

Aus der Klinik für Innere Medizin  
Schwerpunkt Hämatologie/Onkologie/Immunologie  
Direktor: Prof. Dr. med. Andreas Neubauer  
des Fachbereiches Medizin der Philipps-Universität Marburg  
in Zusammenarbeit mit  
dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH  
Standort Marburg

# Die prognostische Bedeutung von Lymphom-infiltrierenden Zellen der Immunab- wehr bei mit Rituximab behandelten follikulären Lymphomen

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin  
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von  
Laura Kristina Budau  
aus Bremen

Marburg 2014

Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Philipps-Universität Marburg am: 23.10.2014

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. Helmut Schäfer  
Referent: Prof. Dr. med. Andreas Neubauer  
Koreferent: Prof. Dr. med. Roland Moll

# Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 Einleitung</b> .....                                | <b>8</b>  |
| 1.1 Grundlagen des Immunsystems .....                    | 8         |
| 1.1.1 Immunantwort .....                                 | 8         |
| 1.1.2 Lymphknoten.....                                   | 9         |
| 1.1.3 Maligne Lymphome.....                              | 10        |
| 1.2 Das folliculäre Lymphom.....                         | 10        |
| 1.2.1 Inzidenz und Pathogenese.....                      | 11        |
| 1.2.2 Klinische Symptome.....                            | 11        |
| 1.2.3 Pathologie .....                                   | 12        |
| 1.2.3.1 Zellmorphologie .....                            | 12        |
| 1.2.3.2 Zellimmunologie und Zytogenetik .....            | 14        |
| 1.2.4 Diagnose und Differenzialdiagnose.....             | 14        |
| 1.2.5 Staging und Prognose.....                          | 15        |
| 1.3 Rolle des Immunsystems im folliculären Lymphom ..... | 17        |
| 1.4 Therapie des FL.....                                 | 18        |
| 1.4.1 Therapieoptionen vor 2002 .....                    | 18        |
| 1.4.2 Monoklonale Antikörper gegen CD20.....             | 18        |
| 1.4.2.1 Pharmakodynamische Eigenschaften.....            | 19        |
| 1.4.2.2 Therapeutischer Nutzen.....                      | 20        |
| 1.4.3 Aktuelle Behandlungsansätze bei FL .....           | 20        |
| 1.5 Patienten und Daten .....                            | 21        |
| 1.6 Fragestellung .....                                  | 22        |
| <b>2 Material und Methoden .....</b>                     | <b>24</b> |
| 2.1 Patienten.....                                       | 24        |
| 2.2 Präparate .....                                      | 25        |
| 2.3 Immunhistochemie.....                                | 26        |
| 2.4 Oberflächenantigene und Zellmarker.....              | 27        |
| 2.5 Bilderfassung, -bearbeitung und -auswertung .....    | 31        |
| 2.5.1 Mikroskop, Kamera, Computereinheit .....           | 31        |
| 2.5.2 Bilderfassung und -bearbeitung .....               | 31        |
| 2.5.3 Bildinterpretation .....                           | 32        |
| 2.5.3.1 Automatische Zählung .....                       | 32        |
| 2.5.3.2 Manuelle Zählung .....                           | 33        |
| 2.6 Statistische Analysen.....                           | 34        |
| <b>3 Ergebnisse.....</b>                                 | <b>36</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.1 Progressionsfreies Überleben.....   | 36        |
| 3.2 Ausprägung der Oberflächenantigene .....  | 37        |
| 3.2.1 CD20.....   | 38        |
| 3.2.2 CD1a.....   | 40        |
| 3.2.3 CD3.....  | 41        |
| 3.2.4 CD5.....  | 43        |
| 3.2.5 CD8.....  | 44        |
| 3.2.6 CD10.....   | 46        |
| 3.2.7 CD56.....   | 48        |
| 3.2.8 CD68.....   | 49        |
| 3.2.9 PLC.....  | 51        |
| 3.2.10 Ski.....   | 51        |
| 3.2.11 S100.....  | 52        |
| 3.2.12 ZAP70.....   | 53        |
| <b>4 Diskussion.....</b>  | <b>55</b> |
| 4.1 Der prognostische Einfluss der Bystander-Zellen .....   | 55        |
| 4.1.1 Die Rolle der Bystanderzellen .....   | 56        |
| 4.1.1.1 T-Zellen vs. Makrophagen .....  | 56        |
| 4.1.1.2 T-Zell-Subtypen und Infiltrationslokalisation.....  | 57        |
| 4.1.1.3 Weitere in FL nachgewiesene Bystanderzellen .....   | 58        |
| 4.1.2 T-Zell-Signaltransduktion: die Rolle von ZAP70.....   | 59        |
| 4.1.3 Das Protoonkogen Ski.....   | 60        |
| 4.2 Einfluss der Immunzellen auf die Therapie mit Rituximab .....   | 60        |
| 4.2.1 B-Zellen und Rituximab .....  | 60        |
| 4.2.2 Zusammenhang der Rituximab-Therapie und der<br>Infiltration durch Bystanderzellen des Immunsystems..... | 62        |
| 4.2.3 Einfluss der Makrophagen auf die Rituximabtherapie .....  | 64        |
| <b>5 Ausblick.....</b>  | <b>65</b> |
| <b>Literaturverzeichnis .....</b>   | <b>66</b> |
| <b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>  | <b>71</b> |
| <b>Zusammenfassung.....</b>   | <b>73</b> |
| <b>Verzeichnis der akademischen Lehrer .....</b>  | <b>77</b> |
| <b>Danksagung.....</b>  | <b>78</b> |

## Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| <b>Abbildung 1:</b> Gesunder Lymphknoten .....   | 9  |
| <b>Abbildung 2:</b> Links ein gesunder Lymphknoten mit reaktiv vergrößerten Follikeln, rechts ein Follikuläres Lymphom. .... | 13 |
| <b>Abbildung 3:</b> CD3-Färbung Follikelzentrum .....  | 32 |
| <b>Abbildung 4:</b> CD3-Färbung extrafollikulär.....   | 32 |
| <b>Abbildung 5:</b> Progressionsfreie Überlebenszeit der Therapiegruppen im Vergleich.....                                   | 36 |
| <b>Abbildung 6:</b> Expression von CD20 in Zusammenhang mit dem progressionsfreien Überleben .....                           | 38 |
| <b>Abbildung 7:</b> Progressionsfreie Überlebenszeit der Gruppen mit hohem und niedrigem CD20 im Vergleich.....              | 39 |
| <b>Abbildung 8:</b> Vergleich der Therapieregime innerhalb der Gruppen mit niedriger CD20-Zellzahl.....                      | 39 |
| <b>Abbildung 9:</b> Vergleich der Therapieregime innerhalb der Gruppen mit hoher CD20-Zellzahl.....                          | 40 |
| <b>Abbildung 10:</b> Vergleich der Therapieregime innerhalb der Gruppe mit negativer intrafollikulärer CD1a-Expression. .... | 40 |
| <b>Abbildung 11:</b> Anzahl der CD3-positiven Zellen in Zusammenhang mit dem PFS .....                                       | 41 |
| <b>Abbildung 12:</b> Vergleich des PFS für die Gruppen mit hoher und niedriger Anzahl CD3-positiver Zellen .....             | 41 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Abbildung 13:</b> Vergleich der Therapieregime innerhalb der Gruppen mit hoher Anzahl CD3-positiver Zellen .....  | 42 |
| <b>Abbildung 14:</b> Vergleich der Therapie-Schemata in der Gruppe mit niedriger CD3-Expression .....  | 43 |
| <b>Abbildung 15:</b> Vergleich des PFS für die Gruppen mit hoher und niedriger Anzahl CD5-positiver Zellen .....   | 43 |
| <b>Abbildung 16:</b> Vergleich der Therapie-Schemata in der Gruppe mit hoher intra- bzw. extrafollikulärer CD5-Expression.....                                     | 44 |
| <b>Abbildung 17:</b> Vergleich des PFS für die Gruppen mit hoher und niedrige Anzahl CD8-positiver Zellen.....   | 45 |
| <b>Abbildung 18:</b> Vergleich der Therapie-Schemata in der Gruppe mit hoher Expression von CD8 intra- und extrafollikulär.....                                    | 45 |
| <b>Abbildung 19:</b> Vergleich der Therapie-Schemata in der Gruppe mit hoher vs. niedriger extrafollikulärer Expression .....                                      | 46 |
| <b>Abbildung 20:</b> Anzahl von CD10-positiven Zellen in Zusammenhang mit dem PFS. ....  | 46 |
| <b>Abbildung 21:</b> Vergleich des PFS für die Gruppen mit hoher und niedrige Anzahl CD10-positiver Zellen.....  | 47 |
| <b>Abbildung 22:</b> Vergleich des PFS für die Gruppe mit positiver vs negativer / bzw. für extrafollikulär hoher vs. niedriger CD56-Expression im Vergleich ..... | 48 |
| <b>Abbildung 23:</b> Vergleich der Therapie-Schemata in der Gruppe mit positiver intrafollikulärer und mit hoher extrafollikulärer CD56-Expression.....            | 48 |
| <b>Abbildung 24:</b> Anzahl von CD68-positiven Zellen in Zusammenhang mit dem PFS. ....  | 49 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Abbildung 25:</b> Vergleich der Therapieregime innerhalb der Patientengruppe hohen Anzahl CD68-positiver Zellen .....                               | 50 |
| <b>Abbildung 26:</b> Progressionsfreie Überlebenszeit der Therapiegruppen (hohe Anzahl Ski-ausprägender Zellen vs. niedrige Anzahl) im Vergleich ..... | 51 |
| <b>Abbildung 27:</b> Vergleich der Therapie-Regime für das Protoonkogen Ski .....  | 52 |
| <b>Abbildung 28:</b> Vergleich der Therapieregime innerhalb der Patientengruppe niedriger Anzahl ZAP70-positiver Zellen .....                          | 53 |

## **Tabellenverzeichnis**

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabelle 1:</b> Die 4 Stadien der Ann-Arbor-Klassifikation .....   | 15 |
| <b>Tabelle 2:</b> 5 Parameter des FLIPI .....  | 16 |
| <b>Tabelle 3:</b> Einschätzung der Prognose für FL Patienten basierend auf dem FLIPI mittels Einteilung in 3 Risikogruppen (low, intermediate, high) nach Anzahl der Risikofaktoren..... | 16 |
| <b>Tabelle 4:</b> Patientendaten, Unterteilung in Therapie-Arme .....  | 25 |
| <b>Tabelle 5:</b> Auflistung der verwendeten Antikörper.....   | 26 |
| <b>Tabelle 6:</b> Musterzusammenfassung der signifikanten Ergebnisse .....   | 37 |

# 1 Einleitung

## 1.1 Grundlagen des Immunsystems

In dieser Arbeit haben wir uns mit dem komplexen Zusammenspiel des Immunsystems und der Tumorzellen in follikulären Lymphomen (FL) auseinandergesetzt. Zum besseren Verständnis der Thematik sollen zu Beginn einige Grundlagen in Erinnerung gerufen werden.

### 1.1.1 Immunantwort

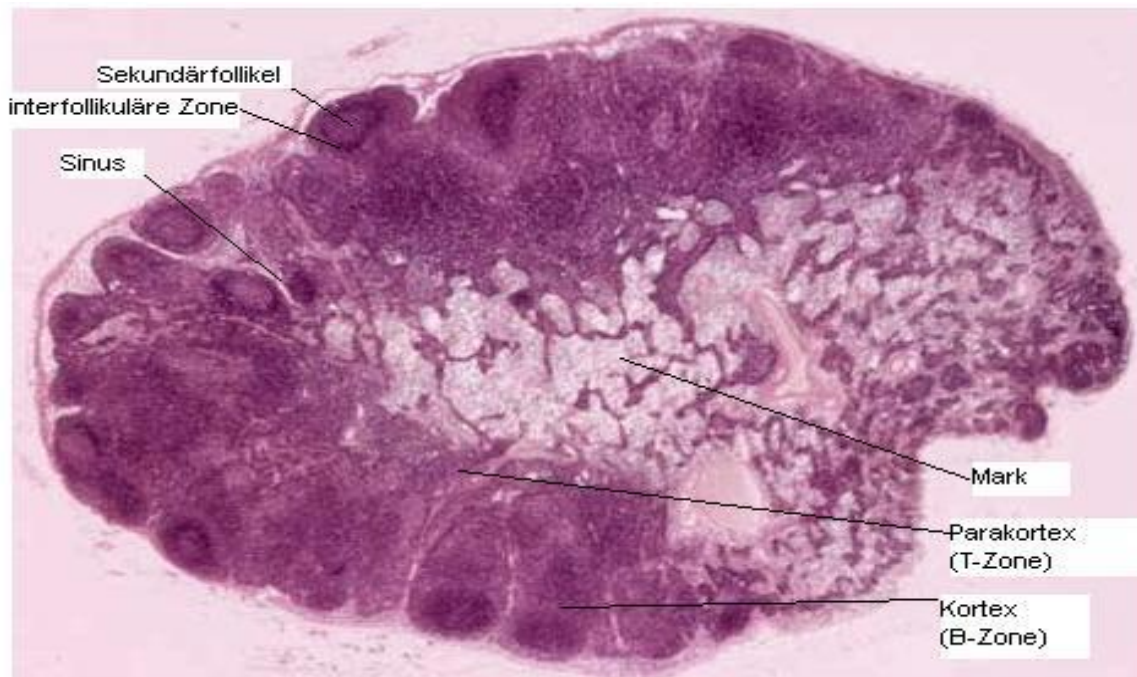
Das Immunsystem dient der Abwehr körperfremder Erreger, aber auch körpereigene entartete Zellen können als fremd erkannt und zerstört werden. Es operiert über zwei verschiedene Systeme:

Das angeborene Immunsystem (unspezifische Abwehr) identifiziert über Rezeptoren fehlerhafte oder fremde Zellen und vernichtet diese durch Chemotaxis. Hierzu zählt z.B. das Komplement-System.

Die Lymphozyten stellen das adaptive (erworbene) Immunsystem dar, die spezifische Abwehr des Körpers, wobei die B-Lymphozyten für die humorale Immunität (Bildung von Antikörpern) und die T-Lymphozyten für die zelluläre Immunität (direkte Apoptoseinduktion, Stimulation von B-Zellen über Interleukine) verantwortlich sind. Körperfremde Moleküle werden von antigenpräsentierenden Zellen (B-Zellen, Makrophagen, dendritischen Zellen) über „major-histocompatibility-complex“- (MHC)-Proteine auf ihrer Oberfläche exponiert. Die Bindung einer Zelle mit passendem T-Zellrezeptor führt zur klonalen Vermehrung der Zelle, wonach zytotoxische T-Zellen die betreffende Zelle zur Apoptose anregen, T-Helferzellen hingegen antigenpräsentierende B-Zellen erkennen und durch Bindung an diese die klonale Vermehrung der B-Zelle stimulieren. Die B-Zelle kann nun zur Plasmazelle reifen und spezifische Antikörper (AK) sezernieren. Diese AK dienen der Neutralisierung der Antigene, aktivieren über Opsonisierung wiederum die angeborene Immunabwehr und bilden Immunkomplexe zur besseren Aufnahme durch die Phagozyten aus.<sup>57</sup>

### 1.1.2 Lymphknoten

Die Vorgänge des adaptiven Immunsystems finden zu einem großen Teil in den Lymphknoten (LK) statt. Der gesunde LK gliedert sich unter seiner Kapsel in 3 Zonen:



**Abbildung 1:** Gesunder Lymphknoten, unter der Kapsel in 3 Zonen gegliedert.<sup>1</sup> Sinus durchziehen den Lymphknoten, die Lymphe fließt über die Randsinus in die Marksinus.

- Im *Kortex* befinden sich die Follikel. Antigene gelangen über die Lymphe durch Vasa afferentia in die subkapsulären Sinus. Naive B-Zellen im Primärfollikel proliferieren nach Antigenpräsentation durch follikuläre dendritische Zellen, der Follikel wird zum Sekundärfollikel mit einem selektierten B-Zell-Klon im Keimzentrum. Makrophagen im Keimzentrum (z.B. sogenannte Sternhimmel-Makrophagen) dienen dem Zellabbau von B-Zellen, die keine hinreichende Antigen-spezifität aufweisen. Antigen-spezifische B-Zellen reifen in der Marginalzone der Follikel zu Memory-B-Zellen und zu Plasmazellen aus.

Der Raum zwischen den Follikeln wird als interfollikuläre Zone bezeichnet.

- Im *Paracortex* finden sich vor allem T-Lymphozyten unterschiedlicher Reife, sowie interdigitierende dendritische Retikulumzellen, welche die T-Zellen nach Antigenkontakt aktivieren.

- In den Marksträngen befinden sich Makrophagen sowie die nach Antigenkontakt in den Follikeln gebildeten spezifischen Plasmazellen. Marksinus durchziehen das *Mark* und befördern immunkompetente Lymphozyten der B- und der T-Zell-Reihe, einige der spezifischen Plasmazellen sowie Immunglobuline über *Vasa efferentia* in die peripheren Lymphbahnen.

Lymphknoten dienen als Filterstationen für körperfremde Moleküle und Erreger sowie im Falle von Malignomen für körpereigene entartete Zellen.

