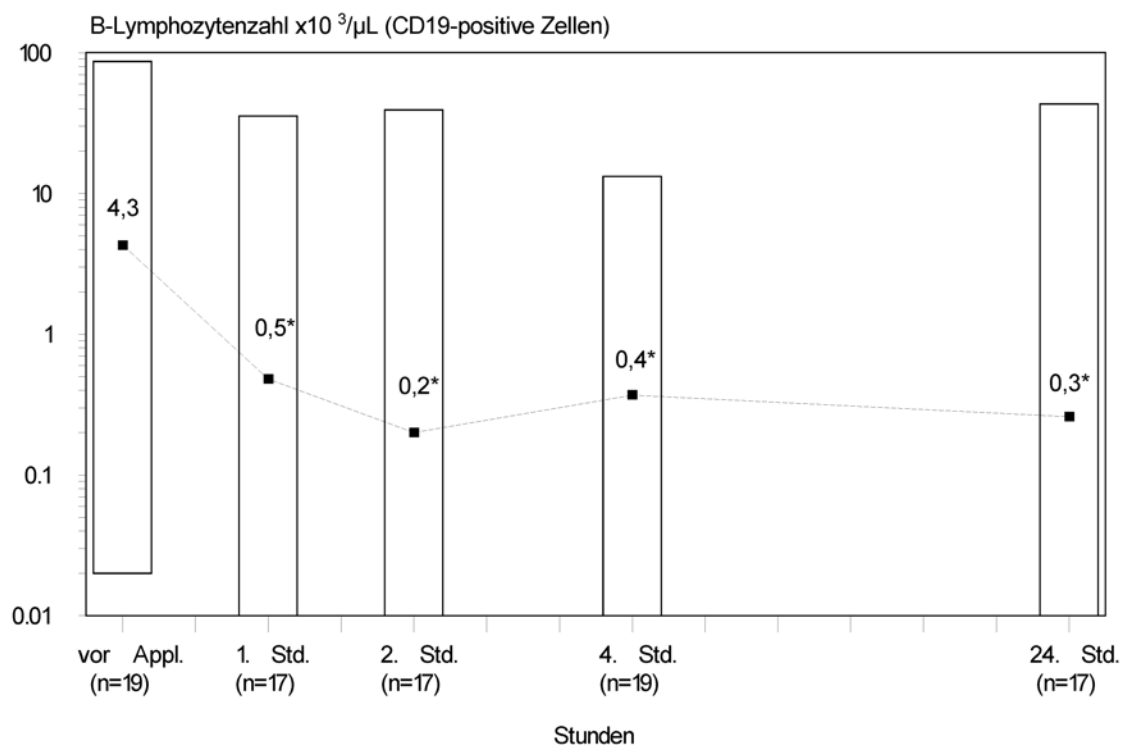


Abb. 3.3: Veränderungen der B-Lymphozytenzahl (Median, Streuung) während der Kurzzeit-Beobachtung.
* - signifikante Veränderungen zum Ausgangswert ($p < 0,05$)

nach der 2. und 4. Stunde am stärksten ausgeprägt war ($p=0,013$ und $p=0,001$). Die Werte blieben bis zum Ende dieser Beobachtung reduziert.

3.1.1.2 Langzeit-Verlauf (4 Applikationen und 8 Wochen danach)

Nach der anfänglichen Leukozytenabnahme während der ersten Applikation, blieben die Leukozytenwerte über die nachfolgenden 3 Applikationen und bis zu 5 Wochen nach Ende der Therapie annähernd konstant. Die Kontrollmessungen nach 8 Wochen ergaben einen Wiederanstieg der Leukozytenzahl (s. Abb. 3.4).

Wie schon die Ergebnisse der Kurzzeituntersuchung gezeigt haben, betrafen auch hier die Zellzahl-Veränderungen überwiegend die Lymphozytenpopulation. (s. Abb. 3.5) Die absoluten Zellzahlen sowohl der Neutrophile als auch der Monozyten blieben nahezu unverändert. Entsprechend des veränderten Differentialblutbildes wurde aber eine relative Erhöhung ihrer Prozentanteile beobachtet.

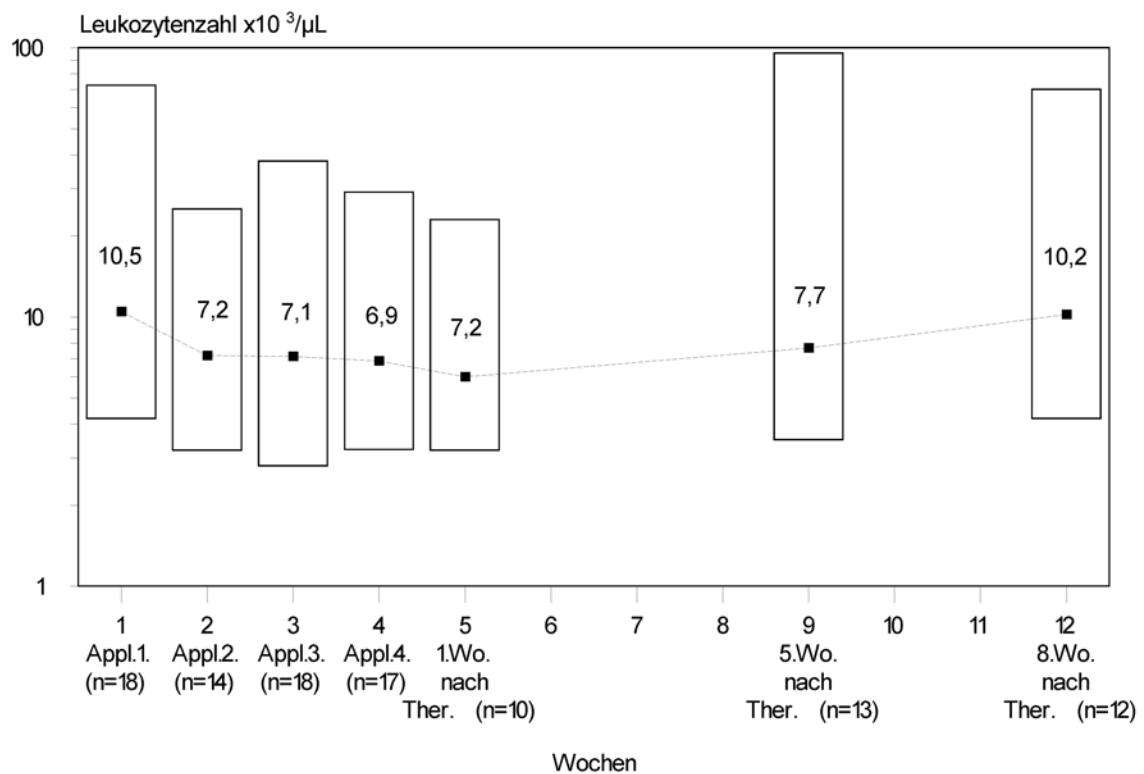


Abb. 3.4: Veränderungen der Leukozytenzahl (Median, Streuung) während der Langzeit-Beobachtung. Keine signifikante Veränderung zum Ausgangswert

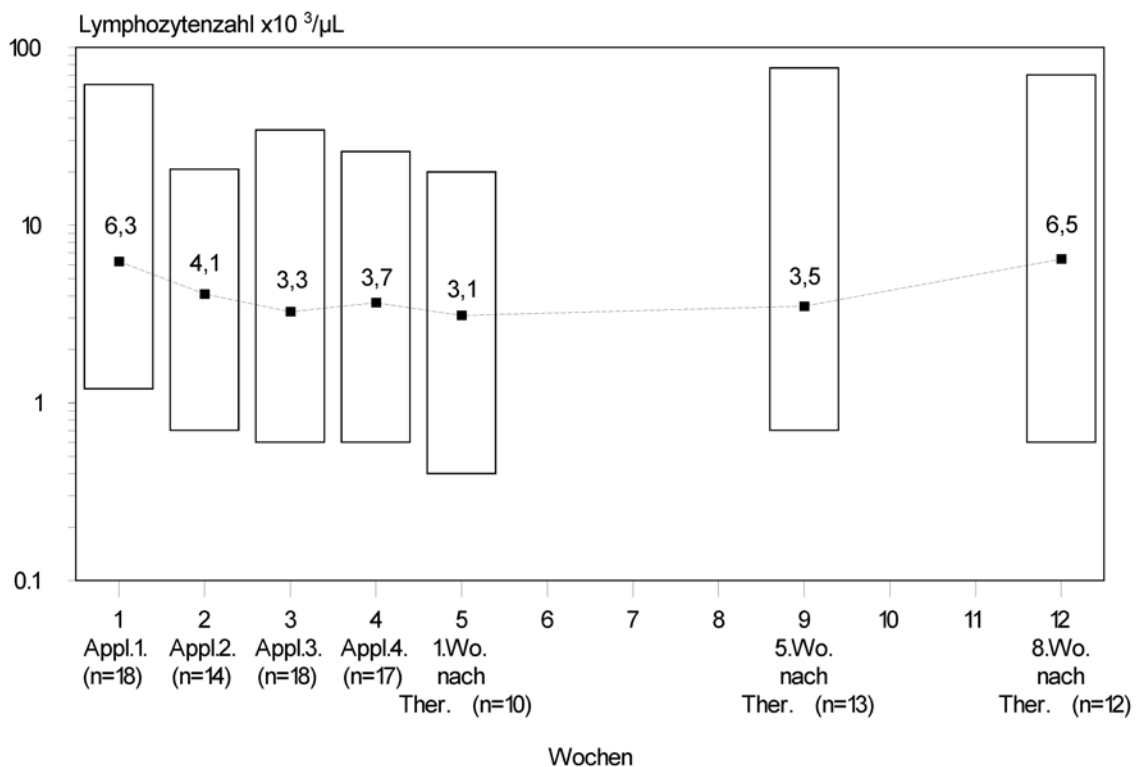


Abb. 3.5: Veränderungen der Lymphozytenzahl (Median, Streuung) während der Langzeit-Beobachtung. Keine signifikante Veränderung zum Ausgangswert

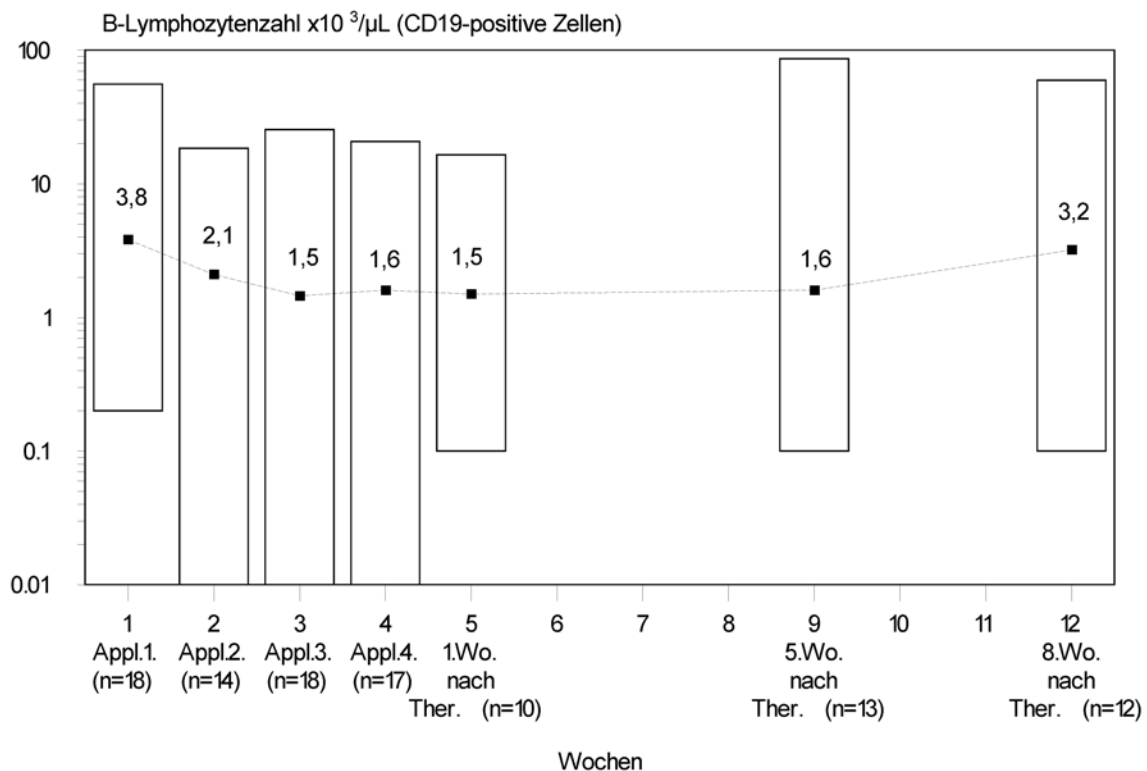


Abb. 3.6: Veränderungen der B-Lymphozytenzahl (Median, Streuung) während der Langzeit-Beobachtung. Keine signifikante Veränderung zum Ausgangswert

Wie die Kurzzeit-Untersuchung ergab auch die Langzeit-Beobachtung, dass die Lymphozytenreduktion mit einer Abnahme der CD19-positiven Zellen einhergeht. (s. Abb. 3.6) Eine Verringerung des Ausgangs-Prozentanteils (41,4%) war im Laufe aller Therapiezyklen (28,4%, 26,6%, 22,9%) und während des Therapie-freien Intervalls bis zur 5. Woche nachweisbar. In der 8. Woche nach Therapie-Ende wurde wieder ein Anstieg des Prozentanteils der B-Zellen (32,1%) festgestellt.

