

**Wirkung immunstimulatorischer CpG-Oligodesoxynukleotide  
auf Non-Hodgkin-Lymphome der B-Zell-Reihe**

vorgelegt von  
Lars Mühlenhoff  
aus  
Meerbusch  
2003



Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie  
Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik Innenstadt

Ludwig-Maximilians-Universität München

Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. med. D. Schlöndorff

**Wirkung immunstimulatorischer CpG-Oligodesoxynukleotide  
auf Non-Hodgkin-Lymphome der B-Zell-Reihe**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Lars Mühlenhoff  
aus  
Meerbusch  
2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: ..... Prof. Dr. med. S. Endres

Mitberichterstatter: ..... Priv. Doz. Dr. med. M. Dreyling  
Priv. Doz. Dr. med. R. Huss

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: ..... Priv. Doz. Dr. med. G. Hartmann

Dekan: ..... Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: ..... 23.10.2003

**Für meine Großeltern**



---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>8</b>
<b>1.1</b>	<b>Fragestellung.....</b>	<b>8</b>
<b>1.2</b>	<b>Immunstimulatorische Oligodesoxynukleotide.....</b>	<b>9</b>
1.2.1	Definition und Geschichte.....	9
1.2.2	Molekulare Wirkmechanismen von CpG-Oligodesoxynukleotiden.....	10
1.2.3	Zelluläre Effekte von CpG-Oligodesoxynukleotiden.....	11
1.2.4	Therapeutische Strategien und Toxikologie von CpG-Oligodesoxynukleotiden.....	13
<b>1.3</b>	<b>B-Lymphozyten.....</b>	<b>15</b>
1.3.1	Lymphatisches System und Differenzierung von B-Lymphozyten.....	15
1.3.2	Oberflächenmoleküle.....	18
<b>1.4</b>	<b>Non-Hodgkin-Lymphome.....</b>	<b>18</b>
1.4.1	Definition und Klassifikation.....	18
1.4.2	Chronisch lymphatische Leukämie vom B-Zelltyp.....	20
1.4.3	Weitere kleinzellige B-Zell-Lymphome.....	20
1.4.4	Großzellige B-Zell-Lymphome.....	22
1.4.5	Burkitt-Lymphom.....	23
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>25</b>
<b>2.1</b>	<b>Zellkultur.....</b>	<b>25</b>
2.1.1	Zellkulturmedium.....	25
2.1.2	Isolation von mononukleären Zellen aus peripherem Blut.....	25
2.1.3	Isolation von mononukleären Zellen aus Lymphknotenbiopsaten.....	26
2.1.4	Magnetische Zellseparation.....	26
2.1.5	Daudi Zellkultur.....	27
<b>2.2</b>	<b>Oligodesoxynukleotide.....</b>	<b>27</b>

---

<b>2.3</b>	<b>Durchflusszytometrie.....</b>	<b>28</b>
2.3.1	Grundlagen.....	28
2.3.2	Oberflächenantigene.....	30
2.3.3	Intrazelluläre Färbung mit 5-(6-) <i>Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester</i> .....	31
2.3.4	Apoptose-Detektion mit Annexin V und Propidiumiodid.....	32
<b>2.4</b>	<b>Therapeutische Antikörper und <i>Chrom-Release-Assay</i>.....</b>	<b>33</b>
2.4.1	Therapeutische Antikörper.....	33
2.4.2	Assay für die lytische Aktivität von Komplement und therapeutischen Antikörpern.....	34
<b>2.5</b>	<b>Statistik.....</b>	<b>35</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>36</b>
<b>3.1</b>	<b>Effekte von CpG-Oligodesoxynukleotiden auf die Zellmorphologie.....</b>	<b>36</b>
<b>3.2</b>	<b>Effekte von CpG-Oligodesoxynukleotiden auf Oberflächenantigene.....</b>	<b>38</b>
3.2.1	Kinetik.....	38
3.2.2	Effekte auf B-Lymphozyten gesunder Spender.....	39
3.2.3	Vergleich verschiedener Oberflächenmarker und Lymphome.....	41
3.2.4	Konzentrationsreihen.....	46
3.2.5	Abhängigkeit der Zellaktivierung vom Oligodesoxynukleotidrückgrat und der Basensequenz.....	48
<b>3.3</b>	<b>Einfluss von CpG-Oligodesoxynukleotiden auf die Zellproliferation.....</b>	<b>52</b>
<b>3.4</b>	<b>Effekte von CpG-Oligodesoxynukleotiden auf Apoptose und Viabilität.....</b>	<b>56</b>

---

<b>3.5</b>	<b>Kombination von CpG-Oligodesoxynukleotiden mit dem therapeutischen Antikörper Rituximab.....</b>	<b>59</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>62</b>
<b>4.1</b>	<b>Einfluss von CpG-Oligodesoxynukleotiden auf Morphologie, Viabilität und Oberflächenantigenexpression maligner B-Zellen...</b>	<b>62</b>
<b>4.2</b>	<b>Einfluss von CpG-Oligodesoxynukleotiden auf das Proliferationsverhalten maligner B-Zellen.....</b>	<b>69</b>
<b>4.3</b>	<b>Bedeutung des Oligodesoxynukleotidrückgrats und der CpG-Motive für die Zellaktivierung.....</b>	<b>70</b>
<b>4.4</b>	<b>Kombination von CpG-Oligodesoxynukleotiden mit Rituximab.....</b>	<b>73</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>77</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>79</b>
	<b>Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen.....</b>	<b>90</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>93</b>
	<b>Veröffentlichungen.....</b>	<b>94</b>
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>96</b>

## 1 Einleitung

### 1.1 Fragestellung

Oligodesoxynukleotide (ODN) bestimmter Basenabfolge (CpG-Motive; CpG-ODN) können verschiedene Zellen des Immunsystems, wie z. B. dendritische Zellen und B-Zellen aktivieren. Neben dieser direkten Wirkung auf Zellen führt ihre Gabe über eine erhöhte Produktion von Zytokinen durch diese Zellen indirekt auch zur Aktivierung weiterer Zellen des Immunsystems.

Im Bereich der Tumorthherapie bieten sich möglicherweise eine Reihe von Einsatzmöglichkeiten. Da CpG-ODN zu abgestimmteren Immunantworten führen, könnten sie im Gegensatz zur Gabe einzelner rekombinant hergestellter Zytokine effektivere Anti-Tumor Antworten bei geringerer Toxizität hervorrufen.

Bei B-Zellen bewirken immunstimulatorische CpG-ODN eine erhöhte Sekretion z. B. der Zytokine Interleukin-6 und Interleukin-10 und eine verstärkte Expression kostimulatorischer und antigenpräsentierender Oberflächenmoleküle. Ferner gibt es Hinweise dafür, dass CpG-ODN die Apoptose von B-Zellen hemmen und sie zur Proliferation anregen.

Über 80 % der Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) leiten sich aus B-Zellen verschiedener Reifestadien ab. Bisher war nicht bekannt, welche Wirkungen immunstimulatorische CpG-ODN auf diese malignen B-Zellen haben. Hauptziel dieser Arbeit war es daher, Zellen von Patienten mit verschiedenen Entitäten des NHL (chronisch lymphatische Leukämie vom B-Zell-Typ, kleinzelliges lymphatisches Lymphom, Mantelzelllymphom, folliculäres Lymphom, diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom und Marginalzonen-Lymphom) dahingehend zu untersuchen, ob und wie sie auf immunstimulatorische CpG-ODN reagieren. Insbesondere sollten dabei die Veränderungen des Oberflächenmarkerprofils, der Proliferationsrate und der Viabilität der Zellen festgestellt werden. Auch sollten mögliche Unterschiede im Verhalten normaler und maligner Zellen unterschiedlichen histologischen Typs aufgezeigt werden.

Abgeleitet von den Ergebnissen sollten darauf aufbauend mögliche therapeutische Strategien diskutiert werden. Durch die Anwendung diverser ODN mit unterschiedlichen Sequenzen und chemischen Modifikationen sollte außerdem herausgefunden werden, welche ODN die stärksten Effekte hervorrufen und damit für einen möglichen klinischen Einsatz am attraktivsten erscheinen.

### 1.2 Immunstimulatorische Oligodesoxynukleotide

#### 1.2.1 Definition und Geschichte

Oligodesoxynukleotide (ODN) sind kurzkettige, einzelsträngige DNS-Moleküle, die bis zu 24 Einzelbausteine (Nukleotide) enthalten, welche wiederum über Phosphatbrücken miteinander verbunden sind (3',5'-Bindung). Bei den Phosphatbrücken handelt es sich natürlicherweise um Phosphodiesterbrücken, diese können aber bei den synthetisch hergestellten ODN durch Phosphorothioatbrücken ersetzt werden, um die Stabilität der ODN vor allem gegenüber Esterasen zu steigern (s. Material und Methoden und Diskussion).

Erstmals berichtete im Jahre 1866 Prof. Busch aus Bonn von Patienten mit multiplen Sarkomen der Gesichtshaut oder malignen Drüsensarkomen des Halses, bei denen er die Beobachtung machte, dass sich diese Geschwülste zurückbildeten, wenn die Patienten gleichzeitig an dieser Stelle ein Erysipel entwickelten (Berliner Klinische Wochenschrift, 23. März 1868 S137f). Der selbe Effekt zeigte sich auch, als er bei einer weiteren Patientin mit Halsdrüsensarkom künstlich ein Erysipel induzierte. 25 Jahre später begann der New Yorker Chirurg William Coley eine Serie von Studien, in denen er untersuchte, welche therapeutischen Erfolge sich bei Tumorpatienten erzielen ließen, wenn man ihnen Streptokokken oder hitzeinaktivierte Bakterien, genannt „Coley´s Toxin“, in die Tumormasse injizierte (Coley 1893, 1894). Tatsächlich erreichten mehr als 40 % seiner annähernd 900 behandelten Patienten anhaltende klinische Remissionen.

Fast 100 Jahre nach den ersten Experimenten Coley´s fanden Tokunaga et al. heraus, dass bakterielle DNS murine Natürliche Killer- (NK-) Zellen aktivierte, deren Interferon- (IFN) Produktion induzierte, sowie zu Tumorrogression führen konnte, während DNS von Wirbeltieren dies nicht vermochte (Tokunaga 1984, Yamamoto 1988, 1992b). Im Gegensatz zu Vertebraten-DNS aktivierte bakterielle DNS auch B-Zellen, führte zu deren Proliferation und gesteigerter Immunglobulin-Sekretion (Messina 1991). Um die für diese Effekte verantwortlichen Sequenzen ausfindig zu machen, wurden daraufhin synthetische einzelsträngige ODN untersucht, wobei vermutet wurde, dass sogenannte Palindrome in den Sequenzen die Effekte hervorrufen (Yamamoto 1992a). Während A. M. Krieg die Wirkung sogenannter *Antisense*-ODN auf B-Zellen studierte, bemerkte er aber, dass einige der Kontroll-ODN, die keine Palindrome in ihren Sequenzen enthielten, ebenfalls B-Zellen aktivierten.

Nachdem er Hunderte von ODN mit verschiedenen Sequenzen getestet hatte, erkannte er, dass für die immunstimulatorischen Effekte unmethylierte CpG Dinukleotide im Kontext von bestimmten Basen notwendig waren (Krieg 1995). Da CpG-Dinukleotide auch im menschlichen Genom vorkommen, stellte sich die Frage, warum das Immunsystem auf bakterielle CpG-DNS mit einer Immunreaktion reagieren kann, durch die eigene humane CpG-DNS aber nicht aktiviert wird. Es muss also einen Unterschied zwischen humaner und bakterieller CpG-DNS bestehen. Es ist schon länger bekannt, dass bei menschlicher DNS der Großteil der Cytidine in CpG-Motiven an ihrer 5. Position methyliert sind, während bei bakterieller DNS Methylierungen in CpG-Motiven nur selten vorkommen (Bird 1987). Zudem weiß man, dass CpG-Motive im bakteriellen Genom mit der erwarteten Häufigkeit von 1:16 auftreten, im menschlichen Genom jedoch mit einer Frequenz von nur 1:64 stark unterrepräsentiert sind (Bird 1987). Ferner war auffällig, dass selbst unmethylierte menschliche DNS mit CpG-Motiven keine immunstimulatorische Wirkung zeigte. Dies ist dadurch zu erklären, dass es sich hier um hemmende CpG-Motive handelte. Bei hemmenden CpG-Motiven ist dem CpG-Dinukleotid entweder ein Cytidin vorangestellt oder es folgt unmittelbar ein weiteres CpG-Dinukleotid oder ein Guanosin (Krieg 1998b).

Es stellte sich schließlich heraus, dass für die oben erwähnte NK-Zell-Aktivierung nicht die Palindrome, sondern CpG-Motive ursächlich waren (Ballas 1996). Die Induktion der NK-Zellen wurde allerdings nicht durch direkte Effekte von CpG-ODN auf jene Zellen hervorgerufen, sondern waren vielmehr Folge von CpG-induzierter Zytokin-Sekretion von Monozyten und dendritischen Zellen, die ihrerseits durch CpG-ODN aktiviert wurden (Ballas 1996, Klinman 1996, Cowdery 1996, Anitescu 1997).

### 1.2.2 Molekulare Wirkmechanismen von CpG-ODN

Lange Zeit war unbekannt, welche molekularen Mechanismen für die Signaltransduktion durch CpG-ODN verantwortlich sind. Erst in letzter Zeit konnten einzelne molekulare Strukturen nachgewiesen werden, die an der Signaltransduktion beteiligt sind. Hemmi konnte als erster bei Mäusen zeigen, dass die zelluläre Antwort auf CpG durch das Transmembranprotein TLR9 (*Toll like receptor*) vermittelt wird (Hemmi 2000). Kürzlich wurde auch der Zusammenhang zwischen CpG-DNS und dem humanen TLR9 beschrieben (Bauer 2001, Takeshita 2001).

Die Familie der TLRs gehört zu den *pattern recognition receptors* (PRRs), welche eine essentielle Rolle bei der Erkennung von mikrobiellen Komponenten (*pathogen-associated molecular patterns*) spielen (Medzhitov 1997). Der zytoplasmatische Teil von TLR9 besitzt strukturelle Ähnlichkeit mit dem Interleukin-1 (IL-1) Rezeptor, wird daher auch als TIR-Domäne (Toll-IL-1R) bezeichnet und nutzt denselben Transduktionsweg. Das Adapterprotein *Myeloid differentiation marker 88* (MyD88) verbindet die TIR-Domäne mit *Interleukin-1 receptor-associated kinase* (IRAK), welche anschließend durch Phosphorylierung dissoziiert und mit einem weiteren Adapterprotein, dem *Tumor necrosis factor receptor-activated factor 6* (TRAF6) assoziiert. Dieser Prozess resultiert schließlich in der Aktivierung verschiedener Reaktionswege, an denen die Stresskinase *c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase* (JNK), die p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK), NF- $\kappa$ B und das Transkriptionsfaktor *activating protein-1* (AP-1) beteiligt sind. Letztendlich werden dadurch Genexpression und Zytokinsekretion induziert (Review Akira 2001).

Unklar bleibt hingegen, wie TLR9 CpG-DNS erkennt, da bisher keine Bindungsdomäne nachgewiesen werden konnte. Es konnte bereits gezeigt werden, dass CpG-DNS pH-abhängig endozytotisch in Endosomen aufgenommen werden muss, um ihre Wirkung zu entfalten (Macfarlane 1998, Hacker 1998, Yi 1998a). Aber auch die Rollen von *reactive oxygen species* (ROS) und von Hitzeschockprotein 90 (Hsp90), die im Zusammenhang mit der CpG-Signaltransduktion beschrieben wurden, müssen noch weiter erforscht werden (Yi, 1996a, Zhu 2001).

### 1.2.3 Zelluläre Effekte von CpG-ODN

Wie schon teilweise oben beschrieben hat CpG-DNS verschiedene Wirkungen auf das Immunsystem. Im folgenden sollen kurz die bisher bekannten Effekte auf verschiedene Zellen des Immunsystem erläutert werden, eine Übersicht gibt Abb. 1.1.

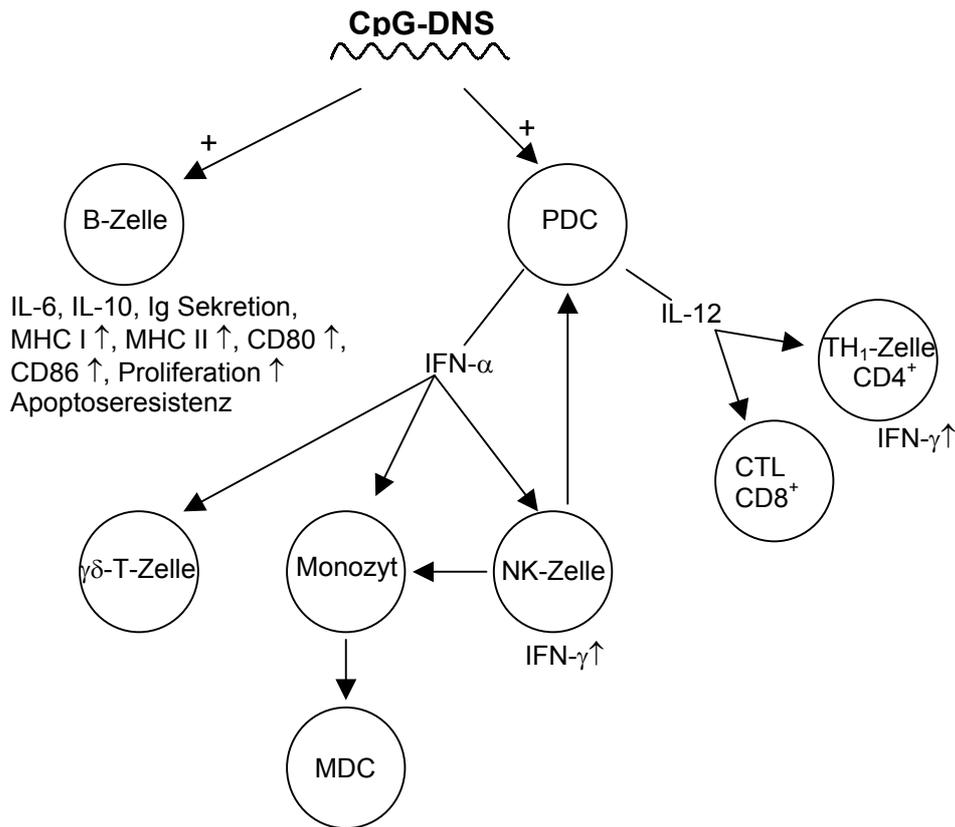


Abbildung 1.1. Wirkungen von CpG-Oligodesoxynukleotiden im humanen Immunsystem. CTL Zytotoxischer T-Lymphozyt; MDC Myeloide dendritische Zelle; PDC Plasmazytoide dendritische Zelle; TH<sub>1</sub>-Zelle: T-Helferzelle Typ 1

CpG-DNS veranlasst bis zu 95 % der B-Zellen, in den Zellzyklus einzutreten (Krieg 1995). Neben der Proliferation wird die Sekretion von IL-6, IL-10 und Immunglobulin induziert (Yi 1996a, Redford 1998), außerdem werden B-Zellen durch CpG-DNS vor spontaner und Fas-vermittelter Apoptose geschützt (Yi 1996b, 1998b, MacFarlane 1997, Wang 1997). Ferner wird die Expression von MHC I, MHC II-, CD80- und CD86-Molekülen auf der Zelloberfläche gesteigert, und es kann in geeignetem Zytokinmilieu zu einem Ig-Klassenwechsel kommen (Krieg 1995, Davis 1998). Die zunächst für murine B-Zellen beschriebenen Ergebnisse wurden auch für humane B-Zellen bestätigt (Hartmann 2000b).

In der Maus haben CpG-ODN auch auf Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen (DC) direkte stimulatorische Effekte, die bei ersteren u. a. in einer gesteigerten IL-12-Sekretion und bei den DCs in vermehrter IL-12-, TNF- $\alpha$ - und IL-6-Sekretion resultieren (Stacey 1996, 2000, Lipford 1997, Chace 1997). DCs weisen nach Stimulation eine erhöhte Expression von MHC I, MHC II, CD40, CD80 und CD86 auf und sind dadurch fähig, die T-Zell-Aktivierung zu steigern (Jakob 1998). Es stellte sich jedoch heraus, dass es sich im humanen System hier um indirekte bzw. sekundäre Effekte handelt. Beim Menschen wird

lediglich die Subpopulation der plasmazytoiden DCs neben den B-Zellen direkt durch CpG-ODN aktiviert (Hartmann 1999, Krug 2001b, Hornung 2002).

Wie schon erwähnt aktiviert CpG-DNS auch murine NK-Zellen, die dann eine stärkere lytische Aktivität und IFN- $\gamma$ -Sekretion aufweisen (Ballas 1996, Cowdery 1996). Hierbei handelt es sich jedoch ebenfalls nicht um einen direkten, sondern um einen indirekten Effekt, da er abhängig von IL-12 und IL-18 ist, welches von durch CpG-DNS aktivierten Makrophagen stammt, die wiederum durch IFN- $\gamma$  weiter aktiviert werden (positives Feedback) (Chace 1997).

Auch auf murine T-Zellen besitzt CpG-DNS keine bisher nachgewiesenen direkten Effekte, jedoch werden diese ebenfalls indirekt durch IL-12 verstärkt aktiviert. Auch wird von einer Kostimulation von bereits über ihren Antigen-Rezeptor aktivierten T-Zellen durch CpG-DNS berichtet, wenn die DNS-Sequenz außerdem ein Poly-Guanosin-Motiv enthält. Die Aktivierung drückt sich in erhöhter Proliferation und Zytokin-Produktion (IL-2) aus (Bendigs 1999, Lipford 2000).

### 1.2.4 Therapeutische Strategien und Toxikologie von CpG-ODN

Bei den erwähnten Effekten auf verschiedene Zellen des Immunsystems ist es nicht verwunderlich, dass die Anwendung von CpG-DNS zu einer Verstärkung der angeborenen Immunabwehr im Rahmen von Infektionen führt. Tatsächlich zeigte sich in diversen Mausmodellen ein präventiver Schutz gegen Listerien, Leishmanien und Malaria, sowie therapeutische Erfolge bei Leishmanien (Krieg 1998a, Zimmermann 1998, Elkins 1999, Gramzinski, 2001).

Durch seine Fähigkeit, antigenspezifische Immunantworten zu verstärken, ist CpG DNS ein attraktives Adjuvans bei prophylaktischen und therapeutischen Vakzinierungen. In Tiermodellen wurde bei Vakzinierungen gegen Hepatitis B, Influenza oder Malaria (Davis 1998, Moldoveanu 1998, Jones 1999) eine schnellere Antikörperproduktion und stärkere Aktivität von zytotoxischen T-Zellen beobachtet, wenn CpG-DNS als Adjuvans verwendet wurde. Seit 1999 läuft eine klinische Studie am Menschen, bei der CpG-DNS als Adjuvans für den Hepatitis B Impfstoff Engerix B benutzt wird. Während Probanden, die nur den Impfstoff erhielten, nach zwei Wochen keine Antikörper gegen Hepatitis B bildeten, hatten 92 % derer, die CpG als Adjuvans bekamen, schon deutliche Antikörpertiter. Nach der dritten Impfung (6 Monate nach der ersten) zeigten die

mit CpG-DNS behandelten Probanden einen um das 10-fache höheren Antikörpertiter als die Kontrollgruppe. Zur Behandlung von Tumorerkrankungen könnte CpG-DNS als Adjuvans entweder zur Unterstützung der Immunisierung gegen tumorspezifische Antigene (Liu 1998) oder für die Reifung und Aktivierung von DCs *in vitro* im Rahmen von Tumor-Vakzinen dienen (Hartmann 1999).

Auch könnte CpG-DNS zur Therapie von Allergien und Asthma beitragen. Diese Krankheiten sind durch ein Überwiegen der Th-2 (T-Helferzelle Typ 2) Antwort gekennzeichnet, wohingegen sich CpG-DNS als ein Induktor der Th1 Immunantwort erwiesen hat. So war CpG-DNS einerseits in verschiedenen Tiermodellen bei allergischem Asthma therapeutisch wirksam (Kline 1998, Sur 1999), andererseits verminderte CpG-DNS als Adjuvans bei Desensibilisierungen gegen spezifische Antigene die Ausprägung der allergischen Reaktionen (Parronchi 1999, Van Uden 1999).

Neben der oben beschriebenen Möglichkeit, CpG-DNS als Adjuvans bei Tumor-Vakzinen zu verwenden, bieten sich weitere Strategien an, CpG-DNS in der Krebstherapie einzusetzen. So kann einerseits die vermehrte Zytokin-Produktion durch Immunzellen genutzt werden, da eine Reihe von Zytokinen Anti-Tumor-Aktivität besitzen, wie z. B. TNF- $\alpha$ , IL-12 und IFN- $\gamma$  (Heaton 1993, Kantarjian 1998, Rosenberg 1985). Andererseits ist auch die Aktivierung der Immunzellen selbst von großem Nutzen. So konnte z. B. gezeigt werden, dass CpG-DNS zu verstärkter lytischer Aktivität von NK-Zellen gegen Lymphome oder Neuroblastome führte (Smith 1998, Carpentier 1999). Ferner gibt es aus einem Tiermodell Hinweise, dass die therapeutischen Erfolge, die mit monoklonalen Antikörpern gegen Tumorantigene erzielt werden, durch CpG-DNS verbessert werden könnten. Die durch Antikörper vermittelte zelluläre Zytotoxizität (ADCC) spielt bei dieser Strategie eine große Rolle, so dass eine verstärkte Aktivität der beteiligten Zellen, wie NK-Zellen, Makrophagen und Monozyten, zu besseren Therapieerfolgen führen sollte. Tatsächlich wurde diese Vermutung bei Mäusen mit B-Zell-Lymphomen bestätigt (Wooldridge 1997).

Bei den bisher durchgeführten klinischen Tests, bei denen vor allem in *Antisense*-Studien mehrere tausend Patienten mit CpG-haltigen Oligodesoxynukleotiden behandelt wurden, erwiesen sich diese als allgemein sehr gut verträglich für Menschen. In großen präklinischen toxikologischen Studien wurden ebenfalls keine unerwarteten Nebenwirkungen oder Toxizitäten

festgestellt. Eine Bildung von Anti-DNS-Antikörpern wurde bisher weder bei Mäusen (Mor 1997) noch beim Menschen beobachtet.

### 1.3 B-Lymphozyten

#### 1.3.1 Lymphatisches System und Differenzierung von B-Lymphozyten

Diese Arbeit beschäftigt sich mit verschiedenen Non-Hodgkin-Lymphomen der B-Zell Reihe. Es zeigte sich, dass die zelluläre Herkunft morphologische, immunphänotypische und klinische Merkmale der verschiedenen Lymphome wesentlich bestimmt, so dass zum Verständnis der Lymphome und ihrer Klassifikation zunächst der Aufbau, die Entwicklung und die Reifungsformen des lymphatischen Systems, speziell der B-Lymphozyten beschrieben werden.

Das lymphatische Gewebe bildet zusammen mit den zirkulierenden Lymphozyten das lymphatische System. Folgende, an der Immunabwehr beteiligte und die Immunantwort regulierende Zellen können im lymphatischen Gewebe identifiziert werden: B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, natürliche Killerzellen, Makrophagen, folliculäre dendritische Zellen (FDC), interdigitierende Zellen und hohe endotheliale Venolen. Man unterscheidet zwischen dem primären bzw. zentralen lymphatischen Gewebe, in dem die Fremdanigen-unabhängige Lymphopoese aus den Stammzellen stattfindet und dem sekundären bzw. peripheren lymphatischen Gewebe, dessen Zellen auf Fremdanigene treffen und darauf mit der Bildung und Vermehrung entsprechender Effektor- und Gedächtniszellen reagieren.

Reife B-Zellen entstehen aus hämopoetischen Stammzellen im Knochenmark bzw. zentralen lymphatischen Gewebe (s. Abbildung 1.2). In der Progenitor-B-Zelle finden sich bereits einige B-Zell-charakteristische Oberflächenproteine, die Umlagerung der Immunglobulin- (Ig-) Gene beginnt. In der Prä-B-Zelle liegt bereits eine vollständige VDJ-Umlagerung des Ig-Schwerkettengens (IgH) vor. Durch die anschließende Umlagerung des Ig-Leichtkettengens (IgL) entsteht die unreife B-Zelle, die komplette Antikörper vom IgM-Typ herstellt und in ihrer Membran verankert. Nach Abschluss dieses Entwicklungsabschnitts entstehen reife naive B-Zellen, die IgM und IgD an der Oberfläche koexprimieren.

Die reifen naiven B-Zellen besiedeln periphere lymphatische Gewebe wie Milz, Lymphknoten und das mukosaassoziierte lymphatische Gewebe (MALT), in

Form von Primärfollikeln. Bei Antigenstimulation differenzieren sie zu kurzlebigen (3-5 Tage) Plasmazellen, welche Antikörper sezernieren, oder in antigeninduzierte B-Zellen, die Keimzentren bilden oder „als Nachschub“ in bestehende Keimzentren einwandern. Bei der Keimzentrumsreaktion transformieren die eingewanderten B-Zellen in Zentroblasten, expandieren durch heftige Proliferation und drängen auf diese Weise die ruhenden naiven B-Zellen an den Rand, wodurch der Follikelmantel entsteht. Im weiteren Verlauf differenzieren die Zentroblasten in Zentrozyten, die sich in der Nähe des Follikelmantels sammeln. Hierdurch entstehen die helle (zentrozytenreiche) und die dunkle (zentroblastenreiche) Keimzentrumszone. Die Vergrößerung, Vermehrung und Aktivierung der Keimzentren im Rahmen der B-Zell-Stimulation wird auch als follikuläre (lymphatische) Hyperplasie bezeichnet (FH).

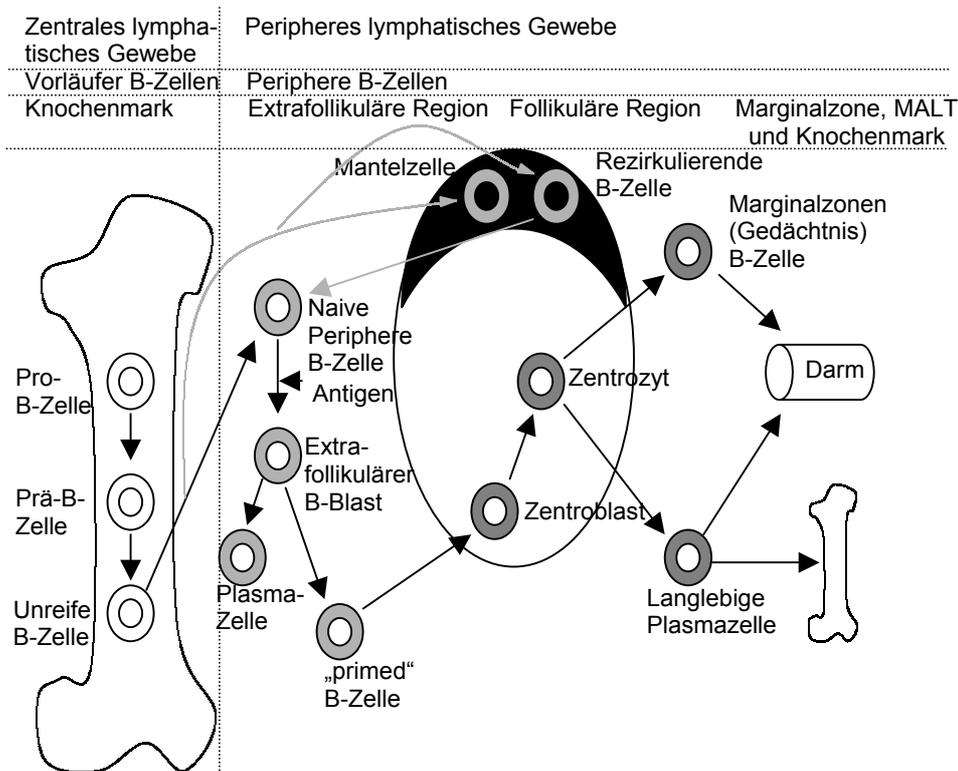


Abbildung 1.2. Übersicht über die Entwicklung und Reifung der B-Zellen (nach Coupland 2000a)

Ebenfalls vermehren sich die FDCs sehr stark. Sie tragen an ihrer Oberfläche Komplementrezeptoren, mit denen sie Antigen-Antikörper-Komplexe abfangen und auf diese Weise den Keimzentrums-B-Zellen Fremdanigen präsentieren. Weit über 90 % der gebildeten Zentrozyten werden durch Apoptose eliminiert. Dabei handelt es sich um Zellen, deren Ig-Rezeptoren das von den FDCs dargebotene Antigen nur mit geringer Affinität oder gar nicht binden können.