### **1.1.3 Maligne Lymphome**

Neoplasien des lymphatischen Gewebes werden als maligne Lymphome bezeichnet und gehen von verschiedenen Entwicklungsstufen der T-, B- oder der NK-Zellen aus. Somit gleichen die Lymphomzellen unterschiedlichen Differenzierungsstufen der normalen Lymphozyten, entgehen jedoch dem Immunsystem und vermehren sich ungerichtet. Nach histologischen Kriterien unterscheidet man die selteneren Hodgkin-Lymphome (40%), welche häufiger lokalisiert auftreten und sich durch das Vorhandensein der Hodgkinzellen auszeichnen, und die Non-Hodgkin-Lymphome (NHL, 60%), die öfter einen disseminierten Befall verschiedener LK und Knochenmark (KM) aufweisen.

Die NHL, zu denen auch das FL gehört, gehen zu 85% von den B-Zellen aus. Abzugrenzen sind hier die Vorläufer-Zell-Neoplasien von den peripheren Lymphomen, deren Zellen reifere Differenzierungsformen aufweisen. Zwei Drittel dieser Malignome entstehen in den LK, die restlichen befallen extranodale Lokalisationen wie KM, Haut und Magen.

## **1.2 Das folliculäre Lymphom**

FL bilden mit einem Anteil von ca. 20% nach der chronischen lymphatischen Leukämie den zweithäufigsten Subtyp unter den niedrig malignen Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) in Westeuropa und den USA, wohingegen sie weniger häufig im afrikanischen und asiatischen Raum auftreten.<sup>2, 10</sup> Das FL ist definiert als Lymphom der B-Zellen des Follikelzentrums, der Zentrozyten und Zentroblasten, und

zeigt ein folliculäres Wachstumsmuster.<sup>2, 52</sup> FL verlaufen meist über mehrere Jahre ohne manifeste Symptome (indolent) und werden oft erst im generalisierten Stadium diagnostiziert.

### **1.2.1 Inzidenz und Pathogenese**

Die Inzidenz der FL liegt bei 4 Manifestationen pro 100.000 Personen im Jahr, wobei der mediane Erkrankungsgipfel um das 60. Lebensjahr liegt. Es zeigt keine geschlechtsspezifische Verteilung, das Erkrankungsrisiko von Verwandten von Patienten mit FL ist geringfügig erhöht.<sup>40</sup>

Die molekulare Pathogenese ist nicht vollständig aufgeklärt. In etwa 85% der Patienten kann die chromosomale Translokation t(14;18)(q32;q21) nachgewiesen werden, welche zu einer Überexpression des antiapoptotischen „B-cell lymphoma 2“ (Bcl2)-Onkogens führt und somit zu prolongiertem Überleben der Lymphomzelle.<sup>41</sup> Es ist jedoch bekannt, dass diese Veränderung nicht allein für die Entstehung des FL verantwortlich ist, da sie auch in Gesunden sowie in an anderen Lymphomsubtypen erkrankten Patienten auftritt.<sup>28, 77</sup> Weitere Mutationen wurden beschrieben, so zum Beispiel die TP53-Mutation/Deletion, die gemeinsam mit der oben genannten Translokation den Übergang in den aggressiveren, diffusen großzelligen FL-Typ begünstigt und eine schlechtere Prognose bedeutet.<sup>63, 67</sup>

Neuere Studien konnten nun zeigen, dass die Entstehung und das Outcome (Endergebnis einer Therapie) vermutlich durch das komplexe Zusammenspiel zwischen chromosomaler Translokation (und folglich veränderter Genexpression der Lymphomzelle) und dem Microenvironment, den Lymphom-infiltrierenden Immunzellen, bedingt ist.<sup>8, 23, 24</sup> Auf dieses Thema wird im Weiteren in Kapitel 1.3 eingegangen.

### **1.2.2 Klinische Symptome**

Patienten mit FL berichten meist über eine längere Phase von zu- und wieder abnehmender, nicht schmerzhafter Lymphadenopathie im zervikalen, axillären, femoralen und inguinalen Bereich. Hiliäre und mediastinale Lymphknoten sind oft

beteiligt, wobei große Mediastinaltumoren selten beobachtet werden. Bei manchen Patienten sind überwiegend infradiaphragmale retroperitoneale Lymphknoten beteiligt, was zu einer atypischen Klinik führt. Sehr selten werden primäre intestinale oder kutane Lymphome beobachtet, die jedoch mit einer überwiegend guten Prognose verbunden sind.

Beteiligung anderer Organe als des Knochenmarks (in ca. 60% der Fälle vorhanden) und des lymphatischen Systems ist selten. Obwohl bei Diagnosestellung meist schon ein disseminierter Befall lymphatischer Organe nachgewiesen werden kann und ein fortgeschrittenes Stadium (III-IV) vorliegt, präsentiert sich der Großteil der Patienten klinisch bis auf die Lymphknotenschwellung asymptomatisch. Nur etwa 20% der Patienten klagen über B-Symptome (Fieber > 38°C, Nachtschweiß, Gewichtsverlust).<sup>79</sup>

### **1.2.3 Pathologie**

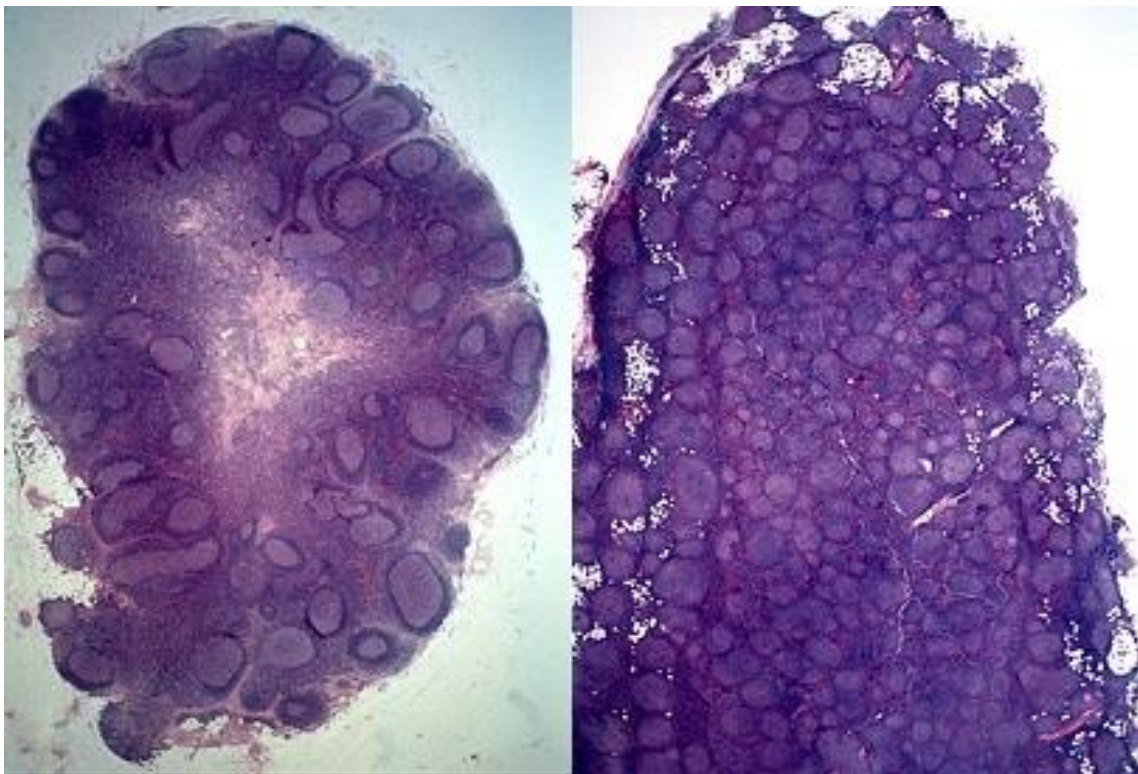
#### 1.2.3.1 Zellmorphologie

Histologisch zeigt das FL ein nodales Wachstumsmuster, welches das Keimzentrum des normalen lymphatischen Sekundärfollikels imitiert, wobei die interfollikulären Areale im Vergleich weniger Raum einnehmen. Wie auch in gesunden Lymphknoten befinden sich im neoplastischen Follikel T-Zellen und follikuläre dendritische Zellen. Die großen Sternhimmelmakrophagen, wie sie im Zentrum reaktiver Sekundärfollikel zu finden sind und die der Phagozytose apoptotischer B-Zell-Vorläufer dienen, lassen sich hier jedoch nicht nachweisen.<sup>84</sup> Im Follikelzentrum finden sich viele Zentrozyten und weniger Zentroblasten, die niedrigere Entwicklungsstufen der B-Zellen darstellen. Das am häufigsten angewandte Grading System, die WHO-Klassifikation, teilt das FL je nach Anteil der Zentroblasten in drei Grade ein, wobei ein höherer Grad eine gesteigerte Aggressivität des Tumors und eine schlechtere Prognose bedeutet.<sup>44</sup>

- Grad 1: 0-5 Zentroblasten pro High Power Field (hpf)
- Grad 2: 6-15 Zentroblasten pro hpf

- Grad 3: mehr als 16 Zentroblasten pro hpf  
 Typ 3a: Zentrozyten vorhanden  
 Typ 3b: ausschließlich Zentroblasten

Grad 1 und 2 werden zu den indolenten Lymphomen gezählt und aufgrund der geringen Unterschiede in der klinischen Manifestation und dem Ansprechen auf eine Therapie gleich behandelt. Aufgrund der klinischen Unterschiede wird Grad 3a oft ebenso zu den indolenten Lymphomen gezählt, wobei Grad 3b sowohl in der klinischen Symptomatik als auch auf molekularer Ebene dem aggressiveren diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom (DLBCL) ähnelt (siehe 1.2.3.2).<sup>12</sup>



**Abbildung 2:** Links ein gesunder Lymphknoten mit reaktiv vergrößerten Follikeln, rechts ein Follikuläres Lymphom.<sup>9</sup>

Große Areale mit hohem Blastenanteil und diffusem Wachstumsmuster gehen in FL mit einer schlechteren Prognose einher und deuten auf die histologische Transformation zum hoch malignen DLBCL hin.<sup>34</sup> Einige Studien konnten zeigen, dass eine früh begonnene Therapie und eine dieser folgende komplette Remission mit einem geringeren Transformationsrisiko verbunden sind.<sup>65</sup>

Ist das Knochenmark befallen, zeigt sich dies durch paratrabekuläre Ansammlungen von Lymphomzellen. Regelmäßig beobachtet man desweiteren eine leukämische Aussaat von wenigen, Zentrozyten-ähnlichen Zellen im peripheren Blut.

#### 1.2.3.2 Zellimmunologie und Zytogenetik

Die Immunphänotypisierung kann bei der Diagnose eines NHL hilfreich sein. So exprimieren nahezu alle Lymphomzellen Bcl-2 sowie bestimmte B-Zell-typische Antigene, sogenannte „cluster of differentiation“ (CD), wie CD19, CD20 und CD10. Typisch ist die Abwesenheit von CD5 und oft auch die von CD23 und CD11c.<sup>35</sup>

Wie bereits erwähnt, lässt sich in FL (mit Ausnahme der meisten kutanen Lymphome, der kindlichen FL und einiger systemischer Grad III FL) im Gegensatz zu Follikelkeimzentren Gesunder eine hohe Expression von Bcl-2 feststellen. In jedem Lymphom lässt sich auf zumindest einigen Zellen das Kernprotein Bcl-6 nachweisen.<sup>69</sup> Die korrespondierenden Veränderungen auf molekulargenetischer Ebene, wie die t(14;18)Translokation für das Bcl-2-Gen und die in ca 10% vorhandenen 3q27-Anomalien für Bcl-6, sind nicht spezifisch für das FL, wobei erstere für die Lymphomentstehung nötig ist. Je höher der histologische Grad, desto mehr Bcl-6-Veränderungen lassen sich nachweisen, was mit einem aggressiveren klinischen Verhalten assoziiert ist.<sup>27</sup> Bcl-6-Veränderungen werden häufig in DLBCL und in FL Grad 3b nachgewiesen. Genexpressionsanalysen haben gezeigt, dass sich ein tumorös veränderter und ein gesunder Lymphknoten in der Expression bestimmter Gene unterscheiden, was einen Ansatzpunkt für zukünftige Therapien liefern und zu einer besseren Einschätzung des klinischen Verhaltens und der Prognose führen könnte.<sup>76</sup>

#### 1.2.4 Diagnose und Differenzialdiagnose

Das FL kann aufgrund der charakteristischen Histologie allein mittels Lymphknotenbiopsie diagnostiziert werden.

Im Falle eines diffuseren Wachstumsmusters oder einer nur partiellen Beteiligung der Lymphknoten können oben erwähnte Methoden der Immunphenotypisierung

(meist mittels Durchflusszytometrie), Genanalyse mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und zytogenetische Verfahren zum Nachweis von Chromosomenaberrationen wie die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) helfen.

Die Histologie kann in verschiedenen Bereichen des entnommenen Lymphknotens sehr verschieden sein, somit ist eine gründliche Aufbereitung des gesamten Biopsats für das Grading und zur Feststellung der Diagnose wichtig, und auch, um die Transformation zu einem aggressiveren Subtyp auszuschließen.

### 1.2.5 Staging und Prognose

Die Prognose des FL ist sehr variabel. Die mediane Überlebenszeit vom Zeitpunkt der Diagnose an beträgt bei 8-10 Jahre<sup>48</sup>. Seit der Einführung monoklonaler Antikörper (mAK) ist die relative 5-Jahres-Überlebensrate für Non-Hodgkin Lymphome weltweit von 47% in den Jahren 1974-1976 auf bis zu 60% im Zeitraum 1995-2001 angestiegen.<sup>54</sup>

**Tabelle 1:** Die 4 Stadien der Ann-Arbor-Klassifikation<sup>16</sup>

|  |  |
|--|--|
| <b>Stage I</b>   | Befall einer einzigen Lymphknotenregion (I) oder eines einzigen extralymphatischen Organs (I E)  |
| <b>Stage II</b>  | Befall von zwei oder mehr Lymphknotenregionen oder lymphatischen Strukturen auf einer Seite des Zwerchfells allein (II) oder mit Beteiligung von angrenzenden extralymphatischen Strukturen (II E) |
| <b>Stage III</b>   | Befall von Lymphknotenstationen auf beiden Seiten des Zwerchfells (III), mit Beteiligung der Milz (III S) oder angrenzender extralymphatischer Strukturen (III E) oder beidem (III ES)             |
| <b>Stage IV</b>  | Diffuser oder disseminierter Befall einer oder mehrerer extralymphatischer Organe, mit oder ohne Lymphknotenbeteiligung  |
| Alle Stadien werden jeweils unterteilt in <b>A</b> und <b>B</b> , B bedeutet das Vorhandensein von B-Symptomen (Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust) |  |

Das Staging von FL Patienten erfolgt mittels der Ann-Arbor-Klassifikation für Hodgkin und Non-Hodgkin Lymphome (siehe Tabelle 1) und wird bei Erstdiagnose

vorgenommen. Die meisten Patienten mit FL werden aufgrund des oft lange indolenten Verlaufs erst in den späteren Stadien III und IV diagnostiziert.

Die beiden standardmäßig verwendeten prognostischen Parameter sind das Tumorgrading (wie näher beschrieben in 1.1.3.1) und der Follicular Lymphoma International Prognostic Index (FLIPI), der eine modifizierte Version des für aggressive Non-Hodgkin Lymphome verwendeten International Prognostic Index (IPI) darstellt. Er basiert auf 5 unabhängigen Risikofaktoren und erlaubt die Unterteilung in 3 prognostische Gruppen: Low-, intermediate- und high-risk (siehe Tabelle 2 und 3).<sup>83</sup>

**Tabelle 2:** 5 Parameter des FLIPI<sup>83</sup>

|   | <i>Nachteiliger prognostischer Faktor</i> |
|---|---|
| <b>Alter</b>                                      | ≥ 60 Jahre                                |
| <b>Ann-Arbor-Stage</b>                            | III / IV                                  |
| <b>Hämoglobin-Level</b>                           | < 120 g/L                                 |
| <b>Serum-LDH-Level</b>                            | > Normalwert                              |
| <b>Anzahl der befallenen Lymphknotenstationen</b> | > 4                                       |

Der FLIPI ermöglicht den Vergleich des Krankheitsverlaufs von Patienten verschiedener Studiengruppen und hat sich international als obligatorisches Mittel der Prognoseeinschätzung durchgesetzt.