Der T-Lymphozytenanteil zeigte auch hier einen relativen Anstieg innerhalb der gesamten Lymphozytenpopulation mit einem unverändert normalen CD4:CD8-Verhältnis. Der NK-Prozentanteil blieb ohne relevante Veränderungen während des gesamten Therapiezyklus und der nachfolgenden Kontrollen.

3.1.2. Immunphänotypische Veränderungen der B-Zellpopulation

Während des gesamten Untersuchungszeitraums bestand die verbliebene, infolge der Therapie stark reduzierte B-Zellpopulation, in ihrem grössten Teil aus malignen B-Zellen. Die immunphänotypischen Marker (CD5/CD19-Koexpression und monoklonale

Leichtkettenexpression), die der Abgrenzung dieser malignen Population dienen, blieben erhalten. Vor Beginn der Behandlung betrug die maligne CD5-positive Zellpopulation bei den entsprechenden 18 Patienten 99,8% (86,9-99,99%) der gesamten B-Zellpopulation (s. Tab. 1, Mat. & Meth). Bei allen nachfolgenden Messungen (n=128) mit Zellmaterial dieser Patientengruppe blieb die CD5-Positivität der CD19-Zellen erhalten (99,79%, 60-100%).

Bei den 4 Patienten mit einem CD5-negativen B-Zellphänotyp (Nr.12, 18, 20, 22 in der Tab. 2.1) wurde die maligne Zellpopulation nur durch die Leichtkettenexpression analysiert. Es wurde keine wesentliche Veränderung der Leichtkettenexpression im Untersuchungszeitraum festgestellt.

3.1.2.1 Kurzzeit-Verlauf

Die Analyse des CD20-Antigens, Target der eingesetzten Antikörpertherapie, zeigte eine signifikante Abnahme bzw. eine komplette Depletion der positiven Zellen nach der 4. Stunde. (s. Abb. 3.7 und 3.8). Nach 24 Stunden wurden 0,4% CD20-positive Zellen nachweisbar. Die Expressionsstärke zeigte ebenso eine signifikante Verminderung über den gesamten Untersuchungszeitraum ($p < 0,002$).

Bei den Non-CLL-Lymphomen wurde das CD20-Antigen deutlich einheitlicher und stärker als bei der CLL exprimiert, was auch die signifikanten Unterschiede in den Ausgangswerten für die Fluoreszenzintensität (249 vs 40 MFI, $p = 0,001$) erklärte. Die unterschiedliche Expressionsintensität persistierte bis zur 4. Stunde ($p = 0,041$). Die danach aufgetretene CD20-Negativierung verlief ähnlich bei allen Patienten.

Ähnlich ausgeprägt waren die Veränderungen der FMC7-Antigenexpression (s. Abb. 3.7 und 3.8). Die FMC7-positiven Zellpopulationen bei den beiden Erkrankungsgruppen unterschieden sich bezüglich Prozentanteil und Expressionsstärke des Antigens, wobei die Proben der Non-CLL-Patienten, ähnlich wie beim CD20-Antigen, einen höheren Prozentanteil FMC7-positiver Zellen (89,3 vs 19,1%, $p < 0,001$) und auch eine entsprechend stärkere Fluoreszenzintensität aufwiesen (61 vs 14 MFI, $p = 0,001$). Die starken Therapie-assoziierten Veränderungen betrafen gleichermassen beide Gruppen, wobei

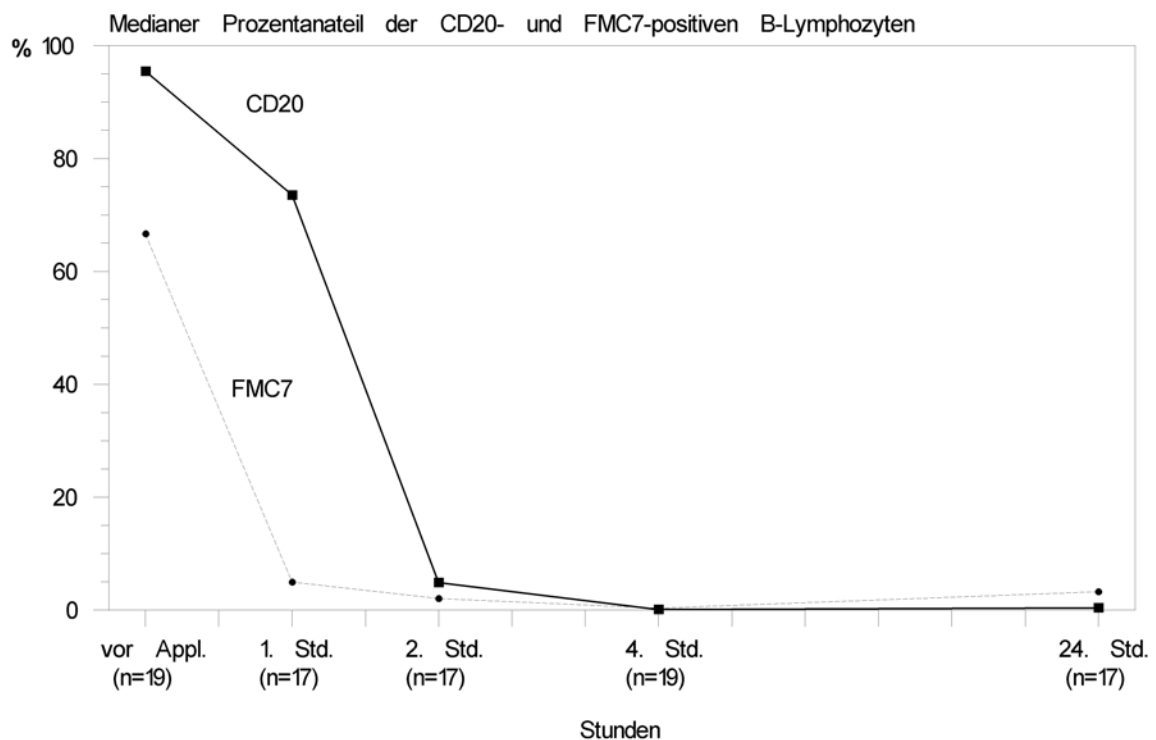


Abb. 3.7: Veränderungen des Prozentanteils CD20- und FMC7-positiver B-Lymphozyten während der Kurzzeit-Beobachtung. **Korrelationskoeffizient $r=0,73$; $p<0,0001$.**

die signifikanten Ausgangsunterschiede nach der 1. Stunde nivelliert waren. Unmittelbar nach Therapie-Beginn nahmen die Expressionsintensität und der Anteil der FMC7-exprimierenden Population bei allen Proben ab, bis zu einer kompletten Negativierung nach der 4. Stunde (von $p=0,02$ bis $p<0,0001$).

Die beobachteten Veränderungen verliefen für die CD20- und FMC7-Antigene parallel. Folgende Korrelationen wurden nachgewiesen: $r=0,73$ ($p<0001$, $n=89$) für die Prozentanteile positiver Ereignisse und $r=0,79$ ($p<0001$, $n=89$) für die MFI.

Infolge der Antikörpertherapie traten Antigen-Veränderungen auch beim Pan-B-Zellantigen CD19 und bei der für die CLL charakteristischen CD23-Antigenexpression auf.

Die CD19-Expressionsstärke nahm während der Kurzzeitbeobachtung nach Therapiebeginn deutlich ab, wobei signifikante Veränderungen ab der 2. Stunde an allen Untersuchungszeitpunkten und bei allen CD19-Probenansätzen beobachtet wurden (von

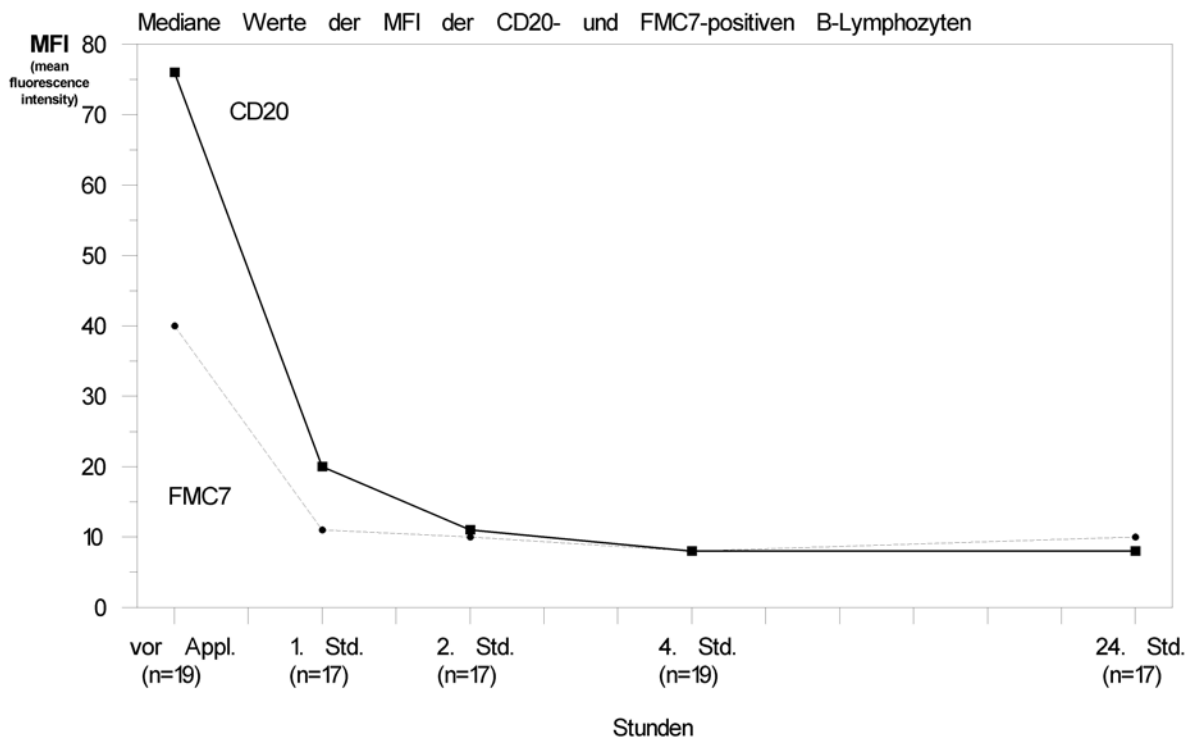


Abb. 3.8: Veränderungen der MFI CD20- und FMC7-positiver B-Lymphozyten während der Kurzzeit-Beobachtung. Korrelationskoeffizient $r=0,79$; $p<0,0001$.

$p=0,047$ bis $p=0,001$). Nach 24 Stunden wurde wieder eine Tendenz zur Zunahme der Expressionsstärke von CD19 beobachtet.

Die CD23-Expression nahm bei 11 Patienten (76,5%, 33,4-84,4% positive Zellen und 20, 11-29 MFI vor Therapie) ab, wobei sowohl der Anteil CD23-positiver Ereignisse als auch ihre Fluoreszenzintensität reduziert wurden (Abb. 3.9a und b). Wesentliche Unterschiede blieben bei allen nachfolgenden Untersuchungen bis zur 24. Stunde bestehen.

Die Veränderungen des CD23-Antigens zeigten Analogien zu CD20- ($r=0,47$, $p=0,001$, $n=52$) und FMC7-Antigenen ($r=0,41$, $p=0,002$, $n=52$) bezüglich Reduktion und Wiederherstellung der Expressionsstärke und des Subpopulationsanteils.

Der in der Abb. 3.10 an einem Patientenbeispiel demonstrierte Untersuchungsverlauf illustriert die am häufigsten beobachteten Veränderungen von CD20- und FMC7-Antigenexpression.

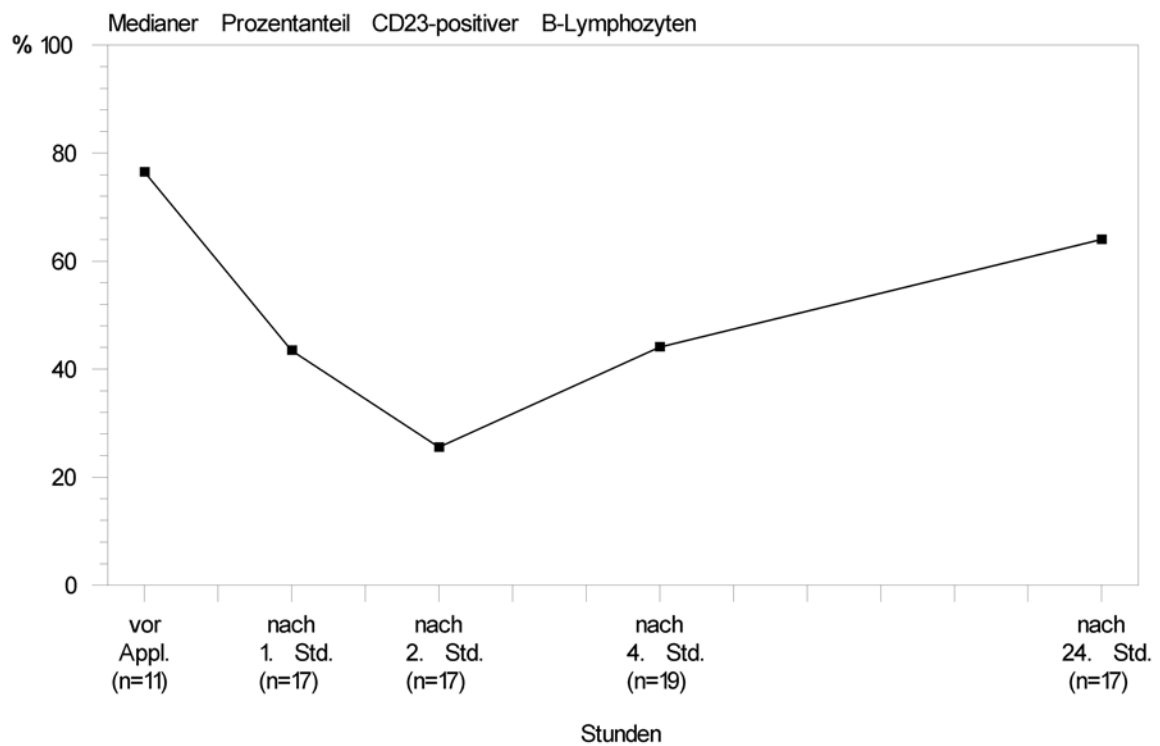


Abb. 3.9a: Veränderungen des Prozentanteils CD23-positiver B-Lymphozyten während der Kurzzeit-Beobachtung.