## Einleitung

Der überlebende Anteil mit hoher Affinität differenziert in langlebige Plasmazellen, wobei meist ein Klassenwechsel von IgM nach IgG oder IgA stattfindet oder in Gedächtnis-B-Zellen, die zu einer neuen beschleunigten Reaktion auf Antigen befähigt sind. Diese terminalen Differenzierungsschritte gehen mit einer Emigration dieser Zellen aus dem Keimzentrum einher. Während die langlebigen Plasmazellen vornehmlich in das Knochenmark wandern, besiedeln die Gedächtnis-B-Zellen die Marginalzone, die sich in der unmittelbaren Nachbarschaft der äußeren Mantelzone befinden.

B-Zelle	Immun-globulin-Gen	Somatische Mutation	Ig-Protein	Marker	Korrespondierende Lymphome
Stammzelle	Keimbahn	Keine	Keine	CD34	
Pro-B-Zelle	Keimbahn	Keine	Keine	CD19, 79a, BSAP	
Prä-B-Zelle	IgH-Umlagerung	Keine	Ig $\mu$ (zytoplasmatisch)	CD19, 45R, 79a, BSAP	B-LBL
Unreife-B-Zelle	IgL-Umlagerung IgH umgelagert IgM (M)	Keine	IgM (Membran)	CD19, 20, 45R, 79a, BSAP	
Reife naive B-Zelle	IgH/L umgelagert IgM und IgD (M)	Keine	IgM/IgD	CD19, 20, 45R, 79a, BSAP	B-CLL, MCL, SLL
Keimzentrums-Zelle	IgH/L umgelagert Klassenwechsel	Einbau somatischer Mutationen	Ig (gering oder abwesend)	CD19, 20, 45R, 79a, BSAP	BL, FL, DGBZL, LPHL, cHL
Gedächtnis-B-Zelle	IgH/L umgelagert	Somatische Mutationen	IgM/IgG	CD19, 20, 45R, 79a, BSAP	MZL
Plasmazelle	IgH/L umgelagert	Somatische Mutationen	IgG>IgA>IgD	CD38, Vs38c, MUM-1	P

Tabelle 1.1. B-Zell-Entwicklung und korrespondierende Lymphome  
M Membran; B-CLL chronisch lymphatische Leukämie vom B-Zell-Typ; BL Burkitt-Lymphom; B-LBL Lymphoblastisches Lymphom vom B-Zell-Typ; cHL klassisches Hodgkin-Lymphom; DGBZL diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom; FL follikuläres Lymphom; LPHL Lymphozytenprädominantes Hodgkin-Lymphom; MCL Mantelzelllymphom; MZL Marginalzonen-Lymphom; P Plasmozytom; SLL kleinzelliges lymphatisches Lymphom

Die Affinitätssteigerung der Ig-Rezeptoren gegenüber dem Antigen wird durch somatische Hypermutation mit nachfolgender Antigenselektion erreicht (Rajewsky 1996). Da somatische Mutationen der Ig-Gene nach gegenwärtigen Verständnis ausschließlich in den Keimzentren auftreten, kann deren Nachweis dazu verwendet werden, die Differenzierungsstufe von normalen und neoplastischen B-Zellen zu studieren. Das Fehlen von somatischen Mutationen im IgV-Gen-Bereich kennzeichnet einen B-Zell-Differenzierungszustand vor der Keimzentrumsreaktion; die Existenz von somatischen Mutationen weist eine B-Zelle als Keimzentrums-B-Zelle oder Postkeimzentrums-Gedächtnis- oder

Effektor-B-Zelle aus Keimzentrums-B-Zellen oder Postkeimzentrums-B-Zellen lassen sich dadurch unterscheiden, dass bei ersteren der somatische Mutationsprozess noch im Gang ist, während er bei letzteren weitgehend abgeschlossen ist (Coupland 2000a).

### 1.3.2 Oberflächenmoleküle

Tabelle 1.2 gibt Auskunft über die in dieser Arbeit untersuchten Oberflächenmoleküle, ihre Funktion und die Zellen auf denen sie exprimiert werden. Im folgenden wird die CD (*cluster of differentiation*)-Nomenklatur verwendet, ein internationales System für die Bezeichnung von Differenzierungsantigenen auf der Zelloberfläche von Leukozyten. Die Detektion erfolgt durch monoklonale Antikörper.

## 1.4 Non-Hodgkin-Lymphome

### 1.4.1 Definition und Klassifikation

Bei den Non-Hodgkin-Lymphomen handelt es sich um eine heterogene Gruppe klonaler neoplastischer Erkrankungen des lymphatischen Systems. Die histologischen Kennzeichen des Morbus Hodgkin fehlen, manche klinische Zeichen sind jedoch ähnlich. Die Unterscheidung der verschiedenen Lymphomkrankheiten ist sinnvoll, weil diese eine unterschiedliche Prognose aufweisen und ihre Behandlung vielfach ein unterschiedliches therapeutisches Vorgehen verlangt. Es existieren zahlreiche Klassifikationssysteme der Non-Hodgkin-Lymphome. In dieser Arbeit wird die neue WHO Klassifikation der malignen Lymphome von 2001 verwendet, die sich an der „*Revised European American Lymphoma*“ (REAL) Klassifikation von 1994 orientiert und diese aktualisiert (Stein 2000). Beiden gemeinsam ist, dass sie im Unterschied zu früheren Klassifikationen nicht nur morphologische und klinische, sondern auch immunphänotypische und molekulargenetische Merkmale heranziehen. Bei Anwendung der in diesen Klassifikationen beschriebenen Kriterien können distinkte Lymphomkrankheiten mit hoher Reproduzierbarkeit diagnostiziert und von reaktiven Läsionen des lymphatischen Gewebes abgegrenzt werden. Im folgenden werden die Morphologie, Immunhistologie, Genetik und Klinik der in dieser Arbeit untersuchten Lymphome näher beschrieben.

## Einleitung

Molekül	Andere Namen	Expression	Funktionen bei B-Zellen
CD5	Leu-1	T-Zellen, bei einigen Lymphomen u. Autoimmunkrankheiten auch auf B-Zellen	Signaltransduktion moduliert T-Zell-B-Zell-Interaktion
CD19	B4	B-Zellen, FDCs	Signaltransduktion, reguliert B-Zell-Differenzierung, Proliferation und Aktivierung
CD69	VEA	aktivierte T-, B-, NK-Zellen, Neutrophile und Eosinophile	Signaltransduktion, Zell-Aktivierung
CD40	Bp50	B-Zellen, Epithelzellen, DCs, Makrophagen u.a.	beteiligt an B-Zell-Wachstum, Differenzierung, Proliferation, Aktivierung und Ig-Klassenwechsel
CD54	ICAM-1	Endothel-, Epithel-, T-, B-Zellen, Monozyten, FDCs	Leukozytenadhäsion ans Endothel bei Immunreaktionen
CD80	B7.1	aktivierte B-Zellen	reguliert IL-2 Gen-Expression, Kostimulation der T-Zell-Aktivierung
CD86	B7.2	Gedächtnis-B-Zellen, Zentrozyten > Zentroblasten, DCs, Monozyten, aktivierte T-Zellen	reguliert IL-2 Gen-Expression, Kostimulation der T-Zell-Aktivierung
IgM		B-Zellen	agglutinierende, komplementbindende und toxinneutralisierende Antikörper, Antigenrezeptor
CD20	B1	B-Zellen	reguliert B-Zell-Proliferation und Aktivierung
1-D-10		maligne B-Zellen	Variante von HLA-DR
MHC I	HLA-A, B, C	fast alle Körperzellen	Antigenpräsentation, Wechselwirkung v. a. mit zytotoxischen T-Zellen
MHC II	HLA-DP, DQ, DR	B-Zellen, DCs, aktivierte Makrophagen	Antigenpräsentation, Wechselwirkung v.a. mit T-Helferzellen
CD95	Fas, APO-1	aktivierte B- und T-Zellen	Transduktion von Apoptose-induzierenden Signalen
CD64	FC $\gamma$ RI	Monozyten, Makrophagen, DCs	Rezeptor-vermittelte Endozytose von IgG-Antigen-Komplexen, ADCC, Zytokin- und Superoxid-Freisetzung

Tabelle 1.2. In dieser Arbeit untersuchte Oberflächenmoleküle  
ADCC *antibody dependent cellular cytotoxicity*; DC dendritische Zelle; HLA *human leucocyte antigen*; ICAM *intercellular adhesion molecule*; MHC *major histocompatibility complex*; VEA *very early activation*

### 1.4.2 Chronische lymphatische Leukämie vom B-Zell-Typ (B-CLL)

Die B-CLL wird zu den kleinzelligen B-Zell-Lymphomen gerechnet. Sie zeigt im befallenen Lymphknoten in 90 % ein pseudofollikuläres, in 10 % ein diffuses Wachstumsmuster. Die Zellen besitzen einen runden Zellkern mit hochkondensiertem Kernchromatin. Gelegentlich sind die Kerne unregelmäßig geformt. Eine immunhistologisch meist nur schwache Positivität für CD20 in Verbindung mit der Expression von CD23, CD5 und CD43 sowie dem Fehlen von Maschenwerken follikulärer dendritischer Zellen ist für die B-CLL pathognomonisch. Ferner sind die B-CLL-Zellen für Bcl-2 positiv, für CD10 und Cyclin-D<sub>1</sub> negativ. Genetisch zeigt sich eine klonale Umlagerung der IgH- und IgL-Gene. Dabei gibt es zwei Formen der B-CLL, eine mit und eine ohne somatische Mutationen. Wie unter 1.3.1 beschrieben folgt, dass B-CLL-Fälle ohne somatische Mutation von Präkeimzentrums-B-Zellen bzw. naiven B-Zellen und B-CLL-Fälle mit somatischen Mutationen von Postkeimzentrums-B-Zellen bzw. Gedächtnis-B-Zellen abstammen. Chromosomale Aberrationen finden sich bei 82 % aller Patienten. In 26 % der B-CLLs findet sich eine Trisomie 12q, in 18 % das Fehlen von Chromosom 11q und in 55 % 13q-Deletionen (Döhner 2000).

Die B-CLL macht 20 % aller NHLs und 90 % aller CLLs aus. Sie kommt hauptsächlich im höheren Lebensalter vor (Durchschnittsalter 65 Jahre) und trifft häufiger Frauen. In den meisten Fällen sind das Knochenmark und das Blut z. Z. der Diagnose befallen. Ein Befall von Lymphknoten, Milz und Leber ist häufig. Gelegentlich ist der Befall bei Diagnosestellung auf Lymphknoten beschränkt, allerdings kommt es im weiteren Verlauf praktisch immer zu einer Ausbreitung in das Knochenmark und das Blut. Diese Form, deren Zellen im Gegensatz zur B-CLL CD11a und CD18 exprimieren, bezeichnet man auch als kleinzelliges lymphozytisches B-Zell-Lymphom (SLL). Die Krankheit ist meist indolent (Ausnahme großzellige Transformation = Richter Syndrom) aber nicht heilbar (Coupland 2000b).

### 1.4.3 Weitere kleinzellige B-Zell-Lymphome

Das Mantelzelllymphom (MCL) hat als Ausgangszelle die Mantelzelle und zeigt ein „mantelzonenartiges“, primärfollikelartiges, angedeutet follikuläres oder diffuses Wachstumsmuster. Zytologisch finden sich kleine bis mittelgroße monomorphe Zellen, deren Kerne meist unregelmäßig konfiguriert sind und

mäßig kondensiertes Kernchromatin mit wenig prominenten Nukleolen aufweisen. Das Zytoplasma ist schmal bis kaum erkennbar. Das Immunprofil mit Positivität für CD20, CD43, CD5 und BCL-2 bei Fehlen von CD10 und CD23 ist charakteristisch. Ein positiver Nachweis von Cyclin-D<sub>1</sub> gelingt aus technischen Gründen nur in 80-90 % der Fälle, ist dann aber diagnosebeweisend. Sehr charakteristisch ist auch ein lockereres offenes Maschenwerk follikulärer dendritischer Zellen zwischen den Tumorzellen. Genetisch finden sich klonale IgH- und IgL-Umlagerungen, keine oder nur sehr wenige somatische Mutationen sowie eine Translokation t(11;14) mit Umlagerung des Cyclin-D<sub>1</sub>-Gens. Diese Cyclin-D<sub>1</sub>-Expression ist tumor- und so gut wie MCL-spezifisch.

Das MCL macht 4 % aller NHL aus, ist eine Erkrankung des mittleren bis höheren Lebensalters (Durchschnittsalter 63 Jahre) und betrifft häufiger das männliche Geschlecht. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ist der Lymphknotenbefall meist ausgedehnt, ferner werden Milz, Knochenmark, Waldeyer-Rachenring und Magen-Darm-Trakt befallen. Das MCL ist relativ aggressiv, die mediane Überlebenszeit beträgt nur 3-5 Jahre, bei einer blastischen Variante (10 %) noch weniger, es ist nicht heilbar.

Das Wachstum des follikulären Lymphoms (FL) ist follikulär, teilweise aber auch diffus. Die typische Zonierung des Keimzentrums fehlt, ein Follikelmantel ist oft nur verschmälert bis fehlend. Meist ist auch die Interfollikularregion durch Tumorzellen infiltriert. Bei den Zellen handelt es sich um ein Gemisch aus den zahlenmäßig stark vorherrschenden Zentrozyten und Zentroblasten. Die Mehrzahl der Zellen exprimiert CD20, CD10 und das Bcl-6-Protein, bei Negativität für CD5 und CD43. Im Vergleich zu reaktiven Keimzentren zeigt das FL eine stark verminderte proliferative Aktivität und in über 90 % der Fälle eine Positivität für Bcl-2. Ferner ist für das FL ein dichtes scharf begrenztes FDC-Maschenwerk charakteristisch. Die IgH- und IgL-Gene sind beim FL klonal umgelagert, die IgH-Gene enthalten eine große Zahl somatischer Mutationen, wobei Zeichen für noch ablaufende („*ongoing*“) Mutationen für das FL hoch charakteristisch sind. Ein weiteres genetisches Merkmal ist die Translokation t(14;18), die sich in 90 % der Fälle nachweisen lässt. Diese geht einher mit der Umlagerung des Bcl-2-Gens in die Nähe des IgH-Promotors, in deren Folge es zu einer Dauerexpression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 kommt. Dies führt dazu, dass sich diese Zellen der physiologischen apoptotischen Elimination bei der Antigenselektion entziehen und es so zu einer kontinuierlichen Anhäufung der FL-Zellen kommt.

Das FL macht in den USA 40 %, in Europa 20-30 % aller NHLs aus, zeigt keine Geschlechtspräferenz und ist eine Erkrankung des späteren Erwachsenenalters (Durchschnittsalter 59 Jahre). Es befällt vornehmlich Lymphknoten, aber auch Milz, Knochenmark und Haut und ist bei Diagnosestellung oft in fortgeschrittenem Stadium. Trotzdem liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei über 75 %. 1/3 der Fälle gehen in ein großzelliges Lymphom über, was mit einer Steigerung der Malignität verbunden ist (Coupland 2000b).

Bei den Marginalzonen-B-Zell-Lymphomen (MZL) unterscheidet man drei Formen: Extranodales MZL (EMZL), nodales MZL und splenisches MZL. In dieser Arbeit wurden nodale MZL untersucht, daher beschränken sich die folgenden Ausführungen auf diese Form der MZL. Ursprungszellen sind die Marginalzonenzellen der Sekundärfollikel. Die monozytoiden, zentrozytoiden oder auch plasmazytoiden Tumorzellen breiten sich in der Marginalzone und interfollikulär aus, z.T. unter Erhalt und z.T. unter Verdrängung von Mantelzone und Kolonisierung der Follikelzentren residualer Sekundärfollikel.

Typischerweise enthält das Infiltrat einige diffus verteilte zentroblastenartige größere Tumorzellen. Die Zellen sind positiv für CD20 und meist auch für Bcl-2, sowie negativ für CD5, CD10, CD23 und Cyclin D<sub>1</sub>. Molekulargenetisch finden sich klonale Umlagerungen der IgH- und IgL-Gene, somatische Mutationen können ausgebildet sein, aber auch fehlen.

Das MZL tritt bevorzugt im mittleren bis hohen Erwachsenenalter auf, Frauen sind etwas häufiger betroffen. Die meisten Fälle des nodalen MZL werden in Zusammenhang mit Sjögren-Syndrom und konsekutivem Speicheldrüsenlymphom oder in Zusammenhang mit einer späteren Entwicklung eines EMZL vom MALT-Typ beschrieben. Der Verlauf ist relativ indolent, kann aber bei blastärer Transformation eine schnellere Progredienz zeigen (Dallenbach 2000).

### 1.4.4 Großzellige B-Zell-Lymphome

Die großzelligen B-Zell-Lymphome repräsentieren eine inhomogene Gruppe. In dieser Arbeit werden nur diffuse großzellige B-Zell-Lymphome (DGBZL) beschrieben und untersucht. Dies sind sämtliche B-Zell-Neoplasien, die diffus wachsen und deren Tumorzellkerne die Größe eines normalen Makrophagen oder den doppelten Durchmesser eines normalen Lymphozyten aufweisen. Sie entstehen meist *de novo*, werden dann als „primär“ bezeichnet, können aber

auch „sekundär“ durch Transformation aus einem anderen Lymphom entstehen, meist aus einem FL, seltener aus einer B-CLL oder einem MZL. Morphologisch werden eine zentroblastische, eine immunoblastische, eine T-Zell- und eine anaplastische Variante unterschieden.

Die letzte Variante, welche in dieser Arbeit untersucht wurde, ist charakterisiert durch ausgesprochen große, rundliche, ovale oder polygonale Zellen mit bizarren polymorphen Zellkernen. Unabhängig von der Zytologie zeigen diese Neoplasien ein diffuses Infiltrationsmuster mit Zerstörung präexistenter Strukturen. Die Zellen exprimieren alle CD20, in bis zu 70 % der Fälle Bcl-6, in bis zu 50 % CD10, die Immunfärbung für CD30 ist Voraussetzung für die Abgrenzung der anaplastischen Variante. Bei sekundären Formen kann je nachdem auch Positivität für CD5 und/oder CD23 nachgewiesen werden. Die Wachstumsfraktion der Tumorzellpopulation beträgt immer mindestens 40 %. Die Ig-Gene sind klonal umgelagert und weisen eine hohe Zahl von somatischen Mutationen auf, woraus folgt, dass diese B-Zell-Neoplasien den Keimzentrumszellen oder den Gedächtnis-B-Zellen entstammen. In bis zu 40 % der DGBZL sind Bcl-6-, in 20-30 % Bcl-2-Genumlagerungen nachweisbar, letztere weisen auf eine Transformation eines FL hin. Ferner finden sich bei DGBZL oft komplexe chromosomale Aberrationen.

Das Durchschnittsalter der Patienten mit DGBZL liegt im 6. Lebensjahrzehnt mit einer breiten Altersspanne. Es handelt sich um einen schnell wachsenden solitär nodalen (60 %) oder extranodalen (40 %, befallen sind z.B. Gastrointestinaltrakt > Haut > Weichgewebe > Zentrales Nervensystem) Tumor mit aggressivem klinischen Verlauf (Anagnostopoulos 2000).

### 1.4.5 Burkitt-Lymphom (BL)

Dieses in Zentralafrika endemisch vorkommende Lymphom zeigt histologisch dominierende lymphoide Blasten und Makrophagen. Die Blasten enthalten einen rundlichen Zellkern und einen großen, meist zentral gelegenen Nukleolus. Wegen einer ausgeprägten Apoptose der rasant proliferierenden Blasten sind die Makrophagen mit phagozytierten Tumorzelltrümmern vollgestopft und werden als „Sternhimmelzellen“ bezeichnet. Die Zellen sind für CD10, CD19, CD20 und Bcl-2 positiv. Zytogenetisch findet sich bei 90 % der Patienten eine Translokation t(8;14), die restlichen 10 % haben Translokationen t(8;2) oder t(8;22). Hierdurch wird das c-myc-Onkogen umgelagert, was zur ungehemmten

Proliferation des Lymphoms führt. Andererseits ist das Genom des Epstein-Barr-Virus (EBV) nahezu immer im BL aus Zentralafrika, jedoch so gut wie nie beim lymphoblastischen Lymphom vom Burkitt-Typ in den USA nachzuweisen.

Der Altersgipfel liegt beim Burkitt-Lymphom in der 1., 5. und 7. Lebensdekade. Es ist meist im Gesicht (v. a. im Kieferknochen) oder am Hals, aber auch an inneren Organen wie Nieren, Nebennieren, Ovarien, Speicheldrüsen und Leber lokalisiert. Es kommt zu spontanen Remissionen bei EBV-positiven Fällen. Auch Chemotherapie kann zu vollständigen Remissionen führen, die Prognose ist im allgemeinen aber sehr ernst, der Tumor sehr aggressiv, die mediane Überlebenszeit beträgt weniger als 1 Jahr.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Zellkultur

#### 2.1.1 Herstellen von Zellkulturmedium

Sowohl für die isolierten Zellen aus peripherem Blut als auch für Daudi Zellen wurde RPMI-1640- Medium (Biochrom, Berlin) verwendet, welchem 10 Vol % hitzeinaktiviertes (56°C, 30 Minuten) fetales Kälberserum (FCS, HyClone, Logan, UT), 2 mM L-Glutamin (Sigma, München) und 1 Vol % Penicillin/Streptomycin (Sigma, München) beigemischt wurde. Dieses Zellkulturmedium wurde noch durch einen 0,2 µm Filter steril filtriert (MNC-Medium). Sämtliche Experimente und Manipulationen mit den Zellen wurden ausschließlich in der sterilen Atmosphäre eines Laminar-Air-Flow (LaminAir® HB 2448, Heraeus, München, BRD) durchgeführt.

#### 2.1.2 Isolation von mononukleären Zellen aus peripherem Blut

Gesunden Spendern oder ambulanten Patienten, die an Chronischer Lymphatischer Leukämie erkrankt waren und in die Tagesklinik der Medizinischen Klinik Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität zur Verlaufskontrolle kamen, wurde im Rahmen eines *informed consent* von den dortigen Ärzten 20 ml heparinisiertes Blut abgenommen, wobei pro 10 ml Blut 100 µl Heparin (Heparin-Natrium, Braun, Melsungen, BRD) verwendet wurde. Das Blut wurde auf vier 50 ml Röhrrchen (*Blue Caps*, Greiner Labortechnik, BRD) verteilt, die zuvor mit je 15 ml Ficoll-Hypaque (Biochrom, Berlin) gefüllt worden waren. Anschließend wurde auf 50 ml mit sterilem 0,9 % NaCl (Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, BRD) vorsichtig aufgefüllt, ohne dass sich dabei die drei Phasen vermischten. Nach Zentrifugieren (1000 g, 20°C, 15 min, Beschleunigung 1, Bremsung 1) fand man in jedem *Blue Cap* von oben nach unten die folgende Schichtung vor: Plasma, Ring aus mononukleären Zellen (MNC), Ficoll, Erythrozyten.

Der MNC-Ring wurde mit Hilfe einer Pipette abgehoben, in ein neues *Blue Cap* gegeben, mit NaCl auf 50 ml aufgefüllt und wiederum zentrifugiert (1590 rpm, 20°C, 15 min, Beschleunigung 9, Bremsung 4). Anschließend folgten zwei weitere Waschgänge, bei denen zunächst der Überstand dekantiert, das Zellpellet mit 10 ml NaCl resuspendiert und jeweils zwei Suspensionen

zusammenpipettiert, erneut auf 50 ml aufgefüllt und zentrifugiert wurden (1200 rpm, 4°C, 10 min, Beschleunigung 9, Bremsung 4). Vor dem letzten Waschgang wurde das Zellpellet in 5 ml ACK Lyseagenz resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die verbliebenen Erythrozyten zu lysieren. Zuletzt wurde das Zellpellet in MNC-Medium aufgenommen, die Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Kammer und Trypanblaufärbung gezählt und auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Es wurden nur solche mononukleäre Zellfraktionen weiterverwendet, von denen über 95 % den Supravitalfarbstoff Trypanblau dank intakter Zellmembranen ausschlossen.

### 2.1.3 Isolation von mononukleären Zellen aus Lymphknotenbiopsaten

Ein etwa 0,5-1 cm<sup>2</sup> großes Lymphknotenbiopsat, dessen Histologie vom Pathologischen Institut der *University of Iowa* bestimmt wurde, wurde mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten. Mit Hilfe eines Zelldissoziationssieb-Gewebeschleifer (Sigma, München) wurde das Gewebe in eine Zellsuspension überführt. Diese wurde in einem *Blue Cap* zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Anschließend wurden die Erythrozyten wie unter 2.1.2 beschrieben lysiert, auf 50 ml mit Medium aufgefüllt und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Medium resuspendiert, die Zellen gezählt und anschließend in einem Medium, bestehend aus 90 % fetalem Kälberserum und 10 % Dimethylsulfonsäureoxid (DMSO) zu je 5-10 Millionen Zellen pro Kryo in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

### 2.1.4 Magnetische Zellseparation

Die Magnetische Zellseparation (MACS) ist eine Methode, die es erlaubt, aus einer heterogenen Zellsuspension eine spezifische Art von Zellen zu isolieren. Um aus MNCs die B-Zellen zu gewinnen, wurde der *B Cell Isolation Kit* (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) verwendet. Die frischen PBMC (s. 2.1.2) wurden in MACS-Puffer gewaschen (PBS mit 10 % hitzeinaktiviertem Serum, 0,5 % Rinderalbumin und 2 mM EDTA), der Überstand dekantiert und die Zellen in 60 µl Puffer pro  $1 \times 10^7$  Zellen resuspendiert. Dann wurden nacheinander 20 µl FcR Block Reagenz und 20 µl Hapten-Antikörper Cocktail zu je  $1 \times 10^7$  Zellen hinzupipettiert. Dieser Cocktail enthielt mit Hapten konjugierte Antikörper gegen CD2, CD4, CD11b, CD16, CD36 und IgE, so dass T-, NK-, myeloide, basophile und dendritische Zellen sowie Thrombozyten, Granulozyten und Erythrozytenvorstufen markiert wurden. Nach 10 min Inkubation bei 10°C

wurden die Zellen erneut 2x gewaschen und in 80 µl MACS-Puffer pro  $1 \times 10^7$  Zellen resuspendiert.

Nun wurden 20 µl *MACS Anti-Hapten MicroBeads* zu  $1 \times 10^7$  Zellen pipettiert, um die vorher mit Antikörper markierten Zellen magnetisch zu markieren. Nach 15 min Inkubation bei 10°C, erneutem Waschen und Resuspendieren in 500 µl Puffer pro  $1 \times 10^8$  Zellen, wurden die Zellen in eine vorher 3 x mit Puffer gewaschene LS<sup>+</sup>/VS<sup>+</sup> Säule gegeben, die im magnetischen Feld eines MACS-Zellseparators platziert wurde. Die Säule wurde noch 4 x mit 3 ml Puffer gespült. Während alle anderen, magnetisch markierten Zellen in der Säule verblieben, da sie durch das magnetische Feld zurückgehalten wurden, konnte die gereinigte B-Zell Fraktion aufgefangen werden und für weitere Experimente verwendet werden.

### 2.1.5 Daudi-Zellkultur

Bei Daudi-Zellen (DSMZ, Braunschweig, BRD) handelt es sich um eine humane Zelllinie vom Typ des Burkitt-Lymphoms (Klein 1968). Sie exprimieren CD10, CD19 und CD20 an ihrer Oberfläche, sind EBV-positiv und weisen eine Translokation t(8;14) auf.

Daudi-Zellen wurden in 100 ml Kulturflaschen in MNC-Medium suspendiert, auf 0,5-1 Mio. Zellen/ml verdünnt und im Brutschrank in einer 5 %-igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre bei 37°C kultiviert. Jeden zweiten Tag wurde das Medium gewechselt, indem die Hälfte des Volumens abpipettiert und frisches MNC-Medium hinzugegeben wurde.

## 2.2 Oligodesoxynukleotide

Die verwendeten Oligodesoxynukleotide wurden von *Coley Pharmaceutical Group* (Wellesley, MA) synthetisiert. Sie wurden in einem Puffer, bestehend aus 10 mM Tris Chlorid und 1 mM EDTA gelöst (pH 8.0), durch einen 0,2 µm Filter steril filtriert und anschließend in sterilem PBS aliquotiert. Die Konzentration wurde mit Hilfe der Photometrie quantifiziert. Dazu wurde die ODN-Lösung auf etwa 1-50 µM bzw. 0,5-100 µg/ml mit PBS verdünnt und 100 µl in eine vorher mit Aqua dest. gereinigte Meßküvette pipettiert. In dem vorher mit 100 µl PBS geeichten Photometer konnte nun bei 260 nm die Absorption gemessen werden

und nach folgenden Formeln die Massenkonzentration bzw. Molarität bestimmt werden.

$$\text{Absorption (260 nm)} \times \text{Verdünnungsfaktor} / 0,027 = \text{Konzentration in } \mu\text{g/ml}$$

$$\frac{\text{Absorption (260 nm)} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 100}{(1,5 \times \text{Na} + 0,71 \times \text{Nc} + 1,2 \times \text{Ng} + 0,84 \times \text{Nt})} = \text{Molarität in } \mu\text{M}$$

mit Nx = Anzahl der Basen vom Typ x im Oligodesoxynukleotid (a= Adenin, c= Cytosin, g= Guanin, t= Thymin)

Die Messungen wurden in Duplikaten vorgenommen.

Aufbewahrt wurden die Oligodesoxynukleotide bei -20°C.

Folgende Oligodesoxynukleotide wurden in dieser Arbeit verwendet:

Name	Sequenz	CS
ODN 2006	5'- <b>TCG TCG</b> TTT TGT <b>CGT</b> TTT GTC <b>GTT</b> -3'	PS
ODN 2017	5'-CCC CCC CCC CCC CCC CC-3'	PS
ODN 2137	5'-TGC TGC TTT TGT GCT TTT GTG CTT-3'	PS
ODN 1758*	5'-TCT CCC AGC <b>GTG CGC</b> CAT-3'	PS
ODN 2216	5'-GGG GGA <b>CGA TCG TCG</b> GGG G-3'	PS/PO
ODN 2078	5'-TGC TGC TTC CCC CCC CC-3'	PO
ODN 2080	5'- <b>TCG TCG</b> TTC CCC CCC CC-3'	PO

Tabelle 2.1. In dieser Arbeit verwendete Oligodesoxynukleotide  
CS chemische Struktur; PO Phosphodiester; PS Phosphorothioat

\*ODN 1758 ist auch unter der Bezeichnung G3139 bekannt. Es handelt sich um ein gegen das Bcl-2-Gen gerichtetes *Antisense*-ODN

Die Endkonzentration in den einzelnen Versuchen betrug, sofern nicht anders angegeben, 5µg/ml.

## 2.3 Durchflusszytometrie

### 2.3.1 Grundlagen

Das Prinzip der Durchflusszytometrie ist die Analyse der Streulicht- und Fluoreszenzsignale einzelner, in einem Flüssigkeitsstrom fokussierter Partikel mittels eines optischen Meßsystems (Raffael et al. 1994). Voraussetzung bei

der Analyse von Zellen ist, dass sie als Suspension von Einzelzellen vorliegen. Eine Zellsuspension wird angesaugt und im Flüssigkeitsstrom des Zytometers in eine Kapillare geleitet, die in der Messkammer – einer von Trägerflüssigkeit laminar durchströmten Quarzküvette – endet. Der Zellstrom wird beim Verlassen der Kapillare von der Trägerflüssigkeit erfasst, auf das Küvettenzentrum verengt und stark beschleunigt. So wird gewährleistet, dass die Zellen einzeln und in ausreichendem Abstand zueinander am Messpunkt vorbeifließen („hydrodynamische Fokussierung“).