Studien konnten zeigen, dass sich der FLIPI auch eignet, um in einem Kollektiv von bereits behandelten Patienten high-risk-Gruppen zu identifizieren.<sup>13</sup>

**Tabelle 3:** Einschätzung der Prognose für FL Patienten basierend auf dem FLIPI mittels Einteilung in 3 Risikogruppen (low, intermediate, high) nach Anzahl der Risikofaktoren. OS: overall survival<sup>83</sup>

| <i>Anzahl der Risikofaktoren</i> | <i>FLIPI-Score: Risikogruppen</i> | <i>Anteil der Patienten, %</i> | <i>OS in 5 Jahren, %</i> | <i>OS in 10 Jahren, %</i> |
|----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|--------------------------|---------------------------|
| <b>0 oder 1</b>                  | Low                               | 36                             | 91                       | 71                        |
| <b>2</b>                         | Intermediate                      | 37                             | 78                       | 51                        |
| <b>≥3</b>                        | High                              | 27                             | 53                       | 36                        |

### 1.3 Rolle des Immunsystems im folliculären Lymphom

Viele Studiengruppen haben in den letzten Jahren versucht, mittels verschiedenster Methoden die Ursachen für die von Patient zu Patient so unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich Verlauf, Therapieansprechen und Überleben zu ermitteln. Das Tumorgrading hat sich als nicht immer eindeutiger Prädiktor gezeigt, ebenso besteht diesbezüglich eine schlechte Reproduzierbarkeit zwischen den einzelnen Untersuchern, insbesondere was Grad 3 Tumoren angeht. Auch die Einstufung mittels des FLIPI stellt kein absolut akurates Mittel zur Einschätzung des Outcomes dar. Weitere Möglichkeiten zur Abschätzung der Prognose und des Ansprechens auf eine Therapie haben sich mit der Genanalyse aufgetan. Da diese Methode teuer und nicht überall verfügbar ist, bieten sich mit der PCR und der Immunhistochemie preiswertere Alternativen. Mit der zunehmenden Nutzung dieser Methodik wurde die Bedeutung der die Lymphomzellen umgebenden Bystanderzellen des Immunsystems immer deutlicher.

So konnten Dave et al. in einer 2004 publizierten Studie zwei Gen-Signaturen identifizieren, die sich unabhängig voneinander mit dem Überleben der FL-Patienten assoziieren lassen.<sup>24</sup> Diese Signaturen wurden bezeichnet als Immunantwort 1 und 2, wobei Immunantwort 1 mit einer guten Prognose vergesellschaftet war und Gene beinhaltete, die für T-Zell-Marker kodieren, und 2 durch Gene gekennzeichnet war, welche in Makrophagen exprimiert werden und sich mit einem weniger guten Outcome assoziieren ließen.

Glas et al. stellten den positiven Einfluss von bestimmten T-Zell-Subtypen und Bystanderzellen auf die Transformation und Prognose des FL heraus.<sup>37</sup>

Diese und weitere Erkenntnisse motivierten viele Wissenschaftler, sich vermehrt mit den im Microenvironment der biopsierten Tumoren vorhandenen Zellen auseinander zu setzen, um deren Einfluss auf das Überleben der Patienten zu ermitteln. Eine dazu geeignete Methode fand sich mit der Immunhistochemie, die es erlaubt, spezifische Antigene der Zellen sichtbar zu machen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das bessere Verständnis der Immunsignatur in FL ein vielversprechendes Mittel zur Einschätzung des klinischen Verlaufs und des Überlebens darstellt und die Entwicklung neuer gezielter Therapien ermöglicht.

## **1.4 Therapie des FL**

### **1.4.1 Therapieoptionen vor 2002**

Behandlungsbedürftige Patienten mit generalisiertem FL wurden vor der Einführung monoklonaler Antikörper (mAK) mit verschiedenen Chemotherapieregimen behandelt, deren Spektrum von Monosubstanzen (insbesondere Alkylanzien) über Kombinationstherapien bis hin zur Einbeziehung von Hochdosiskonzepten mit autologem Blutstammzellsupport reichte. Obgleich einige der Optionen die Remissionsdauer verlängern und das Überleben geringfügig verbessern konnten<sup>62, 75, 85</sup>, blieben häufige Rezidive die Regel und kein Regime konnte sich als Standard für das FL-Management durchsetzen. Das Ziel der Therapie konzentrierte sich daher vorrangig auf die Verminderung der Symptome und die Verbesserung der Lebensqualität.

### **1.4.2 Monoklonale Antikörper gegen CD20**

Die Entwicklung monoklonaler CD20-Antikörper stellt einen entscheidenden Schritt in der Therapie des FL dar. MAK sind nur gegen ein bestimmtes Epitop gerichtet und werden von einer auf einen einzigen B-Lymphozyten zurückgehenden Zelllinie (Zellklon) produziert. In vivo entstehen sie paraneoplastisch z.B. im Rahmen eines multiplen Myeloms, oder sie können synthetisch hergestellt werden. Bei Rituximab, welcher 1997 als erster Antikörper für die Behandlung von NHL von der U.S. Food and Drug Administration zugelassen wurde, handelt es sich um einen biotechnologisch hergestellten chimären mAK, dessen variabler Teil gegen das B-Zell-Antigen CD20 gerichtet ist.

Seit der Zulassung von Rituximab haben sich vielversprechende Resultate bei Patienten mit Rezidiven und in Phase-2-Studien erzielen lassen<sup>33, 43, 51</sup>, so dass Rituximab sich auch in der First-Line-Therapie etablieren konnte.<sup>22, 93</sup>

Viele Studiengruppen konnten nachweisen, dass Rituximab in Kombination mit konventioneller Chemotherapie der alleinigen Chemotherapie überlegen ist und dass das Therapieansprechen sowie das progressionsfreie Überleben erhöht werden konnten.<sup>45, 64, 78</sup> In der 2007 von Herold et al. veröffentlichten Studie sowie in einer 2008 von Marcus et al. publizierten Arbeit zeigte sich auch das Gesamtüberleben verlängert.<sup>45, 64</sup>

#### 1.4.2.1 Pharmakodynamische Eigenschaften

Bei Rituximab handelt es sich um einen murin/humanen chimären IgG(1)-kappa mAK, der auf das CD20-Antigen auf der Oberfläche normaler und maligner B-Zellen ausgerichtet ist. CD20 findet man auf Zellen früher B-Zell-Reihen bis hin zu weit differenzierten Formen, jedoch nicht auf Stammzellen und ausdifferenzierten Plasmazellen. Die genaue Funktion des Antigens ist nicht bekannt, möglicherweise spielt es eine Rolle in der Regulation der Kalziumkonzentration in der Zelle, indem es den Einstrom über die Membran und somit die Aktivierung der B-Zellen kontrolliert.

Der Effekt von Rituximab auf die CD20+-Zellen ist nicht vollständig verstanden, man nimmt jedoch an, dass Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC), Komplement-abhängige Zytotoxizität und direkte Apoptoseinduktion eine Rolle spielen.<sup>19</sup> Eine Downregulation des B-Zell-Rezeptors konnte nachgewiesen werden, desweiteren wird vermutet, dass Rituximab die Tumorzellen für die Wirkung konventioneller Chemotherapeutika sensibilisiert. Weitere zelluläre Faktoren scheinen das Ansprechen zu beeinflussen, so z.B. die Expression der Oberflächenmerkmale CD55 und CD59, welche den Grad der Komplement-vermittelten Toxizität regulieren.<sup>38, 39</sup>

Der therapeutische Effekt resultiert also aus einer kompletten Elimination kranker und auch gesunder B-Zellen, wonach eine neue Population gesunder Zellen heranreifen kann. Die initial bei Therapiebeginn in den meisten Patienten auftretende Lymphozytopenie dauert nur ca. 6 Monate an, nach 12 Monaten beobachtet man für gewöhnlich eine komplette Erholung der peripheren Zellen.<sup>70</sup>

#### 1.4.2.2 Therapeutischer Nutzen

In Europa ist Rituximab (MabThera®, Roche) als Monotherapeutikum für die Behandlung therapierefraktärer FL im Stadium III und IV sowie für die Behandlung von Rezidiven nach erfolgter Chemotherapie zugelassen, ebenso zur Monotherapie von Rezidiven und refraktären Lymphomen, welche zuvor noch nicht mit Rituximab behandelt worden sind. Desweiteren wird Rituximab nach erfolgreicher Induktionstherapie als Erhaltungstherapie verabreicht. In Kombination mit einer konventionellen Chemotherapie (z.B. CHOP, MCP, CVP) wird Rituximab zur Erstbehandlung von FL in den Stadien III-IV verabreicht.<sup>71</sup>

Ebenfalls wird Rituximab für die Behandlung des diffus großzelligen B-Zell-Lymphoms in Kombination mit CHOP als Erstlinien-Therapie eingesetzt, weitere Zulassungsgebiete sind die Behandlung der chronischen lymphatischen B-Zell-Leukämie (B-CLL) in Kombination mit einer Chemotherapie, die Rheumatoide Arthritis und die Wegenersche Granulomatose.<sup>5</sup>

#### 1.4.3 Aktuelle Behandlungsansätze bei FL

Patienten mit niedrigen Stadien werden im Allgemeinen einer kurativ intendierten Radiotherapie zugeführt, bei Patienten mit fortgeschrittenen Stadien und indolentem Verlauf verfolgt man meist eine „watch and wait“-Strategie.<sup>42</sup>

Das FL zeichnet sich durch eine hohe Strahlenempfindlichkeit aus, aufgrund der niedrigeren Toxizität wird häufig eine involved-field-Bestrahlung (kleinvolumige Radiotherapie der betroffenen LK und der dazugehörigen Gruppe) der extended-field- oder totalen Feldbestrahlung vorgezogen, wobei über die notwendige Größe des Bestrahlungsvolumens keine Einigkeit herrscht. Ziel ist es, das Lymphom in lokal begrenzten Stadien möglicherweise kurativ mit der Radiatio zu behandeln.

In fortgeschrittenen Stadien (III und IV) erhalten die Patienten im Falle der Therapiebedürftigkeit eine kombinierte Immuno-Chemotherapie mit dem CD20-Antikörper Rituximab. Hierbei kommen verschiedene Chemotherapieregime wie z.B. R-CHOP, R-CVP, R-MCP, R-FC oder R-Bendamustin zur Anwendung. In

Studien erhobene Daten deuteten darauf hin, dass eine früh begonnene Therapie zwar das progressionsfreie Überleben, jedoch nicht das Gesamtüberleben verlängert.<sup>95</sup> Bei geringer Progredienz trotz fortgeschrittenen Stadiums ist eine abwartende Haltung gerechtfertigt. Konsens ist, dass bei Auftreten von B-Symptomen, bei Symptomen aufgrund von Bulky-Disease oder durch Organbeteiligung sowie bei Progression die Therapie eingeleitet wird.<sup>71</sup>

Die Durchführung einer Hochdosischemotherapie mit anschließender allogener Stammzelltransplantation wird kontrovers diskutiert und zurzeit in Studien getestet. Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass diese Option zwar kurativ sein kann, jedoch durch eine hohe Mortalitätsrate behaftet ist.<sup>56, 88</sup> Sie wird angewandt in Fällen eines frühen Rezidivs bei initial schlechtem Ansprechen auf die Primärtherapie bei Patienten in gutem Allgemeinzustand.

Eine weitere Behandlungsoption stellt die autologe Stammzelltransplantation dar, welche eine geringere Mortalitätsrate aufweist, aber wahrscheinlich keine kurative Potenz besitzt. Als konsolidierende Therapie in der Primärbehandlung gelingt eine Verlängerung des PFS jedoch nicht des OS. Im Rezidiv zeigte eine randomisierte Studie aus der Vor-Rituximab-Ära einen OS Vorteil gegenüber einer konventionellen Rezidivtherapie.

In der Rezidivsituation besteht ebenfalls die Möglichkeit einer Radioimmunotherapie mit mAK, welche an Radioisotope (z.B. Yttrium) gekoppelt sind.<sup>21</sup>

## **1.5 Patienten und Daten**

Daten und Material dieser Doktorarbeit stammen von Patienten, die im Rahmen der 2007 im "Journal of Clinical Oncology" von Herold et al. unter dem Titel „Rituximab Added to First-Line Mitoxantrone, Chlorambucil, and Prednisolone Chemotherapy Followed by Interferon Maintenance Prolongs Survival in Patients With Advanced Follicular Lymphoma: An East German Study Group Hematology and Oncology Study“ veröffentlichten multizentrischen Studie der ostdeutschen Studiengruppe für Hämatologie und Onkologie untersucht worden waren.<sup>46</sup>

An der Studie waren 19 verschiedene deutsche Kliniken, unter anderem auch die Universitätsklinik Marburg, beteiligt. Ziel war es, festzustellen, ob und in welchem

Maße eine kombinierte Chemotherapie plus der Gabe von Rituximab einer alleinigen kombinierten Chemotherapie überlegen ist. Hierzu wurden insgesamt 353 Patienten mit bisher unbehandelten follikulären oder Mantelzelllymphomen im Stadium III oder IV in 2 Gruppen randomisiert, wobei eine Gruppe eine kombinierte Chemotherapie von acht 28-tägigen Zyklen mit Mitoxantron, Chlorambucil und Prednison (MCP) erhielt, die zweite Gruppe eine Therapie mit acht Zyklen MCP plus Rituximab. Alle Patienten, die eine komplette oder partielle Remission erreichten, erhielten eine Erhaltungstherapie mit Interferon bis zum Auftreten eines Rezidivs. Die mediane Nachbeobachtungszeit betrug 47 Monate (R-MCP: 49 Monate, MCP: 42 Monate).

Es konnte gezeigt werden, dass die Rate des Gesamtansprechens (overall-response-rate = ORR) wie auch die Rate der Komplettremissionen (CR) signifikant höher war in der R-MCP-Gruppe gegenüber der MCP-Gruppe (OR: 92% vs. 75%,  $p=0,0009$ , CR: 50% vs. 25%,  $p = 0,004$ ), wobei die Komplettremission die völlige Abwesenheit jeglicher Symptome über einen minimalen Zeitraum von vier Wochen bezeichnet, und die ORR die Anzahl der kompletten und der partiellen Remissionen beinhaltet. Desweiteren zeigte sich das progressionsfreie Überleben (progression-free-survival = PFS) wie auch das Gesamtüberleben (overall survival = OS) deutlich verlängert unter dem Zusatz von Rituximab (PFS: nicht erreicht vs. 28.8 Monate,  $p = 0.0001$ , OS: 4-Jahres-Rate 87% vs. 74%,  $p = 0.0096$ ).

## 1.6 Fragestellung

Der monoklonale Antikörper Rituximab ist ein initialer Bestandteil in jedem Behandlungsregime für FL, dennoch profitieren nicht alle Patienten gleichermaßen von der Therapie. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des Immunsystems der Patienten eine wichtige Rolle bezüglich des Therapie-Outcomes spielt. Unsere Hypothese war, dass Unterschiede in der Immunantwort und der Zusammensetzung des Microenvironments die Variabilität im Ansprechen auf die Antikörpertherapie bedingen.<sup>73</sup>

In dieser Arbeit haben wir den klinischen Verlauf von 20 Patienten mit folliculären Lymphomen aus der oben zitierten Studie von Herold et al beobachtet, wobei ein Teil der Patienten mit dem Chemotherapieregime MCP und der andere Teil mit MCP+Rituximab behandelt wurde.<sup>46</sup> Ziel war es, die Bedeutung des Vorhandenseins bestimmter Immunzellen in diesem Malignom genauer zu beleuchten und insbesondere den Zusammenhang zwischen dem Ansprechen auf den Antikörper Rituximab und der Anzahl im Malignom vorhandener Immunzellen zu untersuchen. Mithilfe von immunhistochemischen Färbungen von T-, natürlichen Killer (NK)- und dendritischen Zell- als auch Monozyten-spezifischen Oberflächenmerkmalen wie CD1a, CD3, CD5, CD8, CD10, CD20, CD56, CD68, S100 und ZAP-70, sowie dem intrazellulären Protein Ski, (deren Vorkommen und Funktion im nachfolgenden Methodenteil näher erklärt sind) wurden diese Immunzellen im jeweiligen Lymphknoten sichtbar gemacht und quantifiziert. Im Rahmen dieser Auswertungen sollte geprüft werden, ob eine hohe Anzahl von Bystanderzellen des Immunsystems das Outcome beeinflussen könnte. Des Weiteren wurde untersucht, ob der Ort der Zellinfiltration, also das Vorhandensein von Zellen innerhalb der neoplastischen Follikel versus der Infiltration der interfollikulären Zone, einen Unterschied bedeutet.

Folgende Fragen sollen beantwortet werden:

- Welchen prognostischen Einfluss haben Unterschiede in der Infiltration der Lymphome durch Bystanderzellen des Immunsystems?
- Welche Rolle spielt dabei Rituximab, und welche Konstellationen in den Bystanderzellpopulationen bewirken ein verbessertes Ansprechen auf das Medikament?
- Stellt die Quantifizierung bestimmter Immunzellen ein geeignetes Mittel dar, um die Prognose, bzw. das Therapieansprechen auf Rituximab abschätzen zu können?

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Patienten**

Für diese Arbeit lagen Gewebeproben von 38 Patienten mit Follikulärem NHL in den Stadien III und IV vor, die im Rahmen der Studie von Herold et. al.<sup>46</sup> gewonnen worden waren. So erhielten wir für 4 Patienten Daten und Material aus Greifswald, für 9 aus Erfurt und für 4 aus Potsdam, 3 Patienten stammten aus Marburg selbst. 18 weitere Blöcke stammten aus Kiel und Würzburg. Nach Ausschluss der Patienten mit Mantelzell-Lymphom und Ausschluss von 10 Proben aufgrund fehlerhafter Beschriftung und unklarer Zuordnung zum jeweiligen Patienten, lagen uns 20 Proben follikulärer Lymphome vor. Da es sich bei Zweien der vorhandenen Präparate um Knochenmarksausstriche handelte, entschlossen wir uns, diese aufgrund der mangelnden Vergleichbarkeit aus der Auswertung auszuschließen, so dass letztendlich 18 Patienten in die Auswertung einbezogen werden konnten.