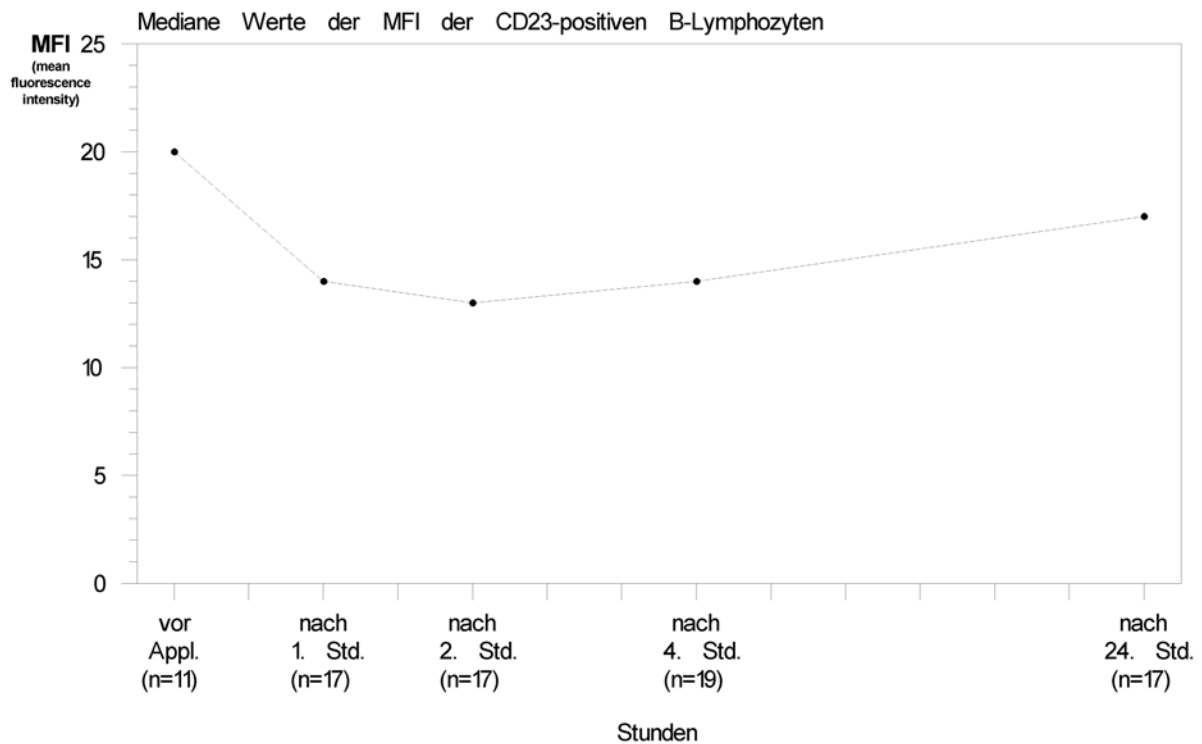


Abb. 3.9b: Veränderungen der MFI der CD23-positiven B-Lymphozyten während der Kurzzeit-Beobachtung.

Die restlichen untersuchten Marker der B-Zellpopulation (CD5, CD22, κ - oder λ -Leichtketten) zeigten für die Dauer der gesamten Experimente keine relevanten kinetischen Veränderungen bezüglich der Positivität und/oder Fluoreszenzintensität.

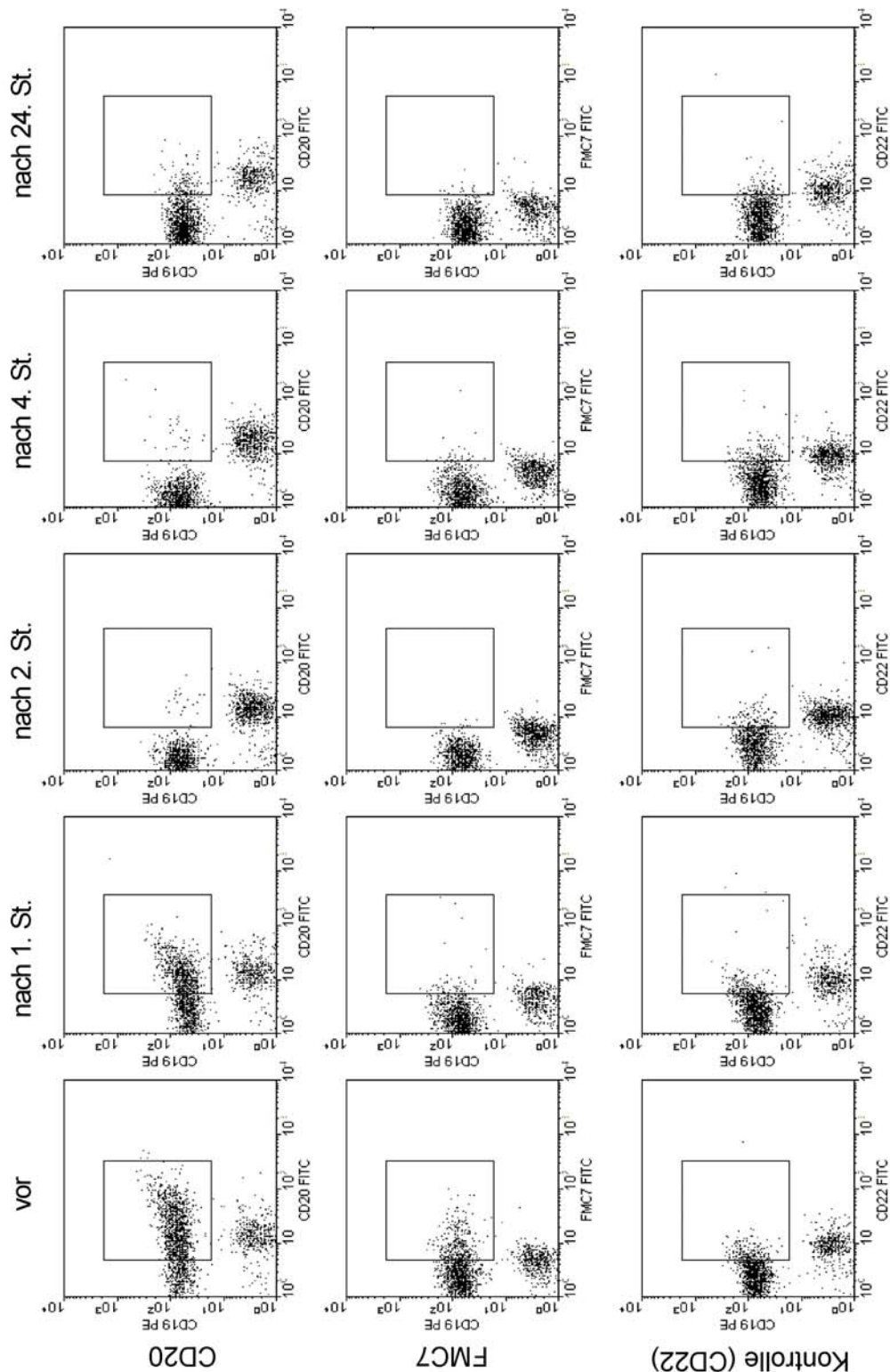


Abb. 3.10: Kurzzeit-Untersuchungsverlauf bei einem der behandelten Patienten. In den ersten zwei Reihen ist die unter Rituximab-Behandlung eintretende typische Reduktion der CD20- und FMC7-Expression gezeigt. Die dritte Reihe zeigt die CD22-Expression, welche keine Veränderungen aufweist.

3.1.2.2 Langzeit-Verlauf

Die Negativierung des CD20-Antigens war komplett nach der 3. Applikation und blieb so während des ganzen folgenden Therapiezyklus und bei den Kontrollen 7 Tage danach. Die Untersuchungen nach der 5. und 8. Woche zeigten eine erneute CD20-Expression. (s. Abb 3.11). Die Fluoreszenzintensitäten blieben bis zur 5. Wochen nach Therapie signifikant niedriger als die Ausgangswerte und danach (8. Woche) wurde eine Tendenz zur Steigerung bis zu 64% des Ausgangswertes beobachtet (s. Abb. 3.12).

Das FMC7-Antigen zeigte eine ähnliche Kinetik unter der Therapie und bis zu einer Woche danach. Die FMC7-Fluoreszenzintensität verminderte sich parallel zu der CD20-Expressionsabnahme ($r=0,85$, $p<0,001$, $n=97$). Ab der 5. Woche wurde eine erneute Expression des FMC7-Antigens nachweisbar. Die Veränderungen im Prozentanteil der FMC7-positiven Population korrelierten mit denen der CD20-exprimierenden Fraktion ($r=0,7$, $p<0,001$, $n=97$). Die Reduktionsphase für die FMC7-positiven Zellen dauerte allerdings länger und die Werte stiegen langsamer an als beim CD20-Antigen (s. Abb. 3.11).

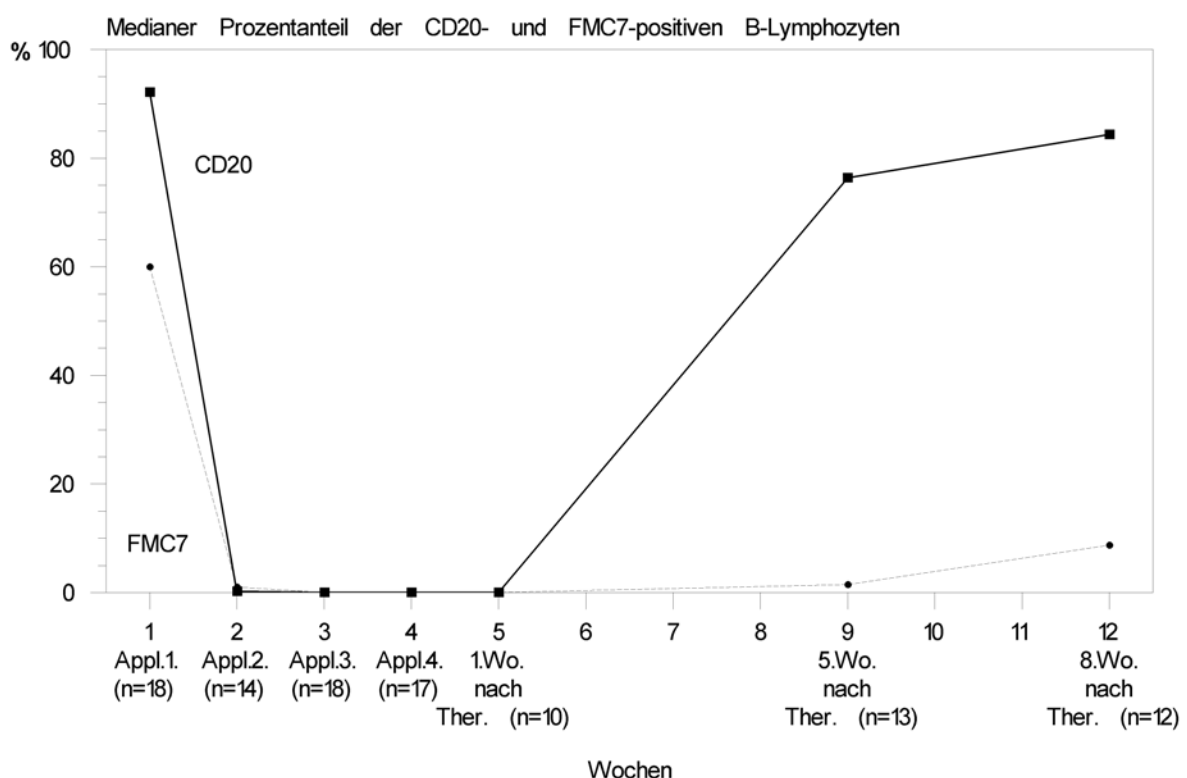


Abb. 3.11: Veränderungen des Prozentanteils CD20- und FMC7-positiver B-Lymphozyten während der Langzeit-Beobachtung. **Korrelationskoeffizient $r=0,7$; $p<0,0001$.**