Am Messpunkt trifft der fokussierte Laserstrahl auf die einzelnen Zellen. Das dadurch entstehende Vorwärtsstreulicht ( $0^{\circ}$ - $10^{\circ}$  zur Richtung des einfallenden Lichtstrahls) und Seitwärtsstreulicht ( $90^{\circ}$  zur Richtung des einfallenden Lichtstrahls), sowie die Lichtemission der durch den Laser angeregten Fluoreszenzfarbstoffe werden von Photodetektoren registriert und in elektrische Signale (Einheit Volt) umgewandelt. Jeder gemessenen Signalintensität wird mittels eines Analog-Digitalwandlers eine Klassenzahl zugewiesen, die Werte von 0 bis 1024 annehmen kann. Die Fluoreszenzsignale werden logarithmisch verstärkt und auf einer vier Dekaden (0,1 bis 1000) umfassenden logarithmischen Skala dargestellt. In Einparameter-Histogrammen kann die Häufigkeitsverteilung eines Parameters innerhalb einer Zellpopulation dargestellt werden (s. z. B. Abbildung 2.1 ). Bei Zweiparameter-Punktediagrammen (*dot plots*) entspricht jeder Punkt einer Zelle mit ihren zwei Eigenschaften (s. z. B. Abbildung 2.2 ). Die Punktdichte spiegelt die Häufigkeitsverteilung der Eigenschaften wieder.

Das in dieser Arbeit verwendete Durchflusszytometer (FACScan, Beckton Dickinson Immunocytometry Systems (BDIS), San Jose, CA, USA) ist mit einem luftgekühlten Argonionen-Laser ausgestattet, der monochromatisches Licht der Wellenlänge 488nm mit einer Leistung von 15mW emittiert. Das an den Zellen entstehende Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) gibt Aufschluss über die Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht (*sideward scatter*, SSC) korreliert mit der Granularität der Zellen. Anhand ihrer charakteristischen Eigenschaften ließen sich so im FSC-/SSC-Punktediagramm die Lymphozyten identifizieren (s. z. B. Abbildung 3.1 ). Die Signalverstärkung der Streulichtsignale wurde so eingestellt, dass sich einerseits die Lymphozyten deutlich darstellen ließen und andererseits tote Zellen, Thrombozyten und Zellfragmente, die sehr geringe FSC-Werte aufweisen, mit Hilfe eines Aquisitionsfensters ausgeschlossen werden konnten.

Die verwendeten Fluorochrome werden durch Licht von 488 nm Wellenlänge zur Fluoreszenz in unterschiedlichen Wellenlängenbereichen angeregt. Bandpassfilter ermöglichen bei der Mehrfarbenanalyse (bis zu 4 Farben) die Auftrennung der von den angeregten Fluoreszenzfarbstoffen emittierten Fluoreszenz (Tabelle 2.2).

Kanal / Bandpassfilter	Farbe	Fluoreszenzfarbstoffe
FI1 / 525nm	grün	Fluoreszein Isothiocyanat (FITC)
FI2 / 575nm	rot	R-Phycoerythrin (PE)
FI3 / 675 nm	violett	Propidiumiodid (PI), Cy-Chrome™, PerCp
FI4 / 660nm	violett	Allophycocyanin (APC)

Tabelle 2.2. Übersicht der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe und deren Eigenschaften

Die Auftrennung der verschiedenen Fluoreszenzen durch Lichtfilter gelingt nicht vollständig, da sich die Spektren der eingesetzten Farbstoffe zum Teil überlappen. Diese Überlappung wurde durch Kompensation korrigiert, indem von jedem registrierten Fluoreszenzsignal der Teil abgezogen wurde, der durch Überlappung entstand. Hierzu wurden bei jedem Versuch Kontrollproben hergestellt, bei denen jeweils nur eine Eigenschaft mit einem bestimmten Fluorochrom angefärbt wurde, während die anderen Fluorochrome, gebunden an Isotypen-Antikörper (Maus-IgG<sub>1,κ</sub>), als Negativkontrolle dienten und so die Kompensation ermöglichten, da hier sichtbar wurde, wie stark das bestimmte Fluorochrom in die anderen Kanäle hineinstrahlte. Ebenso konnte mit Hilfe der Isotypen die Signalverstärkung der einzelnen Kanäle so justiert werden, dass sich Zellen mit entsprechenden Antigenen bzw. Eigenschaften qualitativ und quantitativ unterscheiden und vergleichen ließen.

Die Proben wurden immer mit CD19 Antikörpern gegengefärbt, um eindeutig die B-Lymphozyten zu identifizieren. Von diesen wurden dann je Probe  $1 \times 10^4$  Zellen akquiriert und anschließend mit dem FACS Analyse Programm *FlowJo* (Version 3.1.1, Tree Star, Stanford, CA, USA) ausgewertet.

### 2.3.2 Oberflächenmarker

Die auf ihre Oberflächenantigene zu untersuchenden Zellen wurden auf eine Konzentration von 1 Mio./ml in Vollmedium verdünnt und anschließend auf eine 96-well-Platte verteilt (200 µl pro well). 10 µl verschiedener Oligodesoxynukleotide (Endkonzentration 5 µg/ml) wurden hinzupipettiert und

dann für 48 h inkubiert. Danach wurden die Inhalte der einzelnen *wells* in FACS Röhrchen überführt und mit 5 ml PBS gewaschen (400 g, 4°C, 5 min, Beschleunigung 9, Bremsung 4). Nach Dekantieren des Überstandes wurden je 3 µl der gewünschten Antikörper (FITC-, PE-, Cychrome-, APC-, und PerCP-markiert) hinzupipettiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde erneut mit 5ml PBS gewaschen, um die überschüssigen Antikörper zu entfernen. Nach dem Dekantieren konnten die verbliebenen 300 µl zur FACS-Analyse verwendet werden.

Bei den Antikörpern gegen CD5 (UCHT2), CD19 (HIB19), CD40 (5C3), CD54 (HA58), CD55 (IA10), CD59 (p282), CD64 (10.1), CD69 (FN50), CD80 (L307.4), CD86 (IT2.2), CD95 (DX2), MHC-I (G46-2.6), MHC-II (TÜ39), sowie den Isotyp-Antikörpern handelte es sich um monoklonale murine Antikörper (PharMingen, San Diego, CA, USA). 1-D-10 ist ein monoklonaler, humaner Antikörper gegen eine Variante von HLA-DR (freundlicherweise von Prof. Weiner, IA, USA zur Verfügung gestellt), C2B8 ist ein monoklonaler chimerischer Antikörper gegen CD20, bestehend aus einer humanen, konstanten und einer murinen, variablen Region (IDEC pharmaceuticals, San Diego, CA, USA).

### 2.3.3 Intrazelluläre Färbung mit *5-(6-) Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester*

Die intrazelluläre Färbung mit *5-(6-) Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester* (CFSE; Molecular Probes, Eugene, OR) wurde verwendet, um erkennen zu können, ob CpG-Oligodesoxynukleotide einen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der untersuchten Zellen haben. Die Methode beruht darauf, dass das im ersten Kanal strahlenden CFSE von Zellen aufgenommen wird und irreversibel an intrazelluläre Proteine bindet. Teilen sich nun die Zellen, so wird auch der Farbstoff gleichmäßig auf die beiden Tochterzellen verteilt. Diese Zellen strahlen dann nicht so intensiv in FI1 und können so von Zellen differenziert werden, die nicht proliferieren (Lyons 2000). Anhand verschiedener *peaks* im Histogramm können auch Populationen identifiziert werden, die sich mehrfach geteilt haben (Abbildung 2.1).

Zunächst wurden 2 µl des 5 mM CFSE-Stocks zu 998 µl NaCl in ein Eppendorfröhrchen (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, BRD) gegeben. 10 Mio. Zellen wurden mit NaCl in einem *Blue Cap* gewaschen (400

g, 4°C, 7 min, Beschleunigung 9, Bremsung 4). Der Überstand wurde dekantiert, das Zellpellet in 360 µl NaCl resuspendiert und 40 µl der CFSE-Verdünnung hinzugegeben, so dass sich eine Endkonzentration von 1 µM ergab. Nun wurde die Suspension durchmischt, in ein neues *Blue Cap* pipettiert, um evtl. am Rand klebende, ungefärbte Zellen auszuschließen und für 10 Minuten inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen und das extrazelluläre CFSE zu blocken wurde dann 2 ml MNC-Medium hinzugegeben und anschließend mit NaCl 2 mal gewaschen (400 g, 4°C, 5 min, Beschleunigung 9, Bremsung 4). Zuletzt wurden die Zellen in MNC-Medium aufgenommen, gezählt, auf 1 Mio./ml eingestellt und mit den gewünschten ODN inkubiert. Nach 4 Tagen wurden die Zellen mit CD5 APC und CD19 PerCp gefärbt, sofern es sich um CLL-Zellen handelte, ansonsten wurde CD19 APC zur Identifizierung der B-Lymphozyten verwendet.

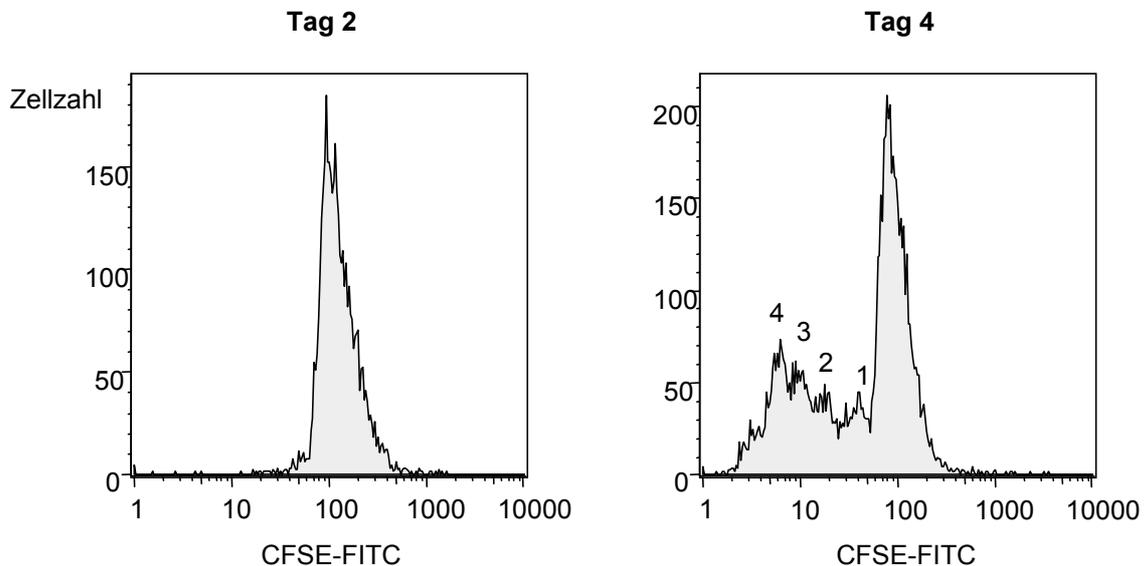


Abbildung 2.1. Bestimmung des Anteils der proliferierten Zellen mittels CFSE-Färbung  
Die Ziffern 1-4 kennzeichnen die Zellpopulationen, die sich entsprechend oft geteilt haben bzw. proliferiert sind und dadurch an Menge bzw. Fluoreszenzintensität des intrazellulären Farbstoffs abgenommen haben

### 2.3.4 Apoptosefärbung mit Annexin V und Propidiumiodid

Annexin V bindet an Phosphatidylserine, die sich normalerweise auf der Innenseite der Zellmembran befinden. Wird eine Zelle apoptotisch, so geht die Integrität der Zellmembran verloren, und Phosphatidylserine sind auch auf der Außenseite der Membran zu finden und somit nun durch Annexin V anfärbbar. Propidiumiodid (PI) hingegen ist ein Farbstoff, der in Zellen eindringt, deren Zellmembranintegrität geschädigt ist.

Nach dem gewünschten Zeitraum der Inkubation wurden die Zellen aus der 96-well-Platte in FACS Röhren pipettiert und mit PBS gewaschen (400 g, 4°C, 5 min, Beschleunigung 9, Bremsung 4). Der Überstand wurde dekantiert und jedem FACS Röhren 200 µl *Annexin V Binding Buffer* (PharMingen, San Diego, CA) sowie 5 µl FITC-markiertes rekombinantes Annexin V (PharMingen, San Diego, CA) zugegeben. Nach Inkubation für 15 min auf Eis wurde mit 2 ml *Annexin V Binding Buffer* gewaschen (400 g, 4°C, 5 min, Beschleunigung 9, Bremsung 4), der Überstand bis auf 200 µl dekantiert. Unmittelbar vor der FACS Analyse wurde 2 µl PI (PharMingen, San Diego, CA; zu 1 mg/ml in PBS verdünnt) hinzupipettiert. Als apoptotische Zellen wurden diejenigen Zellen gewertet, die sowohl in den 1. Kanal (FITC-Annexin V) als auch in den 3. Kanal (PI) strahlten (Abbildung 2.2).

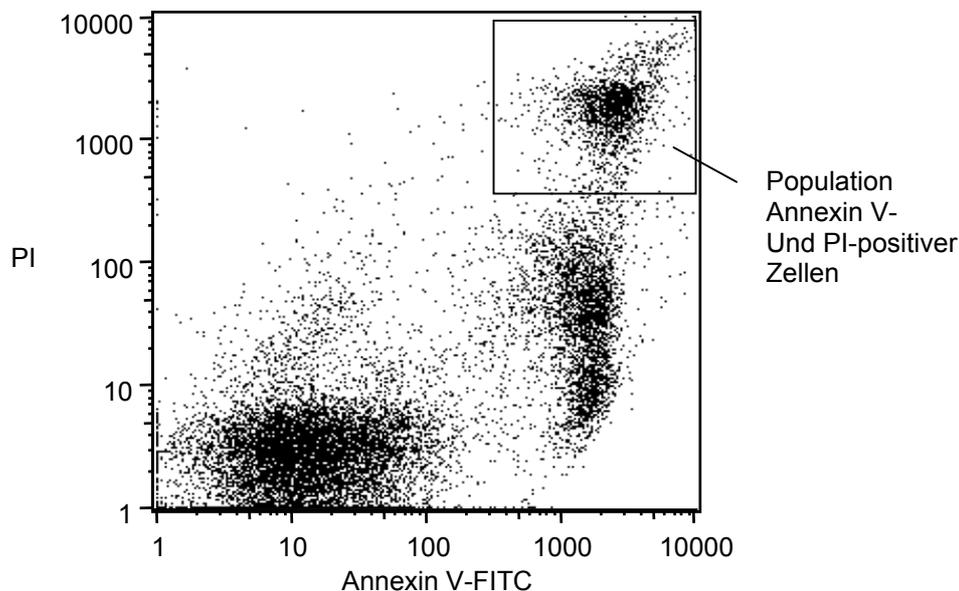


Abbildung 2.2. Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen mittels Annexin V- und PI-Doppelfärbung

## 2.4 Therapeutische Antikörper und *Chrom-release-assay*

### 2.4.1 Therapeutische Antikörper

Für die Antikörperversuche wurde Rituximab, als Kontrollantikörper Trastuzumab verwendet. Rituximab (Mabthera<sup>®</sup>, Roche) ist ein gentechnisch hergestellter monoklonaler chimärer Antikörper (Maus/Mensch), ein glykosyliertes Immunglobulin. Seine konstanten Bereiche bestehen aus humanem IgG<sub>1</sub>, die variablen Bereiche aus leichten und schweren

Kettensequenzen des murinen Antikörpers 2B8. Der Antikörper wird in einer Zellkultur aus Säugetierzellen (Ovarialzellen des chinesischen Hamsters) hergestellt und durch Affinitäts- und Ionenaustauscher-Chromatographie gereinigt, einschließlich spezifischer Schritte zur Virusinaktivierung und -entfernung.

Rituximab ist für die Behandlung von Patienten mit follikulärem Lymphom im Stadium III-IV angezeigt, die gegen eine Chemotherapie resistent sind oder nach einer solchen einen zweiten oder neuerlichen Rückfall haben.

Rituximab bindet spezifisch an das humane Transmembran-Antigen CD20, ein nicht-glykosyliertes Phosphoprotein, das auf prä-B- und reifen B-Lymphozyten lokalisiert ist. Das Antigen wird auf >95 % aller Zellen von Non-Hodgkin-Lymphomen des B-Zell-Typs exprimiert. CD20 ist sowohl auf gesunden als auch auf malignen B-Zellen zu finden. Nach der Antikörperbindung wird CD20 nicht internalisiert oder von der Zellmembran in die Umgebung abgegeben. CD20 zirkuliert nicht als freies Antigen im Plasma und konkurriert somit nicht um die Bindung des Antikörpers.

Trastuzumab (Herceptin<sup>®</sup>, Roche) ist ein rekombinanter humanisierter IgG<sub>1</sub> monoklonaler Antikörper, der aus einer Säugetierzelllinie (Ovarialzellen des chinesischen Hamsters, CHO) im kontinuierlichen Durchflussverfahren gewonnen wird. Trastuzumab ist zur Behandlung von Patienten mit metastasiertem Mammakarzinom indiziert, deren Tumoren den humanen epidermalen Wachstumsfaktor 2 (HER2) überexprimieren. Eine Überexpression von HER2, an den sich Trastuzumab bindet, ist bei 25 % bis 30 % aller primären Mammakarzinome zu beobachten.

### 2.4.2 *Chrom-release-assay* zum Nachweis der lytischen Aktivität von therapeutischen Antikörpern

Durch einen klassischen <sup>51</sup>Cr-*release-assay* lässt sich die Lyse von Zellen quantifizieren. Das Prinzip beruht darauf, dass man radioaktiv markiertes Chrom in lebende Zellen bringt. Stirbt eine Zelle, so verliert ihre Zellmembran die Intaktheit und das Chrom wird freigesetzt. Die Radioaktivität im Überstand gibt somit einen Hinweis auf den Anteil zugrundegegangener Zellen.

Über 48 Stunden wurden jeweils 4 Millionen Daudi-Zellen (1 Mio./ml) zum Teil mit und zum Teil ohne Zugabe von CpG-ODN 2006 (1 µg/ml) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in einem *Blue Cap* zentrifugiert (400

g, 4°C, 5 min, Beschleunigung 9, Bremsung 4), der Überstand abpipettiert und die Zellen in 100 µl Chromium-51 (Amersham Pharmacia Biotech, UK) resuspendiert. Nach 60 min Inkubation bei 37°C wurde das extrazelluläre Chrom durch dreimaliges Waschen (400 g, 4°C, 5 min, Beschleunigung 9, Bremsung 4) mit 5 ml Vollmedium entfernt. Die Zellen wurden gezählt und dann mit Vollmedium auf 50000/ml verdünnt. Jeweils 100 µl wurden zusammen mit unterschiedlichen Konzentrationen von therapeutischen Antikörpern (in 100 µl Vollmedium verdünnt, so dass das Endvolumen 200 µl betrug) in 96-well-Platten für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden unterschiedliche Mengen Komplement (LOW-TOX-M RABBIT COMPLEMENT, Accurate Chemical & Scientific Corporation, USA) hinzupipettiert und wiederum für 60 min bei 37°C inkubiert. Zuletzt wurden 100 µl des Überstandes abpipettiert und in einem *PACKARD COBRA II – Auto Gamma Counter* analysiert.

### 2.5 Statistik

Die Ergebnisse werden als arithmetisches Mittel angegeben, die Streuung der Werte wird als Standardfehler der Mittelwerte (SEM) dargestellt. Um die statistische Signifikanz der Unterschiede einzelner Ergebnisse zu berechnen, wurde der zweiseitige Student t-Test für paarige Stichproben angewendet. Statistische Signifikanz wurde bei p-Werten < 0,05 angenommen. Sowohl für diese Berechnungen als auch für die Berechnung von Korrelationskoeffizienten wurde das Programm *Microsoft Excel* verwendet.

Anmerkung: Aufgrund großer Schwankungen in den Rohdaten und leichter graphischer Darstellbarkeit wird ein Teil der Daten normiert auf dem Mediumwert dargestellt (Wert bei einer bestimmten Bedingung dividiert durch den Wert der Bedingung „nur Medium“). Die statistischen Berechnungen beziehen sich, sofern nicht ausdrücklich erwähnt, immer auf die Rohdaten, also die tatsächlich gemessenen absoluten Werte.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Effekt von CpG-Oligodesoxynukleotiden auf die Zellmorphologie

Von gesunden B-Zellen ist bekannt, dass sie durch CpG-ODN aktiviert werden (Hartmann 2000b). In der vorliegenden Arbeit sollte herausgefunden werden, inwieweit maligne B-Zellen auf immunstimulatorische CpG-ODN reagieren. Es wurde zunächst untersucht, ob die Inkubation der normalen und malignen B-Zellen mit verschiedenen ODN über 48 Stunden eine Veränderung ihrer Größe und Granularität zur Folge hatte. Dazu wurden nach den CD19-positiven Zellen der Median über den FSC und der Median über den SSC dieser Zellen bestimmt (Abbildung 3.1). Der FSC gibt Auskunft über die Größe einer Zelle, der SSC über deren Granularität.

Beim Vergleich der untersuchten Proben ergab sich in 30 der 32 Proben eine Größen- und in 29 Fällen eine Granularitäts-Zunahme, wenn die Zellen mit CpG-ODN 2006 inkubiert wurden, gegenüber den Zellen, denen kein ODN oder ODN 2017 hinzugegeben wurden (Abbildung 3.2). Diese Größenzunahme war sowohl für ODN 2006 ( $p < 0,001$ ) als auch für ODN 2216 ( $p = 0,003$ ) und ODN 2137 ( $p < 0,001$ ) statistisch signifikant. Ebenso verhielt es sich bei der Zunahme der Granularität für ODN 2006 ( $p < 0,001$ ), ODN 2216 ( $p = 0,003$ ) und ODN 2137 ( $p < 0,001$ ). Zwischen ODN 2017 und der Bedingung „nur Medium“ bestanden keine Unterschiede. Auch bei Aufschlüsselung der einzelnen NHL waren deutliche Größenzunahmen und erhöhte Granularität erkennbar, die für das SLL, die CLL und das FL signifikant waren. Lediglich bei den DGBZL kam es in 2 von 3 Fällen zu einer Abnahme der Zellgröße. Jeweils ein SLL, ein DGBZL und ein MCL zeigten eine geringfügige Abnahme der Granularität. Die stärkste Größenzunahme durch ODN 2006 gegenüber ODN 2017 bzw. „nur Medium“ zeigten mit + 60 % die Zellen der MZL, es folgten die benignen Zellen der FH mit + 47 % und die CLL-Zellen mit + 28 % bei einer durchschnittlichen Steigerungsrate von + 26 %. Die durchschnittliche Zunahme der Granularität betrug 36 %, hierbei zeigten wiederum die FH mit + 85 %, die MZL mit + 77 % und die CLLs mit + 60 % die höchsten Werte.

# Ergebnisse

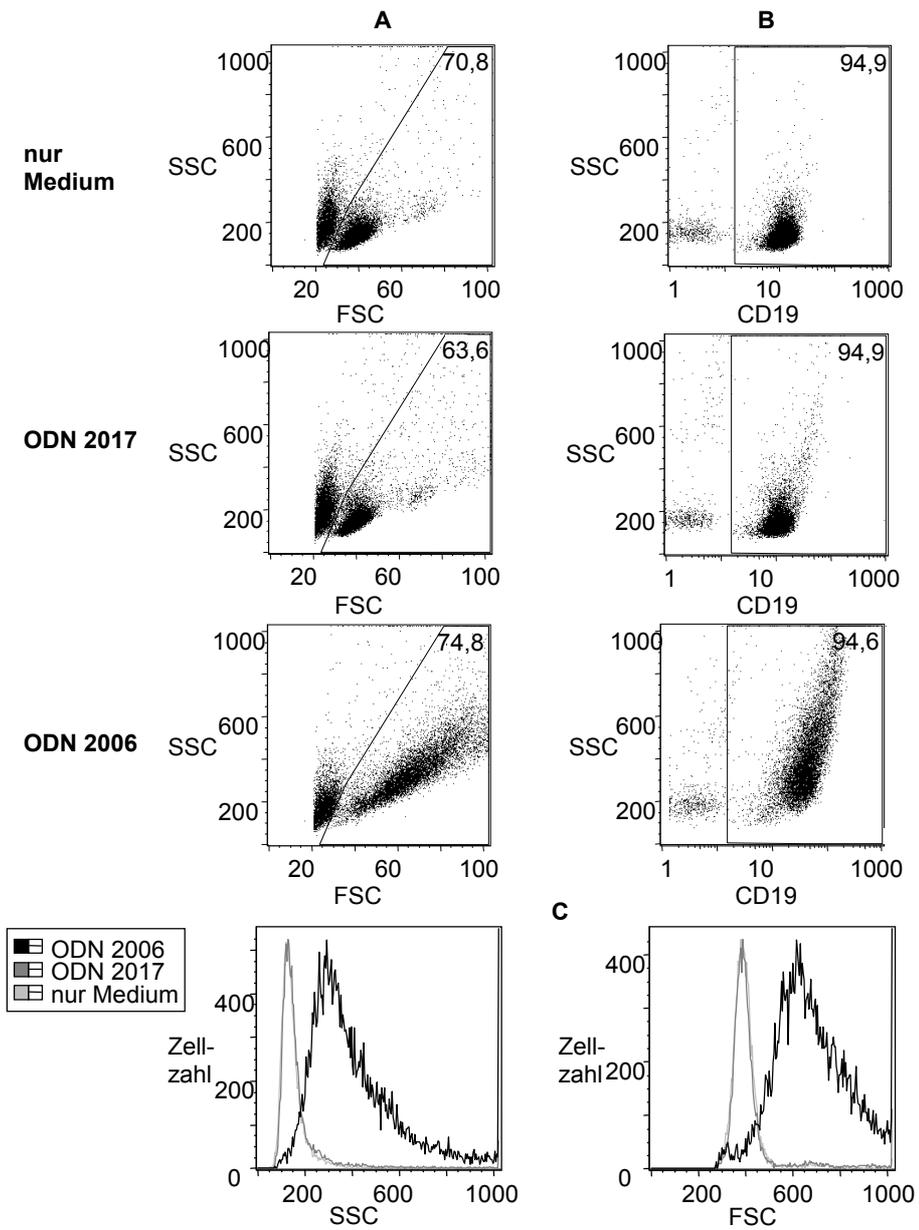


Abbildung 3.1. Untersuchung der Zellmorphologie nach verschiedenen Inkubationsbedingungen  
A: Selektion der viablen Zellen; B: Selektion der B-Lymphozyten; C: Bestimmung der Granularität und Größe der B-Zellen

## Ergebnisse

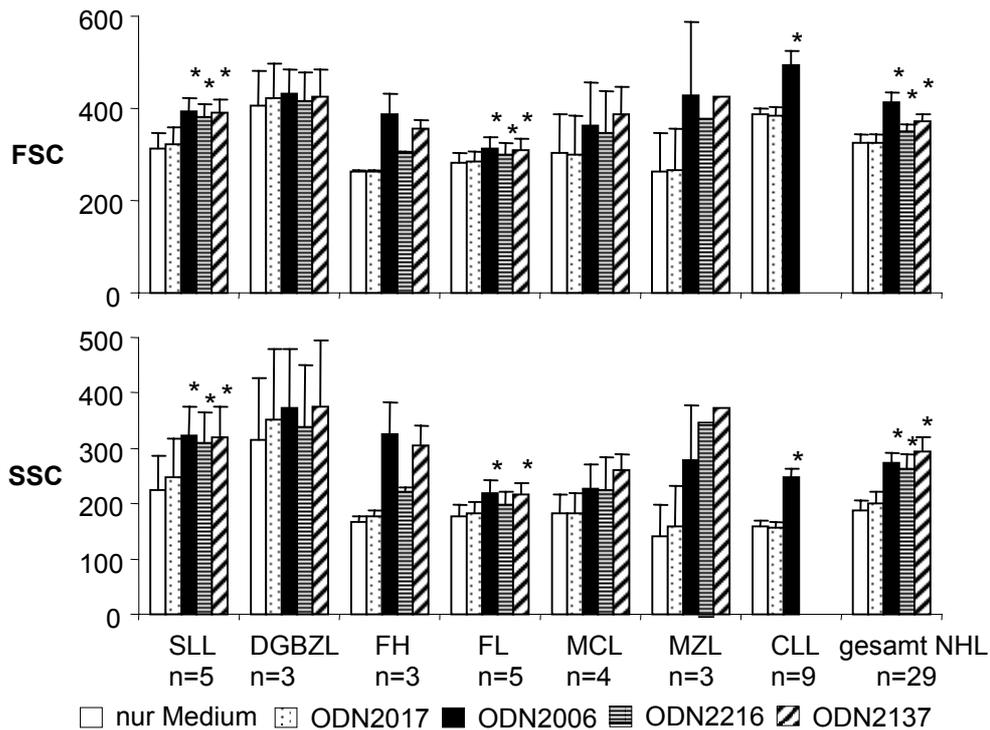


Abbildung 3.2. Größe und Granularität verschiedener B-Zellen nach Zugabe unterschiedlicher ODN

\* statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber ODN 2017

### 3.2 Effekt von CpG-Oligodesoxynukleotiden auf Oberflächenantigene

#### 3.2.1 Kinetik

Untersucht wurde die Kinetik der Aufregulierung einzelner Oberflächenantigene, um einen geeigneten Inkubationszeitraum für weitere Versuche zu bestimmen. Hierzu wurde am Beispiel einer B-CLL die Expression von kostimulatorischen und antigenpräsentierenden Oberflächenmolekülen vor Ansatz des Versuchs, sowie nach 2, 3 und 4 Tagen gemessen. Dabei zeigte sich, dass es zu einer Aufregulierung von CD20, CD40, CD54, CD69, CD80, CD86, 1-D-10, MHC I und MHC II kam und nach 48 h ein Plateau erreicht wurde (Abbildung 3.3). Daher wurde 48 h für die folgenden Versuche als Inkubationszeitraum gewählt. Ein weiterer Grund, bereits nach 48 h zu messen, war die Tatsache, dass nach 2 Tagen Inkubation der Anteil der viablen CD19-positiven Zellen rapide abfiel.

## Ergebnisse

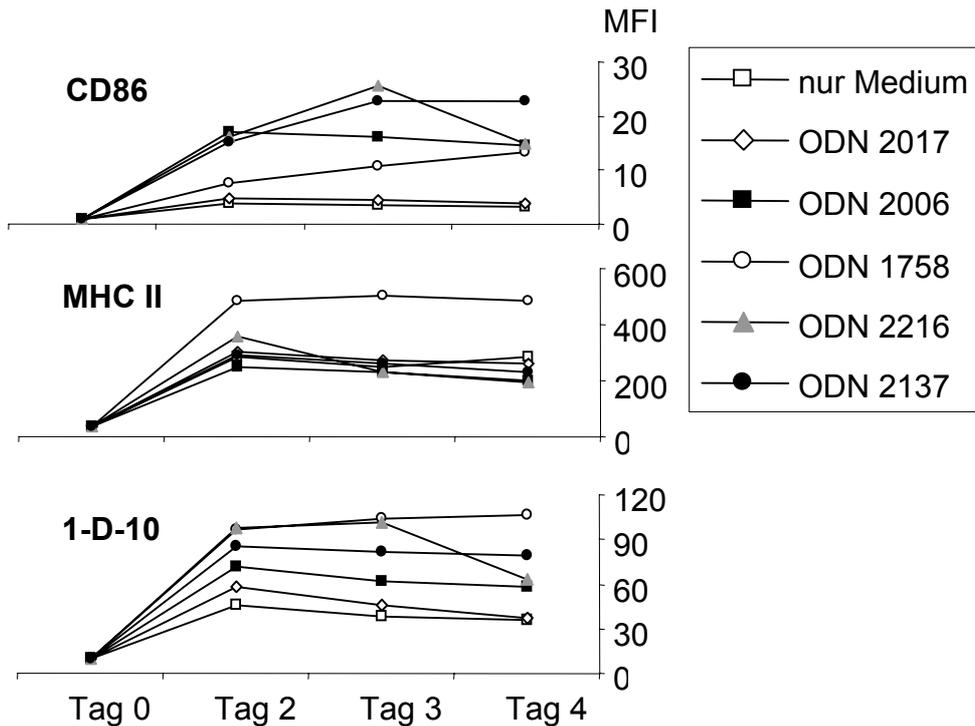


Abbildung 3.3. Expression von CD86, MHC II und 1-D-10 auf B-CLL-Zellen nach 0, 2, 3 und 4 Tagen Inkubation mit verschiedenen ODN

### 3.2.2 Effekte auf B-Lymphozyten gesunder Spender

In zwei Versuchen wurde gesunden Probanden Blut abgenommen und untersucht, wie sich eine Inkubation mit verschiedenen ODN auf das Oberflächenmarkerprofil der B-Zellen auswirkt. In einem der beiden Versuche wurden die MNCs mittels magnetischer Zellseparation noch weiter aufgereinigt, so dass eine Reinheit der B-Zellen von über 90 % erreicht wurde. Es zeigten sich aber keine auffälligen Unterschiede zwischen beiden Versuchen, so dass diese zusammengefasst wurden.