Das Durchschnittsalter bei Erstdiagnose im Patientenkollektiv betrug 59,5 Jahre, wobei sich die Spanne von 38 bis 72 Jahren erstreckte. Der FLIPI-Score bei Ersterkrankung variierte von 1 bis 4, wobei der größte Anteil der Patienten einen FLIPI von 3 erhielt. Bei 9 Teilnehmern lag bei Erstdiagnose ein Stadium IV vor, bei 5 ein Stadium III, bei den übrigen lagen keine Daten diesbezüglich vor. Nach Therapie erreichten 10 Patienten eine Komplettremission, bei 7 trat eine partielle Remission ein, in einem Fall verlief das FL unter Therapie progredient.

Die 18 Patienten waren gleichmäßig auf 2 Kohorten (R-MCP und MCP) verteilt, auch bezüglich des Stadiums und des FLIPI-Scores bei Erstdiagnose bestand Vergleichbarkeit (siehe Tabelle 4):

**Tabelle 4:** Patientendaten, Unterteilung in Therapie-Arme (x = keine Angaben vorhanden)

| <i>Therapie-Arm</i> | <i>Patienten-ID</i> | <i>Stadium</i> | <i>Alter</i> | <i>Geschlecht</i> | <i>FLIPI</i> | <i>Ansprechen</i> | <i>PFS</i> | <i>OS</i> |
|---------------------|---------------------|----------------|--------------|-------------------|--------------|-------------------|------------|-----------|
| R-MCP               | 1                   | IV             | 63           | m                 | 2            | CR                | 106+       | 106+      |
|                     | 2                   | III            | 65           | m                 | 3            | CR                | 65+        | 65+       |
|                     | 3                   | III            | 38           | x                 | 2            | CR                | 76+        | 76+       |
|                     | 4                   | IV             | 68           | x                 | 4            | PR                | 50+        | 50+       |
|                     | 5                   | IV             | 59           | m                 | x            | PR                | 82         | 100+      |
|                     | 6                   | III            | 60           | x                 | 2            | PR                | 56+        | 56+       |
|                     | 7                   | x              | x            | w                 | 2            | CR                | 61         | 61        |
|                     | 8                   | IV             | 42           | w                 | 4            | PR                | 106+       | 106+      |
|                     | 9                   | IV             | 62           | w                 | x            | CR                | 35         | 83        |
| MCP                 | 10                  | x              | x            | w                 | 4            | CR                | 56         | 82        |
|                     | 11                  | IV             | 59           | x                 | 1            | PR                | 45         | 50+       |
|                     | 12                  | x              | x            | w                 | 3            | PR                | 67         | 73        |
|                     | 13                  | III            | 61           | w                 | x            | Progress          | 8          | 35        |
|                     | 14                  | III            | 56           | m                 | 2            | CR                | 19         | 24        |
|                     | 15                  | IV             | 52           | m                 | 3            | CR                | 56+        | 56+       |
|                     | 16                  | IV             | 72           | x                 | 3            | PR                | 88         | 88        |
|                     | 17                  | IV             | 52           | x                 | 4            | CR                | 48         | 60+       |
|                     | 18                  | x              | x            | w                 | 4            | CR                | 67         | 67        |

## 2.2 Präparate

Die verschiedenen Zentren, die an der Studie teilgenommen hatten, stellten uns das Material in Form von Paraffinblöcken bereit.

Um die Expression von spezifischen Oberflächenmerkmalen der Zellen darzustellen, wurden vom Institut für Pathologie in Marburg von jedem Präparat Schnitte angefertigt und mit jeweils einem von 12 verschiedenen Antikörpern immunhistochemisch gefärbt. Eine Übersicht über die verwendeten Antikörper und

Reagenzien liefert Tabelle 5. Insgesamt wurden in dieser Arbeit also 240 Schnitte ausgewertet.

**Tabelle 5:** Auflistung der verwendeten Antikörper

| <i>Antikörper</i> | <i>Klon</i>  | <i>Bezugsquelle</i>      | <i>Antigen-Gewinnung/Puffer</i> | <i>Verdünnung</i> |
|-------------------|--------------|--------------------------|---------------------------------|-------------------|
| <b>CD1a</b>       | O10          | Immunotech               | EDTA                            | 1:20              |
| <b>CD3</b>        | SP7          | Lab Vision               | EDTA                            | 1:300             |
| <b>CD5</b>        | NCL-CD5-4C7  | Novocastra               | EDTA                            | 1:50              |
| <b>CD8</b>        | C8-144B      | Dako                     | EDTA                            | 1:50              |
| <b>CD10</b>       | NCL-CD10-270 | Novocastra               | EDTA                            | 1:200             |
| <b>CD20</b>       | L26          | Dako                     | TRS 6.1                         | 1:600             |
| <b>CD56</b>       | 123C3        | Dako                     | EDTA                            | 1:10              |
| <b>CD68</b>       | PG-M1        | Dako                     | 0,1% Trypsin                    | 1:100             |
| <b>S100</b>       | polyklonal   | Dako                     | -                               | 1:2000            |
| <b>SKI</b>        | polyklonal   | Upstate                  | EDTA                            | 1:100             |
| <b>PLCγ</b>       | B-10         | Santa Cruz Biotechnology | EDTA                            | 1:1500            |
| <b>ZAP70</b>      | 2F3.2        | Upstate                  | EDTA                            | 1:4000            |

## 2.3 Immunhistochemie

Immunhistochemische Färbetechniken gestatten die optische Darstellung von Antigenen auf Zelloberflächen und in Zellen. Dies geschieht mittels sequentieller Anwendung eines spezifischen Antikörpers zum Antigen (primärer Antikörper), eines sekundären Antikörpers zum primären Antikörper und der Reaktion eines Enzymkomplexes mit einem chromogenen Substrat, jeweils getrennt durch dazwischenliegende Waschschriffe. Die Aktivierung des Chromogens durch den Enzymkomplex bewirkt die Sichtbarmachung des Reaktionsprodukts am Ort des Antigens. Das Präparat wird anschließend gegengefärbt und gedeckelt.

Die immunhistochemische Färbung der Paraffinschnitte erfolgte durch die Mitarbeiter des Instituts für Pathologie der Universitätsklinik Marburg und verlief für alle Antikörper nach folgendem Prinzip: Nach Entparaffinierung in absteigender Alkoholreihe wurden die Schnitte zur Freilegung der Bindungsstellen 30 Minuten im vorgeheizten Steamer mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Puffer inkubiert, anschließend mit Leitungswasser abgekühlt, mit Aqua dest abgespült und

in 1:10 verdünnten Waschpuffer gegeben. Für den Antikörper CD68 erfolgte die Inkubierung anstatt mittels EDTA-Puffer mit Trypsin und für CD20 mit TRS-6.1, die Färbung mit S100 erforderte keine Vorbehandlung (siehe Tabelle 5). Im Anschluss wurden die Präparate mit dem jeweiligen Antikörper im Autostainer (Firma Dako) behandelt, wobei die Konzentration und die Inkubationszeiten sich je nach verwendetem Reagenz unterschieden. Danach erfolgten die Gegenfärbung mit Hämalaun, die Entwässerung mittels aufsteigender Alkoholreihe und schließlich die Eindeckelung mit Xylol.

## 2.4 Oberflächenantigene und Zellmarker

Im Folgenden sollen das Vorkommen und die Funktion der in dieser Arbeit verwendeten Antigen-Marker (CD) erläutert werden.<sup>3, 4, 30, 96</sup>

CD1a: ist ein MHC-I-ähnliches Molekül, das auf Thymozyten exprimiert wird. Es ist nicht auf reifen T-Zellen im Blut ausgeprägt, aber wird intrazytoplasmatisch von aktivierten T-Zellen gebildet. Auf normalen B-Zellen findet es sich nicht, Isotypen werden allerdings von einigen B-Zell-Malignomen exprimiert. Hohe CD1a Level werden auf Langerhanszellen gefunden. CD1-Antigene werden außerdem von interdigitierenden dendritischen Zellen und Zytokin-aktivierten Monozyten ausgebildet.

Funktion: CD1a steht in Zusammenhang mit  $\beta$ 2-Mikroglobulin- und Non-Peptid-Antigenpräsentation. Evtl. spielt CD1a eine Rolle bei der Reifung von T-Zellen im Thymus. Das Vorhandensein auf aktivierten T-Zellen deutet auf die Beteiligung bei der Regulierung der T-Zell-Antwort hin.

CD3: wird von T-Zellen während der Reifung im Thymus exprimiert, ebenso auf reifen T-Zellen in der Peripherie. Etwa 75% der CD3-Zellen sind CD4+-T-Zellen, die übrigen sind CD8+-Zellen und nur eine geringe Anzahl sind CD4+8+-T-Zellen.<sup>73</sup>

Funktion: Antigenerkennung führt zu Signaltransduktion und anschließender T-Zell-Aktivierung über den T-Zell-Rezeptor-Komplex. CD3 gilt allgemein als der beste T-Zell-Marker.

CD5: wird auf T-Zellen und zu geringerem Maße auf B1-Zellen exprimiert. Funktion: CD5 schwächt Signale des B-Zell-Rezeptors ab, so dass starke Stimuli zur Aktivierung der B1-Zellen nötig werden. Das Antigen beeinflusst in T-Zellen die Signalkapazität des T-Zell-Rezeptors<sup>36</sup> und wird hochreguliert nach starker Aktivierung. Im Thymus besteht ein Zusammenhang zwischen CD5-Expression und Stärke der Interaktion von T-Zellen mit körpereigenen Proteinen.

CD5 wurde vor der Entwicklung monoklonaler Antikörper gegen CD3 zur T-Zell-Markierung verwendet.

In der B-CLL, dem Mantel-Zell-Lymphomen und in Kleinzelligen B-Zell Lymphomen kann CD5 nachgewiesen werden.

CD8: wird auf zytotoxischen T-Lymphozyten exprimiert.

Funktion: CD8 ist ein Co-Rezeptor für MHC-I.

CD10: wird exprimiert auf B- und T-Vorläufer-Zellen, B-Blasten, Keimzentrums-B-Lymphozyten, reifen Neutrophilen, auf einigen Granulozyten und Knochenmarkstromazellen. Des Weiteren kann es auf Epithelzellen der Niere und des Darms gefunden werden, auf einigen glatten Muskelzellen und Myoepithelien, Gehirn- und Fibroblastzellen. Funktion: CD10 reguliert B-Zell-Wachstum und -Proliferation durch die Hydrolyse kleiner Peptide mit proliferativen/antiproliferativen Effekten (insbesondere des Amyloid  $\beta$ ).

CD10 ist ein charakteristischer Marker für Zellen des Follikelzentrums und Follikulärer Lymphome, kann die Diagnose bestätigen<sup>94</sup> und seine Expression ist mit einem günstigen Outcome assoziiert.<sup>11</sup> Er wird genutzt als ein Marker für Prä B-Zell akuten lymphatischen Leukämie (ALL) und wird auch bezeichnet als **Common Acute Lymphoblastic Leukemia Antigen (CALLA)**.

- CD20: wird von reifen B-Zell-Linien ausgebildet. Die Expression tritt erstmals während der Prä-B-Zell-Entwicklung auf und endet mit der endgültigen Differenzierung zu Plasmazellen. Zu einem sehr geringen Grad wird CD20 auf T-Lymphozyten der peripheren Blutbahn exprimiert. CD20 ist nachweisbar in nahezu allen B-Zell-Lymphomen und ist der Angriffspunkt für den monoklonalen Antikörper Rituximab.  
Funktion: CD20-Bindung aktiviert Tyrosinkinase-abhängige Signalwege, die wahrscheinlich bei der B-Zell-Proliferation und der Differenzierung zu Plasmazellen eine Rolle spielen. Durch Regulierung des transmembranen  $Ca^{2+}$ -Stroms werden die B-Zell-Aktivierung und Proliferation gesteuert.
- CD56: wird auf natürlichen Killer-Zellen exprimiert.  
Funktion: Zelladhäsion durch Bindung von CD56-Molekülen anderer Zellen. Die genaue Funktion ist nicht geklärt, CD56 (auch NCAM = neural cell adhesion molecule) spielt eine Rolle bei der Entwicklung von Nervenzellen.
- CD68: wird intrazellulär in zytoplasmatischen Granula exprimiert, kann aber auch zu geringerem Anteil auf Zelloberflächen gefunden werden. CD68 wird gebildet auf Monozyten, Makrophagen, Dendritischen Zellen, Granulozyten, Mastzellen, myeloiden Vorläuferzellen und aktivierten T-Zellen, wobei es von ca. 40% der B-Zellen im peripheren Blut und in 50% aller B-ALL exprimiert wird.  
CD68 ist in der Immunhistochemie der wichtigste Marker für Makrophagen.  
Funktion: CD68 bindet an gewebe- und organspezifische Lektine und Selektine und ist ein Fresszellrezeptor, über den LDL gebunden und aufgenommen wird. Es ist ein Lysosomen-assoziiertes-Membran-Protein (LAMP) und Bindung bewirkt die Beseitigung von Zelltrümmern, Förderung der Migration und Aktivierung von Makrophagen und somit Phagozytose.

S100: ist gewöhnlich zu finden auf Nervenzellen, Melanozyten und Langerhanszellen der Haut, auf Chondrozyten, Adipozyten und Myoepithelien, sowie auf interdigitierenden Retikulumzellen in Lymphknoten.

Funktion: S100-Moleküle sind an vielen Vorgängen in der Zelle beteiligt, unter anderem an der Proteinphosphorylierung, Enzymaktivitäten, Zellwachstum und Differenzierung, sowie bei Entzündungsreaktionen.<sup>29</sup>

Verschiedene Typen von S100 dienen als Tumormarker für bestimmte Malignome, so z.B. S100A9 zur Früherkennung vom Prostatakarzinom.<sup>55</sup>

ZAP-70: (= Zeta-assoziiertes Protein) ist eine Tyrosinkinase, die intrazellulär in T- und NK-Zellen vorkommt, in B-Zellen dagegen normalerweise nicht exprimiert wird.

Funktion: ZAP-70 ist essentiell an der T-Zell-Signaltransduktion beteiligt und wirkt als Vermittler der T-Zell-Proliferation und -Differenzierung. Es wird als prognostischer Parameter bei der immunphänotypischen Untersuchung hauptsächlich der B-CLL eingesetzt.

PLC $\gamma$ : (= Phospholipase-C- $\gamma$ ) NK-Zellen

Funktion: PLC $\gamma$ 2 ist ein entscheidender Effektor bei der Signaltransduktion des B-Zell-Rezeptors und somit essentiell für die B-Zell-Entwicklung. In NK-Zellen ist die Expression von PLC $\gamma$ 2 unabdingbar für die zelluläre Toxizität.<sup>15</sup>

Ski: ist ein Protoonkoprotein im Zellkern und ist, wenn überexprimiert, mit Tumoren assoziiert.<sup>89</sup>

Funktion: Ski unterdrückt die Transkription von Genen für TGF-beta oder RAR-alpha, behindert somit wichtige Zellfunktionen wie die Zellproliferation und die Apoptoseinduktion und begünstigt so die Tumorentstehung.

## **2.5 Bilderfassung, -bearbeitung und -auswertung**

### **2.5.1 Mikroskop, Kamera, Computereinheit**

Mikroskopiert wurde mit einem Durchlichtmikroskop der Marke Leica DM/RB. Die Wandlung der Bilddaten vom Analogbild des Mikroskops zum digitalen Bild erfolgte mit einer aufmontierten CCD-Kamera der Firma Sony (Geräte-Nr.: CA 325-AP). Zur optimalen Bilddarstellung kamen eine Matrox Millennium G200 AGP Graphikkarte und ein Wacom Graphiktablett zum Einsatz. Als Graphiksoftware diente das Programm Image-Pro PLUS der Fa. Media Cybernetics (USA) in der Version 4.1.0.0. Programmiert wurde mit Visual Basic als Bestandteil der Image-Pro PLUS Software und mit der objektorientierten Programmiersprache Python 2.3. Kalibriert wurde mit Hilfe eines Objektmaßstabes für Durchlicht (2 mm in 200 Teilen).

### **2.5.2 Bilderfassung und -bearbeitung**

Die immunhistochemisch gefärbten Schnitte wurden an einem Mikroskop der Firma Leica, Deutschland, Model: DM RB mit dem Objektiv PI Apo 40x/0,75 untersucht. Das Mikroskop verfügt über ein Okular mit der Vergrößerung 10 mit der Zwischenvergrößerung (Z) 2, so dass die Gesamtvergrößerung also 800 betrug. Unter genauer Ausmessung nach Kalibrierung weisen die im Rahmen dieser Arbeit aufgenommenen Bilder eine exakte Fläche von 0,0608 mm<sup>2</sup> auf. Das Kamerabild entspricht nicht exakt der Größe des Mikroskopgesichtsfeldes, vielmehr bildet die Kamera circa 1/3 des Mikroskopgesichtsfeldes ab. Von jedem Lymphknotenpräparat wurden 4 Bildausschnitte abgelichtet, wobei 2 Aufnahmen von Ausschnitten aus dem Follikelzentrum des Lymphknotens und 2 aus der interfollikulären Zone erfolgten.