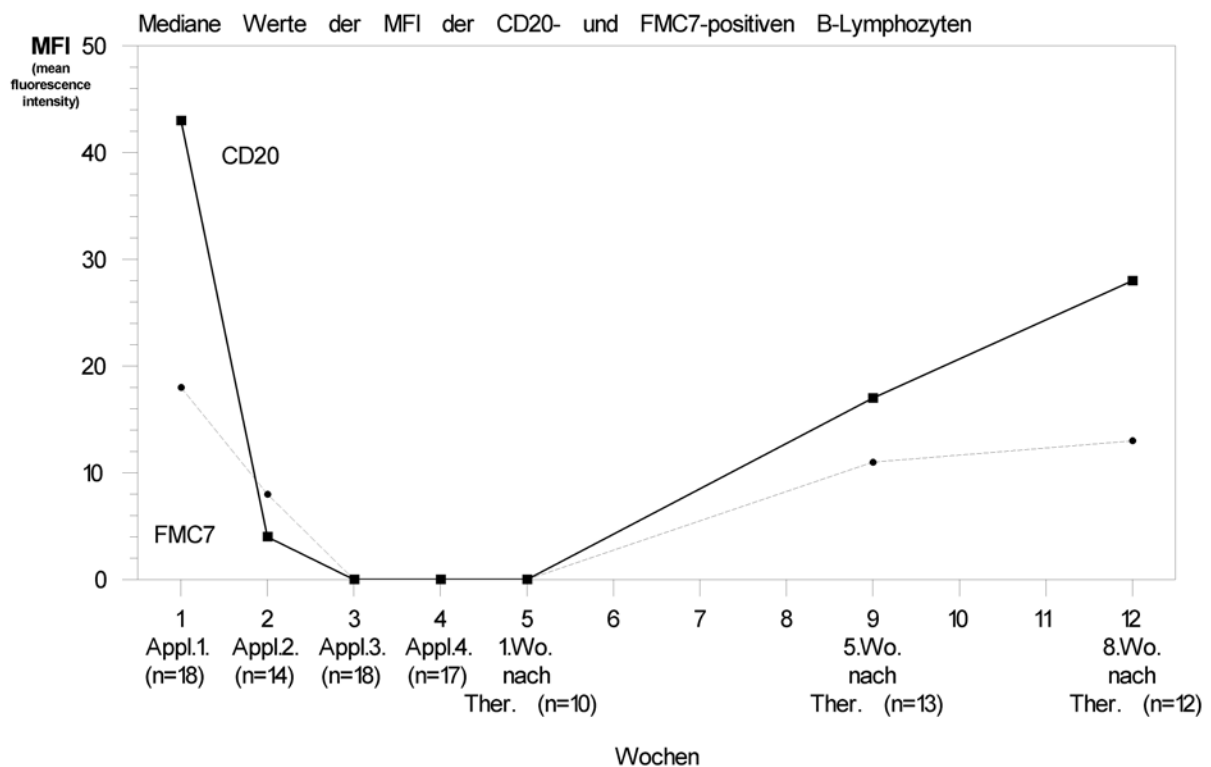


Abb. 3.12: Veränderungen der MFI CD20- und FMC7-positiver B-Lymphozyten während der Langzeit-Beobachtung. **Korrelationskoeffizient $r=0,85$; $p<0,0001$.**

Über den gesamten Therapiezyklus persistierte die schon unter der ersten Applikation aufgetretene Verminderung der CD19-Expression mit signifikanten Unterschieden zu den Ausgangswerten ($p=0,044$ bis $p=0,001$). Dies wurde bei allen mit dem CD19-Antikörper angesetzten Kombinationen festgestellt. Ab der 1. Woche nach Therapie-Ende war allerdings wieder eine Steigerungstendenz festzustellen mit Werten, die sich nach 8 Wochen den Ausgangswerten näherten.

Die CD23-Antigenveränderungen folgten einer den CD20- und FMC7-Antigenen ähnlichen Kinetik, mit einer Verminderung der Fluoreszenzintensität, die bereits eine Woche nach Ende der Rituximab-Behandlung aufgehoben wurde. Die Prozentanteile wiesen unter der Therapie eine nicht signifikante Abnahme auf.

3.2 Kontrollgruppe

Die Leukozytenwerte ($7,17 \times 10^3/\mu\text{l}$; $4,45-11,89 \times 10^3/\mu\text{l}$) und Lymphozytenprozentanteile (26,9%; 19-38,5%) der Kontrollgruppe ($n=40$) waren im Referenzbereich. Die durch-

flusszytometrisch nachweisbare B-Zellpopulation (CD19-positive Ereignisse) betrug 3,11% (0,75-14,6%). Darunter waren 97,2% (52,1-99,8%) CD20- und 90,9% (55,9-99,9%) FMC7-positive Zellen zu finden. Die CD20- und FMC7-Antigenexpressionen korrelierten signifikant ($r=0,9$, $p<0,0001$), gemessen bei den Ansätzen beider Marker als FITC-Konjugate gegen CD19-PE. Bei den doppelt-gefärbten Probenmessungen (FMC7-FITC/CD20-PE) wurde ein typisches Bild klarer Korrelation beider Antigenexpressionen auf der B-Zellpopulation beobachtet, obwohl die Expressions-Intensitäten innerhalb des gesamten Probenmaterials unterschiedlich waren. Allerdings zeigte sich bei diesen Ansätzen im Vergleich zu den Färbungen von CD20- oder FMC7-FITC in Kombination mit CD19-PE eine gegenseitige Inhibition beider Antikörper: die mittlere Fluoreszenzintensität von FMC7 verringerte sich signifikant um 13% ($p<0,0001$) und von CD20 um 23% ($p<0,0001$).

Bei 6 der untersuchten Kontrollproben konnte ein relativ deutlicher Anteil von mehr als 10% CD20-negativen, bzw. schwach-positiven B-Zellen festgestellt werden. Bei diesen Proben waren die CD20-negativen Zellen ebenso für den FMC7-Marker negativ.

Bei allen restlichen 34 untersuchten Proben, bei denen eine messbare CD20-negative B-Zellpopulation vorhanden war, konnte dasselbe Phänomen nachgewiesen werden.

3.3 Transfektionsexperimente mit der myeloischen K-562 Zell-Linie

24 Stunden nach der transienten Transfektion der myeloischen K-562-Zellen mit dem CD20-Plasmid konnte eine *De-novo*-Expression sowohl des CD20- als auch des FMC7-Antigens durchflusszytometrisch nachgewiesen werden (s. Abb.3.13).

Bei allen durchgeführten Transfektionsexperimenten konnte festgestellt werden, dass die Fluoreszenzintensitäten der beiden *de-novo* exprimierten Antigene korrelierten, wobei die schwach CD20-exprimierenden Zellen auch keine FMC7-Expression zeigten.

Die Elektroporationsmethode, die bei der Transfektion angewendet wurde, führte zu wesentlichen Zellverlusten. Die Ursache für die relativ niedrige Transfektionseffizienz blieb

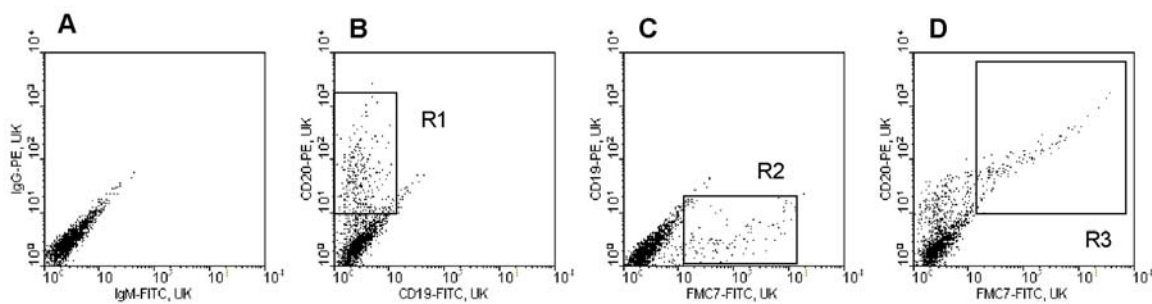


Abb. 3.13: De-novo-Koexpression von CD20- und FMC7-Antigen bei der K562-Zell-Linie nach Transfektion mit 5 µg CD20-Plasmid. **A** – Kontrolle, **B** – CD20-Expression (R1 ca. 15%), **C** – FMC7-Expression (R2 ca. 7%), **D** – Koexpression von CD20 und FMC7 (R3 ca. 7%)

unklar. Ein erheblicher Anteil der Zellen blieb negativ sowohl für das eine als auch für das andere Antigen.

3.4 Blockierungsexperimente mit B-Zell-Linien

3.4.1 Blockierungsexperimente mit den CESS-, DAUDI- und JVM-Zell-Linien unter der Wirkung von CD20- und FMC7-MAK

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse bei den Blockierungsexperimenten mit B-Zell-Linien sind in der Abb. 3.14 dargestellt.

Die Reihen A und C der Abbildung zeigen den Phänotyp der drei Zell-Linien (JVM-links, CESS-in der Mitte, DAUDI-rechts). Reihe B zeigt die Inhibition der endogenen FMC7-Expression bei der CESS-Zell-Linie nach Vorinkubation mit CD20(B1)-MAK. Die viel schwächere FMC7-Fluoreszenzintensität der beiden anderen Zell-Linien wurden ebenfalls unterdrückt. Wie erwartet wurde die CD20-Expression nach dem Blockierungsschritt mit dem entsprechenden unkonjugierten MAK komplett negativiert (Reihe E).

Der unkonjugierte FMC7-MAK blockiert komplett die FMC7-Expression (Abb. 3.14, Reihe C) und inhibiert die Bindung des CD20-MAK sowohl bei der FMC7-positiven CESS (Reihe F in der Mitte), als auch bei den FMC7-negativen JVM- und DAUDI-Zell-Linien (Reihe F, links und rechts).

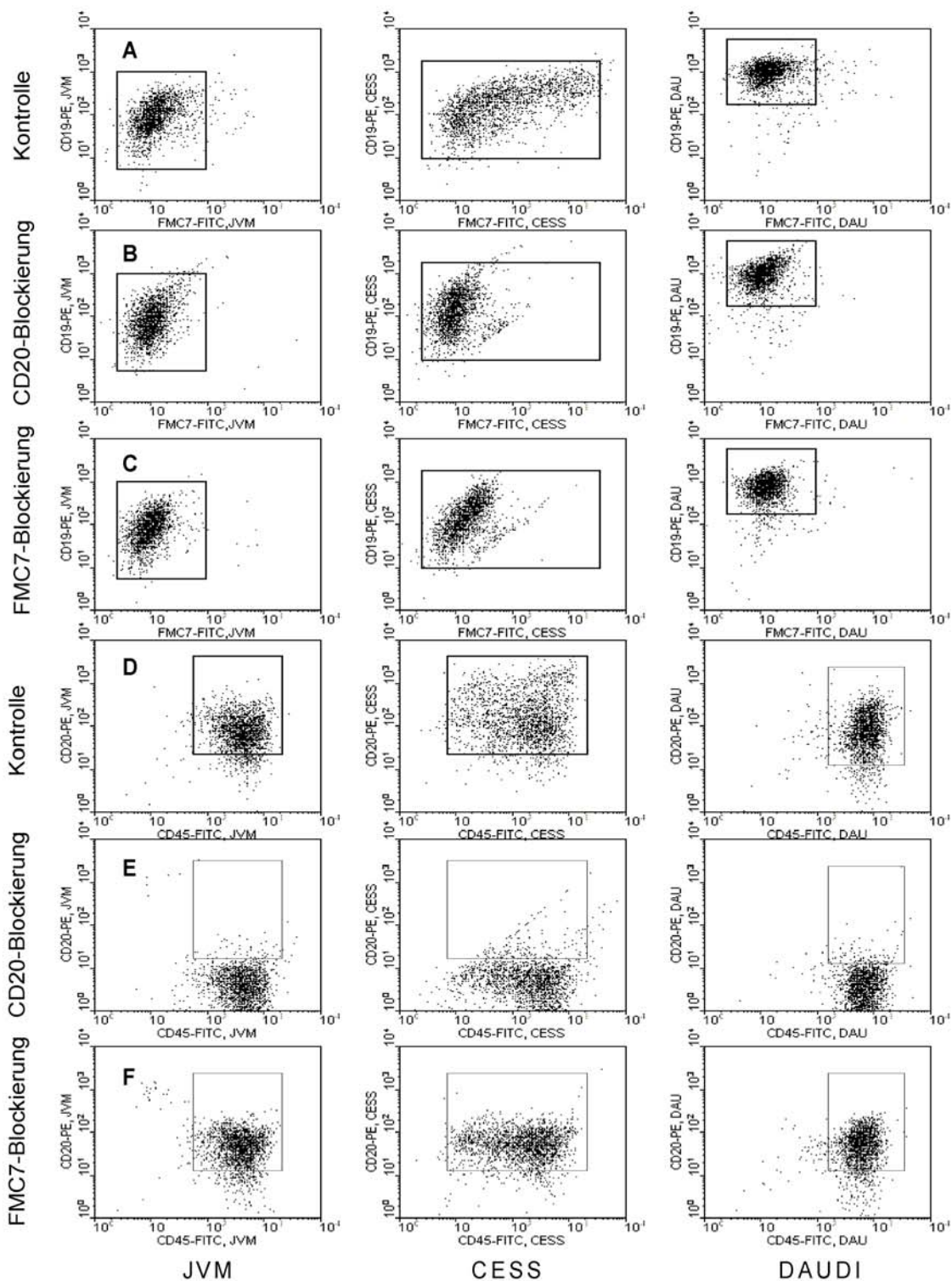


Abb. 3.14: Blockierungsexperimente bei den Zell-Linien: JVM (linke Spalte), CESS (mittlere Spalte) und DAUDI (rechte Spalte). In den Reihen A und D ist der Ausgangsphänotyp mit konstitutiver CD20- und FMC7-Antigenexpression, in den Reihen B und E der Phänotyp nach Blockierung mit dem unkonjugierten CD20(B1)-Antikörper und in den Reihen C und F der Phänotyp nach Blockierung mit dem unkonjugierten FMC7-Antikörper gezeigt.