Das Ergebnis der beiden Versuche war, dass der Aktivierungsmarker CD69, die kostimulatorischen Moleküle CD40, CD54, CD80 und CD86, ebenso die Antigene CD20 und 1-D-10 sowie die antigenpräsentierenden Moleküle MHC I und MHC II und das die Apoptose regulierende CD95 unter Einfluss von ODN 2006, ODN 1758, ODN 2216 und auch ODN 2137 auf der Oberfläche der B-Zellen stärker exprimiert wurden, als dies der Fall war, wenn kein ODN oder ODN 2017 hinzugegeben wurde. Hingegen blieb die Expression von IgM und CD64 auf der Zelloberfläche unter allen Bedingungen unverändert (Abbildung 3.4).

## Ergebnisse

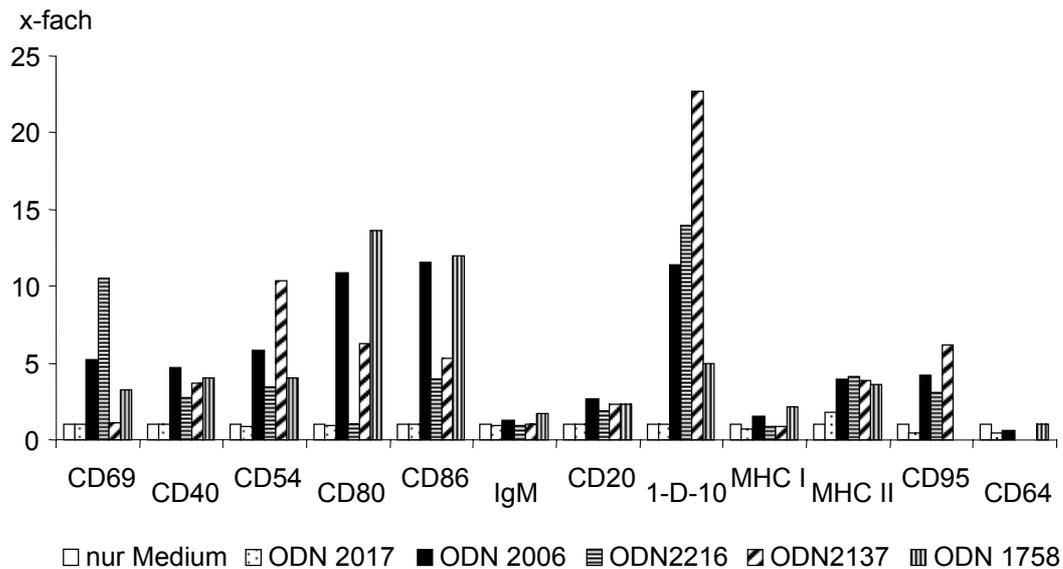


Abbildung 3.4. Oberflächenmarkerexpression auf B-Zellen eines gesunden Spenders (für ODN 2017 und ODN 2006 gilt: n = 2). Bei ODN 1758 wurde CD95 nicht untersucht. Die Werte geben jeweils das Vielfache des Wertes für „nur Medium“ an

Weiterhin wurden 3 Proben untersucht, die von Patienten mit FH stammten. Hierbei zeigten sich ähnliche Ergebnisse wie bei B-Zellen gesunder Spender. Wiederum ließen sich bei CD64 und IgM keine deutlichen Effekte sehen, während alle anderen Oberflächenproteine stärker exprimiert wurden, wenn die Zellen zuvor mit ODN 2006, ODN 2137 oder ODN 2216 inkubiert wurden. ODN 2216 hatte dabei auf die kostimulatorischen Moleküle CD40, CD54, CD80 und CD86 einen deutlich schwächeren Einfluss als die beiden anderen ODN. ODN 2017 zeigte abermals keinen Effekt. Bei CD40, CD54 und MHC I war ODN 2006, bei CD40, CD54 und CD80 war ODN 2137 gegenüber der Wirkung von ODN 2017 signifikant stärker. Einen Überblick über die Ergebnisse gibt Abbildung 3.5.

## Ergebnisse

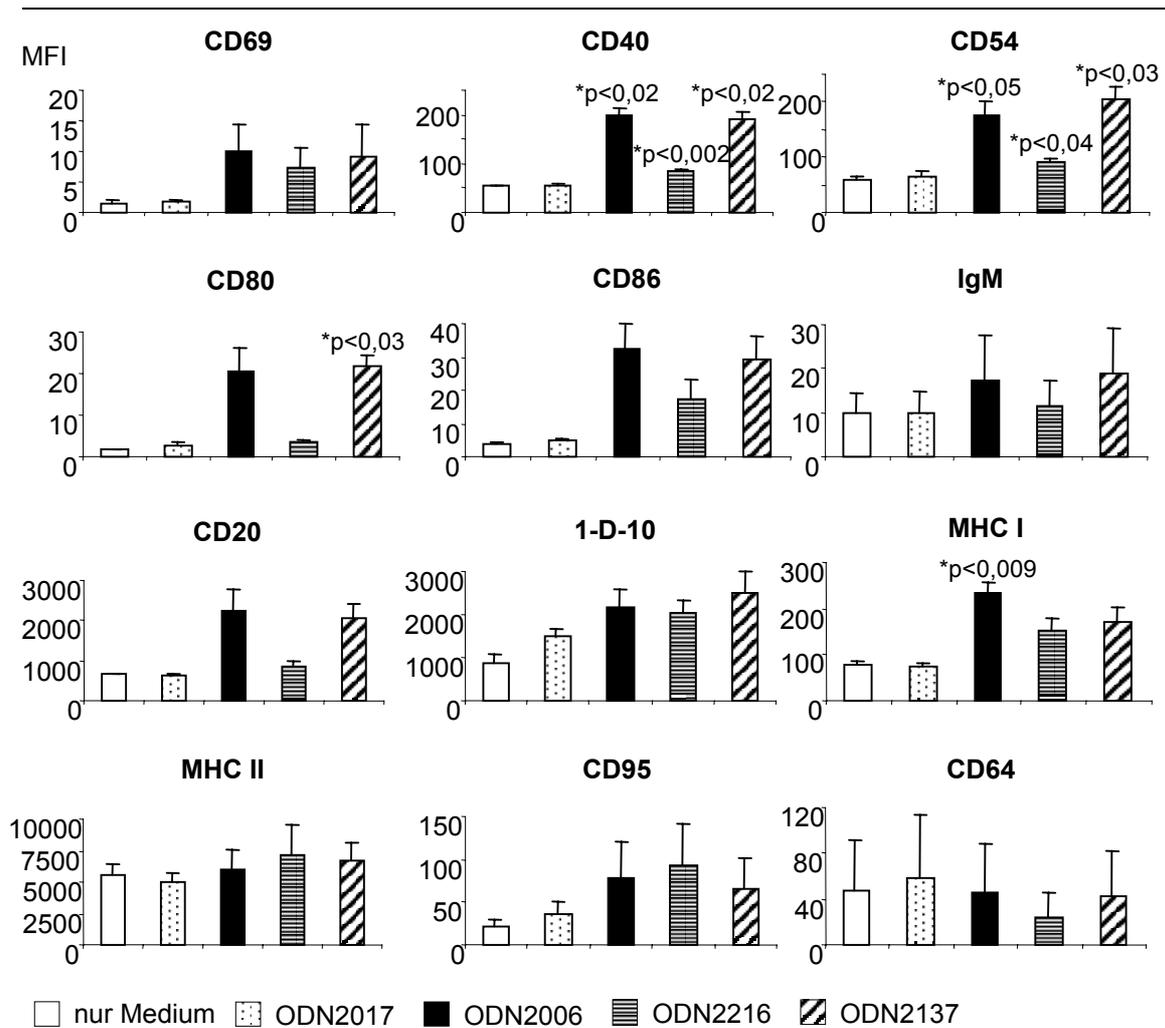


Abbildung 3.5. Mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) der Oberflächenmarker auf B-Zellen follikulärer Hyperplasien (n=3)  
\* signifikant gegenüber ODN 2017

### 3.2.3 Vergleich verschiedener Oberflächenmarker und Lymphome

Zunächst wurde untersucht, welche Veränderungen des Oberflächenantigen-Profiles resultierten, wenn B-CLL-Zellen neun verschiedener Patienten für 48 Stunden mit ODN 2017, ODN 2006 oder ODN 1758 inkubiert wurden. Sowohl ODN 2006 als auch ODN 1758 führten bei den B-CLL Zellen zu einer verstärkten Expression aller hier untersuchten Oberflächenproteine, die in vielen Fällen gegenüber der Expression bei ODN 2017 signifikant höher lag (Abbildung 3.6). ODN 2017 zeigte keine Wirkung, genauso wenig wie die Proben, denen kein ODN zugegeben wurde, die also nur in Medium inkubiert wurden.

## Ergebnisse

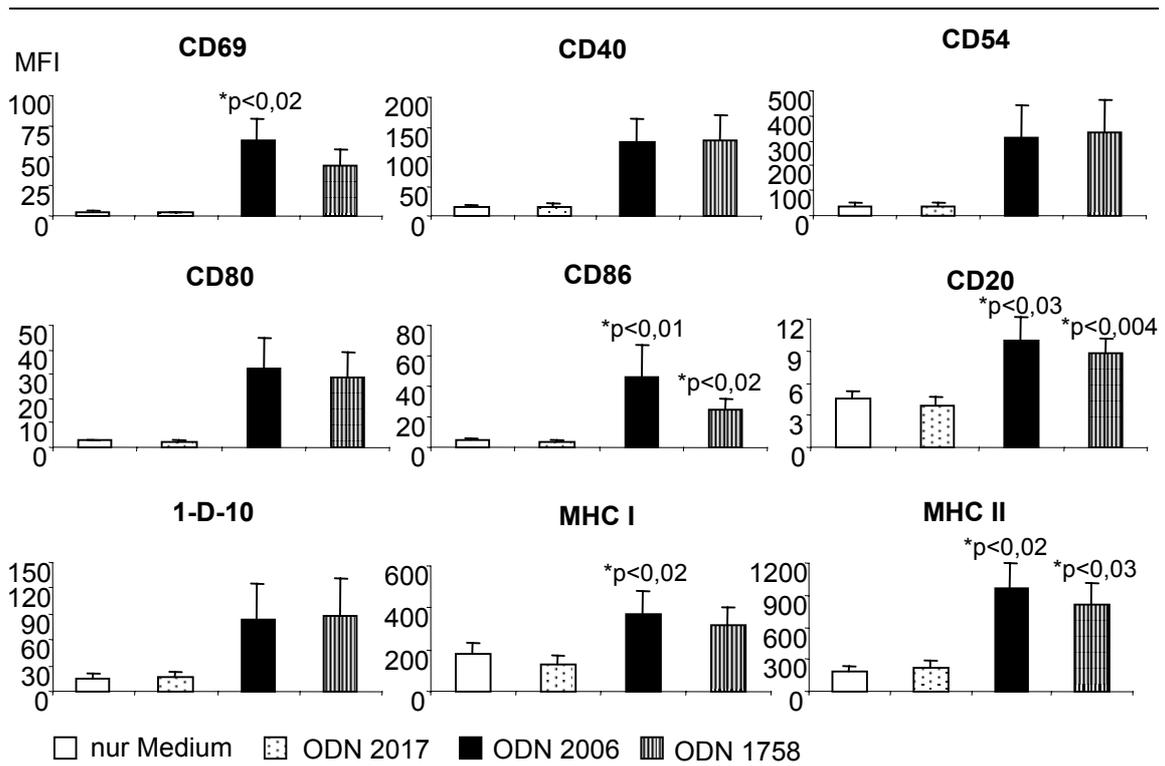


Abbildung 3.6. MFI der Oberflächenmarker auf B-CLL-Zellen (n=9)

\* signifikant gegenüber ODN 2017

[Bemerkung: Betrachtet man die Werte relativ zu „nur Medium“, so ergeben sich für alle Marker sowohl bei ODN 2006 als auch bei ODN 1758 statistisch signifikante Werte gegenüber ODN 2017]

## Ergebnisse

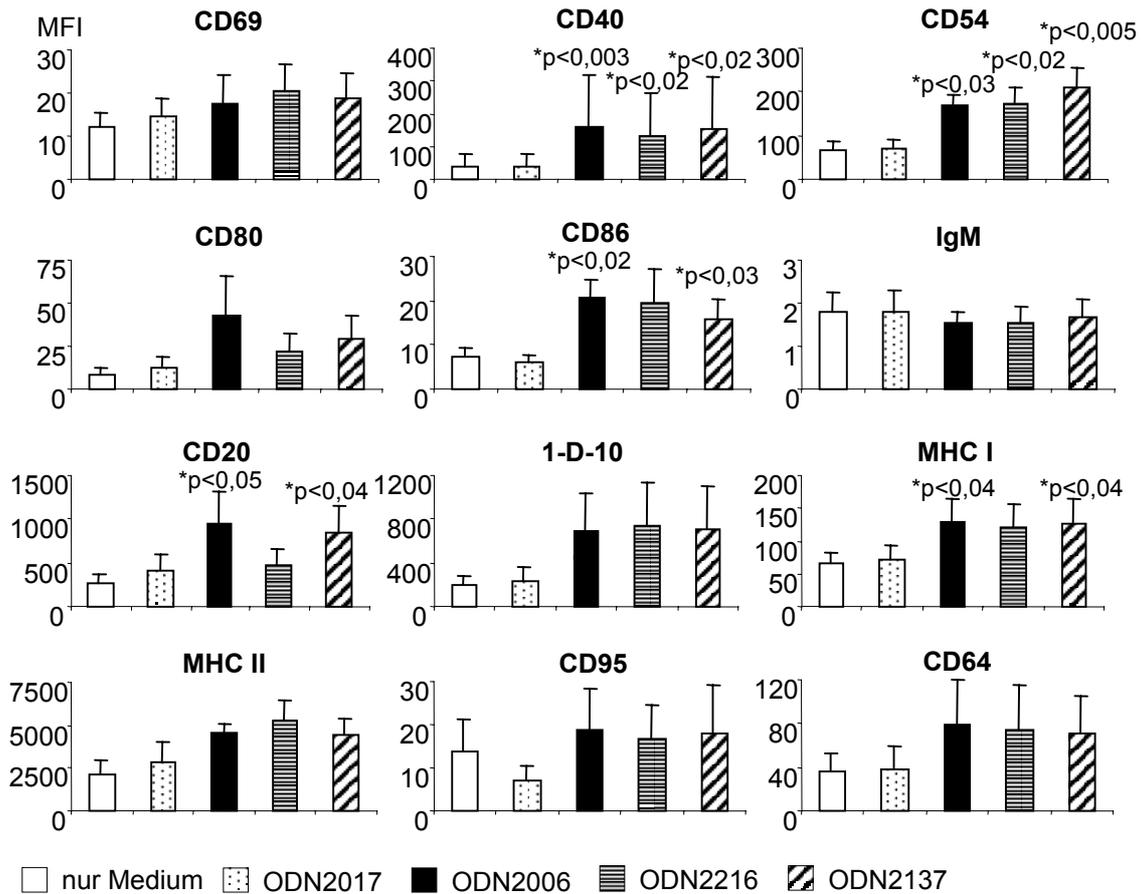


Abbildung 3.7. MFI der Oberflächenmarker auf SLL-Zellen (n=5)  
\* signifikant gegenüber ODN 2017

Zu ähnlichen Resultaten führten die Versuche mit Zellen von fünf SLL-Patienten, wobei hier und bei den anderen B-NHL-Patienten ODN 2137 und ODN 2216 und kein ODN 1758 verwendet und zusätzlich noch die Expression von IgM, CD64 und CD95 gemessen wurden. IgM blieb unverändert, CD64 und CD95 wurden leicht aufreguliert. Auch ODN 2137 und ODN 2216 hatten deutliche, z. T. signifikante Steigerungen zur Folge (Abbildung 3.7).

Bei einem Vergleich von B-CLL und SLL fiel auf, dass die SLL-Zellen eine höhere Grundexpression (Expression ohne Inkubation mit ODN) der meisten Antigene aufwies als die B-CLL-Zellen (Ausnahme: MHC I). Andererseits kam es bei den B-CLL-Zellen zu einer stärkeren Induktion (Ausnahme: CD20) durch ODN (Abbildung 3.8).

## Ergebnisse

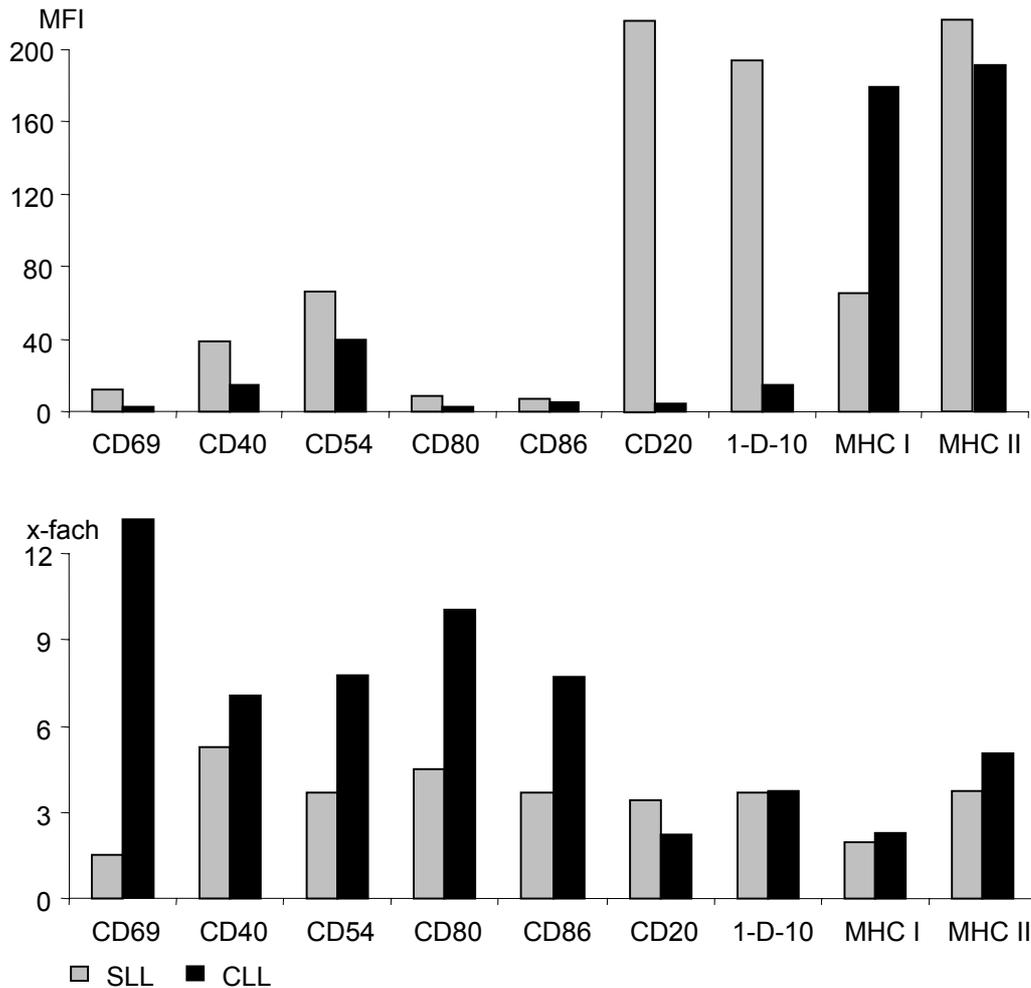


Abbildung 3.8. Vergleich der Oberflächenmarkerexpression auf B-CLL- (n=9) und SLL-Zellen (n=5)

Das obere Diagramm zeigt die Grundexpression (MFI) der Marker ohne Zugabe von ODN, das untere zeigt die Induktion der Expression nach Inkubation mit ODN 2006 gegenüber Inkubation in Medium

Einen Überblick über die Resultate der Versuche mit Zellen aus fünf FL, vier MCL, drei MZL und drei DGBZL gibt Abbildung 3.9. Auch diese Zellen reagierten mit einer unterschiedlich starken, aber deutlichen, teilweise sogar signifikanten Aufregulierung des Aktivierungsmarkers CD69, kostimulatorischen (CD40, CD54, CD80 und CD86) und antigenpräsentierenden (MHC I und MHC II) sowie weiteren (CD20 und 1-D-10) Antigenen, wenn sie mit ODN 2006, ODN 2216 und ODN 2137 inkubiert wurden. ODN 2216 erwies sich dabei gegenüber ODN 2006 in den meisten Fällen unterlegen, während ODN 2137 letzterem hinsichtlich seiner stimulatorischen Potenz meist zumindest ebenbürtig war. CD64 blieb unbeeinflusst, ebenso IgM, das nur bei zwei MCL-Proben verstärkt exprimiert wurde. CD95 wurde auf FL, DGBZL und MCL durch ODN 2006 und ODN 2137 aufreguliert, auf FL und DGBZL auch durch ODN 2216.

# Ergebnisse

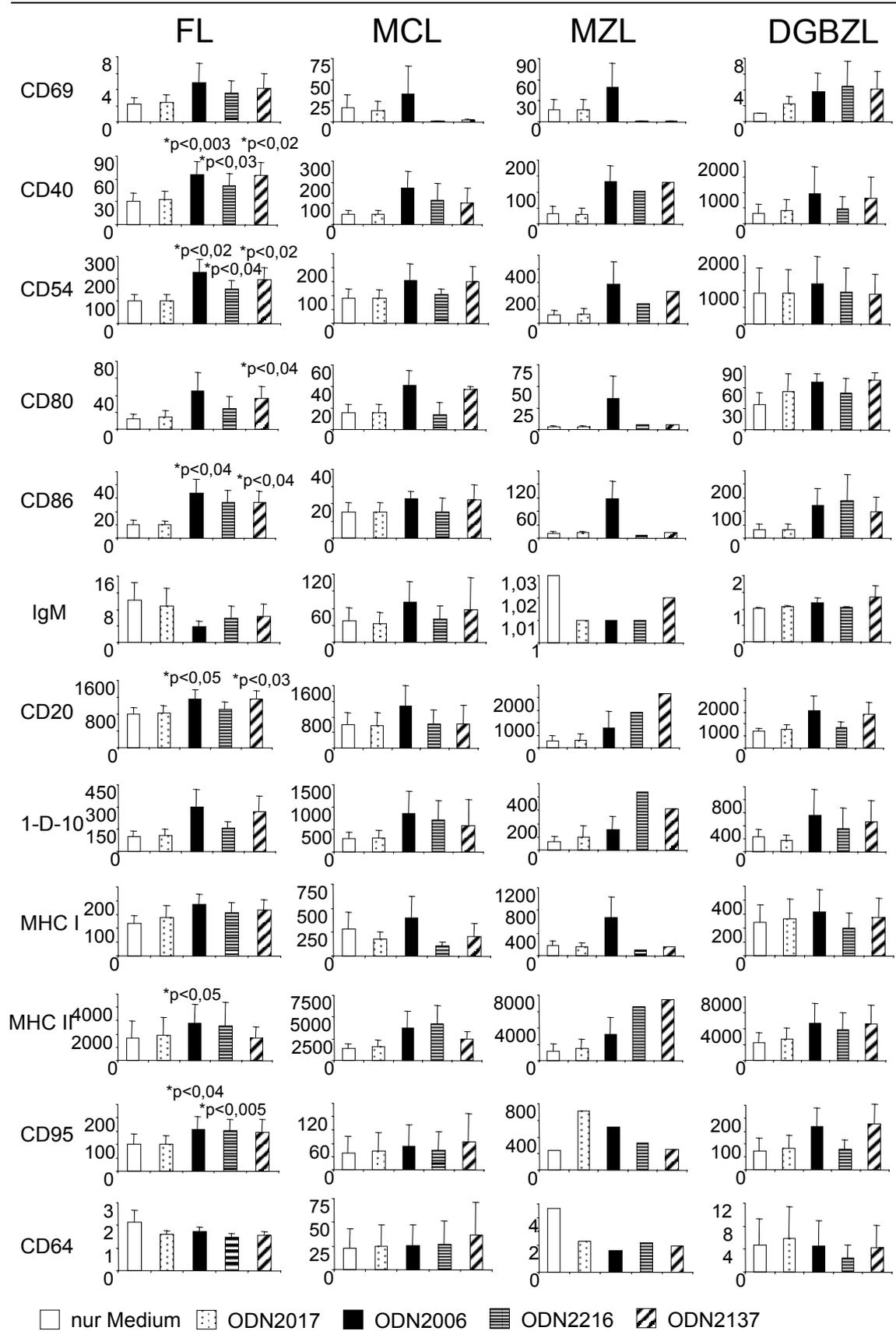


Abbildung 3.9. MFI der Oberflächenmarker auf FL- (n=5), MCL- (n=4), MZL- (n=3) und DGBZL-Zellen (n=3)

Bemerkung: n=1 für ODN 2216 und ODN 2137 bei MZL

\* statistisch signifikant gegenüber ODN2017

Zwischen der Hochregulierung der Oberflächenmarker einerseits und den Parametern Zellgrößenzunahme, Proliferation (s.u.) und Prozentsatz der CD19-positiven Zellen (Reinheit der Probe) andererseits bestand keine Korrelation (Korrelationskoeffizient:  $-0,3 < r < +0,3$ ). Ebenso wenig hatte das Niveau der Grundexpression eines Proteins Bedeutung für dessen Induktionspotential durch ODN. Auch konnte kein Zusammenhang zu klinischen Parametern der Patienten wie Lactatdehydrogenase, Anzahl der weißen Blutkörperchen im Blut,  $\beta_2$ -Mikroglobulin oder Thymidinkinase (die letzten beiden wurden nur bei CLL-Patienten bestimmt) festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

### 3.2.4 Konzentrationsreihen

In verschiedenen Konzentrationsreihen wurde die Abhängigkeit der CD20-, CD40-, CD54- und CD86-Induktion von der Oligodesoxynukleotid-Konzentration untersucht, um herauszufinden, welche Konzentration optimale Ergebnisse liefert und welche Rolle die CpG-Motive dabei spielen. Hierzu wurden B-Zellen gesunder Spender und maligne B-Zellen aus allen Klassen der in dieser Arbeit untersuchten NHL mit ansteigenden Konzentrationen verschiedener ODN für 48 h inkubiert und anschließend auf die Expression der Oberflächenmoleküle mittels Durchflusszytometrie gemessen. Für jeden histologischen Typ wurden dabei zwei der oben genannten Moleküle untersucht.

Hierbei ließ sich insgesamt feststellen, dass es bei sehr geringen Konzentrationen zu keiner Aufregulierung der Oberflächenmoleküle durch ODN kam, bei einem weiteren Anstieg der Konzentration ein sprunghafter Anstieg zu sehen war und sich bei noch weiterer Konzentrationssteigerung keine weitere Aufregulierung mehr zeigte. Der sprunghafte Anstieg war allerdings je nach histologischem Typ, ODN und Oberflächenmarker unterschiedlich ausgeprägt und lag im Bereich zwischen 0,15 und 0,6  $\mu\text{g/ml}$  ODN.

Am schnellsten reagierte das SLL, bei dem bereits bei einer Konzentration von 0,15  $\mu\text{g/ml}$  eine Induktion von CD86 und CD54 durch ODN 2006 zu sehen war, wohingegen bei den anderen ODN noch kein Effekt erkennbar war. Auf ODN 2137 reagierten die Zellen erst bei 0,3  $\mu\text{g/ml}$ . CD54 wurde bei 0,3  $\mu\text{g/ml}$  durch ODN 2006 und ODN 2137 gleich stark induziert, während CD86 bei dieser Konzentration durch ODN 2006 stärker als durch ODN 2137 induziert wurde. ODN 2216 wirkte erst bei Konzentrationen ab 0,6  $\mu\text{g/ml}$  und führte dabei zu einer insgesamt schwächeren Induktion als ODN 2006 und ODN 2137. Auf

## Ergebnisse

ODN 2017 zeigten die Zellen für alle verwendeten Konzentrationen keine Induktion von Oberflächenmarkern.

Ein solches Muster, bei dem ODN 2006 schon bei geringeren Konzentrationen zu einer Aufregulierung der Oberflächenmoleküle führte als ODN 2137 und ODN 2216 noch später und schwächer induzierend wirkte, während man bei ODN 2017 keine Effekte beobachten konnte, fand sich auch bei CLL (CD86 und CD20), gesunden B-Zellen (CD40 und CD86), follikulären Hyperplasien (CD54 und CD86) und bei Zellen eines großzelligen B-Zell Lymphoms (CD54), allerdings erst bei einer ODN-Konzentration ab 0,3 oder 0,6 µg/ml. Bei dem Marginalzonen Lymphom (CD86), dem follikulären Lymphom (CD54 und CD86) und beim Mantelzell Lymphom (CD54 und CD86) stieg die Expression der Moleküle nach Stimulation mit ODN 2006 und ODN 2137 bei gleich niedrigen Konzentrationen an (im Bereich zwischen 0,3 und 0,6 µg/ml), jedoch war der stimulierende Effekt durch ODN 2006 stets größer als durch ODN 2137.

ODN 1758, dessen Wirkung bei B-Zellen gesunder Spender und bei CLL mituntersucht wurde, induzierte – ähnlich wie ODN 2137 – die Aufregulierung der Oberflächenmoleküle schwächer und erst bei höheren Konzentrationen als ODN 2006 (Abbildung 3.10).