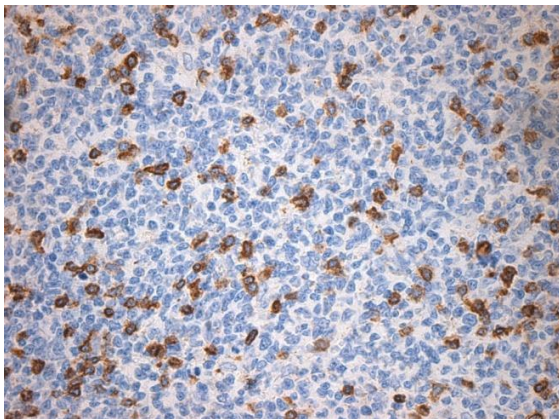
Das Aussuchen der jeweiligen Ausschnitte erfolgte durch den Untersucher unter Berücksichtigung folgender Kriterien:

- Vermeidung überfärbter Areale
- Vermeidung von offensichtlichen Artefakten
- Vermeidung des Mitablichtens angrenzender andersartiger Gewebe

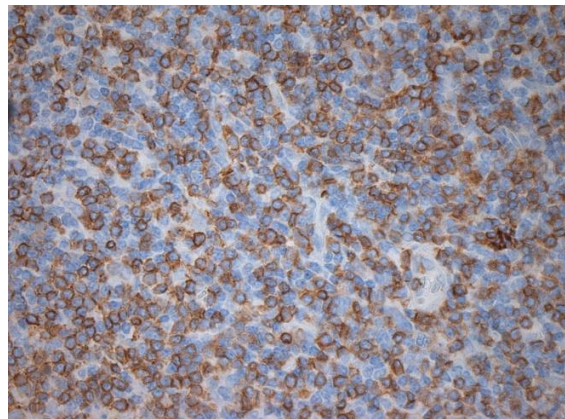
Jedes Bild wurde mit einer Belichtungszeit von 96,1 msek, einer Verstärkung von 1x und einer Farbsättigungseinstellung von 1,5x abgespeichert, anschließend erfolgte ein Weißabgleich. Somit bestand für die verschiedenen Färbungen eine einheitliche Aufnahme- und Nachbearbeitungsmethode, so dass für die spätere Auswertung eine gute Vergleichbarkeit gewährleistet war.

### 2.5.3 Bildinterpretation

Ziel der Bildauswertung war es, für jedes Kamerabild die Zahl der immunhistochemisch angefärbten Zellen pro Kamerabildfläche zu erheben. Je nach Antikörper stellten sich die markierten Zellen unterschiedlich dar. Bei den Antigenen CD1a, CD3, CD5, CD10, CD20, CD56, CD68, PLC $\gamma$ , Ski und ZAP70 handelt es sich um Membranproteine, so dass der Antikörper die Zellwand sichtbar macht. S100 als intrazelluläres Protein markiert das Zytoplasma. Durch die in Kapitel 2.2 beschriebene Behandlung der Schnitte zeigen sich die vom Antikörper markierten (positiven) Zellareale braun und durch die Gegenfärbung die nicht markierten (negativen) Zellen/Zellbestandteile blau.



**Abbildung 3:** CD3-Färbung Follikelzentrum



**Abbildung 4:** CD3-Färbung extrafollikulär

#### 2.5.3.1 Automatische Zählung

Zunächst erfolgte nach Aufnahme der Bilder die Bildbearbeitung mit dem Image-ProPlus® Programm.

Mit den Funktionen „best fit“ und den unter „spatial“ aufgelisteten Einstellungen „color channel“ und „brightness“ war es möglich, den Kontrast so zu erhöhen,

dass sich hauptsächlich die vom Antikörper gefärbten Zellen darstellten und die das Antigen nicht exprimierenden Zellen blasser in den Hintergrund traten. Unter der Funktion „filters“ und den Unterfunktionen „median“, „lo pass“, „erode“ und „flatten“ war es möglich, die aufgrund der Zellmembrananfärbung hauptsächlich im Randbereich gefärbte Zelle weichzuzeichnen, und so den Eindruck eines flächigen kleinen Kreises zu erzielen. Nach Eingabe des Befehls „auto-split“ nach Festlegung der als eine Zelle anzuerkennenden Fläche (hier Fläche eines Lymphozyten = 0,0079 mm<sup>2</sup>) konnten die so modifizierten Aufnahmen nun vom Programm automatisch ausgezählt werden.

Diese Bearbeitung ergab sehr akurate Ergebnisse für Antigene mit eher niedriger Ausprägung wie z.B. CD3, da sich hier die positiven Zellen klarer abgrenzbar zeigten. Bei hoher Antigenausprägung oder auch bei z.T. aufgetretener Überfärbung der Bilder war die automatische Zellzählung weniger geeignet.

#### 2.5.3.2 Manuelle Zählung

Aufgrund der hohen Fehlerquote der automatischen Zellzählung bei einigen Antigenen aufgrund der hohen Expressionrate, entschieden wir uns zu einem Abgleich und gleichzeitiger Kontrolle durch manuelle Auszählung. So konnten durch die Verwendung des Programms aufgetretene Fehler wie z.B. positive Anfärbung von Blutgefäßen oder auch Färbeartefakte erkannt und ausgeschlossen werden. Schließlich erhielten wir pro Antigen zwei Werte für die intrafollikuläre und die extrafollikuläre Zellzahl, aus denen jeweils ein Mittelwert gebildet wurde.

## 2.6 Statistische Analysen

Die statistische Beratung erfolgte durch Herrn Prof. Dr. Konstantin Strauch und Herrn Tilman Görg im Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie der Philipps-Universität Marburg.

Zur statistischen Auswertung und graphischen Darstellung diente das Programm GraphPad Prism 5 for Windows von © 1992-2007 GraphPad Software, Inc..

Im Rahmen der deskriptiven Auswertung wurde zunächst die Expression der jeweiligen Oberflächenantigene graphisch dargestellt, wobei als Parameter für den Therapieerfolg die Überlebenszeit bis zum Progress/Tod durch FL in Monaten, kurz PFS für „progression free survival“, gewählt wurde.

Im nächsten Schritt erfolgte die Erstellung von Überlebenskurven nach der Kaplan-Meyer-Methode jeweils bezogen auf die Zeitspanne bis zum Progress. Diese statistische Methode ermöglichte die Analyse des Einflusses der zu analysierenden Faktoren auf das Überleben sowie den Vergleich der Überlebenskurven mittels des Log-Rank-Tests (auch Mantel-Cox-Test). Der Log-rank-Test ist ein statistischer Test zum Vergleich der Überlebenszeiten zweier unverbundener Stichproben. Die Teststatistik des Tests folgt näherungsweise einer Chi-Quadrat-Verteilung.

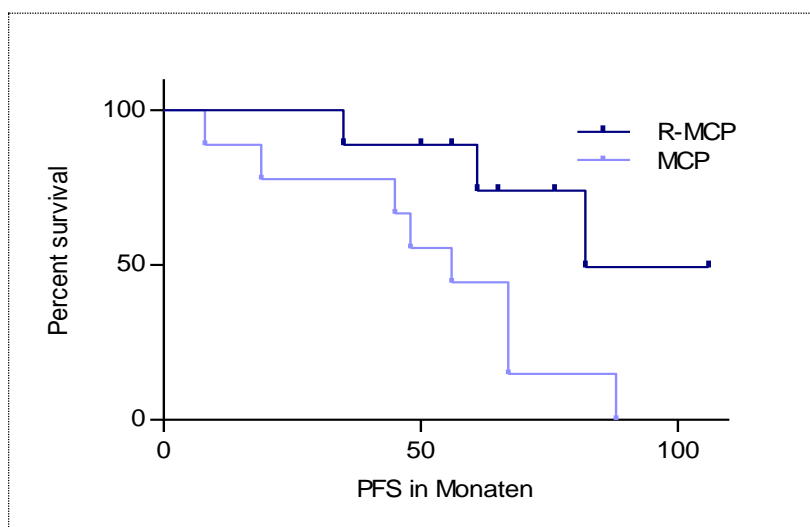
Als Einflussfaktor auf das Überleben sollte hier die Höhe der Antigenexpression ermittelt werden. Bei variierender Ausprägung wurde der Median der Anzahl der das jeweilige Antigen-exprimierenden Zellen zur Unterteilung in zwei Gruppen verwendet: Eine Gruppe mit hohem Expressionsmuster gegenüber einer zweiten mit niedrigem Expressionsmuster. Die Einteilung in die Gruppen unterschied sich für die jeweiligen Oberflächenmarker, so dass nicht zwangsläufig immer die gleichen Patienten der ersten bzw. der zweiten Gruppe zugeordnet waren. Einigen Probanden zeigten keine Ausprägung bestimmter Antigene, wie z.B. im Falle des CD56, so dass hier nicht der Median zur Unterteilung der Gruppen diente, sondern lediglich zwischen vorhandener und nicht vorhandener Expression unterschieden wurde.

In einem weiteren Schritt wurde versucht, den Einfluss von Rituximab auf das progressionsfreie Überleben getrennt für die hohe und die niedrige Expressionsform abzubilden und statistisch auszuwerten. Auch hier wurden Kaplan-Meyer Kurven erstellt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Progressionsfreies Überleben

Die progressionsfreie Überlebenszeit (PFS), definiert als Zeitspanne vom Zeitpunkt des Studieneinschlusses bis zum Ereigniseintritt (Progress oder Tod durch das folliculäre Lymphom), erstreckte sich im beobachteten Patientenkollektiv von 8 Monaten bis zu 106 Monaten. Bei 11 Probanden trat im Beobachtungszeitraum ein Ereignis ein, bei den 7 Verbleibenden hielt die Remission über den Beobachtungszeitraum hinaus an. Das mediane progressionsfreie Überleben der 18 beobachteten Patienten betrug hier für beide Gruppen zusammen 56 Monate, wobei der Median für die R-MCP-Kohorte 61 Monate und der für die MCP-Kohorte 52 Monate betrug. Somit zeigte sich im Vergleich der Überlebenskurven auch in diesem Kollektiv das R-MCP-Regime signifikant überlegen ( $p=0,0273$ ). Das Hazard Ratio betrug hier 0,2490 (95% KI: 0.07249 - 0.8556).



**Abbildung 5:** Progressionsfreie Überlebenszeit der Therapiegruppen im Vergleich ( $p=0,018$ )

Trotz geringer Fallzahl lässt sich im beobachteten Kollektiv also das R-MCP-Regime als signifikant überlegen darstellen, was für die Repräsentativität der Stichprobe spricht.

### 3.2 Ausprägung der Oberflächenantigene

Die Höhe der Expression der jeweiligen Antigene variiert deutlich. So findet sich im Follikelzentrum der Patienten mit FL neben der hohen Ausprägung vom B-Zell-Marker CD20 (durchschnittlich 801,8 CD20 positive Zellen pro Bildfläche) meist eine hohe Zahl von CD10 (356,9), CD5 (397), CD3 (346,4) und PLC (860,8).

Mäßig hohes Vorkommen zeigen ZAP70 (167,8), ski (70,9), CD68 (35,8) und CD8 (44,8). CD56 wird von deutlich weniger Zellen ausgeprägt (8,5), ebenso S100 (2,9) und CD1a (1,8).

Im Folgenden soll jeweils für die Antigene getrennt im Punktdiagramm die entsprechende Ausprägung bezogen auf das PFS dargestellt werden, sowie die Kaplan-Meyer-Kurve des PFS zum Vergleich der beiden Gruppen beschrieben werden, der Gruppe mit hoher Expression versus der Gruppe mit niedriger Expression der Oberflächenmarker. Des Weiteren sollen die beiden Therapieregime innerhalb der Gruppe mit hoher bzw. niedriger Expression verglichen werden. Alle Auswertungen erfolgten jeweils separat für die Follikelzone und den Extrafollikulärraum.

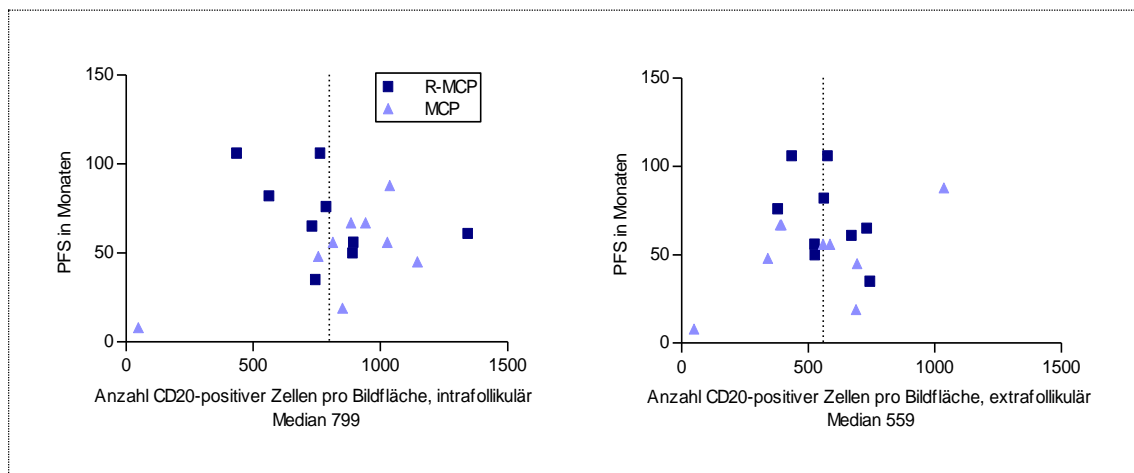
Tabelle 6 zeigt eine Musterzusammenfassung derjenigen Antigene, deren Ausprägungsgrad mit einem signifikanten Unterschied im Überleben einhergeht.

**Tabelle 6:** Musterzusammenstellung der signifikanten Ergebnisse

| <b><i>R-MCP gegenüber MCP überlegen (PFS signifikant verlängert) bei</i></b> |  |   |
|--|--|---|
|  | <b>intrafollikulär</b>                                 | <b>extrafollikulär</b>                              |
| <b>hoher Expression von</b>  | CD68 (p=0,0419)  | CD5 (p=0,0399)<br>CD56 (p=0,0266)<br>Ski (p=0,0483) |
| <b>niedriger Expression von</b>  | CD3 (p=0,0221)<br>CD8 (p=0,0500)<br>ZAP 70 (p= 0,0401) | CD20 (p=0,0328)                                     |

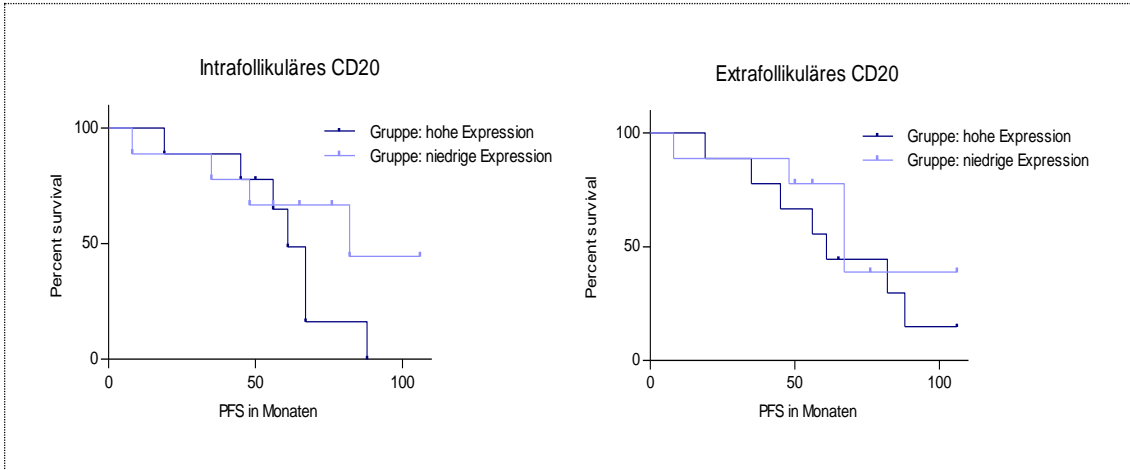
### 3.2.1 CD20

Zunächst soll also aufgrund seiner hohen Ausprägung auf reifen B-Zellen und aufgrund seiner Funktion als Angriffspunkt für Rituximab der CD20 analysiert werden. Die mediane Antigen-Ausprägung im Follikelzentrum liegt hier bei 799 Zellen. Außerhalb der Follikel findet sich erwartungsgemäß eine etwas niedrigere CD20-Expression, der Median liegt hier bei 559 positiven Zellen.