3.4.2 Antigen-Modulationsexperimente mit CESS- und JVM-Zell-Linien unter der Wirkung von CD20- und FMC7-MAK

Die 4 durchgeführten Experimente zu CD23-Expressionsveränderungen unter dem Blockierungseffekt von CD20 (B1) und FMC7 zeigten folgende Ergebnisse:

Tabelle 3.1: Medianwerte der CD23-MFI (Minima und Maxima)

Zelllinie	MOPC21	B-1	FMC7
CESS	409+/-56	357+/-55	312+/-46
JVM	212+/-14	132+/-13	146+/-9

3.5 Aktivierungsexperimente mit der prä-B-Zell-Linie PB-697 unter PMA-Wirkung

Die mit der PB-697-Zell-Linie nach 24-stündiger Inkubation mit Phorbol12-myristate13-acetate (5 ng PMA pro 5×10^5 Zellen) durchgeführten Experimente zeigten eine Induktion der Expression sowohl des klassischen B1-Epitops, als auch des FMC7 (Abb.3.15).

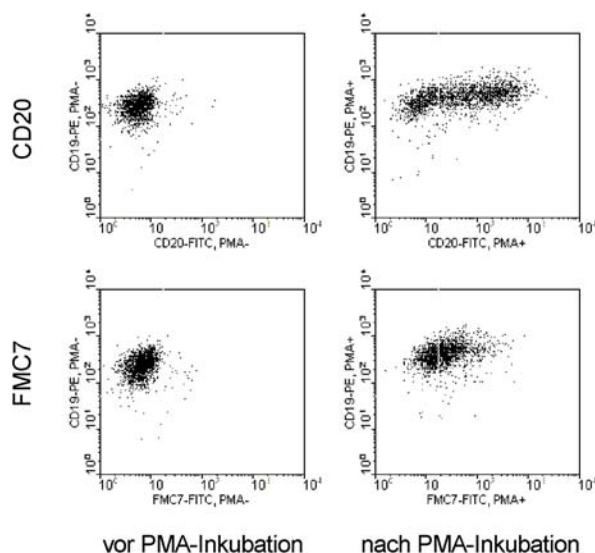


Abb. 3.15: Modulation der CD20- und FMC7-Antigen-expression bei PB697-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit PMA (5ng auf 5×10^5 Zellen)

4. Diskussion

Maligne leukämische B-Zell-Neoplasien exprimieren Membranantigene in typischen Konstellationen, die analog zu den Differenzierungsstufen normaler B-Zellen sind (58). Diese Zell-Marker dienen sowohl der Unterscheidung von den anderen hämatologischen Entitäten als auch der Subklassifizierung der B-Zell-Neoplasien, welche spezifische biologische und klinische Besonderheiten aufweisen (59;60).

Das CD20-Antikörper-basierte Therapiekonzept war für die Klinik von besonderem Interesse, da CD20 als Pan-B-Zellantigen von den meisten malignen Lymphomen exprimiert wird. Der zytotoxische Effekt des Antikörpers Rituximab (IDEC-C2B8) auf die CD20-exprimierenden Zellen wird im Wesentlichen über drei Mechanismen vermittelt: über eine Komplement-(CDC) und Antikörper-(ADCC)-vermittelte Zytolyse einerseits, und durch die Induktion Zell-intrinsischer apoptotischer Mechanismen andererseits (51;53;54).

Bei der Behandlung von Patienten mit refraktären indolenten B-Zell-Lymphomen innerhalb von klinischen Studien mit Rituximab ergab sich die Möglichkeit, umfassende durchflusszytometrische Untersuchungen der immunphänotypischen Veränderungen bei monoklonalen B-Zellpopulationen unter dem Effekt des CD20-Antikörpers vorzunehmen. Die Modulation anderer B-Zellantigene während dieses *in vivo* induzierten Prozesses der B-Zell-Depletion eignet sich zur Untersuchung dieser Moleküle, die auch bestimmte Rezeptor-Signal-Funktionen ausüben.

Der aus früher publizierten klinischen Studien bekannte hämatologische Effekt der Therapie war die schnelle und selektive B-Lymphozytendepletion (50). Bei den untersuchten Patienten war diese Reduktion mit einer wesentlichen Abnahme der malignen Zellpopulation verbunden, zu welcher im peripheren Blut vor Therapie mehr als 90% der Lymphozyten durchflusszytometrisch zuzuordnen waren. Die bei den kurzfristigen Kontrollen (24 Stunden) festgestellten Unterschiede zu den Ausgangswerten blieben während des gesamten Therapiezyklus erhalten.

Die Zellzahlen der anderen Leukozytenpopulationen wie Neutrophile, T-Lymphozyten, NK-Zellen und Monozyten blieben ohne signifikante Veränderungen. Diese Beobachtung ist auf die hoch spezifische Wirkung des eingesetzten Antikörpers zurückzuführen und stimmt mit den Untersuchungsergebnissen anderer klinischer Studien überein (61).

Der hämatologische Therapieeffekt mit einer 50%igen Lymphozytenzahlabnahme und einer erheblichen Reduktion der monoklonalen B-Zellpopulation, wie sie in den Auswertungskriterien der Studie definiert wurde (62) hielt bis zur 5. Woche nach Ende der Behandlung an. Die nachfolgenden Messungen (8. und nachfolgende Wochen) zeigten eine Rückkehr zu den Ausgangswerten bei allen untersuchten Zellpopulationen.

Obwohl stark reduziert, behielt die neoplastische B-Zellpopulation ihre wesentlichen immunphänotypischen Ausgangscharakteristika, wie die κ - oder λ -Leichtkettenrestriktion und/oder die gleichzeitige CD5- und CD19-Positivität, welche ihre durchflusszytometrische Abgrenzung von normalen polyklonalen B-Lymphozyten erlaubten (2;3;5).

Die immunphänotypische Untersuchung zeigte eine wesentliche Veränderung der Expressionsintensität von CD19. Dabei wurde das PE-Antikörperkonjugat bei allen Kombinationen für die Diskriminierung der B-Zell-Population eingesetzt. Die MFI-Reduktion dieses Pan-B-Zell-Antigens dauerte während des gesamten Behandlungszyklus an und zeigte einen Wiederanstieg ca. eine Woche nach Beendigung der Antikörpertherapie. Daten zur Wirkung der CD20-Ligation auf die Fluoreszenzintensität von CD19 liegen nicht vor. Das CD19-Molekül dient bei der B-Zell-Proliferation und -Differenzierung als funktioneller Korezeptor (75), wobei seine Expression während der B-Zell-Ontogenese genetisch streng konservativ reguliert wird. Es ist sehr wahrscheinlich, dass das CD19-Molekül an der Bildung supramolekularer Komplexe unterschiedlicher Zusammensetzung teilnimmt (CD19/CD21/MHC Klasse II) (76). Es ist nicht bekannt, ob ein solcher Komplex auch andere Zellmembran-Protein-Moleküle einschließen (CD19/CD20) und zu ihrer parallelen Modulation führen kann.

Es ist bekannt, dass die leukämischen Zellen bei indolenten B-Zell-Lymphomen mit Ausnahme der HCL das CD19-Antigen schwächer im Vergleich zu den polyklonalen B-Lymphozyten exprimieren (8). Die CD19-Fluoreszenzintensität der polyklonalen B-

Lymphozyten in den Kontrollblutproben der vorliegenden Arbeit war wesentlich höher (MFI von 260 in Median, 161-376) als bei den malignen B-Zellen im Patientenmaterial (MFI von 80,1 in Median, 31,6-212,9).

Eine ebenso signifikante Veränderung wurde beim CD23-Antigen festgestellt. Dieses Antigen ist für den Phänotyp der klassischen CLL charakteristisch und sein Fehlen gilt als prognostisches Kriterium bei der Erkrankung (77). Die von uns *in vivo* beobachteten CD23-Antigen-Veränderungen unter Rituximab-Einwirkung werden durch die *In-vitro*-Experimente von Bourget et al. bestätigt. Die Autoren haben eine Unterdrückung sowohl der konstitutiven als auch der IL-4-induzierten CD23-Expression bei CESS-Zell-Linie nach CD20(B1)-MAK-Präinkubation festgestellt (57). Diese Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass der Effekt einerseits mit einer Erhöhung der sekretorischen Fraktion des Antigens im zellfreien Überstand verbunden und andererseits nicht auf eine inhibierte Biosynthese, sondern auf ein erhöhtes Spalten (cleavage) des Antigens zurückzuführen ist.

Unter der spezifischen Antikörpertherapie waren die beobachteten Veränderungen des CD20-Targetantigens schnell und signifikant und betrafen die CLL- und die Non-CLL-Patientengruppe. Auf den CLL-Zellen wird das CD20-Antigen prinzipiell mit einer überwiegend mässigen Dichte exprimiert (7;8). Der größere Anteil maligner Zellen liegt im Intravasalraum vor, so dass diese rasch von dem intravenös applizierten Antikörper erreicht werden können. Bei den untersuchten Non-CLL-Patienten wurde auch eine große Fraktion leukämischer, stark CD20-exprimierender Zellen im Intravasalraum festgestellt. Die anfänglichen signifikanten Unterschiede zwischen den CLL- und Non-CLL-Zellen bezüglich der CD20-Fluoreszenzintensität verschwanden vollständig kurz nach Therapiebeginn. Die wenigen verbliebenen CD20-positiven Zellen zeigten eine wesentlich schwächere mittlere Fluoreszenzintensität (MFI), die sich im Rahmen der langfristigen Untersuchung bis zu einer kompletten Negativierung des Antigens entwickelte. Der Effekt hielt bis zur 5. Woche nach Therapieende an. Danach stieg der Prozentsatz der CD20-positiven Zellen parallel zur Erhöhung der Fluoreszenzintensität an.

Die Reduktion der Expressionsintensitäten der erwähnten Antigene - CD19 und CD23 - war an keinem Untersuchungszeitpunkt so ausgeprägt wie die Veränderungen des

FMC7-Antigens. Die FMC7-Expression wurde durch die Rituximab-Anwendung sogar schneller und effektiver als die Expression des CD20-Targetantigens unterdrückt. Ähnlich dem CD20 wurden auch hier Ausgangsunterschiede zwischen der CLL- und Non-CLL-Patientengruppe bezüglich der FMC7-Expression festgestellt, die schon eine Stunde nach Therapiebeginn kaum mehr nachweisbar waren.

Die Expressionskinetik des FMC7-Antigens folgte der des CD20-Antigens ($r=0,85$, $p<0,001$, $n=97$) während des gesamten Therapiezyklus. Die Regeneration der CD20-positiven Zellpopulation nach der Therapie war von einer langsameren und weniger effektiven Wiederherstellung der FMC7-Expression begleitet.

Zu keinem Untersuchungszeitpunkt führte jedoch der Abfall der CD19- und CD23- Expressionsintensitäten zu einer vollen Negativierung, wie es bei FMC7- und CD20-Antigen beobachtet werden konnte. Die ausgeprägten Veränderungen von FMC7 und der hohe Korrelationskoeffizient mit dem CD20 unterstützte die Annahme, dass die beiden Antigene verwandt sind.

Dieselben Antigene wurden bei polyklonalen B-Zellen von hämatologisch gesunden Probanden untersucht. Der Befund einer gleichzeitigen CD20- und FMC7-Expression auf der Mehrzahl (97,2% und 90,0%) der B-Zellfraktion entsprach der Feststellung der B-Zell-Sektion auf dem „Leucocyte Typing Workshop V“ (13): 80 bis 100% der peripheren B-Lymphozyten reagieren mit dem monoklonalen FMC7-Antikörper. Allerdings liegen auch Veröffentlichungen vor, welche die FMC7-exprimierende Zellfraktion als wesentlich kleiner beschrieben (23-25).

Bei den polyklonalen B-Lymphozyten wurde auch eine signifikante Korrelation zwischen CD20- und FMC7-Expression ($r=0,9$, $p<0,0001$) gefunden. In Übereinstimmung damit berichten Hübl et al. von einer solchen Korrelation bei mono- und polyklonalen B-Zellpopulationen (28). Diese Ergebnisse wurden im Prinzip auch von D'haoutcourt und Isaac bestätigt, wobei zusätzlich gezeigt wurde, dass beide Antikörper einen gegenseitigen Blockierungseffekt ausüben (29). Bei den Messungen unserer mit FMC7-FITC und CD20-PE gefärbten Proben wurde auch eine signifikante gegenseitige Inhibition der An-

tigen-Expressionsstärke (13% für FMC7, $p < 0,0001$ und 23% für CD20, $p < 0,0001$) festgestellt.

Ein gegenseitiger Inhibitionseffekt beider Antikörper wurde bei *In-vitro*-Blockierungsexperimenten mit lymphoblastoiden B-Zell-Linien bestätigt. Die Präinkubation mit dem Prototyp-CD20(B1)-MAK unterdrückte nahezu vollständig die FMC7-Expression bei der FMC7-positiven CESS-Zell-Linie. Bei den sehr schwach FMC7-exprimierenden JVM- und DAUDI-Zell-Linien wurde die Bindung des FMC7-FITC-MAK nach der Präinkubation mit CD20(B1)-MAK komplett blockiert. Der Blockierungseffekt von CD20-MAK war der Wirkung des für das Epitop spezifischen unkonjugierten FMC7-MAK gleichrangig.

Das FMC7-Inhibitionsphänomen unter der CD20(B1)-MAK-Wirkung war *in vitro* im Einklang mit den *in vivo* beobachteten FMC7-Veränderungen nach Rituximab-Behandlung.