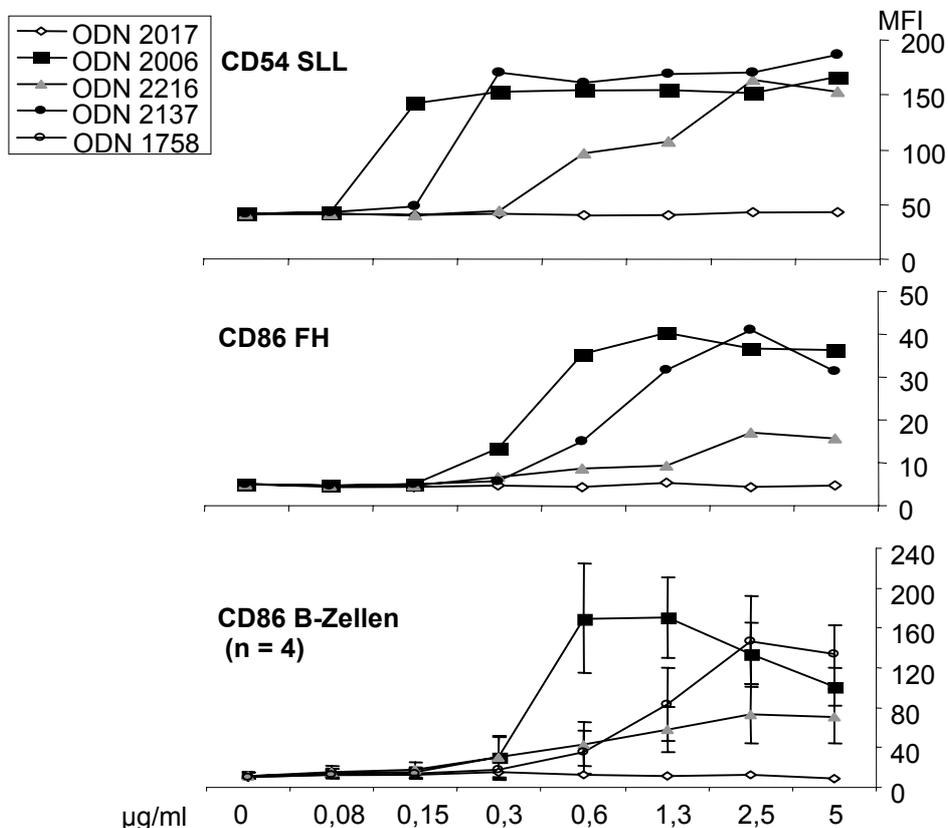


Abbildung 3.10. Induktion von CD54 bzw. CD86 auf B-Zellen eines SLL, einer FH sowie auf gesunden B-Zellen in Abhängigkeit ansteigender ODN-Konzentrationen

3.2.5 Abhängigkeit der Zellaktivierung vom Oligodesoxynukleotidrückgrat und der Basensequenz

Im weiteren Verlauf wurde untersucht, welche Rollen das CpG-Motiv und das Phosphorothioatgerüst innerhalb der ODN-Sequenz hinsichtlich der Potenz der Oberflächenmarkerinduktion spielen. Dazu wurden Zellen zweier CLL-Patienten für 48 h jeweils mit den Phosphodiester-Oligodesoxynukleotiden (PO-ODN) ODN 2080 und Kontroll-ODN 2078 sowie mit den Phosphorothioat-Oligodesoxynukleotiden (PS-ODN) ODN 2006 und Kontroll-ODN 2137 inkubiert und anschließend auf die Expression diverser Oberflächenmarker hin untersucht. In diesen Versuchen wurde auch CD95 auf den CLL-Zellen bestimmt. Dabei wurden die PO-ODN zu den Zeitpunkten 0 h, 3 h und 6 h jeweils in einer Konzentration von 30 µg/ml hinzugegeben, die PS-ODN zum Zeitpunkt 0 h in einer Konzentration von 2 µg/ml. Abbildung 3.11 zeigt, dass sich alle untersuchten Antigene (Ausnahme: CD95) durch die CpG-ODN 2080 und 2006 hochregulieren ließen, während die entsprechenden GpC-Kontroll-ODN geringere bis gar keine Effekte zeigten. Dies wird besonders deutlich bei den Phosphodiester-ODN, während das Phosphorothioat-ODN 2137 zwar etwas schwächere, aber trotzdem deutliche Effekte hervorruft und bei der Induktion von 1-D-10 und CD95 dem ODN 2006 sogar überlegen ist. Insgesamt erwiesen sich PS-ODN als stärkere Induktoren der Antigenexpression als PO-ODN.

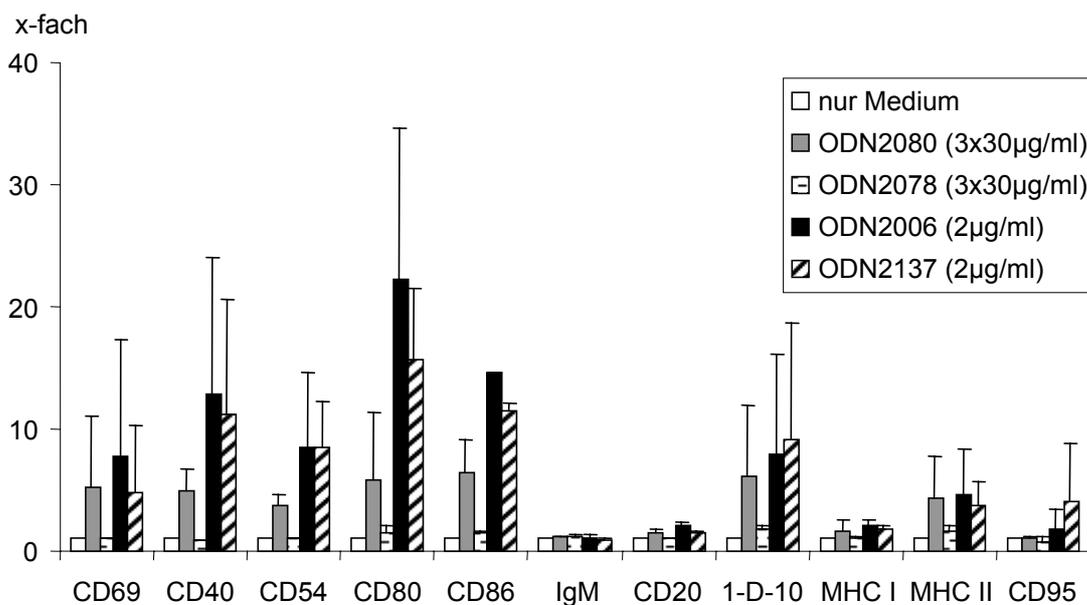


Abbildung 3.11. Vergleich der Wirkung von CpG-PO-ODN (ODN 2080) mit CpG-PS-ODN (ODN 2006) und den jeweiligen GpC-Kontroll-ODN (ODN 2078 bzw. ODN 2137) auf B-CLL-Zellen (n=2). Die Oberflächenmarkerexpression ist jeweils als ein Vielfaches zur Bedingung ohne ODN („nur Medium“) angegeben

Abbildung 3.12 zeigt ein weiteres Beispiel für die ähnliche Wirkung von ODN 2006 und ODN 2137, Abbildung 3.13 und Tabelle 3.1 geben einen Gesamtüberblick über die Versuchsergebnisse (einschließlich Proliferation, s.u.) ohne Berücksichtigung der verschiedenen Lymphomtypen. Hier ist erkennbar, dass die Wirkung von CpG-ODN 2006 sehr stark mit der des GpC-Kontroll-ODN 2137 korreliert. Beide ODN zeigten ähnliche Wirkprofile und statistisch signifikante Unterschiede gegenüber Kontroll-ODN 2017. ODN 2006 war allerdings dem ODN 2137 nur bei der Aktivierung von CD80, CD86, MHC I und der Proliferation signifikant überlegen. Das CpG-ODN 2216 führte zu statistisch signifikanten Hochregulierungen derselben Oberflächenproteine, die auch von ODN 2006 und ODN 2137 aktiviert wurden (Ausnahme: MHC I und Proliferation). Gleichzeitig waren die beiden zuletzt genannten Oligodesoxynukleotide ODN 2216 bei der Induktion von CD80, CD20, 1-D-10 und der Proliferation signifikant überlegen, ODN 2006 dabei auch für CD 54 und MHC I.

# Ergebnisse

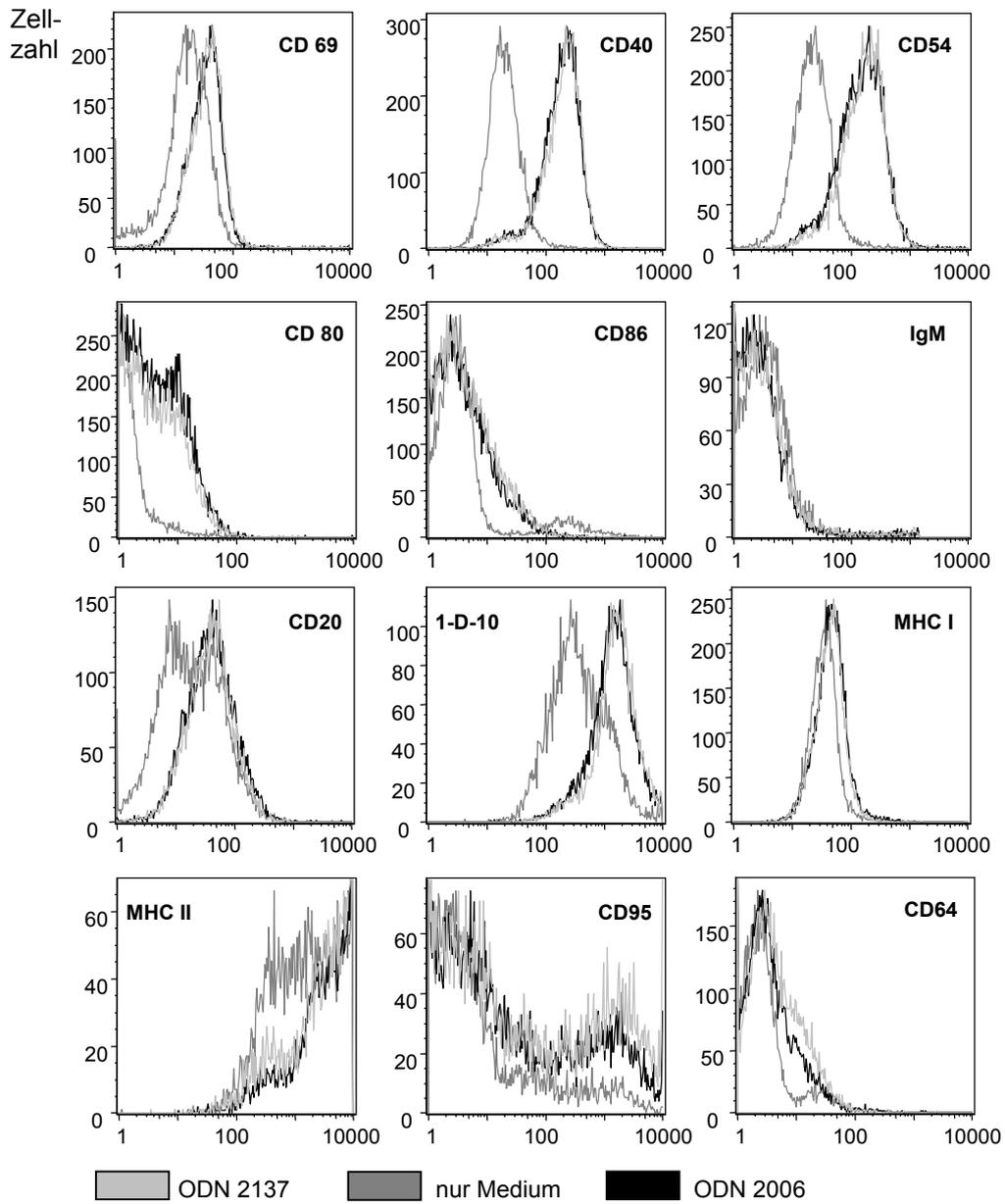


Abbildung 3.12. Beispiel (SLL-Patient) für die Oberflächenmarkerexpression nach Inkubation mit ODN 2006 oder ODN 2137

## Ergebnisse

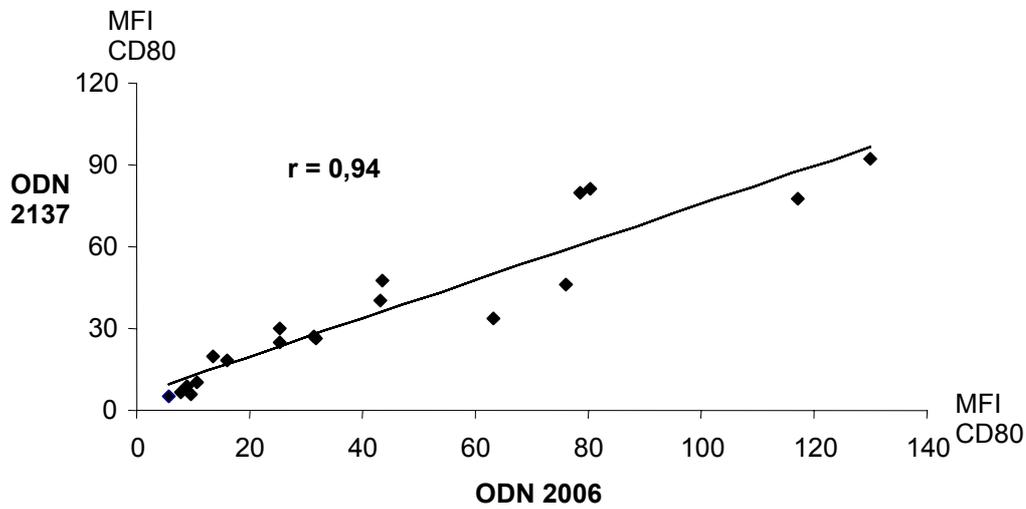
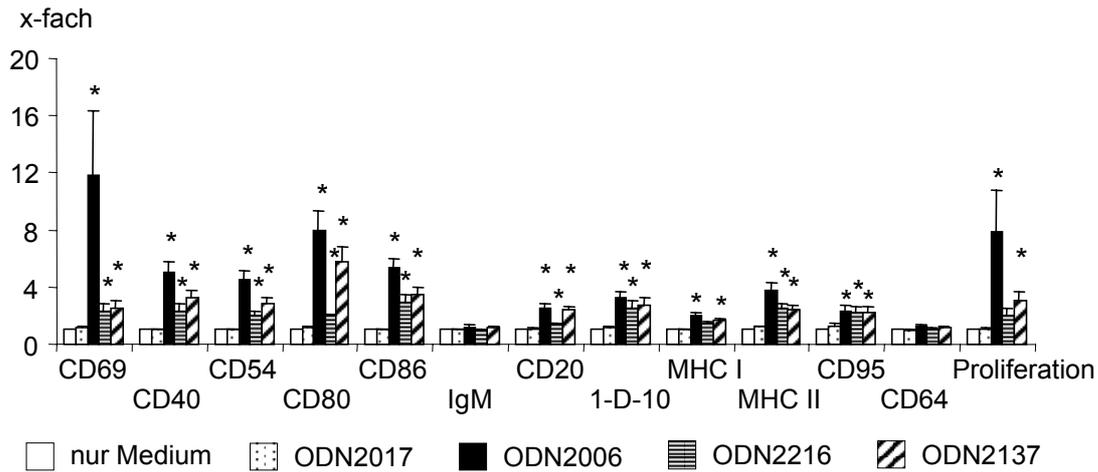


Abbildung 3.13. Das obere Diagramm zeigt eine Zusammenfassung der Oberflächenmarkerexpression und Proliferation aller 27 untersuchten NHL. Die Balken repräsentieren jeweils Vielfache der Bedingung „nur Medium“. Für ODN 2216 und ODN 2137 gilt n=18. Die statistisch signifikanten Werte gegenüber ODN 2017 sind Tabelle 3.1 zu entnehmen.

Die untere Grafik zeigt ein Korrelationsdiagramm für die Wirkung von einerseits ODN 2006 und andererseits ODN 2137 auf die Expression von CD80 bei 18 NHL. Weitere Korrelationen sind in Tabelle 3.1 aufgeführt

## Ergebnisse

	r (2006/ 2137)	p (2006/ 2137)	p (2006/ 2017)	p (2137/ 2017)	p (2216/ 2017)	p (2006/ 2216)	p (2137/ 2216)
<b>CD69</b>	0,96	0,811	0,006	0,022	0,016	0,903	0,973
<b>CD40</b>	0,99	0,181	0,008	0,021	< 0,001	0,096	0,082
<b>CD54</b>	0,99	0,280	< 0,001	0,001	0,004	0,003	0,083
<b>CD80</b>	0,94	0,047	< 0,001	< 0,001	0,039	< 0,001	< 0,001
<b>CD86</b>	0,99	0,003	< 0,001	0,004	0,050	0,626	0,492
<b>IgM</b>	0,99	0,093	0,277	0,259	0,539	0,253	0,115
<b>CD20</b>	0,94	0,055	< 0,001	< 0,001	0,025	< 0,001	< 0,001
<b>1-D-10</b>	0,94	0,925	0,001	0,008	0,041	0,023	0,034
<b>MHC I</b>	0,97	0,004	0,004	< 0,001	0,224	0,003	0,052
<b>MHC II</b>	0,91	0,420	< 0,001	< 0,012	0,001	0,861	0,427
<b>CD95*</b>	0,89	0,236	0,005	0,048	0,020	0,130	0,696
<b>CD64</b>	0,98	0,438	0,221	0,313	0,622	0,207	0,719
<b>Proliferation</b>	0,94	0,059	< 0,001	0,022	0,134	0,006	0,014

Tabelle 3.1. Statistische Kennzahlen zum Vergleich verschiedener ODN bei 27 NHLs ( für ODN 2137 u. ODN 2216: n = 18)

p = p-Wert beim Student-t-Test; r = Korrelationskoeffizient; 2006, 2017, 2137 u. 2216 = entsprechende ODN; grau unterlegt sind statistisch signifikante Werte (p < 0,05)

\* wegen starker Schwankungen der Absolutwerte wurden bei CD95 die Relativwerte zur Berechnung der p-Werte verwendet

### 3.3 Einfluss von CpG-Oligodesoxynukleotiden auf die Zellproliferation

Es ist bekannt, dass CpG-ODN humane B-Zellen gesunder Spender zu vermehrter Proliferation anregen. Es sollte herausgefunden werden, ob derselbe Effekt auch bei malignen B-Zellen zu beobachten ist. Die Wirkung immunstimulatorischer CpG-ODN auf die Proliferation von gesunden B-Zellen und auf Tumorzellen verschiedener NHL wurde dazu mittels intrazellulärer CFSE-Färbung untersucht. Proliferierte lassen sich hierbei von nicht proliferierten Zellen dadurch unterscheiden, dass sie mit geringerer Intensität in den 1. Fluoreszenzkanal (F11) strahlen. Zunächst wurde in einer Proliferations-Kinetik an gesunden B-Zellen und an MZL-Zellen untersucht, zu welchem Zeitpunkt Proliferation erkennbar wurde. Hierbei zeigte sich sowohl bei normalen als auch bei malignen Zellen 72 Stunden nach Inkubationsbeginn mit ODN 2006 oder ODN 1758 eine Induktion der Proliferation. Die Fraktion der proliferierten Zellen stieg an den Tagen 4 und 5 nach Inkubationsbeginn nochmals deutlich an (Abbildung 3.14). In allen folgenden Proliferationsstudien wurde daher Tag 4 als Messzeitpunkt verwendet.

## Ergebnisse

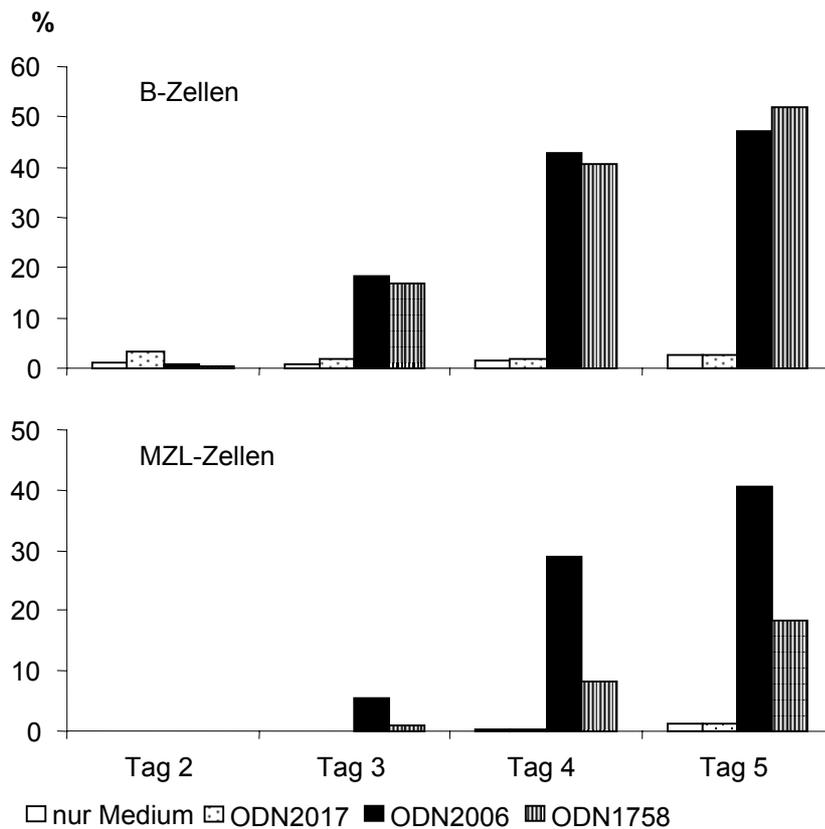


Abbildung 3.14. Anteil der proliferierten B- bzw. MZL-Zellen in % nach 2, 3, 4 und 5 Tagen Inkubation mit diversen ODN (n=1)

Durch CD5/CD19-Doppelfärbung der B-CLL-Proben, lässt sich die maligne (CD19- und CD5-positiv) von der normalen (CD19-positiv und CD5-negativ) B-Zellpopulation trennen (Abbildung 3.15). Sowohl bei CLL-Patienten als auch bei 8 Proben gesunder Spender, ließ sich die Fraktion proliferierender normaler B-Zellen durch Zugabe von ODN 2006 und ODN 1758 signifikant steigern (für beide  $p < 0,001$  im Vergleich zu ODN 2017), während die Inkubation mit ODN 2017 keine Effekte zeigte. In einem der Versuche wurden auch ODN 2137 und ODN 2216 verwendet. Diese ODN zeigten eine ebenfalls deutliche, aber im Vergleich zu ODN 2006 etwas schwächere Induktion der Proliferation (Abbildung 3.16). Bei genauerer Betrachtung fiel auf, dass normale B-Zellen nach ODN-Stimulation eine höhere Zahl an Zellteilungen durchliefen als maligne B-Zellen im selben Zeitraum.

## Ergebnisse

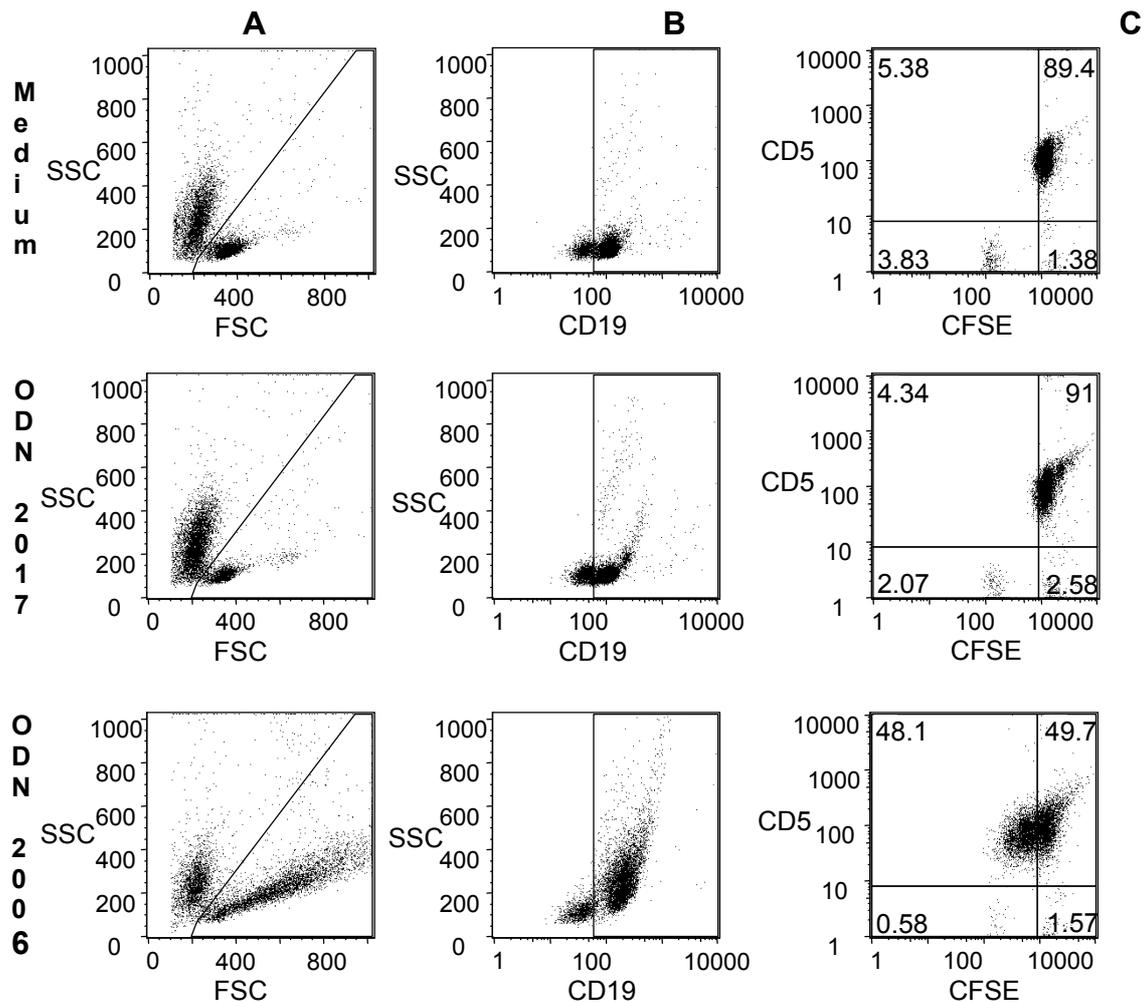


Abbildung 3.15. Bestimmung des Anteils proliferierter CD5<sup>+</sup> und CD5<sup>-</sup> Zellen eines B-CLL-Patienten nach 96 h Inkubation mit ODN 2017 bzw. ODN 2006. A zeigt die Selektion der viablen Zellen, B die Auswahl der CD19<sup>+</sup> Zellen, in C ist dann das unterschiedliche Proliferationsverhalten der malignen und normalen Zellen als Punktdiagramm dargestellt

Auch bei den B-CLL Proben zeigten ODN 2006 und ODN 1758 eine signifikante Steigerung der Proliferationsfraktion im Vergleich zu den Proben, denen kein ODN zugegeben wurde ( $p = 0,036$  und  $p = 0,040$ ). Allerdings war der proliferationsteigernde Effekt hier bei weitem nicht so hoch wie bei den gesunden Spendern, im Mittel machte der Anteil der proliferierten Zellen nach Inkubation bei den B-CLL nur  $15 \pm 5\%$  (ODN 2006) bzw.  $14 \pm 5\%$  (ODN 1758) aus, während er bei den gesunden Spendern bei  $40 \pm 5\%$  bzw.  $46 \pm 5\%$  lag. In beiden Fällen betrug die Grundproliferation, d.h. der Anteil der Zellen, der auch ohne Zugabe von ODN proliferierte, unter 2% (Abbildung 3.16).

## Ergebnisse

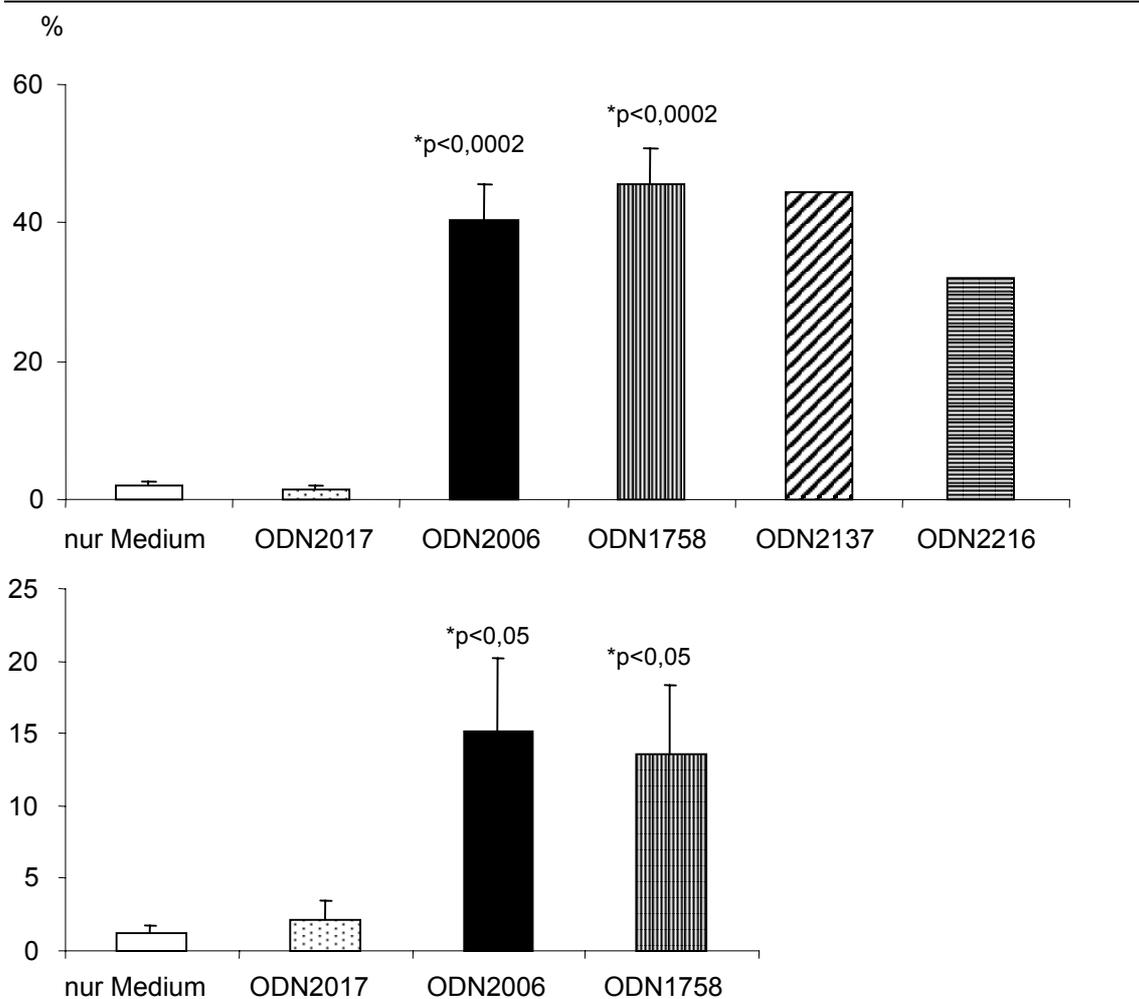


Abbildung 3.16. Das obere Diagramm zeigt das Proliferationsverhalten von B-Zellen gesunder Spender (n=8, für ODN 2216 und ODN 2137 n=1), das untere das von malignen CD5<sup>+</sup> CLL-Zellen (n=6)

\* statistisch signifikant gegenüber ODN 2017 und „nur Medium“

Ebenfalls ließ sich bei den FH-Proben feststellen, dass die Zugabe von ODN 2006 zu einer signifikanten Steigerung der Proliferation führte, und zwar von  $5 \pm 2$  % auf  $43 \pm 5$  % ( $p=0,004$  gegenüber ODN 2017). Auch gegenüber ODN 2137 ( $27 \pm 5$  %) und ODN 2216 ( $13 \pm 4$  %) war ODN 2006 signifikant effektiver ( $p=0,021$  bzw.  $p<0,001$ ), gleichzeitig zeigte auch ODN 2137 gegenüber ODN 2017 statistische Signifikanz ( $p=0,008$ ).

Fasst man die Daten aller anderen (ohne CLL) untersuchten NHL zusammen, so lässt sich eine signifikante Steigerung der Proliferation durch ODN 2006 ( $p=0,001$ ) und ODN 2137 ( $p=0,017$ ) gegenüber ODN 2017 nachweisen. Bei ODN 2216 zeigten sich schwächere, nicht signifikante Effekte, ODN 2017 zeigte keine Wirkung und unterschied sich nicht von den Ergebnissen, wenn kein ODN zugegeben wurde. Die Grundproliferation lag mit im Mittel über 5 % deutlich höher als bei den normalen Zellen (2 %). Im Vergleich zu normalen

Zellen zeigte sich eine nur schwache Steigerung der Proliferation, nämlich bei ODN 2006 auf  $18 \pm 3$  %, bei ODN 2137 auf  $15 \pm 3$  % und bei ODN 2216 auf  $11 \pm 3$  %. Zwischen der Wirkung von ODN 2006 und ODN 2137 bestand kein signifikanter Unterschied ( $p=0,059$ ), zwischen ODN 2006 bzw. ODN 2137 und ODN 2216 dagegen schon ( $p=0,006$  für ODN 2006;  $p=0,014$  für ODN 2137).

Aus Abbildung 3.17 ist zu ersehen, dass das MZL das am stärksten proliferierende NHL nach ODN-Stimulation war ( $38 \pm 9$  % proliferierte Zellen bei ODN 2006), bei nur sehr geringer Grundproliferation ( $3 \pm 2$  %). Es folgte das FL mit einer Steigerung von  $6 \pm 2$  % auf  $22 \pm 7$  % und die B-CLL ( $1,3 \pm 0,5$  %  $\rightarrow$   $15,2 \pm 5$  %). Das MCL und das SLL wiesen mit  $10 \pm 4$  % bzw.  $7 \pm 4$  % zwar die höchste Grundproliferation auf, ließen sich aber nur auf einen Proliferationsanteil von  $14 \pm 1$  % bzw.  $14 \pm 7$  % steigern. Das DGBZL erreichte mit  $13 \pm 4$  % nach  $4 \pm 2$  % den geringsten Wert.