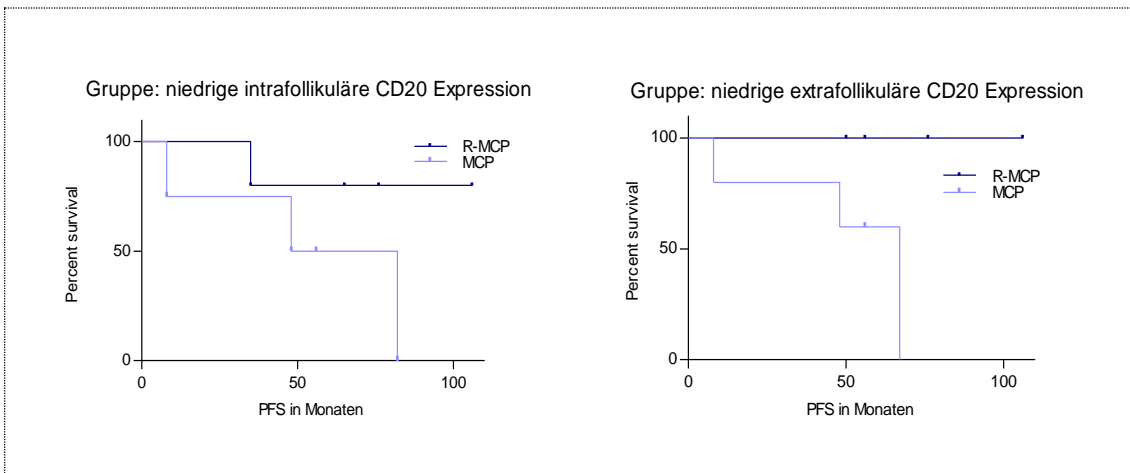
**Abbildung 6:** Expression von CD20 in Zusammenhang mit dem progressionsfreien Überleben

Bei Betrachtung der Überlebenskurven (siehe Abbildung 7) fällt auf, dass diese sich im Verlauf kreuzen, es liegt also kein proportionaler Hazard vor (intrafollikulär: Hazard Ratio = 2,227 mit einem 95% KI: 0.6547 - 7.577, extrafollikulär: Hazard Ratio = 1,628 mit einem 95% KI: 0.4779 - 5.544). Die graphische Darstellung (siehe Abbildung 7) zeigt zwar eine zum Ende des Beobachtungszeitraumes langsamer absteigende Kurve für die Gruppe mit hoher CD20-Expression, der Log-rank Test liefert jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den Expressionmustern ( $p=0,1998$ ). Auch für eine hohe Anzahl von CD20-Zellen außerhalb der Follikel lässt sich kein Überlebensvorteil nachweisen ( $p=0,4350$ ).



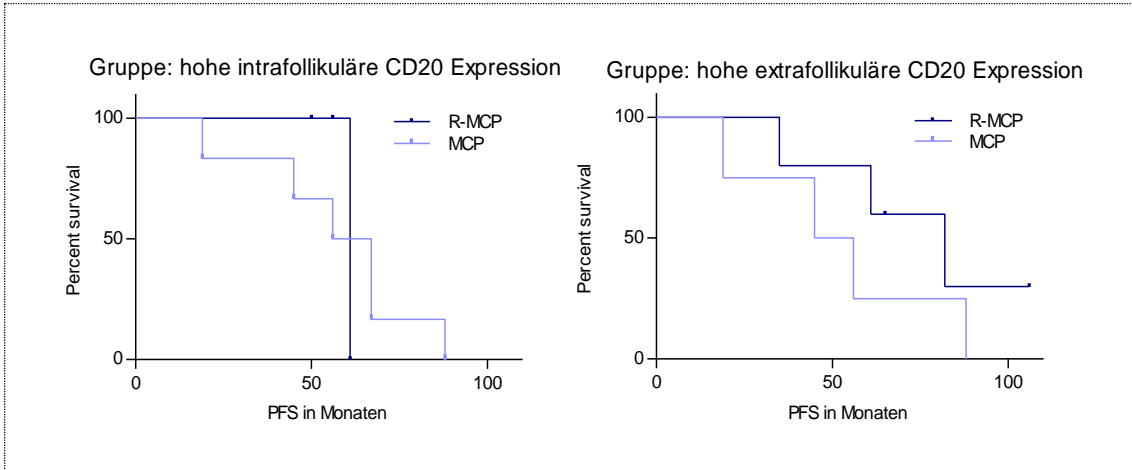
**Abbildung 7:** Progressionsfreie Überlebenszeit der Gruppen mit hohem und niedrigem CD20 im Vergleich (intrafollikulär  $p=0,1998$ , extrafollikulär  $p=0,4350$ )

Betrachtet man im Weiteren jedoch die beiden Therapiegruppen getrennt (siehe Abbildung 8), fällt auf, dass besonders in der Gruppe mit niedriger CD20-Ausprägung die mit dem Rituximab-Regime behandelten Patienten ein höheres PFS aufweisen. Für die intrafollikuläre CD20-Expression zeigt sich kein signifikanter Unterschied ( $p=0,1452$ ), wobei sich für die extrafollikuläre Expression eine signifikante Differenz im PFS ergibt ( $p=0,0328$ , Hazard-Ratio 0,09613, 95% KI: 0.01119 - 0.8262).



**Abbildung 8:** Vergleich der Therapieregime innerhalb der Gruppen mit niedriger CD20-Zellzahl (intrafollikulär  $p=0,1452$ , extrafollikulär  $p=0,0328$ )

In der Gruppe mit hoher CD20-Expression zeigt sich kein Unterschied zwischen den Therapieregimen (intrafollikulär  $p=0,7540$ ; extrafollikulär  $p=0,2705$ , siehe Abbildung 9).

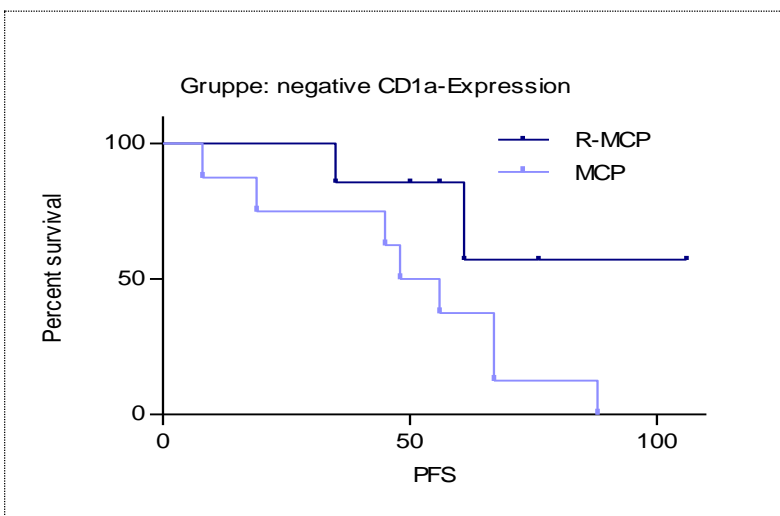


**Abbildung 9:** Vergleich der Therapieregime innerhalb der Gruppen mit hoher CD20-Zellzahl (intrafollikulär  $p=0,7540$ , extrafollikulär  $p=0,2705$ )

### 3.2.2 CD1a

Im Falle dieses Antigens wurde nicht der Median zur Unterteilung der Gruppen gewählt, sondern lediglich zwischen Vorhandensein und Abwesenheit CD1a-exprimierender Zellen unterschieden, da sich in 15 von 18 Fällen innerhalb der Follikel keine Expression fand. Hier ließ sich, auch aufgrund der ungleichen Verteilung, kein Unterschied der beiden Gruppen feststellen (intrafollikuläre Expression  $p=0,1703$ ; extrafollikulär  $p=0,6553$ ). Das relative Risiko beträgt 0,3780 mit einem 95%-KI von 0.09411 - 1.518.

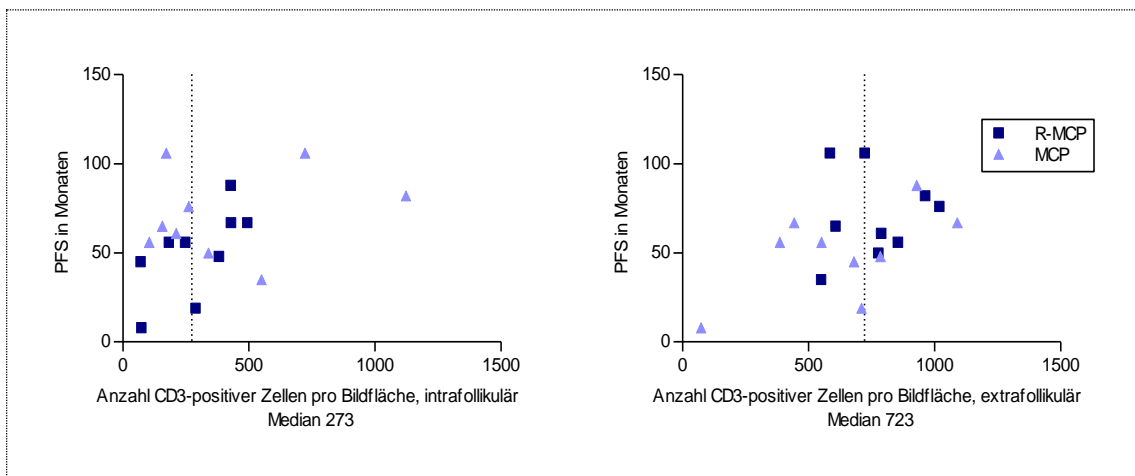
Innerhalb der Gruppe mit negativer intrafollikulärer Expression zeigt sich ein verlängertes Überleben der mit Rituximab behandelten Patienten ( $p=0,0581$ ).



**Abbildung 10:** Vergleich der Therapieregime innerhalb der Gruppe mit negativer intrafollikulärer CD1a-Expression ( $p=0,0581$ ).

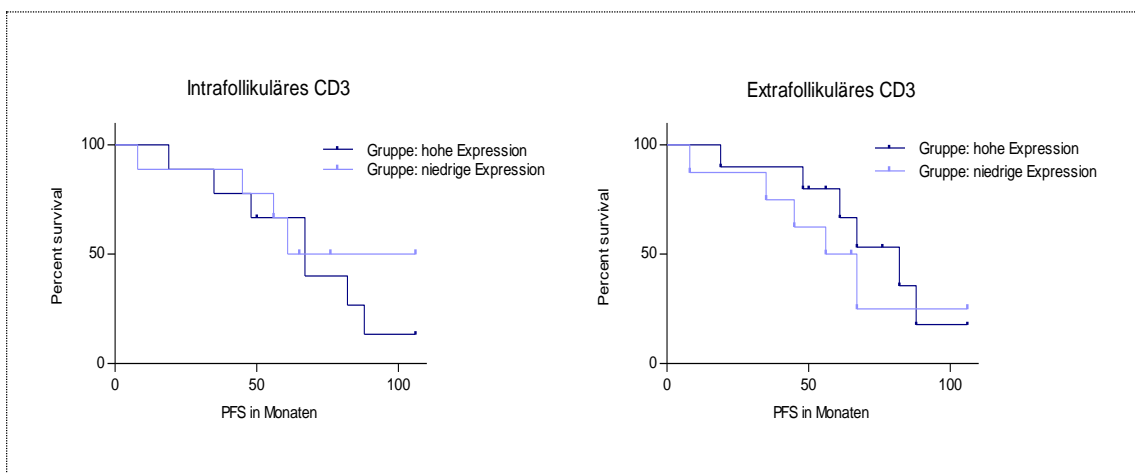
### 3.2.3 CD3

Die mediane Ausprägung des CD3 beträgt hier intrafollikulär 274 positive Zellen, wobei jeweils in 9 Patienten eine hohe bzw. eine niedrige Expression festgestellt wurde. Außerhalb der Follikel liegt der Median bei 723 positiven Zellen, 8 Patienten zeigten hiervon eine niedrige, 10 eine hohe Ausprägung. In den beiden Gruppen waren die beiden Therapieregime annähernd gleich verteilt (siehe Abbildung 11).



**Abbildung 11:** Anzahl der CD3-positiven Zellen in Zusammenhang mit dem PFS

Betrachtet man die intrafollikuläre Ausprägung von CD3 (Abbildung 12), so zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen hoher und niedriger Expression ( $p=0,6634$ ).

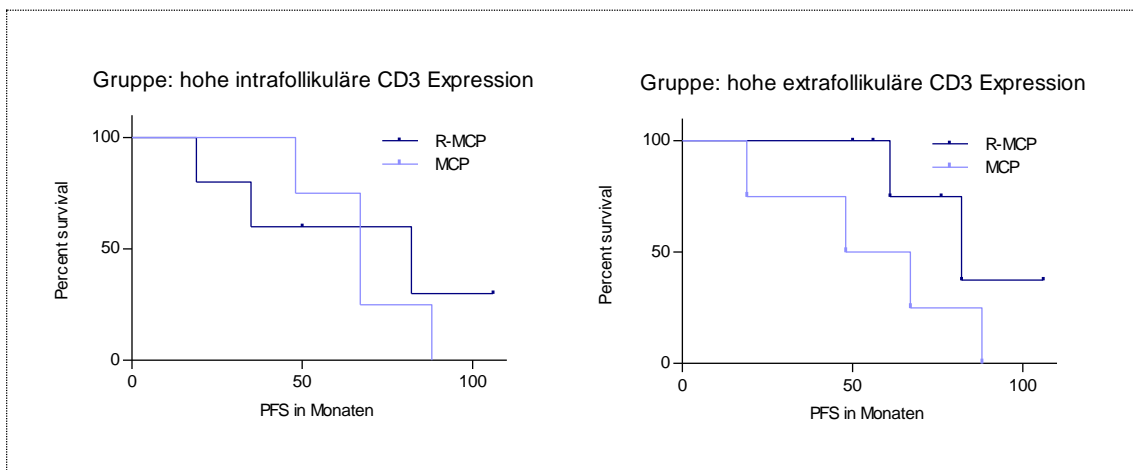


**Abbildung 12:** Vergleich des PFS für die Gruppen mit hoher und niedriger Anzahl CD3-positiver Zellen (intrafollikulär  $p=0,6634$ , extrafollikulär  $p=0,5020$ )

Sieht man sich die extrafollikuläre Expression an, so beträgt das mediane PFS von Patienten mit hoher Anzahl CD3-positiver T-Zellen 82 Monate gegenüber 61,5 Monate PFS der Patienten mit niedriger Ausprägung. Der Unterschied der Überlebenskurven ist jedoch auch hier nicht signifikant ( $p=0,5020$ , Hazard-ratio 0,6495, 95% KI 0.1842 - 2.290).

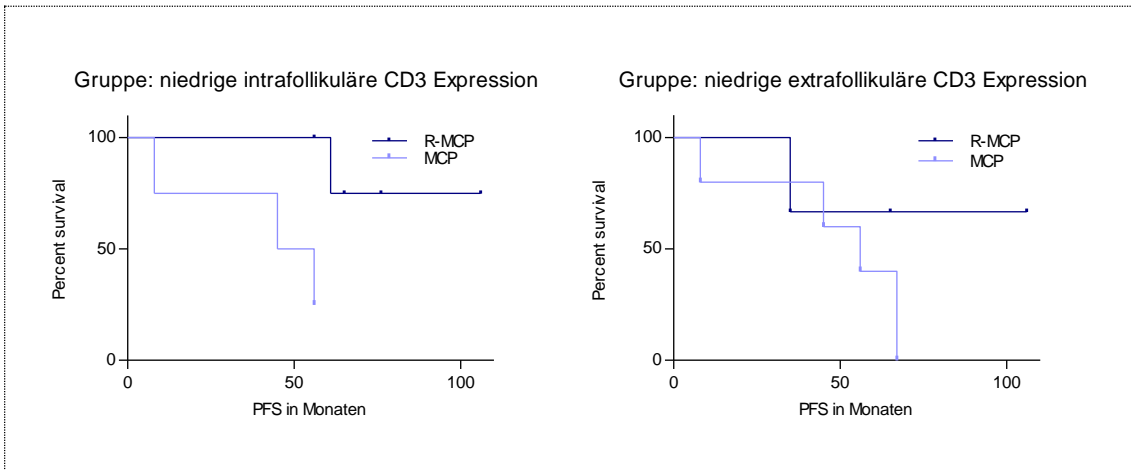
Im Vergleich der Therapieregime (Abbildung 13) ließ sich in der Gruppe mit hohem intrafollikulären Expressionsmuster keine signifikante Überlegenheit der R-MCP-Therapie feststellen ( $p=0,7194$ ). Die Hazard-Ratio beträgt 0,7510 und zeigt somit keinen Unterschied der beiden Gruppen.

Extrafollikulär ergibt sich für die Gruppe mit hoher CD3-Expression ein medianes Überleben von 82 Monaten in der R-MCP Gruppe vs. 57,5 Monaten für die MCP Gruppe. Der Vergleich der Überlebenskurven zeigt jedoch keine signifikante Differenz ( $p=0,1503$ , Hazard-Ratio 0,2961, 95% KI 0.05638 - 1.555).



**Abbildung 13:** Vergleich der Therapieregime innerhalb der Gruppen mit hoher Anzahl CD3-positiver Zellen (intrafollikulär  $p=0,7194$ , extrafollikulär  $p=0,1503$ )

Zu beachten ist bezogen auf das CD3 jedoch die Gruppe mit niedrigem Expressionsmuster (siehe Abbildung 14): Patienten mit niedriger Anzahl intrafollikulärer CD3-positiver Zellen scheinen von der Rituximab-Therapie signifikant zu profitieren. Im Vergleich der Überlebenskurven zeigt sich hier ein deutlich verlängertes PFS ( $p=0,0221$ , Hazard-Ratio 0,06300, 95%KI 0.005903 - 0.6722). In der Gruppe mit niedriger extrafollikulärer CD3-Zellzahl zeigt sich dieser Unterschied nicht.