Interessant war die Auswirkung der FMC7-Präinkubation auf die Expression des CD20-Antigens bei den untersuchten Zell-Linien. Die CD20-Bindung wurde nicht nur bei der FMC7-positiven CESS-Linie unterdrückt, sondern auch bei den schwach FMC7-exprimierenden JVM- und DAUDI-Zell-Linien. Diese Tatsache kann in einer räumlichen (sterischen) Inhibition oder auch in der Affinität des unkonjugierten FMC7-MAK zu dem Epitop des klassischen CD20(B1)-MAK begründet sein. Bei der Durchführung ähnlicher co-capping-Experimente für die Identifikation des intrazellulären Targets des CD20(L26)-MAK beschreiben auch Mason et al. eine Unterdrückung der Färbung mit L26 (dotlike reactivity) nach Präinkubation mit FMC7-MAK. Der Effekt war mit der blockierenden Wirkung des CD20(B1)-MAK vergleichbar, obwohl die Autoren diesen als unspezifisch eingeschätzt haben (56).

Die Fragen bezüglich der Natur der beobachteten Wechselwirkungen zwischen beiden Antikörpern und der Wahrscheinlichkeit einer Überlappung der Epitope waren Anlaß für zusätzliche Experimente, darunter z.B. die Untersuchung des Verhaltens anderer B-Zellmembran-Antigene nach FMC7-Blockierung (CD23), Experimente zur Identifizierung des FMC7-Antigens, immunchemische Blotting-Untersuchungen und Transfektionsexperimente mit einer CD20-Gensequenz.

Die Ergebnisse der bei der vorliegenden Arbeit durchgeführten vier Experimente zeigen einen Modulationseffekt des FMC7-MAK auf die CD23-Expression, die mit der Wirkung des CD20(B1)-Antikörpers vergleichbar ist. Der Befund deutet darauf hin, dass beide Antikörper als Target eine analoge Struktur haben, die mindestens bei der untersuchten CESS-Zell-Linie den gleichen funktionellen Effekt auf B-Zell-Membranstrukturen ausübt. Mit dem Patientenmaterial konnte keine Bestimmung der sekretorischen CD23-Fraktion durchgeführt werden, da unter der Wirkung des therapeutischen CD20-Antikörpers die Zell-Lyse allzu schnell war.

Eine der zuverlässigsten Methoden zur Untersuchung monoklonaler Antikörper mit unbekannter Spezifität besteht in ihrer Anwendung bei transfizierten ektopischen Zell-Linien. Die für die Transfektionen verwendete cDNA kodiert für das angenommene membranständige Antigen des getesteten Antikörpers. Diese Methode wurde schon beim „III Workshop on Leucocyte Differentiation Antigens“ angewandt und hat beim „IV Workshop“ nach der Identifizierung der Gen-Sequenzen der meisten Antigene, die in den sogenannten „clusters of differentiation“ (CD) eingeordnet sind, eine noch breitere Anerkennung erfahren (56).

Um die Zielstruktur des FMC7-Antikörpers näher zu definieren, wurde in der vorliegenden Arbeit eine transiente Transfektion der myeloischen Zell-Linie K562 mit einer CD20-kodierenden Gen-Sequenz durchgeführt. Die eingesetzte cDNA wurde in einen pCDM8-Vektor kloniert (von Prof. Mason, Oxford University, UK). Aus der Literatur war bereits bekannt, dass dieses Gen-Konstrukt bei der Transfektion von T-Zell-Linien (COS-1) effektiv ist (56). Die Elektroporationsmethode, die bei der Transfektion angewandt wurde, führte zu wesentlichen Zellverlusten. Allerdings wurde die durchflusszytometrisch festgestellte *De-novo*-CD20-Antigenexpression bei den transfizierten Zellen von einer FMC7-Expression begleitet. 48 Stunden nach der Transfektion waren ca. 15-18% der Zellen CD20-positiv (CD20 als PE-Konjugat) und ein wesentlich niedrigerer Prozentsatz (ca. 5–7 %) FMC7-positiv (FITC-Konjugat). Die CD20-negativen und -schwach positiven Zellen blieben auch FMC7-negativ.

Der Befund lieferte eindeutige Hinweise dafür, dass der FMC7-Antikörper an eine Struktur bindet, die Teil des CD20-Antigens ist. Die Ergebnisse der Transfektionsexperimente bestätigten auch den schon bei den Untersuchungen mit Patientenmaterial und Zelllinien gezeigten Zusammenhang zwischen den Expressionsintensitäten beider Antigene.

Ungeklärt blieben die Fragen zu:

- Der Art des vom FMC7 erkannten Epitops;
- Den möglichen CD20-cDNA Transkriptions- und/oder Translationsvariationen als Grundlage der Vielfalt von exprimierten CD20-Genprodukten;
- Der biologischen Funktion der CD20-Genprodukte.

Die Analyse der CD20-Gen-Promotor-Region weist eine majore und eine Mehrzahl minorer Transkriptions-Startloci für CD20-mRNA auf. Es ist durch Northern-Blot-Analyse festgestellt worden, dass grundsätzlich 3 Varianten der CD20 mRNA existieren: zwei dominante (2.6 und 2.8 kb), eine dritte (3.4 kb) mit wesentlich niedrigerer Expression und daneben eine Reihe weiterer Varianten mit viel seltenerer Expression. Die unterschiedlichen Varianten sind auf „splicing events“ zurückzuführen, die die CD20-Gen-Expression nicht beeinflussen. Keine der bekannten CD20-mRNA-Varianten führt zur Synthese eines CD20-Translationsproduktes mit geändertem Molekulargewicht oder geänderter Struktur (31;32).

Die B-Lymphozyten exprimieren drei Isoformen des klassischen CD20(B1)-Moleküls: eine dominante Variante mit einer Molekülgröße von 33 kDa und zwei seltener vorkommenden Formen, entsprechend mit 34.5 und 36 kDa. Es ist nachgewiesen worden, dass sich die unterschiedlichen Formen aus der Post-Translationsphosphorylierung der Aminosäurereste des CD20-Proteins ergeben (35;36).

Obwohl die Faktoren, die die CD20-Transkription regeln, nicht vollständig geklärt sind, wurde beobachtet, dass bei der humanen CD20-negativen prä-B-Zell-Linie PB-697 die Synthese der CD20-mRNA und des CD20-Proteins unter der Wirkung von Phorbol-Estern induziert werden kann (55). Dabei wurden auch zwei CD20-mRNA-Varianten gefunden (2.8- und 3.4 kb) (63). Wegen des schnell eintretenden Effektes vermuten die

Autoren, dass sich eine direkte Induktion der CD20-Transkription abspielt (J.W. Sleasman and T.F. Tedder, unveröffentlichte Ergebnisse) (31).

Ergebnisse einer anderen Arbeitsgruppe mit derselben Zell-Linie bewiesen die Induktion von CD20 durch ein nur bei den B-Zellen vorkommendes Oct-2 Transkriptionsprotein (64). Dieselbe Arbeitsgruppe publizierte 1997 Daten von zwei weiteren, die CD20-Transkription regulierenden Proteinen (PU.1/Pip and Basic Helix Loop Helix Zipper Transcription Factors), die die spezifische CD20-Expression abhängig von der Differenzierungsstufe der B-Lymphozyten kontrollieren (65).

Unsere Experimente nach 24-stündiger Inkubation der PB-697-Zell-Linie mit Phorbol12-myristate13-acetate (5 ng PMA/ 1×10^6 Zellen) zeigten eine *De-novo*-Expression sowohl des klassischen CD20(B1)-Epitops, als auch des FMC7. Es kann zusammengefasst werden, dass zumindest bei der untersuchten Zell-Linie die Transkription des klassischen CD20(B1)- und des CD20(FMC7)-Gen-Produktes durch denselben Mechanismus induziert werden kann.

Zusätzliche Untersuchungen sollten durchgeführt werden, um die Vorgänge aufzuklären, die die Transkription und die Translation der Expressionsvarianten des CD20-Gens sowie auch die Induktion dieser Expression regeln. Die Probleme bei solchen Experimenten könnten teilweise in den Schwierigkeiten bei der genauen immunchemischen Identifizierung der CD20-Molekül-Konformationsvarianten begründet sein. Für eine solche Variante halten wir das FMC7-Epitop. Unsere Versuche, eine reproduzierbare Methode für die immunchemische Identifizierung der FMC7-Variante des CD20-Antigens mittels Westernblotting zu etablieren, blieben ohne Erfolg. Es kann von der Annahme ausgegangen werden, dass die CD20-Mutimer-Variante eine tertiäre oder quaternäre Proteinstruktur voraussetzt. Daher ist es möglich, dass der Misserfolg durch eine Zerstörung dieser Proteinstruktur durch die angewandten chemischen Agenzien begründet ist. Ein indirekter Beweis für die Sensibilität des FMC7-Epitops sind die Probleme, die bei der immunhistochemischen Anwendung des Antikörpers auftreten. Die einzige veröffentlichte Abbildung eines erfolgreichen Immunoblottings mit FMC7 stammt von der Gruppe, die den Antikörper entwickelt hat (22). Darauf beruhen alle im folgenden publizierten Daten, welche von einer Molekülgröße des Antigens von 105 kDa ausgehen.

Auf diese Abbildung können jedoch zwei weitere Bänder unterschieden werden, eines von ca. 30 kDa Molekulgewicht und ein weiteres von ca. 65-70 kDa. Diese Tatsache wurde von den Autoren nicht erörtert.

In der Literatur finden sich Hinweise darauf, dass das CD20-Molekül in der Zell-Membran der Homo- oder Heterooligomer-Komplexe bildet. Bubien et al. (41) zeigen *in-situ* drei Protein-Banden bei nicht-reduzierenden Bedingungen (non-reducing conditions) durch chemische Querbindung (chemical crosslinking) von Plasma-Membran-Proteinen mit nachträglicher Immunpräzipitation von CD20. Die Banden haben eine Molekülgröße von je 33, 70 und 140 kDa, und migrieren bei reduzierenden Bedingungen (reducing conditions) in Richtung der Basis-33 kDa-Bande. Die von den Autoren vorgeschlagene Erklärung ist, dass die Membran-Komplexe, die aus zwei oder vier homologen Einheiten bestehen, eine funktionelle Konfiguration des CD20-Proteins darstellen. Diese Konfiguration ähnelt den gut charakterisierten Membranstrukturen, die als Ionen-Kanäle wirken (der GABA-A-Rezeptor Cl^- -Kanal, die Glutamat-Rezeptor-Ionen-Kanal-Familie, der Azetylcholin-Rezeptor).

Fest steht, dass das CD20-Antigen zur sogenannten MS4A-Genfamilie (membrane-spanning 4A family) gehört. Zur Letzteren zählt auch die β -Kette des hochaffinen-IgE-Rezeptors ($\text{Fc}\epsilon\text{RI}\beta$) und HTm4, die auch von hämatopoietischen Zellen exprimiert wird (66). Die Mitglieder dieser Familie sind strukturell verwandt und zeigen eine hohe Homologie in der Aminosäuresequenz. Ihre kodierende Gene liegen nah beieinander auf Chromosom 11 (11q12-q13.1) (66;67). Die drei Proteine beinhalten je vier streng definierte hydrophobe Transmembran-Regionen mit je einem N- und COOH-intrazytoplasmatischen Ende. $\text{Fc}\epsilon\text{RI}\beta$ bildet tetramere Komplexe mit α - und β - Ketten (68). Die anderen Proteine, die zur Genfamilie gehören, nehmen höchstwahrscheinlich auch an der Bildung solcher Komplexe teil. Die Autoren, die sich mit der Untersuchung der Eigenschaften dieser Proteine beschäftigen, sind der Auffassung, dass die multimeren CD20-Komplexe tatsächlich heterolog sind und sogar andere Mitglieder der MS4A-Familie einschließen können, da sie sowohl in ihrer Struktur als auch in ihrer Größe ähnlich sind. Solche heterologe Komplexe bilden auch die GABA-A-Rezeptor-Proteine (47). Die homologen Aminosäuresequenzen der Transmembrandomäne der MS4A-Proteine, ihre Strukturähnlichkeit und ihre Position auf der Zellmembran bedingen verwandte

funktionelle Eigenschaften. Sie wirken entweder als Ligand-empfindliche Ionen-Kanäle (ligand-gated ion channels), oder als essentielle Komponenten eines Rezeptor-Komplexes (69).

Die gegenwärtig bekannten Daten bestätigen die These, dass der CD20-Protein-Komplex einen Ca^{2+} -Kanal darstellt, dessen Eigenschaft, die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration zu steigern, den Übergang der B-Lymphozyten von der G_1 in die S-Phase des Zellzyklus blockiert (36). Die Anwendung der CD20-Antikörper hält diesen Kalzium-Kanal dauerhaft durchlässig, wobei sich wahrscheinlich ein Membran-Komplex Typus „pore“ (ähnlich den Purin-Rezeptoren) bildet (70) und damit eine weitere Proliferation verhindert (71). In diesem Sinne konnte die Identifikation der CD20(FMC7)-Komplexstruktur neue Felder für die CD20-Immuntherapie eröffnen.

Durch den Umstand, dass in seltenen Fällen T-Zell-Neoplasien endogen CD20 exprimieren, gewinnen die unterschiedlichen Varianten des CD20-Antigens an biologischer Bedeutung. Im peripheren Blut und Knochenmark von Patienten ohne maligne Erkrankungen sind auch CD20-positive reife T-Lymphozyten nachgewiesen worden (72-74).

Solange die Untersuchung der CD20- und FMC7-Antigene Bestandteil der meisten immunphänotypischen Panels zur Charakterisierung lymphoproliferativer maligner B-Zell-Erkrankungen ist, hat der definitive Nachweis eines gemeinsamen Membranprotein-Substrats eine konkrete diagnostische Bedeutung. Die FMC7-Positivität ist eine der Grundlagen für die immunphänotypische Differenzierung der nosologischen Entitäten CLL und Non-CLL innerhalb der Gruppe der indolenten malignen lymphoproliferativen B-Zell-Erkrankungen.