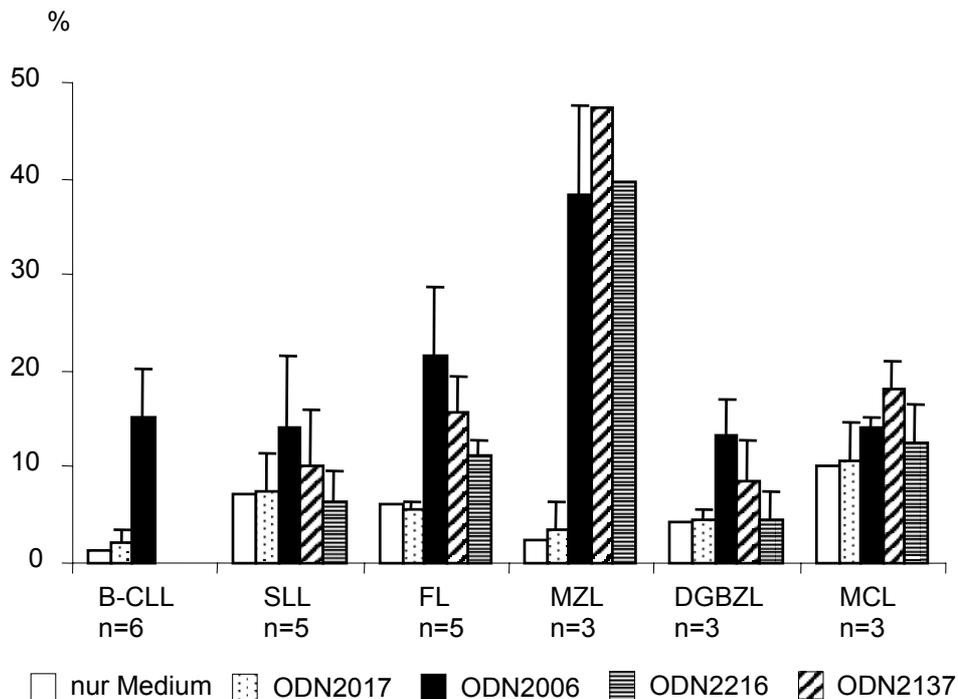


Abbildung 3.17. Proliferationsverhalten maligner B-Zellen unterschiedlicher NHLs  
Die Balken geben den Anteil der proliferierten Zellen in % an. Beim MZL gilt für ODN 2216 und ODN 2137: n=1

### 3.4 Effekt von CpG-Oligodesoxynukleotiden auf Apoptose und Viabilität

Nach 48 Stunden Inkubation mit verschiedenen ODN wurde durch eine Doppelfärbung mit Annexin V FITC und PI der Anteil der spätapoptotischen bzw. toten Zellen in den einzelnen Proben bestimmt. Um die B-Zellen identifizieren zu können, wurden die Zellen mit CD 19 APC gegengefärbt. Es

fanden sich weder bei Beurteilung der einzelnen ODN noch der einzelnen Lymphome Unterschiede hinsichtlich des Anteils spätapoptotischer bzw. nekrotischer Zellen. Er lag bei allen Bedingungen nach 48 Stunden zwischen 15 % und 25 %. Auch die Wahl eines früheren oder späteren Zeitpunktes führte zu keinen Unterschieden für den Prozentsatz Annexin V- und PI-positiver Zellen zwischen den verschiedenen Inkubationsbedingungen (Abbildung 3.18).

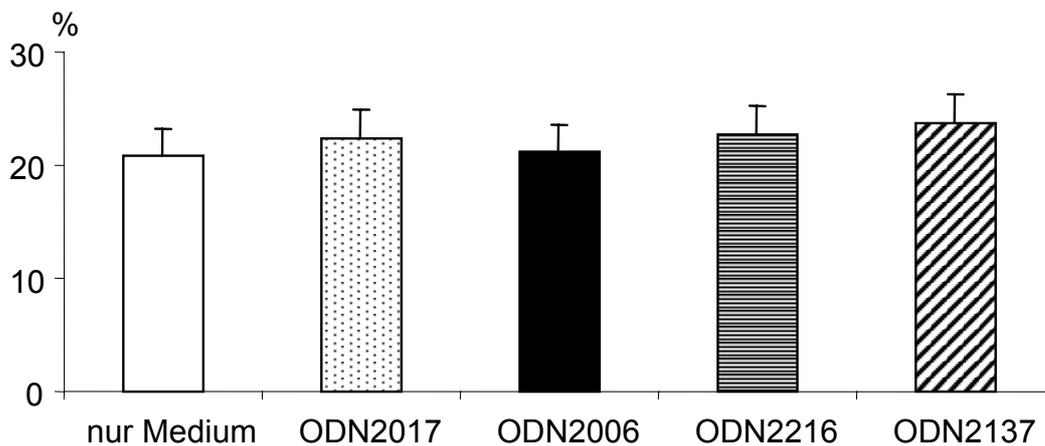


Abbildung 3.18. Anteil der Annexin V- und PI-positiven NHL-Zellen (n=21, für ODN 2216 und ODN 2137 gilt n=12) in %

Eine andere Möglichkeit, den Anteil viabler CD19-positiver und somit indirekt auch den Anteil der spätapoptotischen und nekrotischen Zellen zu bestimmen, ist, zunächst im SSC/CD19 APC-Punktendiagramm die CD19-positiven Zellen auszuwählen und anschließend anhand morphologischer Kriterien im FSC/SSC Punktendiagramm den Prozentsatz der viablen Zellen zu bestimmen (Abbildung 3.19).

Die auf diese Art und Weise gewonnenen Ergebnisse zeigt Abbildung 3.20. Werden alle Proben zusammen (n=32) betrachtet, so erhält man einen signifikant höheren Prozentsatz CD19-positiver viabler Zellen bei Zugabe von ODN 2006 ( $p=0,005$ ), ODN 2216 ( $p=0,001$ ) oder ODN 2137 ( $p=0,003$ ), jeweils verglichen mit ODN 2017, welches sich nicht von der Bedingung ohne ODN unterschied. Im Mittel betrug der Anteil viabler CD19-positiver Zellen nach Zugabe von ODN 2006 50 %, während er bei ODN 2017 oder bei Weglassen von ODN 2006 45 % bzw. 46 % ausmachte. ODN 2216 und ODN 2137 führten zu 45 % bzw. 46 %, wobei die Mittelwerte für ODN 2017 und die Bedingung „nur Medium“ für diese Proben (n=21) jeweils 41 % betragen.

## Ergebnisse

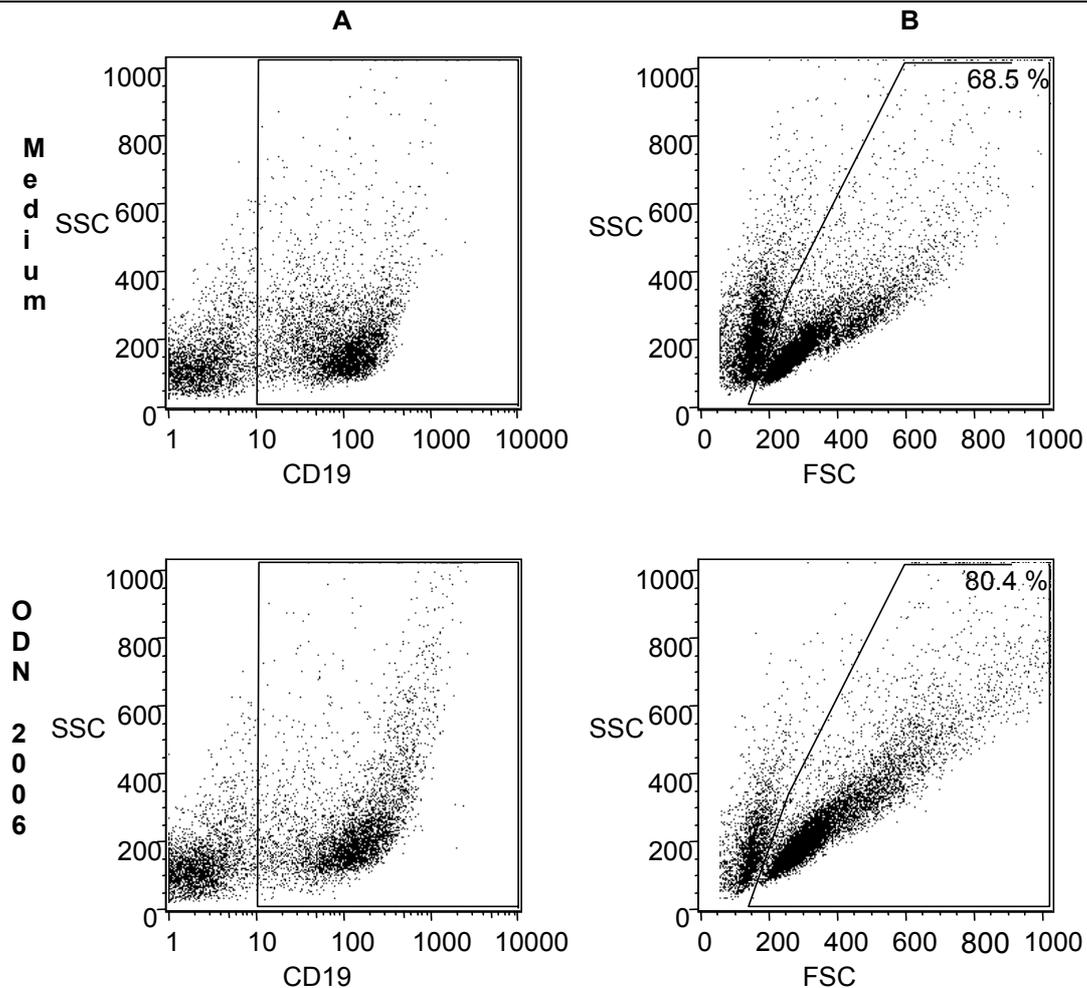


Abbildung 3.19. Beispiel (FL) zur Bestimmung des Anteils viabler CD19<sup>+</sup> Zellen in % anhand morphologischer Kriterien.

A zeigt die Auswahl der CD19<sup>+</sup> Zellen, B die Selektion der morphologisch viablen Zellen

Bei Betrachtung der Proben im einzelnen fiel auf, dass der Effekt der ODN bei den benignen Zellen der FH am deutlichsten ausgeprägt war, wohingegen sich bei den CLLs kein Trend erkennen ließ. So gab es einzelne CLL-Proben, bei denen die Zugabe von ODN 2006 zu einer deutlich erhöhten Zahl der viablen CD19-positiven Zellen führte, wohingegen bei anderen CLL-Proben die Zugabe von ODN 2006 genau den umgekehrten Effekt zur Folge hatte. Für das SLL ergab sich bei Verwendung von ODN 2216 ein deutlich protektiver Effekt ( $p=0,021$ ), ebenso für das FL bei ODN 2006 ( $p=0,041$ ). Die anderen NHL zeigten statistisch keine eindeutige Tendenz. Allerdings war der Anteil der viablen CD19-positiven Zellen bei ODN 2006 in 24 der insgesamt 32 untersuchten Proben höher als bei ODN 2017, was auch in der Gesamtstatistik (s.o.) erkennbar war.

Zwischen dem Anteil der viablen bzw. der apoptotischen Zellen einerseits und der Expression von CD95 andererseits wurde unabhängig von der Zugabe von ODN kein statistischer Zusammenhang gefunden.

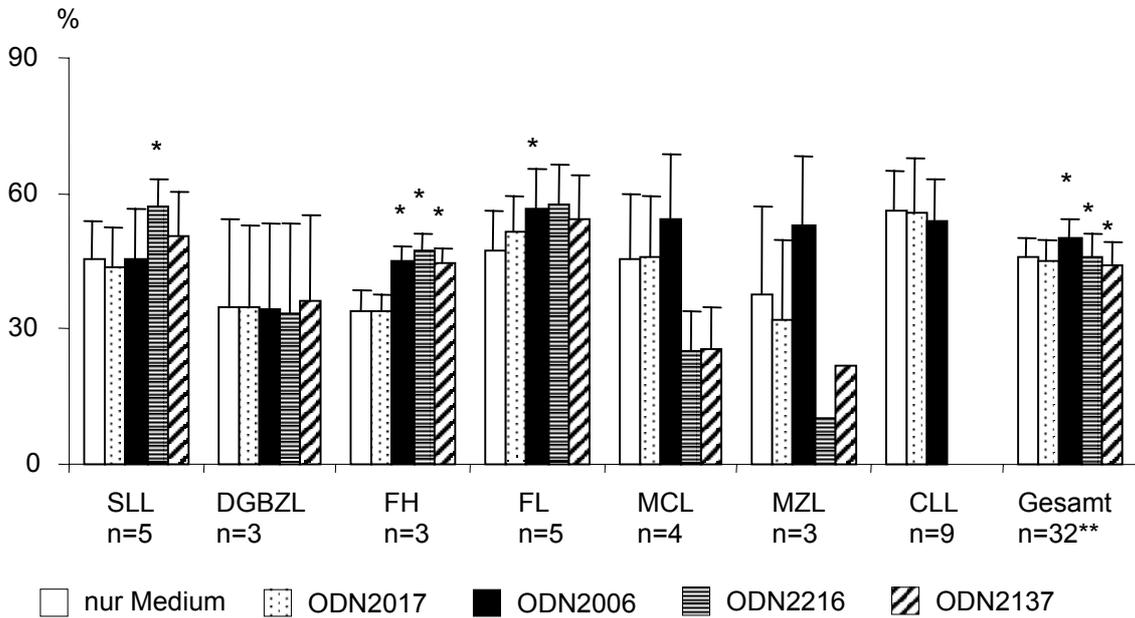


Abbildung 3.20. Anteil viabler CD19<sup>+</sup> Zellen in Proben verschiedener NHLs und FHs in %  
 \* statistisch signifikant gegenüber ODN 2017  
 \*\* für ODN 2216 und ODN 2137 gilt: n=21

### 3.5 Kombination von CpG-Oligodesoxynukleotiden mit dem therapeutischen Antikörper Rituximab

Um zu untersuchen, ob die direkte Wirkung von Rituximab auf maligne B-Zellen durch Hochregulierung von CD20 verstärkt werden kann, wurden Zellen von Patienten mit CLL oder Marginalzonenlymphom mit 2 µg/ml CpG-ODN 2006 oder ODN 2017 inkubiert. Zusätzlich wurden den einzelnen Proben 10 µg/ml Rituximab zugegeben. Ebenso wurden Kontrollproben ohne ODN bzw. ohne Rituximab angesetzt. Zu verschiedenen Zeitpunkten (Tag 0, 2, 4) wurde dann mittels Durchflusszytometrie der Anteil Annexin V und PI-positiver Zellen bestimmt. In weiteren Proben wurde die Expression von CD20 gemessen. Abbildung 3.21 zeigt die Ergebnisse eines repräsentativen Versuchs. Es zeigte sich, dass weder die Zugabe von Rituximab noch die Anwendung verschiedener ODN zu einer erhöhten Anzahl apoptotischer oder nekrotischer Zellen führten. Im Gegenteil schien ODN 2006 sogar einen protektiven Effekt zu haben.

## Ergebnisse

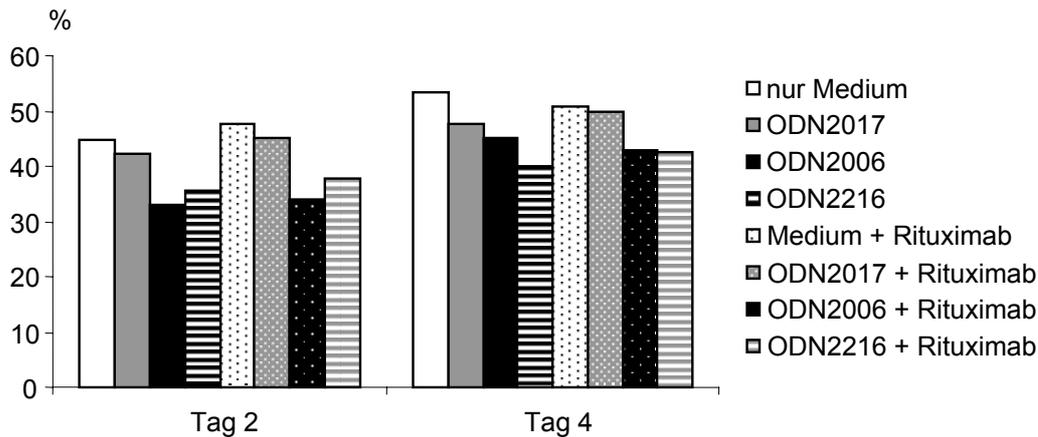


Abbildung 3.21. Anteil Annexin V- und PI-positiver B-CLL-Zellen in % nach Zugabe von verschiedenen ODN (2µg/ml) und Rituximab (10µg/ml)

Die bisher beschriebenen Versuche zeigten daher keine direkte Wirkung von Rituximab auf maligne B-Zellen. Bisher war nicht bekannt, durch welchen Mechanismus der monoklonale Antikörper Rituximab wirkt. Es liegen jedoch Hinweise dafür vor, dass er seine Wirkung über Aktivierung des Komplementsystems entfaltet (Harjunpää 2000). Es wurde daher als nächstes untersucht, ob sich nach Hochregulierung des Zielantigens CD20 durch CpG-ODN die Wirkung von Rituximab steigern ließ, wenn im System Komplement anwesend war. Dazu wurde mittels eines *Chrom Release Assays* (s. Material Methoden) der Prozentsatz lysierter Daudi-Zellen bestimmt, nachdem die Zellen für 48h mit oder ohne CpG-ODN 2006 inkubiert und anschließend unterschiedliche Konzentrationen Rituximab bzw. Trastuzumab sowie Komplement hinzugegeben wurden. Gleichzeitig wurden weitere Proben zur Bestimmung der Expression von CD20, CD55 und CD59 angesetzt.

Die Ergebnisse von insgesamt 11 Vorversuchen ergaben schließlich die optimalen Versuchsbedingungen. Es zeigte sich, dass der Prozentsatz der lysierten Zellen von verschiedenen Variablen abhängig war, nämlich von den eingesetzten Konzentrationen an Rituximab und Komplement sowie vom Einsatz von CpG-ODN. Die insgesamt stärkste Lyse wurde erreicht, indem 20 µg/ml Rituximab, 10 µl Komplement und 2 µg/ml ODN 2006 verwendet wurden. Unter diesen Bedingungen wurde eine Lyse von  $76 \pm 6$  % erreicht, während der Kontrollantikörper Trastuzumab keine Wirkung entfaltete ( $8 \pm 12$  % Lyse) (Abbildung 3.22 A). Außerdem konnte man hier beobachten, dass der Einsatz von CpG-ODN CD20 hochreguliert, während CD55 und CD59 unbeeinflusst blieben (Abbildung 3.22 B). Es wurde so unter Verwendung von CpG-ODN eine

## Ergebnisse

stärkere Lyse erzielt, nämlich  $76 \pm 6$  % gegenüber  $57 \pm 3$  % bei Einsatz von Rituximab ohne CpG-ODN.

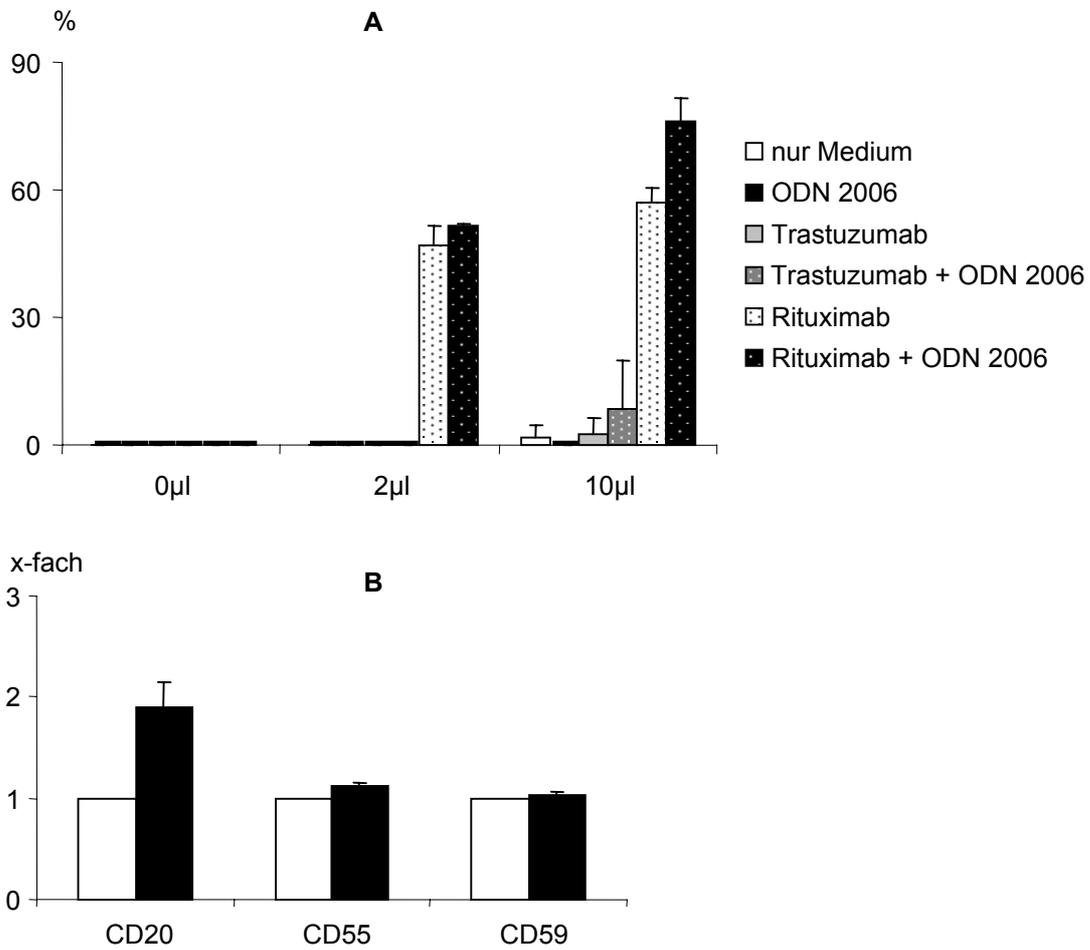


Abbildung 3.22. A zeigt den Anteil lysierter Daudi-Zellen in % nach Zugabe von CpG-ODN 2006, therapeutischen Antikörpern und unterschiedlichen Konzentrationen Komplement (n=2). B zeigt die Wirkung von ODN 2006 auf die Oberflächenexpression von CD20, CD55 und CD59 auf Daudi Zellen nach 48 Stunden Inkubation als Vielfaches von „nur Medium“ (n=2)

## 4 Diskussion

### 4.1 Einfluss von CpG-Oligodesoxynukleotiden auf Morphologie, Viabilität und Oberflächenantigenexpression maligner B-Zellen

Nachdem B-NHL-Zellen unterschiedlicher histologischer Typen mit verschiedenen Oligodesoxynukleotiden (5 µg/ml) für 48 Stunden bei 37°C inkubiert wurden, wurde mittels FACS-Analyse das Oberflächenmarkerprofil der malignen B-Zellen untersucht. Der Zeitpunkt von 48 Stunden ergab sich aus Vorversuchen, bei denen auf B-CLL-Zellen die Expression der entsprechenden Marker nach 0, 48, 72 und 96 Stunden gemessen wurde und sich nach 48 Stunden ein Plateau herausbildete. Die Beobachtung von Krieg et al., dass auf murinen B-Zellen nach 24 Stunden ein Maximum und nach 48 Stunden wieder die Ausgangsexpression erreicht wird, konnte für humane Zellen nicht bestätigt werden (Krieg 1995). Auch Hartmann et al. bzw. Decker et al. benutzten 48 Stunden nach ODN-Inkubationsbeginn als Zeitpunkt für ihre Messungen von Oberflächenmarkern auf humanen B-Zellen bzw. B-CLL-Zellen (Hartmann 2000b, Decker 2000).

Bei Vergleich maligner B-Zellen mit normalen B-Zellen oder FH-Zellen, lässt sich erkennen, dass maligne B-Zellen ähnlich stark wie normale B-Zellen auf CpG-ODN reagieren. Alle untersuchten Proben zeigten ein heterogenes Regulationsmuster der Oberflächenmarker. Zwischen den einzelnen Lymphomtypen und dem Oberflächenmarkerprofil ließen sich unabhängig vom histologischen Typ, der Malignität oder der Ursprungs-B-Zelle keine eindeutigen Tendenzen oder Korrelationen feststellen. Ob die Lymphomzellen also beispielsweise von einer reifen naiven B-Zelle abstammten, wie dies bei B-CLL, SLL und MCL der Fall ist, oder von einer Gedächtnis-B-Zelle, wie beim MZL, war nicht dafür entscheidend, wie stark der eine oder andere Oberflächenmarker durch CpG-ODN heraufreguliert wurde.

Es fiel in diesem Zusammenhang lediglich auf, dass B-CLL-Zellen ohne ODN-Zugabe zwar eine niedrigere Expression aller Marker (außer MHC I) aufwiesen als Zellen des SLL, dafür aber bei Zugabe von ODN eine viel stärkere relative Zunahme von ihrem niedrigeren Ausgangsniveau erreichen konnten (Ausnahme: CD20). Ein Charakteristikum der CLL ist die sehr niedrige CD20 Expression im Vergleich zum SLL, die sich auch hier deutlich feststellen ließ. Interessant ist hier, dass es ausgerechnet bei CD20 als einzigem Marker nicht zu einer relativ stärkeren Hochregulierung bei der B-CLL kam. Trotzdem bleibt

festzuhalten, dass CD20 auf B-CLL-Zellen signifikant durch immunstimulatorische ODN hochreguliert wurde. Das Phänomen, dass bestimmte Oberflächenmarker umso stärker induziert werden, je geringer ihre Ausgangsexpression ist, wie es bereits einmal beschrieben wurde (Jahrsdörfer 2001), ließ sich bei der Untersuchung einer größeren Zahl an NHLs nicht bestätigen. Es ist allerdings anzumerken, dass es methodisch zweifelhaft ist, Absolutwerte verschiedener Proben miteinander zu vergleichen, da die Grundeinstellungen des FACS-Gerätes bei jeder Probe etwas unterschiedlich waren.

Decker et al. beschrieben kürzlich ähnliche Experimente, bei denen B-CLL Zellen für 48 Stunden mit 2 µg/ml des Phosphorothioat-modifizierten ODN DSP30 (5'-TCG TCG CTG TCT CCG CTT CTT CTT GCC-3') inkubiert wurden. Anschließend wurde auch hier die Expression einiger Oberflächenmarker mittels FACS-Analyse bestimmt. Die durchschnittliche Induktion (Expression auf stimulierten Zellen / Expression auf unstimulierten Zellen) lag allerdings meist unter den in dieser Arbeit beobachteten Resultaten von ODN 2006 (CD40: 6,4 [Wert von Decker et al.] – 7,1 [eigener Wert]; CD80: 3,6 – 10,0; CD86: 4,6 – 7,7; MHC I: 2,4 – 2,3; CD54 3,9 – 7,7). Auch das bei den CLLs mitgetestete *Antisense*-ODN 1758 zeigte bessere Ergebnisse als DSP30. Als Ursache für diese Beobachtung kommt wohl weniger die geringere verwendete Konzentration (2µg/ml vs. 5µg/ml) in Frage, da sich in den Konzentrationsreihen zeigte, dass in diesem Konzentrationsbereich keine Wirkungsunterschiede bestehen. Vielmehr ist davon auszugehen, dass es sich um sequenzspezifische Ursachen handelt, also ODN 2006 und ODN 1758 bezüglich ihres stimulatorischen Potentials aktivere ODN darstellen als DSP30.

Diese Arbeit beschreibt erstmals auch den Einfluss von immunstimulatorischen CpG-ODN auf maligne B-Zellen anderer NHLs. Im folgenden soll nun die Wirkung auf die einzelnen Oberflächenmarker diskutiert und sich daraus ergebende Einsatzmöglichkeiten von CpG-ODN in der Therapie von NHL-Patienten aufgezeigt werden.

Bei der Betrachtung aller 27 NHLs in dieser Arbeit lässt sich feststellen, dass die malignen B-Zellen durch ODN 2006, ODN 2216 und ODN 2137 aktiviert wurden, was darin zum Ausdruck kommt, dass sie an Größe und Granularität zunahmten und den frühen Aktivierungsmarker CD69 verstärkt exprimierten. Die relative Größenzunahme korreliert weder mit der relativen Zunahme der CD69 Expression noch mit der Zunahme eines der anderen untersuchten

Oberflächenproteine, so dass deren verstärkte Expression nicht auf die Größenzunahme der Zellen zurückgeführt werden kann, sondern dass tatsächlich die Dichte der Moleküle zugenommen hat.

Auch die Expression weiterer Aktivierungsmarker wie CD40, CD54, CD80 und CD86 wurde durch CpG-ODN auf den Lymphomen signifikant induziert. Diese Moleküle besitzen außerdem auch kostimulatorische Eigenschaften. So beschrieben beispielsweise Chaperot et al. eine positive Korrelation zwischen der Expression von CD54 auf malignen B-Zellen und deren Empfänglichkeit gegenüber Killerzell-vermittelter Lyse (Chaperot 1997). Sie postulierten, dass die schwache Expression von CD54 möglicherweise eine Strategie maligner B-Zellen ist, sich den körpereigenen natürlichen Abwehrkräften oder Immuntherapien zu entziehen. Eine Hochregulierung durch CpG-ODN könnte hier also möglicherweise einen Ausweg liefern. Außerdem stimuliert CD54 die Proliferation und IL-2 Produktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Deeths 1999).

CD40 besitzt ebenfalls zahlreiche kostimulatorische Funktionen (Grewal 1996). U.a. wurde beschrieben, dass über eine Aktivierung von CD40 durch seinen Liganden die Expression von CD80 hochreguliert wird (Yellin 1994). Tatsächlich findet sich auch bei allen hier untersuchten Lymphomen eine positive Korrelation zwischen der durch ODN 2006 induzierten CD40- und CD80-Expression ( $r = 0,68$ ). Daher wäre es auch denkbar, dass die beobachtete CD80-Induktion nicht nur durch CpG-ODN sondern auch durch CD40 Ligand hervorgerufen wurde. CD40 bietet sich außerdem auch für die Therapie mit monoklonalen Antikörpern (MoAbs) oder Immunotoxinen an. So führte die Gabe von MoAbs gegen CD40 bei Mäusen mit B-Zell-Lymphomen zu Tumorregression, verstärkter CTL-Antwort, erhöhter Überlebensrate und sogar zu Protektion gegenüber erneuter Tumorinduktion (Francisco 1997, French 1999, Funakoshi 1994).

Ebenso sind die Moleküle CD80 und CD86 essentiell für die Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Sie verstärken deren Proliferation und Zytokinproduktion, was schließlich in einer verbesserten Immunantwort resultiert, wie z. B. der erhöhten Lyse von Tumorzellen. Hierbei soll CD80 eine größere Bedeutung zukommen als CD86 (Plumas 1995, Lenschow 1996, Fields 1998). In dieser Arbeit war nach CpG-ODN-Stimulation CD80 auf den Zellen bei FL, MCL und SLL und CD86 bei CLL, MZL und DGBZL stärker exprimiert. Jedoch war bei allen Lymphomtypen zu erkennen, dass sich CD80 besser induzieren ließ als CD86 (im Durchschnitt + 700 % bzw. + 430 % gegenüber „nur Medium“).

Es ist daher möglich, dass eine Induktion von CD40, CD54, CD80 und CD86 durch immunstimulatorische CpG-ODN die Immunogenität der malignen B-Zellen verstärkt, so dass diese vom Immunsystem einerseits besser erkannt und andererseits effektiver bekämpft werden könnten. So wurde bereits beschrieben, dass CLL-Zellen nicht potent genug sind, das Immunsystem zu aktivieren (Dazzi 1995), aber dass es zu verstärkter Lyse von CLL-Zellen durch zytotoxische T-Zellen kam, wenn erstere vorher durch CpG-ODN aktiviert wurden und kostimulatorische Moleküle hochregulierten (Decker 2000).