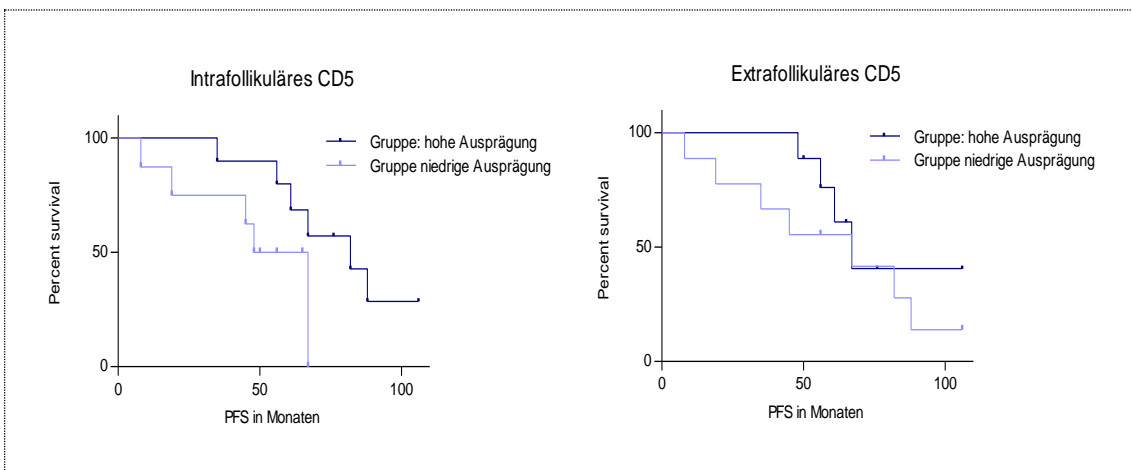


**Abbildung 14:** Vergleich der Therapie-Schemata in der Gruppe mit niedriger CD3-Expression (intrafollikulär  $p=0,0221$ , extrafollikulär  $p=0,3421$ )

### 3.2.4 CD5

Die mediane CD5-Expression beträgt intrafollikulär 353 und extrafollikulär 894 Zellen.

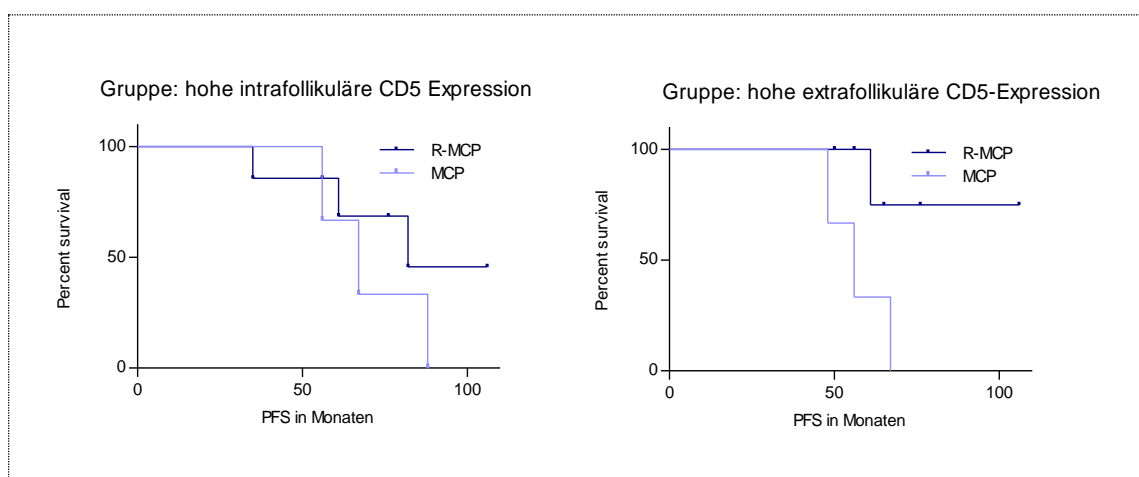
Im Vergleich der Kaplan-Meyer-Kurven für die beiden Expressions-Gruppen (siehe Abbildung 15) zeigt sich ein längeres medianes PFS für die Gruppe mit hohem intrafollikulären Ausprägungsmuster (82 vs. 57,5 Monate), wenngleich hier keine Signifikanz vorliegt ( $p=0,0891$ , Hazard-Ratio 0,2774 mit einem 95%-KI von 0.06324 - 1.217).



**Abbildung 15:** Vergleich des PFS für die Gruppen mit hoher und niedriger Anzahl CD5-positiver Zellen (intrafollikulär  $p=0,0891$ , extrafollikulär  $p=0,3733$ )

Betrachtet man die extrafollikuläre Zellzahl, so ergibt sich kein Unterschied der beiden Expressions-Gruppen (medianes PFS beträgt 67 Monate in beiden Gruppen,  $p=0,3733$ ).

Bei getrennter Analyse der Expressions-Gruppen ergibt sich für die Gruppe mit hoher intrafollikulärer Ausprägung keine signifikante Differenz der Therapie-Regime in Bezug auf das PFS (Gruppe hohe CD5-Zellzahl:  $p=0,3012$ , siehe Abbildung 16). Zu bemerken ist, dass hier wie auch schon bei den CD3-positiven Zellen beobachtet, die Patienten mit hoher extrafollikulärer Expression in der R-MCP Gruppe ein höheres PFS erreichen. Hier zeigt sich ein signifikanter Unterschied ( $p=0,0399$ , Hazard-ratio 0,1018, 95%KI 0.01151 - 0.9000).



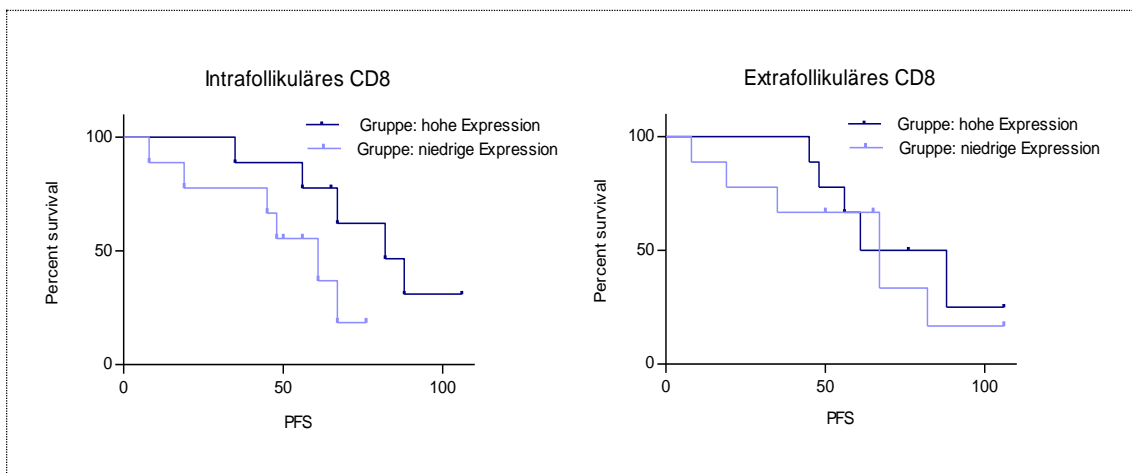
**Abbildung 16:** Vergleich der Therapie-Schemata in der Gruppe mit hoher intra- bzw. extrafollikulärer CD5-Expression (intrafollikulär  $p=0,3012$ , extrafollikulär  $p=0,0399$ )

In der Gruppe mit niedriger Expression von CD5 lässt sich weder intra- noch extrafollikulär ein Überlebensvorteil der Therapieschemata nachweisen (intrafollikulär:  $p=0,1696$ ; extrafollikulär  $p=0,3755$ ).

### 3.2.5 CD8

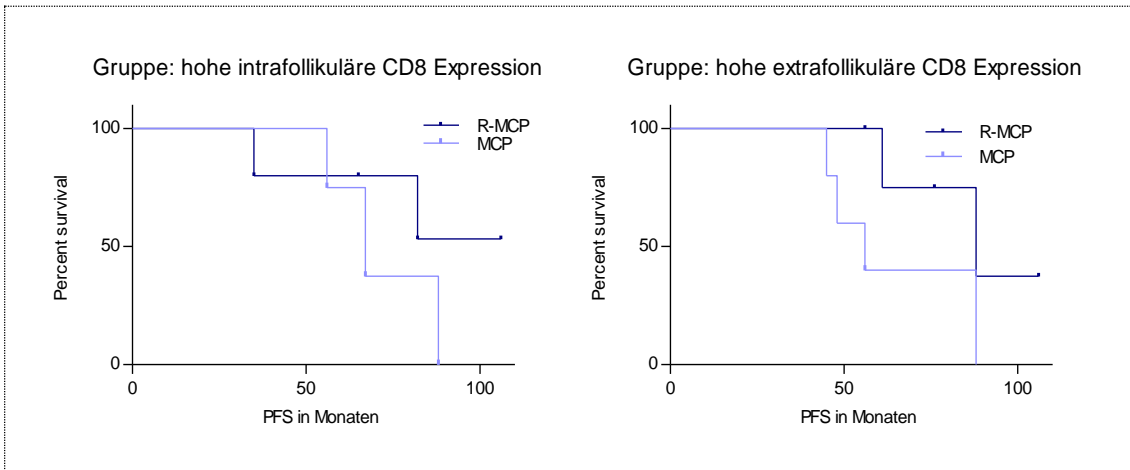
Die mediane Ausprägung für das Oberflächenantigen CD8 beträgt hier intrafollikulär 27 positive Zellen bei einem sehr heterogenen Ausprägungsgrad von nur einer bis zu 145 positiven Zellen pro Bildfläche. Die extrafollikuläre CD8-Zellzahl liegt mit 189 Zellen deutlich höher. Den Expressionsgruppen konnten jeweils 9 Patienten zugeteilt werden.

Das mediane PFS unterscheidet sich hier deutlich und beträgt in der Gruppe mit hoher intrafollikulärer Expression 82 Monate, in der Gruppe mit niedriger Ausprägung 61 Monate (95%-KI von 1.039 - 1.649). Der Vergleich der Überlebenskurven (siehe Abbildung 17) für die intrafollikuläre Ausprägung zeigt jedoch kein signifikant verlängertes PFS für die Gruppe mit hoher CD8-Zellzahl ( $p=0,0839$ ). Für die extrafollikuläre Zone ergibt sich im Vergleich der Kaplan-Meyer-Kurven kein Unterschied im PFS der beiden Gruppen ( $p=0,6133$ ).



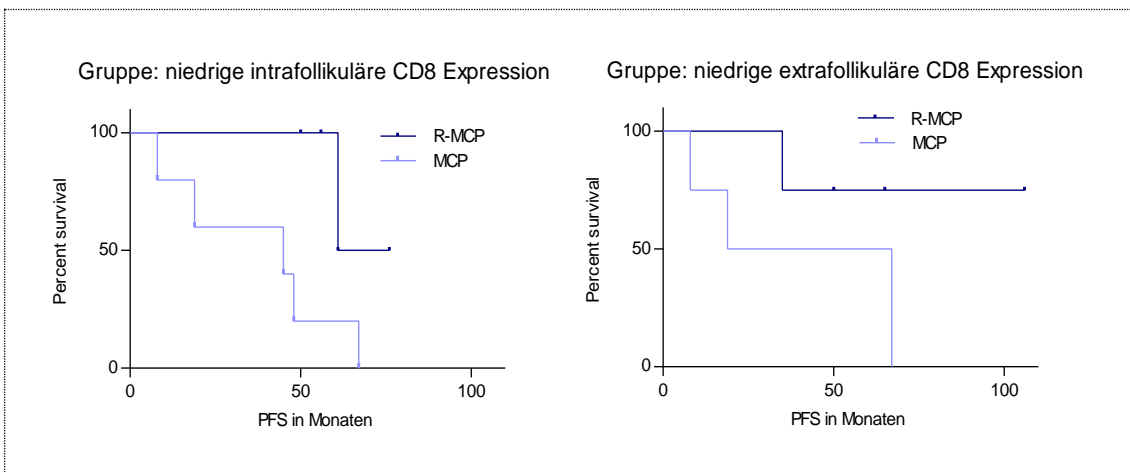
**Abbildung 17:** Vergleich des PFS für die Gruppen mit hoher und niedrige Anzahl CD8-positiver Zellen (intrafollikulär  $p=0,0839$ , extrafollikulär  $p=0,6133$ )

Im Vergleich der Therapiegruppen lässt sich für die Gruppe mit hoher Expression keine signifikante Differenz im PFS nachweisen, wobei die mit R-MCP behandelten Patienten in der Gruppe mit hoher Expression extrafollikulär ein tendentiell verlängertes PFS zeigen (intrafollikulär  $p=0,3167$ , extrafollikulär  $p=0,0856$ , Hazard-Ratio 0,1948, 95%KI 0.03796 to 0.9998).



**Abbildung 18:** Vergleich der Therapie-Schemata in der Gruppe mit hoher Expression von CD8 intra- und extrafollikulär (intrafollikulär  $p=0,3167$ , extrafollikulär  $p=0,0856$ )

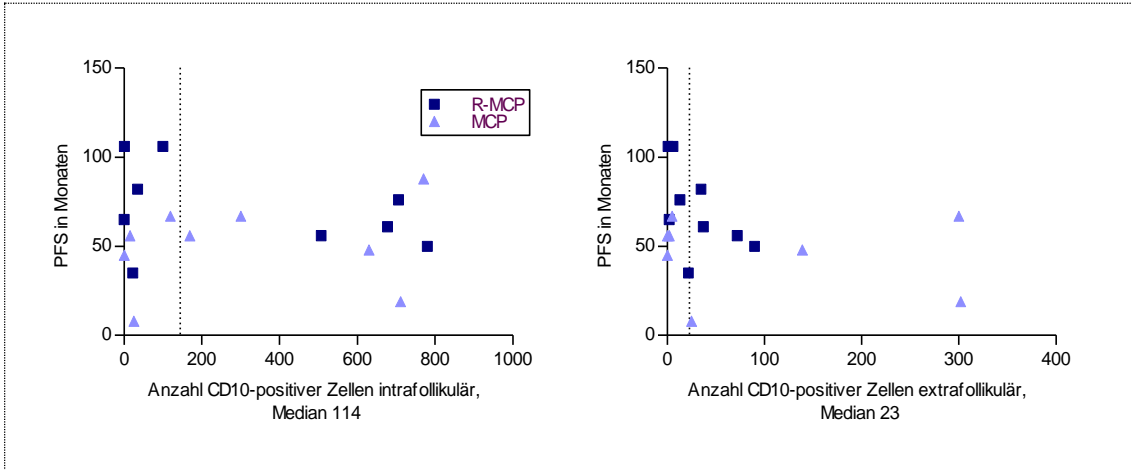
Betrachtet man die Gruppe mit geringer CD8-Ausprägung (siehe Abbildung 19) fällt auf, dass besonders die Patienten mit niedriger intrafollikulärer CD8-Zellzahl von Rituximab zu profitieren scheinen (medianes PFS 83,5 vs 45 Monate,  $p=0,0500$ ). Extrafollikulär zeigt sich dieser Unterschied nicht ( $p=0,1472$ ).



**Abbildung 19:** Vergleich der Therapie-Schemata in der Gruppe mit niedriger CD8-Expression (intrafollikulär  $p=0,0500$ , extrafollikulär  $p=0,1472$ )

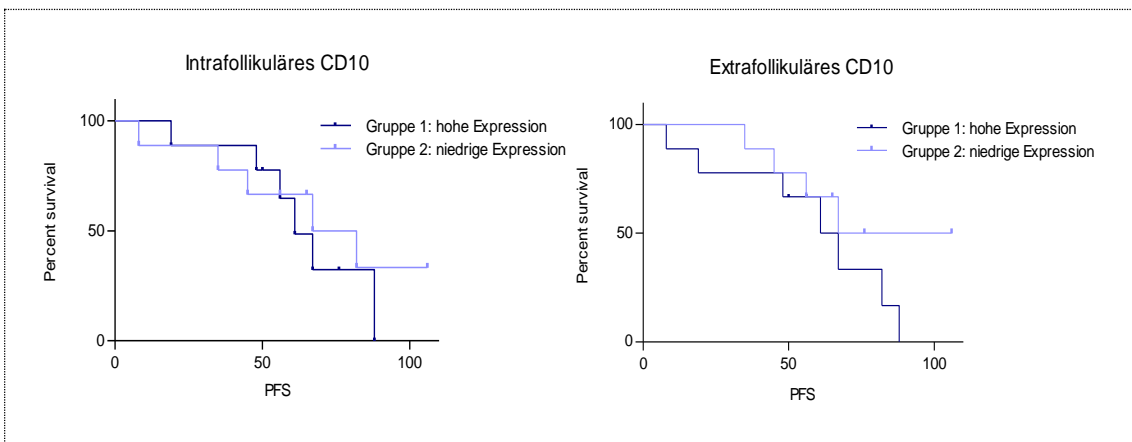
### 3.2.6 CD10

Für den B-Zell Marker CD10, der als charakteristischer Marker für folliculäre Lymphome gilt, ist bekannt, dass ein hoher Ausprägungsgrad mit einer besseren Prognose einhergeht. Die mediane Ausprägung beträgt hier intrafollikulär 114 und extrafollikulär 23 positive Zellen (Abbildung 20).