Die erste Veröffentlichung über FMC7 als Unterscheidungskriterium der typischen CLL von der B-PLL, stammt von 1981 und der Arbeitsgruppe, die den Antikörper herstellte (Catovsky et al.) (12). Spätere Publikationen anderer Autoren weisen auf das Spektrum der FMC7-positiven Erkrankungen hin (PLL, HCL und andere NHL), indem sie diese von den typischen CLL-Fällen abgrenzten.

Bei den seltenen Fällen von FMC7-positiven CLL sind Besonderheiten im morphologischen Befund, Varianten in der klinischen Präsentation, assoziierte zytogenetische Anomalien, Verlaufs- und Überlebensunterschiede der Erkrankung bekannt. 1994 schlugen Matutes et al. ein Punktesystem für die präzise immunphänotypische Abgrenzung der klassischen CLL von den anderen indolenten B-Zell-Neoplasien vor. Der FMC7-Marker ist seither als eines der fünf diagnostischen Grundkriterien akzeptiert (19). Dieselbe Gruppe veröffentlichte 1996 Untersuchungen an 544 CLL-Patienten, bei denen ein höheres Trisomie12-Vorkommen unter den FMC7-positiven CLL-Fällen gefunden wurde (15). Geisler et al. publizierten Daten über eine niedrigere Überlebensrate bei den FMC7-positiven CLL-Fällen in einer Gruppe von 457 Patienten (17).

In fast allen veröffentlichten Auswertungen wurden unterschiedliche quantitative Kriterien für die Festlegung der FMC7-Positivität angewandt. In der ersten Publikation von Catovsky et al. über FMC7-Positivität bei der CLL-Diagnose wurde die FMC7-Fluoreszenz mikroskopisch untersucht. Es wurden nur qualitative Wertungen wie „strongly“- und „weakly“ als positiv angegeben, wobei Kriterien zur Abgrenzung negativer von positiven Befunden lagen nicht vor. In der Veröffentlichung von Scott et al. zeigten 121 von 150 CLL-Fällen nur weniger als 10% schwach FMC7-positive Zellen (78). In der zuvor zitierten Arbeit von Geisler et al. lag die Grenze für die prognostische Bedeutung der FMC7-Positivität bei 50%. Das Punktesystem von Matutes et al. zieht diese Grenze bei 30%. So beruhen die Vergleiche bei der Auswertung der FMC7-Positivität auf verschiedenen subjektiv eingeschätzten Kriterien.

Bei unseren mit Rituximab behandelten Patienten hatten die intensiv CD20-exprimierenden malignen Zellen bei den Non-CLL-Fällen auch eine wesentlich stärkere FMC7-Expression (MFI 61 vs 14 bei CLL, $p=0,001$). Diese Tatsache ist im Einklang mit den zitierten Literaturangaben bezüglich immunphänotypischer Unterschiede innerhalb der Gruppe indolenter B-Zell-Erkrankungen. Die schwächere CD20-Expression ist eine charakteristische Besonderheit der CLL, die diese Erkrankung von den anderen nosologischen Entitäten dieser Gruppe unterscheidet (6;7). Die festgestellte intensive FMC7-Expression erlaubte eine eindeutige Abgrenzung der FMC7-positiven Population bei den Non-CLL-Fällen im Unterschied zu denen bei CLL (89,3 vs 19,1%, $p,0,001$).

Die charakteristische schwache FMC7-Expression bei den CLL-Fällen kann nur durch einen zweifarbigen Ansatz (dual-color staining) in Kombination eines anderen B-Zell-Markers (in unserem Panel gegen CD19-PE) zuverlässiger beurteilt werden. Bei der Auswertung eines monochromen Ansatzes (single-color staining) kommt es zu einer Überlappung der schwach exprimierenden Fraktion mit den für das Antigen negativen Zellen.

Die Anwendung eines PE-Konjugats des FMC7-MAK würde die Untersuchung und Analyse der FMC7-negativen oder sehr schwach exprimierenden Zellfraktionen objektiver machen und zu einer besseren Vergleichbarkeit der Fluoreszenzintensitäten beider Epitope des CD20-Antigens beitragen. Zur Zeit wird der FMC7-Antikörper allerdings kommerziell nur stabilisiert als IgM-Isotyp und als FITC-Konjugat angeboten.

Die Zusammenschau der Ergebnisse der Immunphänotypisierung, Zellkultur- und Transfektionsexperimente lässt den eindeutigen Schluss zu, dass FMC7 und CD20 zur gleichen B-Zell-Membranstruktur gehören. Die Expression dieser bisher als unterschiedlich definierten Epitope zeigt eine signifikante Korrelation und wird von derselben Gensequenz gesteuert.

5. Zusammenfassung

Die immunphänotypische Differenzierung der indolenten B-Zell-Neoplasien beruht auf der Expression bestimmter Membranantigene, wobei einzelne Lymphomentitäten charakteristische Markerprofile aufweisen können. Das FMC7-Antigen, eine unbekannte B-Zell-Membranstruktur, dient als eines der immunphänotypischen Grundkriterien zur Diagnose der typischen B-CLL. Die unterschiedliche CD20-Expressionsintensität ist auch ein charakteristisches Merkmal bei der Subtypisierung der Lymphomentitäten.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Modulation des CD20- und des FMC7-Antigens während einer Therapie mit CD20-Antikörper (Rituximab) bei Patienten mit indolenten B-Zell-Lymphomen untersucht.

Bei der durchflusszytometrischen Untersuchung quantitativer und qualitativer Charakteristika der monoklonalen B-Zell-Population bei CLL- (n=12) und Non-CLL-Patienten (n=10) unmittelbar nach der Antikörperinfusion und bis zur 8. Woche nach der Therapie wurden parallele Veränderungen von FMC7 und CD20 festgestellt. Die Anzahl und die Fluoreszenzintensitäten der für die beiden Antigene positiven Zellen korrelierten signifikant sowohl bei der malignen Zell-Population (Kurzzeitbeobachtung: n=89; r=0,9; p<0,001 und Langzeitbeobachtung: n=97; r=0,7; p<0,001), als auch bei polyklonalen B-Lymphozyten in Kontroll-Blutproben von hämatologisch gesunden Probanden (n=40; r=0,9; p<0,0001).

Blockierungsexperimente mit unkonjugierten CD20- und FMC7-Antikörpern zeigten, dass CD20-MAK die Bindung von FMC7-MAK ebenso blockiert wie FMC7-MAK in der Lage ist, die Bindung von CD20-MAK zu hemmen. Dieser Effekt wurde bei den B-Zell-Linien CESS, DAUDI und JVM beobachtet.

Bei der CD20(B1)-negativen prä-B-Zell-Linie PB-697 ist nach Induktion einer CD20-Expression durch PMA (Phorbol12-myristate13-acetate) auch eine parallele FMC7-Antigenexpression zu beobachten. Unsere Versuche, die FMC7-Variante der CD20-Struktur mittels Western-Blot zu identifizieren, blieben erfolglos.

Die mittels Elektroporation durchgeführte Transfektion der myeloischen K-562 Zell-Linie mit für CD20 kodierender cDNA induzierte sowohl eine *De-novo*-Expression des CD20(B1)-Antigens, als auch eine Expression des vom FMC7-Antikörper erkannten Epitops.

Diese Experimente erbrachten Hinweise dafür, dass die Membranstruktur, an die der FMC7-Antikörper bindet, von der CD20-Gensequenz kodiert wird.

Zahlreiche Publikationen über die Struktur und die Funktionen des CD20-Antigens unterstützen die Annahme möglicher Konformationsänderungen des CD20-Moleküls, welche mit seiner biologischen Funktion und seiner Rolle als Kalzium-Kanal-Regulator verbunden zu sein scheinen. Damit wird die These, dass der FMC7-Antikörper eine tertiäre oder quaternäre Konformationstruktur des klassischen CD20-Epitops erkennt, die durch die chemischen Substanzen beim immunchemischen Blotting zerstörbar ist, sehr wahrscheinlich.

Weitere Untersuchungen zur Natur des CD20-FMC7-Komplexes könnten Regulationsmechanismen bei der Transkription und Translation des CD20-Gens und ihre mögliche biologische Bedeutung klären.

6. Schriftenverzeichnis

- (1) Garand R, Robillard N. Immunophenotypic characterization of acute leukemias and chronic lymphoproliferative disorders: practical recommendations and classifications. *Hematol Cell Ther* 1996; 38(6): 471-486.
- (2) Rothe G, Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. Working Group on Flow Cytometry and Image Analysis. *Leukemia* 1996; 10(5): 877-895.
- (3) DiGiuseppe JA, Borowitz MJ. Clinical utility of flow cytometry in the chronic lymphoid leukemias. *Semin Oncol* 1998; 25(1): 6-10.
- (4) Borowitz MJ, Bray R, Gascoyne R, Melnick S, Parker JW, Picker L et al. U.S.-Canadian Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: data analysis and interpretation. *Cytometry* 1997; 30(5): 236-244.
- (5) Huh YO, Andreeff M. Flow cytometry. Clinical and research applications in hematologic malignancies. *Hematol Oncol Clin North Am* 1994; 8(4): 703-723.
- (6) Tefferi A, Bartholmai BJ, Witzig TE, Li CY, Hanson CA, Phyliky RL. Heterogeneity and clinical relevance of the intensity of CD20 and immunoglobulin light-chain expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Am J Clin Pathol* 1996; 106 (4): 457-461.
- (7) Almasri NM, Duque RE, Iturraspe J, Everett E, Braylan RC. Reduced expression of CD20 antigen as a characteristic marker for chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol* 1992; 40(4): 259-263.
- (8) Ginaldi L, De MM, Matutes E, Farahat N, Morilla R, Catovsky D. Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias. *J Clin Pathol* 1998; 51(5): 364-369.
- (9) Witzig TE, Borell TJ, Herath JF, Tefferi A, Li CY, Jenkins RB. Detection of trisomy 12 by FISH in untreated B-chronic lymphocytic leukemia: correlation with stage and CD20 antigen expression intensity. *Leuk Lymphoma* 1994; 14(5-6): 447-451.
- (10) Witzig TE, Li CY, Tefferi A, Katzmann JA. Measurement of the intensity of cell surface antigen expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Am J Clin Pathol* 1994; 101(3): 312-317.
- (11) D'Arena G, Musto P, Cascavilla N, Dell'Olio M, Di RN, Carotenuto M. Quantitative flow cytometry for the differential diagnosis of leukemic B-cell chronic lymphoproliferative disorders. *Am J Hematol* 2000; 64(4): 275-281.
- (12) Catovsky D, Cherchi M, Brookss D, Bradely J, Zola H. Heterogeneity of B-cell leukemias demonstrated by the monoclonal antibody FMC7. *Blood* 1981; 58(2): 406-408.
- (13) Huh YO, Pugh WC, Kantarjian HM, Stass SA, Cork A, Trujillo JM et al. Detection of subgroups of chronic B-cell leukemias by FMC7 monoclonal antibody. *Am J Clin Pathol* 1994; 101(3): 283-289.
- (14) den OG, Schuit HR, Waayer JL, Huibregtsen L, Hijmans W, Jansen J. Chronic B-cell leukemias: relation between morphological and immunological features. *Clin Immunol Immunopathol* 1985; 35(1): 92-102.

- (15) Matutes E, Oscier D, Garcia-Marco J, Ellis J, Copplestone A, Gillingham R et al. Trisomy 12 defines a group of CLL with atypical morphology: correlation between cytogenetic, clinical and laboratory features in 544 patients. *Br J Haematol* 1996; 92(2): 382-388.
- (16) Geisler CH, Philip P, Christensen BE, Hou-Jensen K, Pedersen NT, Jensen OM et al. In B-cell chronic lymphocytic leukaemia chromosome 17 abnormalities and not trisomy 12 are the single most important cytogenetic abnormalities for the prognosis: a cytogenetic and immunophenotypic study of 480 unselected newly diagnosed patients. *Leuk Res* 1997; 21(11-12): 1011-1023.
- (17) Geisler CH, Larsen JK, Hansen NE, Hansen MM, Christensen BE, Lund B et al. Prognostic importance of flow cytometric immunophenotyping of 540 consecutive patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1991; 78(7): 1795-1802.
- (18) Newman RA, Peterson B, Davey FR, Brabyn C, Collins H, Brunetto VL et al. Phenotypic markers and BCL-1 gene rearrangements in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *Blood* 1993; 82(4): 1239-1246.
- (19) Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, Garcia MJ, Houlihan A, Que TH et al. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia* 1994; 8(10): 1640-1645.
- (20) Brooks DA, Beckman IG, Bradley J, McNamara PJ, Thomas ME, Zola H. Human lymphocyte markers defined by antibodies derived from somatic cell hybrids. IV. A monoclonal antibody reacting specifically with a subpopulation of human B lymphocytes. *J Immunol* 1981; 126(4): 1373-1377.
- (21) Zola H, Moore HA, Hohmann A, Hunter IK, Nikoloutsopoulos A, Bradley J. The antigen of mature human B cells detected by the monoclonal antibody FMC7: studies on the nature of the antigen and modulation of its expression. *J Immunol* 1984; 133(1): 321-326.
- (22) Zola H, Neoh SH, Potter A, Melo JV, De OM, Catovsky D. Markers of differentiated B cell leukaemia: CD22 antibodies and FMC7 react with different molecules. *Dis Markers* 1987; 5(4): 227-235.
- (23) Bloem AC, Chand MA, Dollekamp I, Rijkers GT. Functional properties of human B cell subpopulations defined by monoclonal antibodies HB4 and FMC7. *J Immunol* 1988; 140(3): 768-773.
- (24) Rijkers GT, Dollekamp I, Zegers BJ. Evidence that FMC7 is a human B cell differentiation antigen. *Immunol Lett* 1990; 24(4): 261-264.
- (25) Zola H. Human B cells: is FMC7 a marker for relatively mature B cells or does it define a population equivalent to the LyB5-negative mouse B cells? In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, editors. *Leukocyte Typing II*. New York: Springer, 1986: 141-145.
- (26) Zola H, McNamara PJ, Moore HA, Smart IJ, Brooks DA, Beckman IG et al. Maturation of human B lymphocytes--studies with a panel of monoclonal antibodies against membrane antigens. *Clin Exp Immunol* 1983; 52(3): 655-664.
- (27) Ferro LM, Zola H. Modulation of expression of the antigen identified by FMC7 upon human B-lymphocyte activation: evidence for differences between activation in vivo and in vitro. *Immunology* 1990; 69(3): 373-378.
- (28) Hubl W, Iturraspe J, Braylan RC. FMC7 antigen expression on normal and malignant B-cells can be predicted by expression of CD20. *Cytometry* 1998; 34(2): 71-74.