In diesem Zusammenhang ebenfalls wichtig ist die Beobachtung, dass alle in dieser Arbeit untersuchten NHL-Typen auch die antigenpräsentierenden Moleküle MHC I und MHC II vermehrt exprimierten, wenn sie zuvor durch CpG-ODN stimuliert wurden. MHC I bzw. MHC II präsentieren an der Zelloberfläche zelleigene bzw. fremde Antigene und dienen so einerseits als Zielantigen für zytotoxische T-Lymphozyten und andererseits als Initiatoren einer antigenspezifischen Immunreaktion durch Aktivierung von T-Helferzellen (Klein 2000, Zeng 2001). Wird nun auf den malignen Zellen MHC hochreguliert, so könnte dies ebenfalls dazu beitragen, dass diese leichter als Tumorzellen identifiziert und spezifisch eliminiert werden, sowie das Immunsystem stimulieren und für weitere Tumorzellen sensibilisieren.

Die Steigerung der Immunogenität von NHL-Zellen durch die vermehrte Expression von kostimulatorischen und antigenpräsentierenden Zellen dient nicht nur der Aktivierung von körpereigenen DCs und CTLs, sondern könnte auch therapeutische Strategien mit Tumor-Vakzinen ermöglichen. Tumorzellen eines NHL-Patienten könnten gewonnen werden, *in vitro* mit immunstimulatorischen CpG-ODN zu vermehrter Oberflächenmarkerexpression stimuliert und nach Bestrahlung dem Patienten reinjiziert werden. Dann könnten die bestrahlten, aktivierten Zellen das patienteneigene Immunsystem für die Tumorzellen sensibilisieren und letztere somit leichter vernichten. Dies entspricht natürlich in etwa der direkten Behandlung mit ODN, allerdings ließen sich auf diesem Wege eventuelle unerwünschte Nebenwirkungen vermeiden, da der Patient nicht mit ODN in Kontakt kommt.

Ein weiteres Oberflächenantigen, welches eine Variante von HLA-D darstellt, wurde durch den Antikörper 1-D-10 jeweils auf den Lymphomen identifiziert. Es wird von den meisten malignen aber, entgegen ursprünglicher Annahme, auch von gesunden B-Zellen bestimmter Reifestadien exprimiert (Gingrich 1990, Kostelny 2001). Bei allen in dieser Arbeit untersuchten Proben ließ sich dieser

Marker durch 1-D-10 in unterschiedlicher Intensität nachweisen, auch auf den Zellen gesunder Spender. Durch ODN 2006, ODN 1758, ODN 2080, ODN 2137 und ODN 2216 ließ es sich signifikant hochregulieren. Der humane, monoklonale Antikörper 1-D-10 induziert Komplement-vermittelte Zytotoxizität, ADCC und direkte Apoptose auf malignen B-Zellen (Kostelny 2001). Er wurde bereits in einer Phase II Studie an Patienten mit follikulärem Lymphom getestet (Brown 2001). Die Kombination von immunstimulatorischen CpG-ODN mit dem MoAb 1-D-10 könnte analog zu Rituximab (s. u.) auch in diesem Fall eine vielversprechende Strategie sein, um durch verstärkte Zielantigenpräsentation die Ansprechrate auf diese Behandlung zu steigern.

Bei CD20 handelt es sich um ein anderes Zielantigen auf B-Zellen, gegen das ein MoAb (Rituximab, Mabthera<sup>®</sup>) existiert, der inzwischen für die Lymphomtherapie zugelassen ist. CD20 ließ sich ebenfalls auf allen Lymphomzellen nachweisen und durch CpG-ODN signifikant hochregulieren. Neben Rituximab existiert inzwischen ein weiterer therapeutischer Antikörper gegen CD20, nämlich das an radioaktives Yttrium gekoppelte Ibritumomab (Zevalin<sup>™</sup>), welches sich in einer Phase III Studie dem Rituximab signifikant überlegen erwies (Gesamtansprechrate 80 % gegenüber 44 %). In einer weiteren Studie, in die nur gegen Rituximab refraktäre Patienten mit follikulärem Lymphom einbezogen wurden, wurde noch eine Gesamtansprechrate von 74 % erreicht (Wiseman 2001, Witzig 2001). Zu den therapeutischen Möglichkeiten bzw. Konsequenzen aus den Ergebnissen zu CD20 siehe 4.4.

Sowohl für murine B-Zellen als auch für humane B-CLL-Zellen wurde beschrieben, dass CpG-ODN die Expression von Fas (CD95) auf der Zelloberfläche herunterreguliert und dadurch die Zellen gegen Fas-vermittelte Apoptose und Th1-Zell-vermittelte Zytotoxizität schützt (Wang, Z. 1997, Decker 2000). Andererseits wird auch berichtet, dass maligne B-Zellen unabhängig von der Höhe ihrer CD95 Expression gegenüber Fas-vermittelter Apoptose resistent sind (Wang, D. 1997, Plumas 1998).

Die Expression von CD95 variiert in ihrer Intensität je nach Lymphomtyp. Hier konnten die Ergebnisse von Plumas bestätigt werden, dass die Expression auf solchen Lymphomen geringer ausfällt, die von naiven B-Zellen abstammen (Mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI): SLL =14 , MCL=39), während sie bei FL (101) und DGBZL (72), die sich beide von Keimzentrums-B-Zellen ableiten deutlich höher ausfiel und auf dem einen untersuchten MZL (241) am höchsten war. Letzteres leitet sich von Gedächtnis-B-Zellen ab. Die follikulären

Hyperplasien wiesen mit einer MFI von 22 wiederum ein niedriges Niveau auf. Diese Daten stehen im Einklang mit dem in der Literatur beschriebenen Zusammenhang zwischen unterschiedlicher CD95 Expression und verschiedenen Reifestadien von B-Zellen (Möller 1993, Lagresle 1996). Allerdings sollte an dieser Stelle erneut auf das methodische Problem hingewiesen werden, die gemessenen FACS-Daten miteinander zu vergleichen, da die Absolutwerte je nach Justierung des FACS-Geräts schwanken. Auf je einem SLL und einem MCL konnte kein CD95 nachgewiesen werden, nach Stimulierung durch ODN 2006 fand sich allerdings auf dem MCL eine deutliche, wenn auch niedrige (MFI=10) CD95-Expression. Auch bei den anderen untersuchten Proben zeigte sich bei ODN 2006 in 18 und bei ODN 2216 und ODN 2137 in 17 von 20 Fällen eine Induktion der CD95 Expression. Im Zusammenhang mit den Phosphodiester-Versuchen wurden auch zwei B-CLL-Proben auf ihre CD95 Oberflächenexpression hin untersucht. Dabei exprimierten beide kein CD95, und nur eine reagierte mit einer leichten Aufregulation bzw. Expression nach ODN Behandlung.

Fasst man alle NHLs zusammen, so ergibt sich für CD95 eine signifikante Hochregulierung um durchschnittlich 120 %. Dies ist insofern bemerkenswert, da Decker et al. auf B-CLL-Zellen eine Herunterregulierung nach CpG-ODN-Zugabe beobachteten. Nun stellte sich aber auch heraus, dass zwischen der Intensität der CD95 Expression auf NHL-Zellen und deren Empfänglichkeit gegenüber Fas-vermittelter Apoptose kein Zusammenhang bestand (Plumas 1998). Auch eine Hochregulierung von CD95 durch CD40 Aktivierung änderte daran nichts, woraus auf eine Blockade im CD95-Reaktionsweg in NHL-Zellen geschlossen wurde, welche auch für die Tumorentwicklung mitverantwortlich sein könnte (Plumas 1998).

Auch bei den in dieser Arbeit untersuchten NHLs zeigte sich kein Zusammenhang zwischen der Expression oder Induktion von CD95 einerseits und dem Anteil der apoptotischen Zellen andererseits, weder bei der Bestimmung mit Annexin V und PI noch bei der morphologischen Identifizierung der viablen Zellen. Vielmehr zeigte sich eher, dass die Zellen nach Inkubation mit CpG-ODN zwar CD95 stärker exprimierten, gleichzeitig aber auch der Anteil der viablen Zellen angestiegen war, während die Messung mit Annexin V und PI gar keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Bedingungen hervorbrachte.

Erklärt werden kann dieses Phänomen damit, dass die Induktion der Apoptose über CD95/ Fas durch den Fas-Liganden fehlt. Außerdem sind an der Regulierung der Apoptose unzählige Moleküle und Mechanismen beteiligt, wobei die Fas-vermittelte Apoptose nur eine unter vielen Möglichkeiten darstellt, so dass andere Ursachen für diese Ergebnisse mitverantwortlich sein dürften. So fanden Jahrsdörfer et al. einen Zusammenhang zwischen der Serum-Thymidinkinase (s-TK), ein Marker für die proliferative Aktivität maligner B-Zellen, und der durch CpG induzierten Apoptose in B-CLL Zellen. Ein niedriger s-TK Wert ging mit einer erhöhten Apoptoserate nach Inkubation mit ODN 2006 einher, bei Patienten mit hohem s-TK Wert hingegen vermochte ODN 2006 nicht, Apoptose zu induzieren (Jahrsdörfer 2002). Dies ist ein Hinweis darauf, dass maligne B-Zellen in einem frühen Stadium der Krankheit möglicherweise sensibler für Apoptose sind und somit auch von einer höheren CD95 Expression profitieren könnten.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für den gering erhöhten Anteil viabler Zellen nach CpG-ODN-Stimulation (50 % gegenüber 46 % ohne CpG-ODN-Zugabe) besteht darin, dass es sich um proliferierte Zellen handeln könnte, da CpG-ODN die NHL zur Proliferation anregen. Der beobachtete Einfluss immunstimulatorischer CpG-ODN auf CD95 bietet also wahrscheinlich keinen attraktiven Ansatzpunkt für mögliche therapeutische Strategien.

IgM-Moleküle ließen sich nur bei 2 follikulären Hyperplasien, 2 Mantelzell-Lymphomen und 3 follikulären Lymphomen auf der Oberfläche nachweisen, bei letzteren wurde es durch CpG-ODN herunter-, bei den FHs und MCLs hochreguliert. Bei allen anderen untersuchten Zellen wurde IgM auch nicht nach CpG-ODN-Stimulierung exprimiert. Dieser Befund spricht dafür, dass die meisten malignen NHL-Zellen nicht ausdifferenziert sind und keine gesteigerte IgM-Produktion aufweisen und sich daran auch nichts durch Inkubation mit CpG-ODN ändert, wie es z. B. für normale murine B-Zellen beschrieben wurde, deren Immunglobulin-Sekretion gesteigert wurde (Krieg 1995). Aufgrund der unsicheren und heterogenen Expression auf der Oberfläche von NHL-Zellen bietet auch IgM keinen attraktiven Ansatzpunkt für eine Kombinationstherapie mit ODN und beispielsweise MoAbs.

Das Protein CD64, welches sich normalerweise nicht auf B-Zellen befindet, wurde bei jeder Probe mituntersucht. Es handelt sich um den Fc $\gamma$ -Rezeptor, an den sich unspezifisch Antikörper binden können. Auch nach CpG-ODN-Zugabe wurde kein CD64 auf den Lymphomzellen nachgewiesen, so dass es sich bei

den Färbungen der anderen Oberflächenantigene mit den fluoreszenzmarkierten Antikörpern mit hoher Wahrscheinlichkeit um antigenspezifische Bindungen handelt.

### **4.2 Einfluss von CpG-Oligodesoxynukleotiden auf das Proliferationsverhalten maligner B-Zellen**

In der Literatur finden sich Hinweise, dass immunstimulatorische CpG-ODN humane B-Zellen zur Proliferation anregen. Sowohl für das in dieser Arbeit verwendete PO-ODN 2080 als auch für das PS-ODN 2006 beschrieb Hartmann einen Anteil von 60-70 % bzw.  $58 \pm 8$  % proliferierter B-Zellen nach 5 Tagen. Dabei verwendete er das ODN 2006 in einer Konzentration von 0,6 µg/ml, während in dieser Arbeit 5 µg/ml gegeben wurden (Hartmann 2000a, Hartmann 2000b). Auch für B-CLL-Zellen wurde ein proliferationsfördernder Effekt von CpG-ODN nachgewiesen (Decker 2000). Hier wurde die Wirkung des PS-ODN DSP30 in einer Konzentration von 2 µmol/l untersucht, und es stellte sich heraus, dass gesunde humane B-Zellen in stärkerem Ausmaß zur Proliferation angeregt wurden als maligne B-CLL-Zellen, welche ihrerseits aber auch reagierten.

In einer Kinetik zeigte sich, dass nach 4 Tagen ein geeigneter Messzeitpunkt für die Proliferation lag, da vorher keine (2 Tage) oder nur geringe (3Tage) Proliferation nachweisbar war und sie sich später (5 Tage) nicht mehr wesentlich erhöhte und zudem nach 5 Tagen viele Zellen zugrunde gegangen waren. Die Feststellungen zu B-Zellen und zu B-CLL-Zellen konnten in dieser Arbeit bestätigt werden. So proliferierten die B-Zellen gesunder Spender nach Inkubation mit ODN 2006 zu  $40 \pm 5$  %, B-CLL-Zellen dagegen nur zu  $15 \pm 5$  %. Auch die Zellen der FH, die zu den benignen Zellen gerechnet werden können, zeigten mit  $43 \pm 5$  % eine deutliche Antwort. Sie wiesen auch ohne ODN-Zugabe mit 5 % eine höhere basale Proliferationsaktivität (d.h. bei Inkubation in Medium) auf als B-CLL- oder B-Zellen (je 2 %).

Auch die anderen NHLs reagierten auf die CpG-ODN-Inkubation mit verstärkter proliferativer Aktivität, wobei je nach histologischem Typ unterschiedlich starke Ausgangswerte und Antworten zu beobachten waren. Werden alle Lymphome zusammengefasst, macht der Anteil der proliferierten Zellen bei ODN 2006  $18 \pm 3$  % aus, was bei einem durchschnittlichen Ausgangswert von 5 % einer Induktion von +260 % entspricht. Die beschriebenen Effekte zeigten sich jedoch

nicht nur bei ODN 2006, sondern auch bei Inkubation mit dem *Antisense*-Oligodesoxynukleotid ODN 1758 sowie mit ODN 2216, welche teilweise mituntersucht wurden. Überraschenderweise proliferierten die Zellen auch nach Inkubation mit ODN 2137, der GpC-Kontrolle zu ODN 2006, und zwar in ähnlich starkem Ausmaß, so dass kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden nachgewiesen werden konnte. Hier wirft sich erneut die Frage auf, ob eher die PS-Struktur oder die CpG-Sequenz für die Wirkungen der ODN verantwortlich sind, zumal auch Liang und Decker beobachteten, dass PS-ODN unabhängig davon, ob sie CpG-Motive enthalten, B-Zellen zur Proliferation anregen (Liang 1996, Decker 2000). Das PS-ODN 2017 zeigte abermals keine Wirkungen (s. 4.3). Es scheint also ein Teil der Wirkung auf die Phosphorothioat-Struktur und ein Teil auf die Sequenz zurückzuführen zu sein.

Unabhängig davon, welche chemische Struktur für die proliferationsfördernde Wirkung der ODN ursächlich ist, stellt sich die Frage nach den möglichen therapeutischen bzw. klinischen Konsequenzen. Zunächst einmal erscheint es unerwünscht, dass Tumorzellen noch weiter zur Vermehrung angeregt werden. Es besteht die Gefahr einer „Explosion“ des Tumors und dem beschleunigten Voranschreiten der Krankheit - ein sicher nicht zu unterschätzendes Problem bei einer eventuellen systemischen Gabe von immunstimulatorischen CpG-ODN. Andererseits bietet dieses Phänomen, sofern es gemäßigt und kontrollierbar erzeugt werden kann, auch die Chance, dass die Tumorzellen sensibler gegenüber bereits erprobten Chemotherapeutika werden. So gibt es einige Zytostatika, die dadurch wirken, dass sie den Zellzyklus blockieren und so zum Absterben der Tumorzellen führen. Vielfach treten aber Resistenzen auf, und hier könnte die Kombinationstherapie mit immunstimulatorischen CpG-ODN möglicherweise zu erhöhten Ansprechraten führen.

### **4.3 Bedeutung des Oligodesoxynukleotidrückgrats und der CpG-Motive für die Zellaktivierung**

In dieser Arbeit wurden verschiedene Oligodesoxynukleotide verwendet, die sich nicht nur in ihrer Sequenz unterscheiden, sondern auch Unterschiede in der chemischen Struktur ihres Rückgrats aufweisen. Welche Rolle spielen nun einerseits die Sequenz, insbesondere CpG-Motive, und andererseits die Phosphorothioat-Modifikation im Gegensatz zur natürlicherweise vorkommenden Phosphodiester-Struktur für die Effekte der ODN auf maligne B-Zellen?

Werden nun zunächst einmal die beiden verwendeten PO-ODN betrachtet, so ist erkennbar, dass das CpG-ODN 2080 zu einer deutlichen Heraufregulierung der untersuchten Oberflächenmarker führte, wohingegen die Wirkung des Kontroll-ODN 2078, in dem die CpG-Motive durch GpC-Sequenzen ersetzt wurden, sich nicht von der Bedingung unterschied, in der den Zellen gar kein ODN zugefügt wurde. Diese Ergebnisse stützen die Theorie, dass CpG-Motive notwendig sind, damit ein ODN immunstimulatorisch wirken kann. Die beiden PO-ODN wurden in höheren Konzentrationen eingesetzt, als in den anderen Experimenten die PS-ODN, nämlich 3 x 30 µg/ml (gegenüber nur 2 bzw. 5 µg/ml). Dies ist notwendig, da die natürliche Phosphodiester-Struktur nicht so stabil ist, da sie im Gegensatz zu Phosphorothioaten durch Diesterasen enzymatisch aufgespaltet wird. Die hier auf malignen B-Zellen (B-CLL) resultierende Hochregulierung wurde für die Proteine CD40, CD54, CD86 und MHC II bereits bei B-Zellen gesunder Spender beschrieben (Hartmann 2000b).

CpG-ODN 2006, welches PS-modifiziert ist, führt in denselben Versuchen zu einer noch stärkeren Hochregulierung der untersuchten Marker. Da sich aber ODN 2006 und ODN 2080 auch in ihrer Sequenz unterscheiden, ist nicht eindeutig zu sagen, ob für die Aktivität die PS-Modifikation verantwortlich ist, oder ob ODN 2006 mit seinen 4 CpG-Motiven eine für die Stimulation optimalere Sequenz besitzt als das ODN 2080 mit seinen nur 2 CpG-Motiven. In ähnlicher Intensität wie ODN 2006 vermochte auch das *Antisense*-Oligodesoxynukleotid ODN 1758, welches ebenfalls ein PS-Rückgrat und außerdem 2 CpG-Motive enthält, die malignen B-Zellen zu stimulieren. ODN 2216 nimmt eine Zwischenstellung ein, da es zwar 3 CpG-Motive enthält, sein Rückgrat aber zum Teil aus Phosphorothioaten und zum Teil aus Phosphodiestern besteht. Dieses war zwar dem ODN 2006 in vielen Fällen unterlegen, führte aber dennoch mit Ausnahme von MHC I und der Proliferation zu statistisch signifikanten Induktionen aller anderen Marker, obwohl es als das klassische CpG-ODN vom Typ A gilt, welche nur schwache Aktivierung von B-Zellen, dafür aber starke Induktion von NK-Zellen und PDCs bewirken (Krug 2001). Hingegen stellt ODN 2006 den klassischen Vertreter der CpG-ODN vom Typ B dar.

Überraschenderweise zeigte auch die GpC-Kontrolle ODN 2137 deutliche Effekte. Es besitzt ein PS-Rückgrat und entspricht in seiner Sequenz ODN 2006 mit dem einzigen Unterschied, dass alle CpG-Motive durch GpC-Sequenzen ersetzt wurden. Trotzdem zeigt es eine deutlich stärkere Aktivität als das CpG-ODN 2080 und ist andererseits ODN 2006 nur bei der Induktion von CD80,

CD86 und MHC I statistisch signifikant unterlegen. Wenn man die Wirkung von ODN 2006 und ODN 2137 miteinander vergleicht, findet sich eine hohe Korrelation ( $0,89 < r < 0,99$ ). Diese Ergebnisse lassen es fragwürdig erscheinen, dass CpG-Motive allein die entscheidende Rolle für die Effekte von ODN auf malignen B-Zellen spielen. So beschrieben auch schon Krieg 1996 und Boggs 1997, dass B-Zellen unabhängig von der ODN-Sequenz stimuliert werden können, sofern das ODN in genügend hoher Konzentration verabreicht wird und andererseits Phosphorothioat-modifiziert ist (Krieg 1996, Boggs 1997).

Wie lässt sich jedoch erklären, dass ODN 2017, welches ein PS-ODN ist, gar keine Wirkung auf maligne B-Zellen hatte, sich in seiner Wirkung also nicht von der Bedingung „nur Medium“ unterschied? Hier wird postuliert, dass die Poly-C-Sequenz dieses ODN möglicherweise eine hemmende Wirkung auf die B-Zellen ausübt und dadurch den stimulierenden Effekt des PS-Rückgrats neutralisiert. Somit spielt die Sequenz also doch eine Rolle, wahrscheinlich sind sie und das PS-Rückgrat ab einer bestimmten Konzentration beide ergänzend für die Wirkung verantwortlich. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit dafür, dass bestimmte ODN wie ODN 2006 oder ODN 2137 stärker wirken als z. B. ODN 2216 oder ODN 2017, bietet ihre dreidimensionale Struktur bzw. ihre Tertiärstruktur. So könnten die einen eine höhere Affinität zu TLR9 besitzen als andere. Dass CpG-ODN 2006 ausgerechnet bei der Induktion von CD80, CD86 und MHC I dem ODN 2137 statistisch signifikant überlegen war, könnte daran liegen, dass sich in der nicht reinen Zellsuspension noch einige PDCs befanden, die CpG-abhängig zur Produktion und Sekretion von IFN- $\alpha$  angeregt wurden, welches dann zu den beschriebenen Effekten bei den B-Zellen führte. Das heißt, dass zu der direkten CpG-unabhängigen Wirkung der ODN noch indirekte CpG-abhängige Mechanismen zur Aktivierung der malignen B-Zellen hinzukamen. Die Frage, ob es sich um Wirkungen handelt, die direkt über TLR9 vermittelt sind oder indirekt über autokrine Stimulation der B-Zellen oder Beeinflussung durch andere Zellen und deren Sekretion von Zytokinen, kann durch diese Experimente nicht beantwortet werden. Experimente mit einerseits aufgereinigten B-Zellen und andererseits PBMCs sowie jeweils ODN 2006 zeigten, dass die Oberflächenantigene auf B-Zellen in beiden Populationen hochreguliert wurden. Allerdings war der Effekt auf die aufgereinigten B-Zellen niedriger, was dafür spricht, dass sowohl direkte als auch indirekte Mechanismen eine Rolle spielen (persönliche Kommunikation mit M. Wagner). Zwischen der Reinheit der Proben einerseits, also dem Anteil CD19-positiver Zellen, und der Proliferation, Apoptose oder Expression der Oberflächenmarker andererseits bestand kein statistischer Zusammenhang, was zunächst für einen

direkten Effekt der ODN auf die malignen B-Zellen spricht, aber es reichen schon weniger als 0,1% bestimmter anderer Zellen wie z. B. PDCs aus, um genügend Zytokine zu bilden, die dann wiederum die B-Zellen stimulieren könnten, und die Reinheit lag bei den untersuchten Proben maximal bei 98 %, im Mittel bei 71 % CD19-positiver Zellen.

In den Konzentrationsreihen, die für jeden histologischen NHL-Typ sowie für B-Zellen gesunder Spender angesetzt wurden, wurden die Expression von CD54 und CD86, teilweise auch von CD20 und CD40, in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationen der unterschiedlichen ODN gemessen. Hierbei fiel auf, dass bei sehr geringen Konzentrationen nur das CpG-ODN 2006 zu einer Induktion der Oberflächenmarkerexpression führte, während seine GpC-Kontrolle ODN 2137 genau wie ODN 2216 und ODN 1758 zunächst unwirksam blieben und erst bei höheren Konzentrationen ihre Wirksamkeit entfalteten. Das wiederum spricht dafür, dass CpG-Motive eine nicht unwichtige Rolle spielen. In der Literatur ist beschrieben, dass CpG-Motive bei humanen Zellen dann besonders wirksam sind, wenn die zwei vorausgehenden Basen Guanin und Thymin sind, und es sich bei den zwei nachfolgenden, flankierenden Basen beide Male um Thymin handelt (Hartmann 2000a). Diese Sequenz ist in ODN 2006 gleich zweimal und auch in ODN 2080 einmal enthalten, während sie in den anderen in dieser Arbeit untersuchten CpG-ODN nicht vorkommt. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit, wonach ODN 2006 die stärksten Effekte bewirkte und erklärt, warum die CpG-ODN ODN 2216 und ODN 1758 erst bei höheren Konzentrationen wirksam waren. Die Frage, welche chemische Struktur letztendlich ein Oligodesoxynukleotid zu einem potenten Immunstimulans macht, ist weiterhin nicht eindeutig zu beantworten. Sowohl die Sequenz, insbesondere CpG-Motive, als auch das Phosphorothioat-Rückgrat scheinen für die Aktivierung von normalen und malignen B-Zellen eine wichtige Rolle zu spielen.

#### **4.4 Kombination von CpG-Oligodesoxynukleotiden mit Rituximab**

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Kombination von therapeutischen monoklonalen Antikörpern (MoAb) mit immunstimulatorischen CpG-ODN zu einer gesteigerten Komplement-vermittelten Lyse maligner B-Zellen führt. Im Gegensatz dazu konnten in einem Komplement-freien System keine therapeutischen Effekte des MoAb Rituximab beobachtet werden.

Die Möglichkeit, MoAbs mit Hilfe der Hybrid-Technik in großen Mengen produzieren zu können, wurde bereits 1975 geschaffen (Köhler, 1975), trotzdem haben bis heute nur wenige MoAbs die Zulassung erreicht. Trotz ihrer Fähigkeit, spezifisch gegen Tumorzellen gerichtet zu sein, vermochten sie nicht, entweder selbst ausreichend zytotoxisch zu sein oder aber die Effektormechanismen des Patienten adäquat zu aktivieren (Riethmüller 1993). Generell wirken MoAbs bei Leukämien und Lymphomen besser als z. B. bei soliden Tumoren (Houghton 1988, LoBuglio 1992). Eine Erklärung dafür ist, dass die Zielzellen den systemisch applizierten MoAbs zugänglicher sind, während bei soliden Tumoren eine hohe Dichte der Zellen bei gleichzeitig kurzer Zirkulationszeit der Antikörper deren therapeutische Effekte reduziert (Jain 1988). Rituximab stellt den ersten zugelassenen Antikörper für den klinischen Gebrauch bei Krebspatienten dar. Bis heute konnte allerdings nicht eindeutig geklärt werden, durch welche Mechanismen Rituximab zu klinischen Erfolgen führt.

Bei der Zugabe von Rituximab zu Tumorzellen konnte nach 48 Stunden keine verstärkte Apoptose oder Nekrose der Zellen beobachtet werden, wenn dem System keine weiteren Reagenzien zugegeben wurden. Auch der Einsatz von CpG-ODN führte hier zu keinem therapeutischen Effekt, bewirkte sogar eher im Gegenteil eine verstärkte Resistenz der malignen B-Zellen gegenüber Rituximab. Daraus lässt sich schließen, dass Rituximab keine eigenen zytotoxischen Fähigkeiten besitzt, sondern dass für dessen Wirkung andere Effektormechanismen des Immunsystems notwendig sind. Maloney et al. beschrieben allerdings, dass Rituximab direkt Apoptose in einigen NHL B-Zelllinien induziert (Maloney 1996). Eine andere Erklärungsmöglichkeit für die Ergebnisse dieser Experimente bietet deren Methode bzw. Versuchsaufbau. Es wurde nämlich erst 48 Stunden nach Zugabe der MoAbs der Anteil der apoptotischen und nekrotischen Zellen mittels Annexin V- und PI-Färbung bestimmt. Dieser Methode entziehen sich aber alle bis dahin vollständig zugrundegegangenen Zellen, d.h. dass man aus den Ergebnissen nicht darauf zurückschließen kann, wie viele Zellen tatsächlich durch Rituximab bis zu diesem Zeitpunkt evtl. vernichtet wurden. Um diesem Problem aus dem Weg zu gehen, wurde für die weiteren Versuche ein anderes Verfahren verwendet, nämlich das des *Chrom-release-assays*. Jedoch auch in diesem Versuchsaufbau zeigte Rituximab keine eigenständigen lytischen Effekte.

Bei Anwendung dieser Methode in Verbindung mit dem Zusatz eines Gemischs aus Komplementfaktoren konnte in dieser Arbeit schließlich gezeigt werden,

dass die Wirkung von Rituximab Komplement-abhängig ist und dass sie durch den zusätzlichen Einsatz von immunstimulatorischen CpG-ODN verstärkt werden kann. Schon frühere *in vitro* Studien haben nahegelegt, dass Rituximab eine Komplement-abhängige Zytotoxizität (CDC) und ADCC induziert (Reff 1994). Auch die Komplement-abhängige zelluläre Zytotoxizität (CDCC) könnte eine Rolle für den Wirkmechanismus von MoAbs spielen. Harjunpää et al. konnten mit ähnlichen Methoden zeigen, dass der zytolytische Effekt von Rituximab hauptsächlich durch CDC vermittelt wird, während die zellulären Effektormechanismen zu keiner signifikanten Wirkungsverstärkung führten (Harjunpää 2000). Trastuzumab, welches als Kontrolle verwendet wurde, führte zu keiner verstärkten Lyse, was nahe legt, dass es sich um einen Rituximab-spezifischen, also von dessen Struktur abhängigen, Effekt handelte. Ein anderer Grund für das erwartete Versagen von Trastuzumab könnte aber auch darin bestehen, dass es sich um einen humanisierten und nicht chimären Antikörper handelt, an dem das verwendete *Rabbit-Komplement* vielleicht nicht so gut wirken kann.

Abgesehen von der Unsicherheit über den Wirkmechanismus von Rituximab, konnte in klinischen Studien gezeigt werden, dass es bei 50 % der Patienten zu therapeutischen Erfolgen führte (Grillo-Lopez 1999). Hier wird aber auch deutlich, dass es den Tumorzellen gelingt, Resistenzmechanismen gegenüber Rituximab zu entwickeln. Ein beschriebenes Phänomen ist der Verlust der CD20 Expression (Kinoshita 1998, Davis 1999) oder dessen Herunterregulierung, so dass dem MoAb sein Angriffspunkt fehlt. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die Resistenz könnte die verstärkte Expression von Komplement-inhibierenden Molekülen wie CD46, CD55, CD59 bieten, sollte die CDC tatsächlich eine wichtige Rolle spielen (Morgan 1994, Harjunpää 2000). Auch eine geschwächte ADCC der immunsuprimierten NHL Patienten, besonders bei zusätzlicher Radio- oder Chemotherapie, könnte eine Ursache der Therapieresistenz sein.

In den hier beschriebenen Versuchen stellte sich heraus, dass immunstimulatorische CpG-ODN die Expression der Komplement-inhibierenden Moleküle CD55 und CD59 nicht beeinflusste, auf der anderen Seite aber die Expression von CD20 auf allen untersuchten NHLs stark heraufregulierte. Die Heraufregulierung von CD20 durch ODN 2006 und damit verbunden ein leichter Zugang des Zielproteins für Rituximab ist daher die naheliegendste Erklärung für den verstärkten lytischen Effekt von Komplement in den *Chrom-release-assays*. Der kombinierte Einsatz von immunstimulatorischen CpG-ODN

und Rituximab könnte somit eine vielversprechende therapeutische Strategie zur Behandlung von NHL-Patienten darstellen.

Dies gilt ebenso, wenn die ADCC der wichtigste Wirkmechanismus von Rituximab sein sollte, da, wie in der Einleitung beschrieben, immunstimulatorische CpG-ODN diese durch ihr breites Wirkspektrum zu verstärken vermögen. Die Kombination von therapeutischen Antikörpern mit CpG-ODN führte in einem murinen Lymphommodell zu einer Steigerung der Ansprechrate bzw. der Langzeitüberlebensdauer von 15 % auf 80 % (Wooldridge 1997), klinische Studien beim Menschen werden derzeit durchgeführt.

### 5 Zusammenfassung

Oligodesoxynukleotide mit einer bestimmten chemischen Struktur wirken auf humane B-Zellen aktivierend. Für diese Wirkung sind sogenannte CpG-Motive in ihrer Sequenz verantwortlich. Non-Hodgkin-Lymphome der B-Zell-Reihe sind mit herkömmlichen Strategien bisher nur eingeschränkt therapierbar.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welche Effekte immunstimulatorische CpG-Oligodesoxynukleotide auf histologisch unterschiedliche, maligne B-Zellen haben und welche Rolle dabei CpG-Motive spielen. Basierend auf den Ergebnissen sollten darauf aufbauend mögliche therapeutische Strategien für B-Non-Hodgkin-Lymphome diskutiert werden.

#### Material und Methoden

Aus peripherem Blut oder aus Lymphknotenbiopsaten von Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphomen, sowie zur Kontrolle aus peripherem Blut gesunder Probanden, wurden mittels Dichtegradienten-Zentrifugation die malignen bzw. normalen B-Zellen isoliert. Nach einer Inkubationsdauer von 48 Stunden mit verschiedenen Oligodesoxynukleotiden wurden dann mittels Durchflusszytometrie das Oberflächenmarkerprofil, die Morphologie und die Apoptoserate der Zellen bestimmt, sowie nach 96 h mittels intrazellulärer CFSE-Färbung die proliferative Aktivität. In weiteren Versuchen wurde mit der Methode eines *Chrom-release-assays* untersucht, ob die kombinierte Gabe des therapeutischen Antikörpers Rituximab zusammen mit einem immunstimulierenden Oligodesoxynukleotid zu einer verstärkten Lyse von Tumorzellen führt.

#### Ergebnisse und Bewertung

Die Größe und die Granularität der Zellen, sowie die Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69, erhöhte sich nach Inkubation mit immunstimulatorischen CpG-Oligodesoxynukleotiden. Diese Aktivierung drückte sich auch darin aus, dass kostimulatorische Moleküle wie CD40, CD54, CD80 und CD86 ebenso wie die antigenpräsentierenden Moleküle MHC I und MHC II verstärkt exprimiert wurden. Diese Veränderungen resultieren zusammen in einer verstärkten Immunogenität der Zellen, d. h. sie könnten einerseits leichter vom Immunsystem identifiziert werden und andererseits könnte dies zu einer stärkeren Aktivierung von dendritischen Zellen und zytotoxischen T-

Lymphozyten führen, also letztendlich zu einer verbesserten Tumorbekämpfung durch das eigene Immunsystem. Gleichzeitig ergeben sich dadurch Möglichkeiten für Vakzine-Strategien, bei denen Tumorzellen zunächst *in vitro* aktiviert, dann bestrahlt und einem Knochenmarkspender oder dem Patienten selbst injiziert werden könnten, so dass dann eine gegen die Tumorzellen spezifische Immunantwort induziert werden könnte.

Die Aufregulierung der Antigene CD20 und 1-D-10, die Zielstrukturen für therapeutische monoklonale Antikörper darstellen, könnte zu einer verminderten Resistenz bzw. einer erhöhten Ansprechrate gegenüber solchen Medikamenten führen. Dies wurde exemplarisch für ODN 2006 und Rituximab gezeigt, die in Kombination *in vitro* mehr Tumorzellen zu lysieren vermochten, als die alleinige Gabe von Rituximab.

Die proliferative Aktivität der malignen B-Zellen wurde deutlich gesteigert und könnte die Zellen gegenüber konventionellen Chemotherapeutika sensibilisieren, welche in den Zellzyklus eingreifen.

Auf die Oberflächenexpression von IgM hatten immunstimulatorische CpG-Oligodesoxynukleotide keinen Einfluss, genauso wenig wie auf die Viabilität bzw. Apoptose der Tumorzellen, obwohl das apoptoseregulierende CD95 verstärkt exprimiert wurde.

Es ließen sich keine Zusammenhänge zwischen dem Reifegrad der malignen oder normalen B-Zellen und deren Antwort auf die CpG-Oligodesoxynukleotide finden.

Die Frage, welche chemische Struktur ein Oligodesoxynukleotid zu einem potenten Immunstimulans macht, ist weiterhin nicht eindeutig zu beantworten. Sowohl die Sequenz, insbesondere CpG-Motive, als auch das Phosphorothioat-Rückgrat scheinen für die Aktivierung von normalen und malignen B-Zellen eine wichtige Rolle zu spielen.

Zusammenfassend stellen immunstimulatorische CpG-Oligodesoxynukleotide eine vielversprechende neue Klasse immunmodulierender Substanzen für die Behandlung von B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen dar.

## 6 Literaturverzeichnis

- Akira, S., Takeda, K. & Kaisho, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* **2**, 675-80 (2001).
- Anagnostopoulos, I. & Stein, H. [Large B-cell lymphomas: variants and entities]. *Pathologe* **21**, 178-89 (2000).
- Anitescu, M. et al. Interleukin-10 functions in vitro and in vivo to inhibit bacterial DNA-induced secretion of interleukin-12. *J Interferon Cytokine Res* **17**, 781-8 (1997).
- Ballas, Z.K., Rasmussen, W.L. & Krieg, A.M. Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. *J Immunol* **157**, 1840-5 (1996).
- Bauer, S. et al. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9237-42 (2001).
- Bendigs, S., Salzer, U., Lipford, G.B., Wagner, H. & Heeg, K. CpG-oligodeoxynucleotides co-stimulate primary T cells in the absence of antigen-presenting cells. *Eur J Immunol* **29**, 1209-18 (1999).
- Boggs, R.T. et al. Characterization and modulation of immune stimulation by modified oligonucleotides. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* **7**, 461-71 (1997).
- Brown, K.S., Levitt, D.J., Shannon, M. & Link, B.K. Phase II Trial of Remitogen(TM) (Humanized 1D10) Monoclonal Antibody Targeting Class II in Patients with Relapsed Low-Grade or Follicular Lymphoma. *Clin Lymphoma* **2**, 188-90 (2001).
- Carpentier, A.F., Chen, L., Maltonti, F. & Delattre, J.Y. Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs can induce rejection of a neuroblastoma in mice. *Cancer Res* **59**, 5429-32 (1999).
- Chace, J.H., Hooker, N.A., Mildenstein, K.L., Krieg, A.M. & Cowdery, J.S. Bacterial DNA-induced NK cell IFN-gamma production is dependent on macrophage secretion of IL-12. *Clin Immunol Immunopathol* **84**, 185-93 (1997).

Chaperot, L. et al. Relationships between susceptibility to LAK cell-mediated lysis, conjugate formation and expression of adhesion molecules in B-cell derived non-Hodgkin's lymphomas. *Leuk Lymphoma* **28**, 133-43 (1997).

Coley, W.B. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas with a report of ten original cases. *Am. J. Med. Sci.* **105**, 487-511. (1893)

Coley, W.B. Treatment of inoperable malignant tumors with the toxins of erysipelas and the bacillus prodigiosus. *Am. J. Med. Sci.* **108**, 183-212. (1894)

Coupland, S.E., Hummel, M. & Stein, H. [Lymphatic system and differentiation of B and T lymphocytes]. *Pathologe* **21**, 106-12 (2000a).

Coupland, S.E., Dallenbach, F.E. & Stein, H. [Small cell B-cell lymphomas: guidelines for differential diagnosis]. *Pathologe* **21**, 147-61 (2000b).

Cowdery, J.S., Chace, J.H., Yi, A.K. & Krieg, A.M. Bacterial DNA induces NK cells to produce IFN-gamma in vivo and increases the toxicity of lipopolysaccharides. *J Immunol* **156**, 4570-5 (1996).

Dallenbach, F.E., Coupland, S.E. & Stein, H. [Marginal zone lymphomas: extranodal MALT type, nodal and splenic]. *Pathologe* **21**, 162-77 (2000).

Davis, H.L. et al. CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *J Immunol* **160**, 870-6 (1998).

Davis, T.A., Czerwinski, D.K. & Levy, R. Therapy of B-cell lymphoma with anti-CD20 antibodies can result in the loss of CD20 antigen expression. *Clin Cancer Res* **5**, 611-5 (1999).

Dazzi, F. et al. Failure of B cells of chronic lymphocytic leukemia in presenting soluble and alloantigens. *Clin Immunol Immunopathol* **75**, 26-32 (1995).

Decker, T. et al. Immunostimulatory CpG-oligonucleotides cause proliferation, cytokine production, and an immunogenic phenotype in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* **95**, 999-1006 (2000).

Deeths, M.J. & Mescher, M.F. ICAM-1 and B7-1 provide similar but distinct costimulation for CD8+ T cells, while CD4+ T cells are poorly costimulated by ICAM-1. *Eur J Immunol* **29**, 45-53 (1999).

Döhner, H. et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* **343**, 1910-6. (2000).

Elkins, K.L., Rhinehart-Jones, T.R., Stibitz, S., Conover, J.S. & Klinman, D.M. Bacterial DNA containing CpG motifs stimulates lymphocyte-dependent protection of mice against lethal infection with intracellular bacteria. *J Immunol* **162**, 2291-8 (1999).

Fields, P.E. et al. B7.1 is a quantitatively stronger costimulus than B7.2 in the activation of naive CD8+ TCR-transgenic T cells. *J Immunol* **161**, 5268-75 (1998).

Francisco, J.A. et al. In vivo efficacy and toxicity of a single-chain immunotoxin targeted to CD40. *Blood* **89**, 4493-500 (1997).

French, R.R., Chan, H.T., Tutt, A.L. & Glennie, M.J. CD40 antibody evokes a cytotoxic T-cell response that eradicates lymphoma and bypasses T-cell help. *Nat Med* **5**, 548-53 (1999).

Funakoshi, S. et al. Inhibition of human B-cell lymphoma growth by CD40 stimulation. *Blood* **83**, 2787-94 (1994).

Gingrich, R.D., Dahle, C.E., Hoskins, K.F. & Senneff, M.J. Identification and characterization of a new surface membrane antigen found predominantly on malignant B lymphocytes. *Blood* **75**, 2375-87 (1990).

Gramzinski, R.A. et al. Interleukin-12- and gamma interferon-dependent protection against malaria conferred by CpG oligodeoxynucleotide in mice. *Infect Immun* **69**, 1643-9 (2001).

Grewal, I.S. & Flavell, R.A. The role of CD40 ligand in costimulation and T-cell activation. *Immunol Rev* **153**, 85-106 (1996).

Grillo-Lopez, A.J. et al. Overview of the clinical development of rituximab: first monoclonal antibody approved for the treatment of lymphoma. *Semin Oncol* **26**, 66-73 (1999).

Hacker, H. et al. CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *Embo J* **17**, 6230-40 (1998).

Harjunpaa, A., Junnikkala, S. & Meri, S. Rituximab (anti-CD20) therapy of B-cell lymphomas: direct complement killing is superior to cellular effector mechanisms. *Scand J Immunol* **51**, 634-41 (2000).

Hartmann, G., Weiner, G.J. & Krieg, A.M. CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 9305-10 (1999).

Hartmann, G. et al. Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune responses in vitro and in vivo. *J Immunol* **164**, 1617-24 (2000a).

Hartmann, G. & Krieg, A.M. Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J Immunol* **164**, 944-53 (2000b).

Heaton, K.M. & Grimm, E.A. Cytokine combinations in immunotherapy for solid tumors: a review. *Cancer Immunol Immunother* **37**, 213-9 (1993).

Hemmi, H. et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**, 740-5 (2000).

Hornung, V. et al. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* **168**, 4531-7 (2002).

Houghton, A. & Scheinberg, D. Monoclonal antibodies in the treatment of hematopoietic malignancies. *Semin Hematol* **25**, 23-9 (1988).

Jahrsdörfer, B. et al. CpG DNA increases primary malignant B cell expression of costimulatory molecules and target antigens. *J Leukoc Biol* **69**, 81-8 (2001).

Jahrsdörfer, B. et al. Modulation of malignant B cell activation and apoptosis by bcl-2 antisense ODN and immunostimulatory CpG ODN. *J Leukoc Biol* **72**, 83-92 (2002).

Jain, R.K. Determinants of tumor blood flow: a review. *Cancer Res* **48**, 2641-58 (1988).

Jakob, T., Walker, P.S., Krieg, A.M., Udey, M.C. & Vogel, J.C. Activation of cutaneous dendritic cells by CpG-containing oligodeoxynucleotides: a role for dendritic cells in the augmentation of Th1 responses by immunostimulatory DNA. *J Immunol* **161**, 3042-9 (1998).

Jones, T.R. et al. Synthetic oligodeoxynucleotides containing CpG motifs enhance immunogenicity of a peptide malaria vaccine in Aotus monkeys. *Vaccine* **17**, 3065-71 (1999).

Kantarjian, H.M., Giles, F.J., O'Brien, S.M. & Talpaz, M. Clinical course and therapy of chronic myelogenous leukemia with interferon-alpha and chemotherapy. *Hematol Oncol Clin North Am* **12**, 31-80 (1998).

Kinoshita, T., Nagai, H., Murate, T. & Saito, H. CD20-negative relapse in B-cell lymphoma after treatment with Rituximab. *J Clin Oncol* **16**, 3916 (1998).

Klein, E. et al. Surface IgM-kappa specificity on a Burkitt lymphoma cell in vivo and in derived culture lines. *Cancer Res* **28**, 1300-10 (1968).

Klein, J. & Sato, A. The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med* **343**, 702-9 (2000).

Kline, J.N. et al. Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma. *J Immunol* **160**, 2555-9 (1998).

Klinman, D.M., Yi, A.K., Beaucage, S.L., Conover, J. & Krieg, A.M. CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 2879-83 (1996).

Kohler, G. & Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. 1975. *Biotechnology* **24**, 524-6 (1992).

Kostelny, S.A. et al. Humanization and characterization of the anti-HLA-DR antibody 1D10. *Int J Cancer* **93**, 556-65 (2001).

Krieg, A.M. et al. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* **374**, 546-9 (1995).

Krieg, A.M., Love-Homan, L., Yi, A.K. & Harty, J.T. CpG DNA induces sustained IL-12 expression in vivo and resistance to *Listeria monocytogenes* challenge. *J Immunol* **161**, 2428-34 (1998a).

Krieg, A.M. et al. Sequence motifs in adenoviral DNA block immune activation by stimulatory CpG motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 12631-6 (1998b).

Krug, A. et al. Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN- $\alpha$ / $\beta$  in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* **31**, 2154-63 (2001).

Krug, A. & Hartmann, G. [Specific modification of the immune system with CpG-oligonucleotides]. *Dtsch Med Wochenschr* **126**, 1002-4 (2001b).

Lagresle, C., Mondiere, P., Bella, C., Krammer, P.H. & Defrance, T. Concurrent engagement of CD40 and the antigen receptor protects naive and memory human B cells from APO-1/Fas-mediated apoptosis. *J Exp Med* **183**, 1377-88 (1996).

Lenschow, D.J., Walunas, T.L. & Bluestone, J.A. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* **14**, 233-58 (1996).

Liang, H., Nishioka, Y., Reich, C.F., Pisetsky, D.S. & Lipsky, P.E. Activation of human B cells by phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *J Clin Invest* **98**, 1119-29 (1996).

Lipford, G.B. et al. Immunostimulatory DNA: sequence-dependent production of potentially harmful or useful cytokines. *Eur J Immunol* **27**, 3420-6 (1997).

Lipford, G.B., Bendigs, S., Heeg, K. & Wagner, H. Poly-guanosine motifs costimulate antigen-reactive CD8 T cells while bacterial CpG-DNA affect T-cell activation via antigen-presenting cell-derived cytokines. *Immunology* **101**, 46-52 (2000).

Liu, H.M. et al. Immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides enhance the immune response to vaccine strategies involving granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* **92**, 3730-6. (1998).

LoBuglio, A.F. & Saleh, M.N. Advances in monoclonal antibody therapy of cancer. *Am J Med Sci* **304**, 214-24 (1992).

Lyons, A.B. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *J Immunol Methods* **243**, 147-54 (2000).

Macfarlane, D.E., Manzel, L. & Krieg, A.M. Unmethylated CpG-containing oligodeoxynucleotides inhibit apoptosis in WEHI 231 B lymphocytes induced by several agents: evidence for blockade of apoptosis at a distal signalling step. *Immunology* **91**, 586-93 (1997).

Macfarlane, D.E. & Manzel, L. Antagonism of immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides by quinacrine, chloroquine, and structurally related compounds. *J Immunol* **160**, 1122-31 (1998).

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. & Janeway, C.A., Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**, 394-7 (1997).

Messina, J.P., Gilkeson, G.S. & Pisetsky, D.S. Stimulation of in vitro murine lymphocyte proliferation by bacterial DNA. *J Immunol* **147**, 1759-64 (1991).

Moldoveanu, Z., Love-Homan, L., Huang, W.Q. & Krieg, A.M. CpG DNA, a novel immune enhancer for systemic and mucosal immunization with influenza virus. *Vaccine* **16**, 1216-24 (1998).

Moller, P. et al. Coregulation of the APO-1 antigen with intercellular adhesion molecule-1 (CD54) in tonsillar B cells and coordinate expression in follicular center B cells and in follicle center and mediastinal B-cell lymphomas. *Blood* **81**, 2067-75 (1993).

Mor, G. et al. Do DNA vaccines induce autoimmune disease? *Hum Gene Ther* **8**, 293-300 (1997).

Morgan, B.P. & Meri, S. Membrane proteins that protect against complement lysis. *Springer Semin Immunopathol* **15**, 369-96 (1994).

Parronchi, P. et al. Phosphorothioate oligodeoxynucleotides promote the in vitro development of human allergen-specific CD4+ T cells into Th1 effectors. *J Immunol* **163**, 5946-53 (1999).

Plumas, J. et al. Malignant B lymphocytes from non-Hodgkin's lymphoma induce allogeneic proliferative and cytotoxic T cell responses in primary mixed lymphocyte cultures: an important role of co-stimulatory molecules CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) in stimulation by tumor cells. *Eur J Immunol* **25**, 3332-41 (1995).

Raffael, A., Nebe C. T., Valet G. Grundlagen der Durchflusszytometrie. In: *Durchflusszytometrie in der Klinischen Zelldiagnostik*. Schmitz G., Rothe G. (Hrsg.). Schattauer Verlag, Stuttgart, New York, 3-49 (1994)

Rajewsky, K. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* **381**, 751-8 (1996).

Redford, T.W., Yi, A.K., Ward, C.T. & Krieg, A.M. Cyclosporin A enhances IL-12 production by CpG motifs in bacterial DNA and synthetic oligodeoxynucleotides. *J Immunol* **161**, 3930-5 (1998).

Reff, M.E. et al. Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood* **83**, 435-45 (1994).

Riethmuller, G., Schneider-Gadicke, E. & Johnson, J.P. Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Curr Opin Immunol* **5**, 732-9 (1993).

Rosenberg, S.A., Mule, J.J., Spiess, P.J., Reichert, C.M. & Schwarz, S.L. Regression of established pulmonary metastases and subcutaneous tumor mediated by the systemic administration of high-dose recombinant interleukin 2. *J Exp Med* **161**, 1169-88 (1985).

- Smith, J.B. & Wickstrom, E. Antisense c-myc and immunostimulatory oligonucleotide inhibition of tumorigenesis in a murine B-cell lymphoma transplant model. *J Natl Cancer Inst* **90**, 1146-54 (1998).
- Stacey, K.J., Sweet, M.J. & Hume, D.A. Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. *J Immunol* **157**, 2116-22 (1996).
- Stacey, K.J., Sester, D.P., Sweet, M.J. & Hume, D.A. Macrophage activation by immunostimulatory DNA. *Curr Top Microbiol Immunol* **247**, 41-58 (2000).
- Stein, H. [The new WHO classification of malignant lymphoma. After "REAL" a further step on the road to a worldwide consensus]. *Pathologe* **21**, 101-5 (2000).
- Sur, S. et al. Long term prevention of allergic lung inflammation in a mouse model of asthma by CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* **162**, 6284-93. (1999).
- Takeshita, F. et al. Cutting edge: Role of Toll-like receptor 9 in CpG DNA-induced activation of human cells. *J Immunol* **167**, 3555-8 (2001).
- Tokunaga, T. et al. Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from Mycobacterium bovis BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J Natl Cancer Inst* **72**, 955-62 (1984).
- Van Uden, J. & Raz, E. Immunostimulatory DNA and applications to allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* **104**, 902-10 (1999).
- Wang, D., Freeman, G.J., Levine, H., Ritz, J. & Robertson, M.J. Role of the CD40 and CD95 (APO-1/Fas) antigens in the apoptosis of human B-cell malignancies. *Br J Haematol* **97**, 409-17 (1997).
- Wang, Z., Karras, J.G., Colarusso, T.P., Foote, L.C. & Rothstein, T.L. Unmethylated CpG motifs protect murine B lymphocytes against Fas-mediated apoptosis. *Cell Immunol* **180**, 162-7 (1997).
- Wiseman, G.A. et al. Biodistribution and dosimetry results from a phase III prospectively randomized controlled trial of Zevalin radioimmunotherapy for low-grade, follicular, or transformed B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol* **39**, 181-94 (2001).

Witzig, T.E. Radioimmunotherapy for patients with relapsed B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Chemother Pharmacol* **48**, S91-5 (2001).

Wooldridge, J.E., Ballas, Z., Krieg, A.M. & Weiner, G.J. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing CpG motifs enhance the efficacy of monoclonal antibody therapy of lymphoma. *Blood* **89**, 2994-8 (1997).

Yamamoto, S., Kuramoto, E., Shimada, S. & Tokunaga, T. In vitro augmentation of natural killer cell activity and production of interferon-alpha/beta and -gamma with deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. *Jpn J Cancer Res* **79**, 866-73 (1988).

Yamamoto, S. et al. Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce IFN [correction of INF] and augment IFN-mediated [correction of INF] natural killer activity. *J Immunol* **148**, 4072-6 (1992a).

Yamamoto, S. et al. DNA from bacteria, but not from vertebrates, induces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth. *Microbiol Immunol* **36**, 983-97 (1992b).

Yellin, M.J. et al. T lymphocyte T cell-B cell-activating molecule/CD40-L molecules induce normal B cells or chronic lymphocytic leukemia B cells to express CD80 (B7/BB-1) and enhance their costimulatory activity. *J Immunol* **153**, 666-74 (1994).

Yi, A.K., Klinman, D.M., Martin, T.L., Matson, S. & Krieg, A.M. Rapid immune activation by CpG motifs in bacterial DNA. Systemic induction of IL-6 transcription through an antioxidant-sensitive pathway. *J Immunol* **157**, 5394-402 (1996a).

Yi, A.K., Hornbeck, P., Lafrenz, D.E. & Krieg, A.M. CpG DNA rescue of murine B lymphoma cells from anti-IgM-induced growth arrest and programmed cell death is associated with increased expression of c-myc and Bcl-xL. *J Immunol* **157**, 4918-25 (1996b).

Yi, A.K. et al. CpG motifs in bacterial DNA activate leukocytes through the pH-dependent generation of reactive oxygen species. *J Immunol* **160**, 4755-61 (1998a).

Yi, A.K., Chang, M., Peckham, D.W., Krieg, A.M. & Ashman, R.F. CpG oligodeoxyribonucleotides rescue mature spleen B cells from spontaneous apoptosis and promote cell cycle entry. *J Immunol* **160**, 5898-906 (1998b).

Zeng, G. MHC class II-restricted tumor antigens recognized by CD4+ T cells: new strategies for cancer vaccine design. *J Immunother* **24**, 195-204 (2001).

Zhu, F.G. & Pissetsky, D.S. Role of the heat shock protein 90 in immune response stimulation by bacterial DNA and synthetic oligonucleotides. *Infect Immun* **69**, 5546-52 (2001).

Zimmermann, S. et al. CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis. *J Immunol* **160**, 3627-30 (1998).

---

**Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen**

1-D-10	Variante von HLA-DR
<sup>51</sup> Cr	Chromium-51
ACK	Lysereagenz zur Lyse von Erythrozyten
ADCC	Antigen vermittelte zelluläre Zytotoxizität
AP-1	<i>Activating protein-1</i>
APC	Allophycocyanin
B-CLL	Chronisch lymphatische Leukämie vom B-Zell-Typ
BL	Burkitt-Lymphom
B-LBL	Lymphoblastisches Lymphom vom B-Zell-Typ
C2B8	Synthetischer Antikörper gegen CD20
CD	<i>Cluster of differentiation</i> : Oberflächenantigen
CDC	Komplement-abhängige Zytotoxizität
CDCC	Komplement-abhängige zelluläre Zytotoxizität
CFSE	<i>5-(6-) Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester</i>
c-HL	Klassisches Hodgkin-Lymphom
c-myc	Onkogen
CpG	Dinukleotid bestehend aus Cytidin und Guanosin
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt (CD8 <sup>+</sup> )
DC	Dendritische Zelle
DGBZL	Diffuses Großzelliges B-Zell-Lymphom
DMSO	Dimethylsulfonsäureoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Eppstein-Barr-Virus
EMZL	Extranodales Marginalzonen-Lymphom
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorter</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FDC	Follikuläre dendritische Zelle
FH	Follikuläre Hyperplasie
FITC	Fluoreszein Isothiocyanat
FL	Follikuläres Lymphom
FSC	<i>Forward scatter</i>
HER2	Humaner epidermaler Wachstumsfaktor 2
HLA	<i>Human leucocyte antigen</i>
Hsp 90	Hitzeschockprotein 90
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin

## Abkürzungen

---

IgH	Schwerketten-Immunglobulin
IgL	Leichtketten-Immunglobulin
IL	Interleukin
IRAK	<i>Interleukin-1 receptor-associated kinase</i>
JNK	<i>c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase</i>
LPHL	Lymphozyten prädominantes Hodgkin-Lymphom
MACS	Magnetische Zellseparation
MALT	Mukosa assoziiertes lymphatisches Gewebe
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCL	Mantelzell-Lymphom
MDC	Myeloide dendritische Zelle
MFI	Mittlere Fluoreszenz-Intensität
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MNC	Mononukleäre Zellen
MoAb	Monoklonale Antikörper
MyD88	<i>Myeloid differentiation marker 88</i>
MZL	Marginalzonen-Lymphom
NaCl	0,9 % ige Lösung aus Natriumchlorid
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
ODN	Oligodesoxynukleotide
P	Plasmozytom
PBMC	Mononukleäre Zellen im peripheren Blut
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PDC	Plasmazytoide dendritische Zelle
PO	Phosphodiester
PE	R-Phycoerythrin
PerCp	<i>Peridinin chlorophyll protein</i>
PI	Propidium-Iodid
PS	Phosphorothioat
REAL	<i>Revised European American Lymphoma</i> (- Klassifikation)
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SEM	Standardfehler der Mittelwerte
SSC	Sideward scatter
SLL	Kleinzelliges lymphozytisches Lymphom
s-TK	Serum-Thymidinkinase
TH-Zelle	T-Helferzelle
TIR	Toll-Interleukin-1 Rezeptor

## Abkürzungen

---

TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRAF6	<i>Tumor necrosis factor receptor-activated factor 6</i>
VEA	<i>Very early activation</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>

---

## Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. Stefan Endres für die fachliche und persönliche Unterstützung sowie die Möglichkeit, in der ebenso engagierten wie freundschaftlichen Atmosphäre der Abteilung zu forschen und die Ergebnisse auf Kongressen und in wissenschaftlichen Zeitschriften zu präsentieren, insbesondere für die Unterstützung eines Forschungsaufenthalts in den USA.

Ich danke Herrn PD Dr. Gunther Hartmann für die klare Konzeption, den wissenschaftlichen Rat und die Motivation.

Ich danke Herrn Dr. Bernd Jahrsdörfer für die methodische Anleitung, die Korrektur der Dissertation und seine wertvolle Hilfe im allgemeinen.

Ich danke allen Laborkollegen, die mich bereitwillig und tatkräftig unterstützten, allen voran Dr. Ralf Jox.

Ich danke den wissenschaftlichen Kooperationspartnern in der hämatologisch-onkologischen Abteilung des Klinikums Innenstadt in München (Dr. Gerold Meinhardt und Prof. Dr. Berthold Emmerich), an der University of Iowa (Prof. Dr. Arthur M. Krieg) sowie in den Unternehmen Coley Pharmaceutical Group (Wellesley, Massachusetts) und Byk Gulden (Konstanz).

Ich danke Herrn Prof. Dr. George J. Weiner und seinen Mitarbeitern für die Möglichkeit und Unterstützung, zwei Monate am Holden Comprehensive Cancer Center, University of Iowa, USA zu forschen und für die Bereitstellung der Patientenzellen.

Ich danke ganz besonders meinen Eltern Ferdinand und Gabriele Mühlenhoff, die mir mein Medizinstudium ermöglicht und mich in jeglicher Hinsicht unterstützt haben.

Ich danke ebenso meiner Schwester Anke Mühlenhoff und meiner Großmutter Ingemarie Holtzem für ihre unschätzbare Hilfe.

---

## Veröffentlichungen

### Originalarbeiten

Jahrsdörfer, B., Hartmann, G., Racila, E., Jackson, W., **Mühlenhoff, L.**, Meinhardt, G., Endres, S., Link, B.K., Krieg, A.M., Weiner, G.J. CpG DNA increases primary malignant B cell expression of costimulatory molecules and target antigens. *J Leukoc Biol* 69, 81-8 (2001).

Jahrsdörfer, B., Jox, R., **Mühlenhoff L.**, Tschöp, K., Krug, A., Rothenfusser, S., Meinhardt, G., Emmerich, B., Endres, S., Hartmann, G. Modulation of malignant B cell activation and apoptosis by bcl-2 antisense ODN and immunostimulatory CpG ODN. *J Leukoc Biol* 72, 83-92 (2002)

### Abstracts

R.J. Jox, B. Jahrsdörfer, **L. Mühlenhoff**, K. Tschöp, S. Endres, G. Hartmann  
Immunostimulation and Apoptosis Modulation of B-CLL cells by Anti-Bcl-2-ODN G3139  
Deutscher Internisten Kongress, Wiesbaden, 2000

B. Jahrsdörfer, E. Racila, W. Jackson, **L. Mühlenhoff**, G. Meinhardt, A.M. Krieg, G.J. Weiner, G. Hartmann  
CpG DNA increases primary malignant B cell expression of costimulatory molecules and target antigens  
Joint Annual meeting of Immunology of the German and Dutch Societies, Düsseldorf, 2000

R.J. Jox, B. Jahrsdörfer, **L. Mühlenhoff**, K. Tschöp, T. Raff, S. Endres, G. Meinhardt, G. Hartmann  
Modulation of spontaneous and chemotherapy-induced apoptosis in B-CLL by Bcl-2 antisense ODN and immunostimulatory CpG ODN  
Joint Annual meeting of Immunology of the German and Dutch Societies, Düsseldorf, 2000

---

B. Jahrsdörfer, **L. Mühlenhoff**, G.J. Weiner, B. Emmerich, S. Endres, G. Hartmann

Distinct activity of CpG ODN on plasmacytoma and other types of B cell malignancy

Activating Immunity with CpG Oligos, 2nd International Symposium, Amelia Island, Florida, USA

---

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Lars Mühlenhoff

Geburtsdatum: 04.01.1977

Geburtsort: Meerbusch

### Schulbildung

1983 – 1987: Astrid Lindgren Grundschule, Meerbusch

1987 – 1996: Städtisches Mataré Gymnasium, Meerbusch  
Abschluss: Abitur (1,6)

### Hochschulbildung

1996 – 1998: Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine  
Universität Düsseldorf

Sept. 1998: Ärztliche Vorprüfung (1,33)

1998 – 2003: Studium der Humanmedizin an der LMU München

Sept. 1999: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (1,0)

Okt. 1999: Beginn der Promotion bei Prof. Dr. med. S Endres

Aug. – Okt. 2000: Forschungsaufenthalt bei G. Weiner, M.D. im Holden  
Comprehensive Cancer Center, University of Iowa,  
USA

Sept. 2001: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (2,0)

April 2002 – März 2003: Praktisches Jahr an der LMU München und der  
University of Melbourne, Australien

April 2003: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (1,0)

Okt. 2003: Abschluss der Promotion

### Berufliche Tätigkeit

seit Juli 2003 Arzt im Praktikum, Klinik für Psychiatrie, LMU  
München