- (29) D'hautcourt JL, Isaac J. Mean fluorescence intensity of dual stained cells. *Cytometry* 1999; 38(1): 44-46.
- (30) Kehrl JH, Riva A, Wilson GL, Thevenin C. Molecular mechanisms regulating CD19, CD20 and CD22 gene expression. *Immunol Today* 1994; 15(9): 432-436.
- (31) Tedder TF, Klejman G, Schlossman SF, Saito H. Structure of the gene encoding the human B lymphocyte differentiation antigen CD20 (B1). *J Immunol* 1989; 142(7): 2560-2568.
- (32) Einfeld DA, Brown JP, Valentine MA, Clark EA, Ledbetter JA. Molecular cloning of the human B cell CD20 receptor predicts a hydrophobic protein with multiple transmembrane domains. *EMBO J* 1988; 7(3): 711-717.
- (33) Stamenkovic I, Seed B. Analysis of two cDNA clones encoding the B lymphocyte antigen CD20 (B1, Bp35), a type III integral membrane protein. *J Exp Med* 1988; 167(6): 1975-1980.
- (34) Stashenko P, Nadler LM, Hardy R, Schlossman SF. Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen. *J Immunol* 1980; 125(4): 1678-1685.
- (35) Tedder TF, Schlossman SF. Phosphorylation of the B1 (CD20) molecule by normal and malignant human B lymphocytes. *J Biol Chem* 1988; 263(20): 10009-10015.
- (36) Tedder TF, McIntyre G, Schlossman SF. Heterogeneity in the B1 (CD20) cell surface molecule expressed by human B-lymphocytes. *Mol Immunol* 1988; 25(12): 1321-1330.
- (37) Deans JP, Robbins SM, Polyak MJ, Savage JA. Rapid redistribution of CD20 to a low density detergent-insoluble membrane compartment. *J Biol Chem* 1998; 273(1): 344-348.
- (38) Deans JP, Kalt L, Ledbetter JA, Schieven GL, Bolen JB, Johnson P. Association of 75/80-kDa phosphoproteins and the tyrosine kinases Lyn, Fyn, and Lck with the B cell molecule CD20. Evidence against involvement of the cytoplasmic regions of CD20. *J Biol Chem* 1995; 270(38): 22632-22638.
- (39) Deans JP, Schieven GL, Shu GL, Valentine MA, Gilliland LA, Aruffo A et al. Association of tyrosine and serine kinases with the B cell surface antigen CD20. Induction via CD20 of tyrosine phosphorylation and activation of phospholipase C-gamma 1 and PLC phospholipase C-gamma 2. *J Immunol* 1993; 151(9): 4494-4504.
- (40) Valentine MA, Meier KE, Rossie S, Clark EA. Phosphorylation of the CD20 phosphoprotein in resting B lymphocytes. Regulation by protein kinase C. *J Biol Chem* 1989; 264(19): 11282-11287.
- (41) Bubien JK, Zhou LJ, Bell PD, Frizzell RA, Tedder TF. Transfection of the CD20 cell surface molecule into ectopic cell types generates a Ca²⁺ conductance found constitutively in B lymphocytes. *J Cell Biol* 1993; 121(5): 1121-1132.
- (42) Kanzaki M, Shibata H, Mogami H, Kojima I. Expression of calcium-permeable cation channel CD20 accelerates progression through the G1 phase in Balb/c 3T3 cells. *J Biol Chem* 1995; 270(22): 13099-13104.
- (43) Anderson RG. Caveolae: where incoming and outgoing messengers meet. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(23): 10909-10913.
- (44) Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 1997; 387(6633): 569-572.

- (45) Parton RG, Simons K. Digging into caveolae. *Science* 1995; 269(5229): 1398-1399.
- (46) Polyak MJ, Taylor SH, Deans JP. Identification of a cytoplasmic region of CD20 required for its redistribution to a detergent-insoluble membrane compartment. *J Immunol* 1998; 161(7): 3242-3248.
- (47) Whiting PJ. The GABA-A receptor gene family: new targets for therapeutic intervention. *Neurochem Int* 1999; 34(5): 387-390.
- (48) Field KA, Holowka D, Baird B. Compartmentalized activation of the high affinity immunoglobulin E receptor within membrane domains. *J Biol Chem* 1997; 272(7): 4276-4280.
- (49) Mayor S, Rothberg KG, Maxfield FR. Sequestration of GPI-anchored proteins in caveolae triggered by cross-linking. *Science* 1994; 264(5167): 1948-1951.
- (50) Maloney DG, Grillo-Lopez AJ, White CA, Bodkin D, Schilder RJ, Neidhart JA et al. IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997; 90(6): 2188-2195.
- (51) Reff ME, Carner K, Chambers KS, Chinn PC, Leonard JE, Raab R et al. Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood* 1994; 83(2): 435-445.
- (52) Dallaire BK, Deardorff J., White C.A., Dowden S., Varns C., Shen D. et al. Antibody therapy with Rituximab for patients with low-grade Non-Hodgkin's Lymphoma. *Onkologie* 1999; (22): 184-190.
- (53) Shan D, Ledbetter JA, Press OW. Apoptosis of malignant human B cells by ligation of CD20 with monoclonal antibodies. *Blood* 1998; 91(5): 1644-1652.
- (54) Mathas S, Rickers A, Bommert K, Dorken B, Mapara MY. Anti-CD20- and B-cell receptor-mediated apoptosis: evidence for shared intracellular signaling pathways. *Cancer Res* 2000; 60(24): 7170-7176.
- (55) Nadler LM, Ritz J, Bates MP, Park EK, Anderson KC, Sallan SE et al. Induction of human B cell antigens in non-T cell acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest* 1982; 70(2): 433-442.
- (56) Mason DY, Comans-Bitter WM, Cordell JL, Verhoeven MA, van DJ. Antibody L26 recognizes an intracellular epitope on the B-cell-associated CD20 antigen. *Am J Pathol* 1990; 136(6): 1215-1222.
- (57) Bourget I, Di BW, Breittmayer JP, Grenier-Brossette N, Plana-Prades M, Bonnefoy JY et al. CD20 monoclonal antibodies stimulate extracellular cleavage of the low affinity receptor for IgE (Fc epsilon RII/CD23) in Epstein-Barr-transformed B cells. *J Biol Chem* 1994; 269(9): 6927-6930.
- (58) Freedman AS, Boyd AW, Bieber FR, Daley J, Rosen K, Horowitz JC et al. Normal cellular counterparts of B cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1987; 70(2): 418-427.
- (59) Kilo MN, Dorfman DM. The utility of flow cytometric immunophenotypic analysis in the distinction of small lymphocytic lymphoma/chronic lymphocytic leukemia from mantle cell lymphoma. *Am J Clin Pathol* 1996; 105(4): 451-457.
- (60) Frizzera G, Wu CD, Inghirami G. The usefulness of immunophenotypic and genotypic studies in the diagnosis and classification of hematopoietic and lymphoid neoplasms. An update. *Am J Clin Pathol* 1999; 111(1 *Suppl* 1):S13-S39.

- (61) Maloney DG, Liles TM, Czerwinski DK, Waldichuk C, Rosenberg J, Grillo-Lopez A et al. Phase I clinical trial using escalating single-dose infusion of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8) in patients with recurrent B-cell lymphoma. *Blood* 1994; 84(8): 2457-2466.
- (62) Huhn D, von SC, Wilhelm M, Ho AD, Hallek M, Kuse R et al. Rituximab therapy of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001; 98(5): 1326-1331.
- (63) Tedder TF, Streuli M, Schlossman SF, Saito H. Isolation and structure of a cDNA encoding the B1 (CD20) cell-surface antigen of human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85(1): 208-212.
- (64) Thevenin C, Lucas BP, Kozlow EJ, Kehrl JH. Cell type- and stage-specific expression of the CD20/B1 antigen correlates with the activity of a diverged octamer DNA motif present in its promoter. *J Biol Chem* 1993; 268(8): 5949-5956.
- (65) Himmelmann A, Riva A, Wilson GL, Lucas BP, Thevenin C, Kehrl JH. PU.1/Pip and basic helix loop helix zipper transcription factors interact with binding sites in the CD20 promoter to help confer lineage- and stage-specific expression of CD20 in B lymphocytes. *Blood* 1997; 90(10): 3984-3995.
- (66) Adra CN, Lelias JM, Kobayashi H, Kaghad M, Morrison P, Rowley JD et al. Cloning of the cDNA for a hematopoietic cell-specific protein related to CD20 and the beta subunit of the high-affinity IgE receptor: evidence for a family of proteins with four membrane-spanning regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(21): 10178-10182.
- (67) Liang Y, Buckley TR, Tu L, Langdon SD, Tedder TF. Structural organization of the human MS4A gene cluster on Chromosome 11q12. *Immunogenetics* 2001; 53(5): 357-368.
- (68) Blank U, Ra C, Miller L, White K, Metzger H, Kinet JP. Complete structure and expression in transfected cells of high affinity IgE receptor. *Nature* 1989; 337(6203): 187-189.
- (69) Liang Y, Tedder TF. Identification of a CD20-, FcepsilonRIbeta-, and HTm4-related gene family: sixteen new MS4A family members expressed in human and mouse. *Genomics* 2001; 72(2): 119-127.
- (70) Di VF, Chiozzi P, Ferrari D, Falzoni S, Sanz JM, Morelli A et al. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood* 2001; 97(3): 587-600.
- (71) Tedder TF, Engel P. CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes. *Immunol Today* 1994; 15(9): 450-454.
- (72) Yokose N, Ogata K, Sugisaki Y, Mori S, Yamada T, An E et al. CD20-positive T cell leukemia/lymphoma: case report and review of the literature. *Ann Hematol* 2001; 80(6): 372-375.
- (73) Algino KM, Thomason RW, King DE, Montiel MM, Craig FE. CD20 (pan-B cell antigen) expression on bone marrow-derived T cells. *Am J Clin Pathol* 1996; 106(1): 78-81.
- (74) Hultin LE, Hausner MA, Hultin PM, Giorgi JV. CD20 (pan-B cell) antigen is expressed at a low level on a subpopulation of human T lymphocytes. *Cytometry* 1993; 14(2): 196-204.
- (75) Sato S, Hasegawa M, Fujimoto M, Tedder TF, Takehara K. Quantitative genetic variation in CD19 expression correlates with autoimmunity. *J Immunol* 2000; 165(11):

6635-6643.

(76) Leveille C, AL-Daccak R, Mourad W. CD20 is physically and functionally coupled to MHC class II and CD40 on human B cell lines. *Eur J Immunol* 1999; 29(1): 65-74.

(77) Finn WG, Thangavelu M, Yelavarthi KK, Goolsby CL, Tallman MS, Traynor A et al. Karyotype correlates with peripheral blood morphology and immunophenotype in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Clin Pathol* 1996; 105(4): 458-467.

(78) Scott CS, Stark AN, Head C, Roberts BE. Diagnostic features and survival in typical and prolymphocytoid variants of chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol* 1989; 7(2): 175-179.

Frau Maya Jordanova
Pirotska Str. 22A,
1000 Sofia
Bulgarien
Tel: +359 88 912797
e-Mail: maia@mail.bol.bg

Campus Charité Mitte
Promotionsausschuss
Schumannstr. 20/21
10117 Berlin

Berlin, den 09.07.2003

Erklärung an Eides Statt

Hiermit erkläre ich, dass die von mir vorgelegte Dissertationsschrift zum Thema: „Veränderungen von B-Zellantigenen unter Rituximab-Therapie: FMC7 ist Teil des CD20-Antigenkomplexes“ von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Prof. Dr. P. Dörken, Direktor der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie, CVK, der Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin, ist der betreuende Hochschullehrer dieser Arbeit.

Diese Erklärung ist Bestandteil meiner Doktorarbeit.

M. Jordanova

In Memoriam

Herrn Prof. Dr. S. Serke danke ich für die Überlassung des Themas, seine Freundschaft und seine Unterstützung.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. B. Dörken, Direktor der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie, CVK, der Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin, für sein Verständnis, seine freundliche und wohlwollende Hilfsbereitschaft sowie für die Möglichkeit, diese Doktorarbeit erfolgreich abschließen zu können.

Herrn Dr. J. Westermann aus derselben Klinik möchte ich meinen Dank aussprechen für die zahlreichen Diskussionen bei der Verfassung, Gestaltung und insbesondere bei der sprachlichen Korrektur der Arbeit.

Allen Mitarbeitern des durchflusszytometrischen Labors möchte ich danken für die freundliche Aufnahme, Hilfe und Unterstützung sowie für das angenehme Arbeitsklima.

Ferner möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der Durchführung meiner Doktorarbeit unterstützt haben.