**Abbildung 20:** Anzahl von CD10-positiven Zellen in Zusammenhang mit dem PFS.

Die Überlebenskurven laufen hier annähernd parallel, so dass im beobachteten Kollektiv kein Unterscheid für hohe und niedrige Expressionsmuster bewiesen werden kann (intrafollikulär  $p=0,5397$ , Hazard-ratio: 1,530, 95%KI: 0.4308 - 4.998, extrafollikulär  $p=0,1997$ , Hazard-ratio: 2,210, 95%KI: 0.6577 - 7.428, siehe Abbildung 21).



**Abbildung 21:** Vergleich des PFS für die Gruppen mit hoher und niedriger Anzahl CD10-positiver Zellen (intrafollikulär  $p=0,5397$ , extrafollikulär  $p=0,1997$ )

Auch hier zeigt sich insgesamt die Rituximab Therapie dem alleinigen MCP-Regime überlegen, wobei sich weder in der Gruppe mit niedriger noch in der mit hoher Ausprägung ein signifikanter Unterschied zeigt (hohe Expression intrafollikulär  $p=0,2472$ , Hazard-ratio: 0,3506, 95%KI: 0.0594 - 2.069; hohe Expression extrafollikulär  $p=0,4828$ , Hazard-ratio: 0,5599, 95%KI: 0.1108 - 2.829; niedrige Expression intrafollikulär  $p=0,1161$ , Hazard-ratio: 0,1932, 95%KI: 0.02486 - 1.502; niedrige Expression extrafollikulär  $p=0,1532$ , Hazard-ratio: 0,2272,

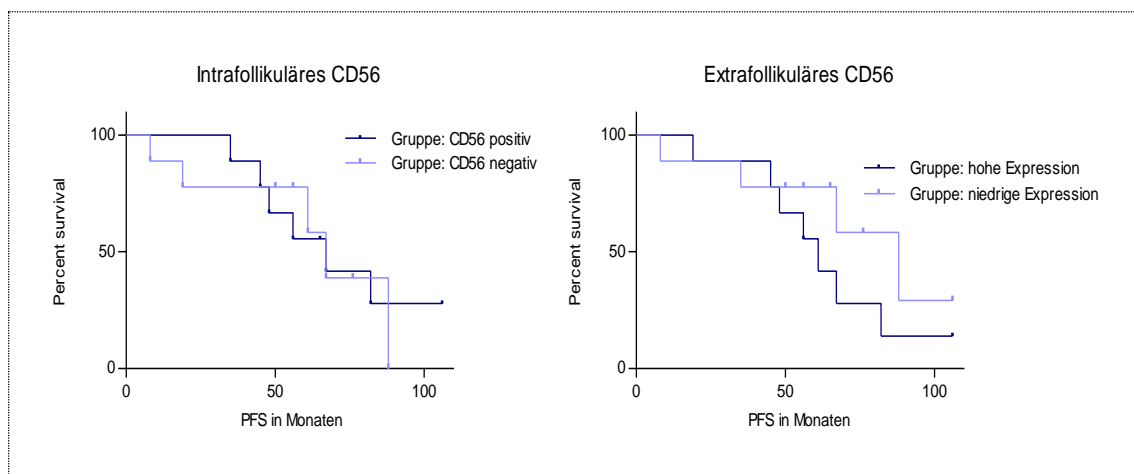
95%KI: 0.02975 - 1.736). Es lässt sich nicht darstellen, ob die CD10-Zellzahl einen Einfluss auf das PFS hat.

### 3.2.7 CD56

Der Oberflächenmarker CD56 wird intrafollikulär nur in 9 Fällen exprimiert, so dass hier erneut nach positiver und negativer Expression unterteilt wurde.

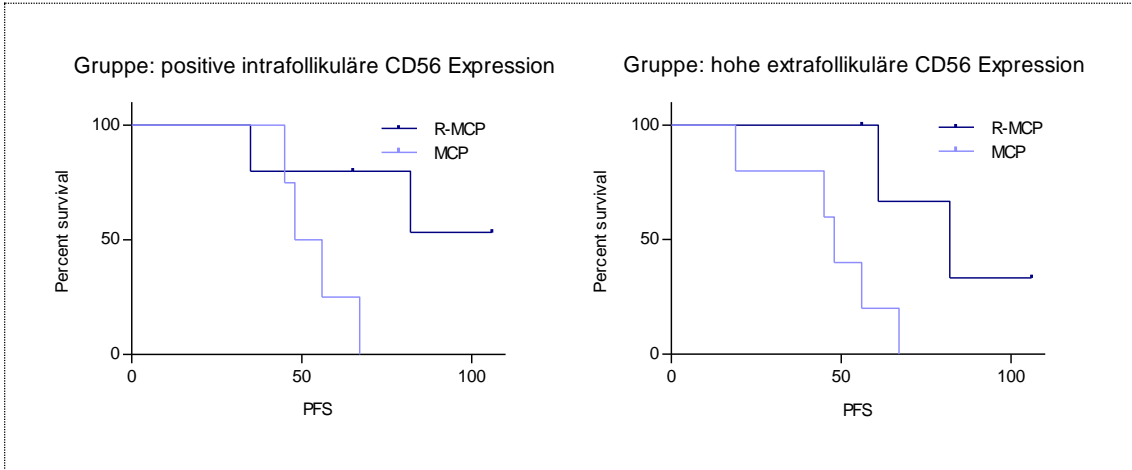
Hier zeigt sich für die intrafollikuläre Expression mit einem p-Wert von 0,8806 kein signifikanter Unterschied der Überlebenskurven. Das mediane PFS beträgt in beiden Gruppen 67 Monate.

Für die extrafollikuläre Zone zeigt sich ein höheres medianes PFS in der Gruppe mit niedriger Expression (61 vs. 88 Monate, Ratio 0,6932, 95%KI 0.4004-0.9859), wobei der Vergleich der Überlebenskurven keinen signifikanten Unterschied für das PFS liefert (p=0,2660, Hazard-ratio: 1,987, 95%KI: 0.5927-6.660, siehe Abbildung 22).



**Abbildung 22:** Vergleich des PFS für die Gruppe mit positiver vs negativer / bzw. für extrafollikulär hoher vs. niedriger CD56-Expression im Vergleich (intrafollikulär p=0,8806, extrafollikulär p=0,2660)

Im Vergleich der Therapieschemata fällt besonders in der Gruppe mit positiver intrafollikulärer bzw hoher extrafollikulärer CD56 Expression ein verlängertes PFS in der mit Rituximab behandelten Gruppe auf (siehe Abbildung 23).

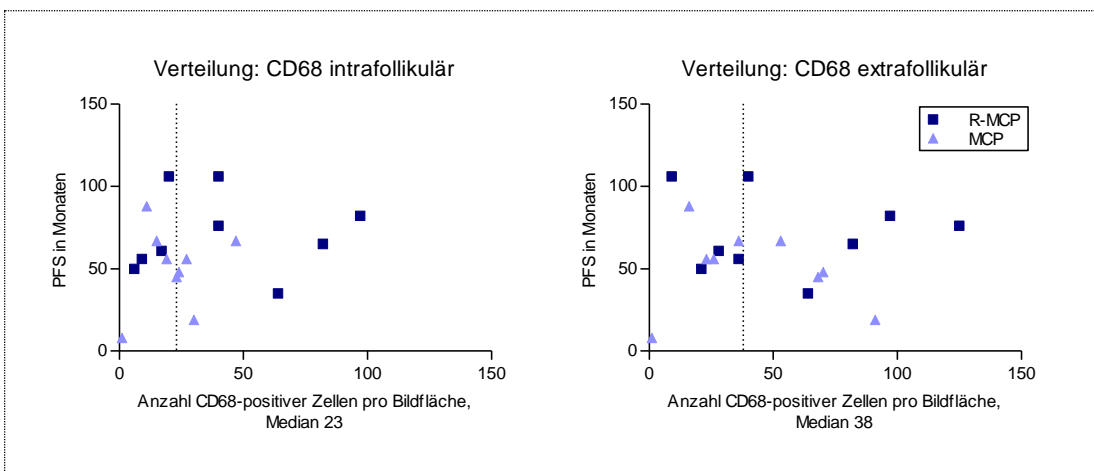


**Abbildung 23:** Vergleich der Therapie-Schemata in der Gruppe mit positiver intrafollikulärer und mit hoher extrafollikulärer CD56-Expression (intrafollikulär  $p=0,0569$ , extrafollikulär  $p=0,0266$ )

Dies ist für die intrafollikuläre Ausprägung nicht signifikant ( $p=0,0569$ , Hazard-ratio: 0,1695, 95%KI: 0.02729 - 1.053), für die extrafollikuläre Zone zeigt sich jedoch eine deutliche Überlegenheit der Rituximab-Therapie für die Patienten mit hoher CD56-Zellzahl ( $p=0,0266$ , Hazard-ratio: 0,1508, 95%KI: 0.02832 - 0.8027). In der Gruppe ohne bzw. mit niedriger CD56-Ausprägung lässt sich kein Unterschied der beiden Therapie-Regime nachweisen (intrafollikulär  $p=0,4295$ ; extrafollikulär  $p=0,2334$ ).

### 3.2.8 CD68

Das CD68-Oberflächenantigen gilt in der Immunhistochemie als charakteristischer Marker für Makrophagen.

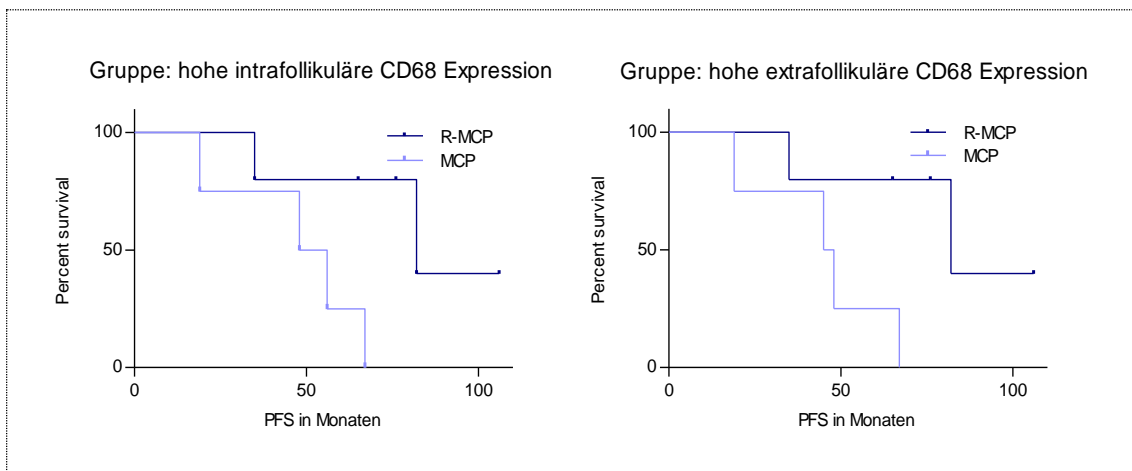


**Abbildung 24:** Anzahl von CD68-positiven Zellen in Zusammenhang mit dem PFS.

Die intrafollikuläre Ausprägung liegt hier bei einem Median von 23 positiven Zellen pro Bildausschnitt, extrafollikulär bei 38 Zellen, wobei die Patienten mit hoher intrafollikulärer Expression ebenfalls eine hohe extrafollikuläre Ausprägung aufweisen (siehe Abbildung 24).

Das mediane Überleben für die beiden Ausprägungs-Gruppen liegt jeweils für die intrafollikuläre als auch für die extrafollikuläre Expression bei 67 Monaten, es ergibt sich kein Unterschied der Überlebenskurven (intrafollikulär  $p=0,7707$ , extrafollikulär  $p=0,6981$ ).

Es fällt auf, dass in der Gruppe mit hoher CD68-Zellzahl die mit R-MCP behandelten Patienten ein deutlich erhöhtes PFS aufweisen. Das mediane PFS liegt intrafollikulär bei 82 Monaten in der R-MCP-Kohorte vs. 52 Monaten bei den nicht mit Rituximab behandelten Patienten, extrafollikulär bei 82 vs. 46,5 Monaten. Auch die Überlebenskurven verlaufen signifikant unterschiedlich (intrafollikulär  $p=0,0419$ , Hazard ratio= 0,1482, 95%-KI 0.02356 - 0.9322, extrafollikulär  $p=0,0419$ , Hazard ratio= 0,1482, 95%-KI 0.02356 - 0.9322, siehe Abbildung 25).



**Abbildung 25:** Vergleich der Therapieregime innerhalb der Patientengruppe hohen Anzahl CD68-positiver Zellen (jeweils  $p=0,0419$ )

In der Gruppe mit niedriger CD68-Expression lässt sich ebenfalls ein tendentieller Vorteil der Rituximab-Behandlung erkennen, der hier jedoch geringer und nicht statistisch signifikant ist (intrafollikulär  $p=0,2472$ , extrafollikulär  $p=0,2736$ ).

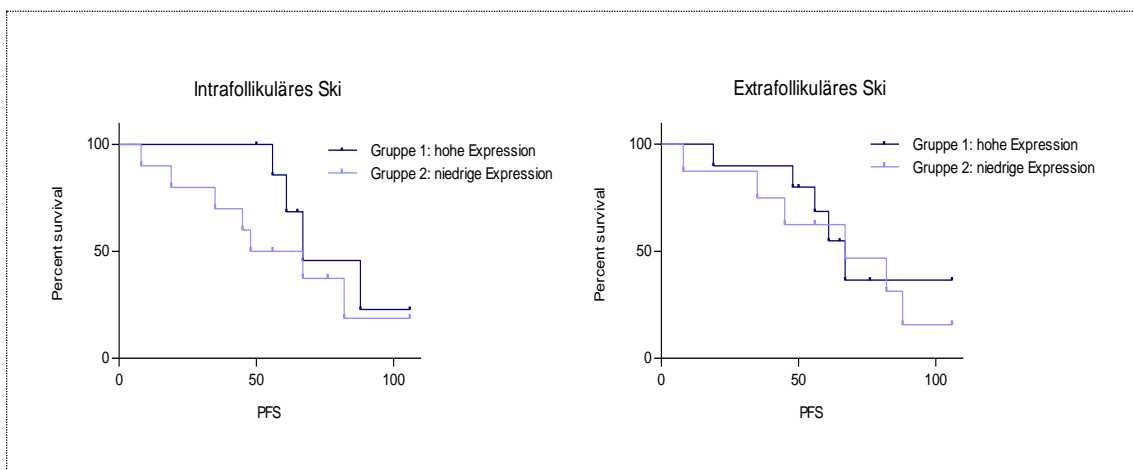
### 3.2.9 PLC

Bezüglich der Höhe der PLC-Expression lässt sich im Rahmen dieser Arbeit kein Einfluss auf das PFS ermitteln (intrafollikuläre Expression  $p=0,9395$ ; extrafollikuläre Expression  $p=0,8233$ ).

Innerhalb der Ausprägungsgruppen zeigt sich sowohl für die intrafollikuläre als auch für die extrafollikuläre Ausprägung kein signifikanter Unterschied der Therapie-Regime.

### 3.2.10 Ski

Die mediane Expression des Markers Ski beträgt hier innerhalb der Follikel 12 positive Zellen pro Fläche, extrafollikulär liegt der Median bei 40 Zellen. Ski stellt ein Protoonkogen dar und für einige Tumoren wie z.B. im Falle des Magenkarzinoms konnte in Studien der negative prognostische Einfluss einer hohen Ski-Ausprägung nachgewiesen werden<sup>66</sup>. Bei 3 Patienten kann hier eine außerordentlich hohe Ski-Expression ermittelt werden (530 und 350 positive Zellen im Follikelzentrum), wohingegen bei anderen Patienten Ski nicht exprimiert wird.



**Abbildung 26:** Progressionsfreie Überlebenszeit der Therapiegruppen (hohe Anzahl Ski-ausprägender Zellen vs. niedrige Anzahl) im Vergleich (intrafollikulär  $p=0,2977$ , extrafollikulär  $p=0,7388$ )

In diesem Patientenkollektiv lässt sich kein Unterschied im Einfluss der Expressionsmuster auf das PFS nachweisen (intrafollikuläre Expression:  $p=0,2977$ , Hazard Ratio 0,5249, 95%-KI 0.1560 to 1.766, extrafollikuläre Expression  $p=0,7388$ , Hazard Ratio 0,8103, 95%-KI 0.2353 - 2.790, siehe Abbildung 26).

Die beiden Patienten mit sehr hoher intrafollikulärer Ski-Expression zeigten ebenfalls kein auffallend geringes PFS (67 und 56 Monate bei einem medianen Überleben von 67 Monaten für die gesamte Kohorte).

Im Vergleich der Therapie-Regime zeigt sich erneut die Rituximab-Therapie insgesamt überlegen, wobei hier einzig die Patientengruppe mit hoher extrafollikulärer Ski-Expression unter Rituximab ein signifikant höheres PFS aufweist (hier  $p=0,0483$ , Hazard Ratio 0,1553, 95%-KI 0.02445 - 0.9862, siehe Abbildung 27).

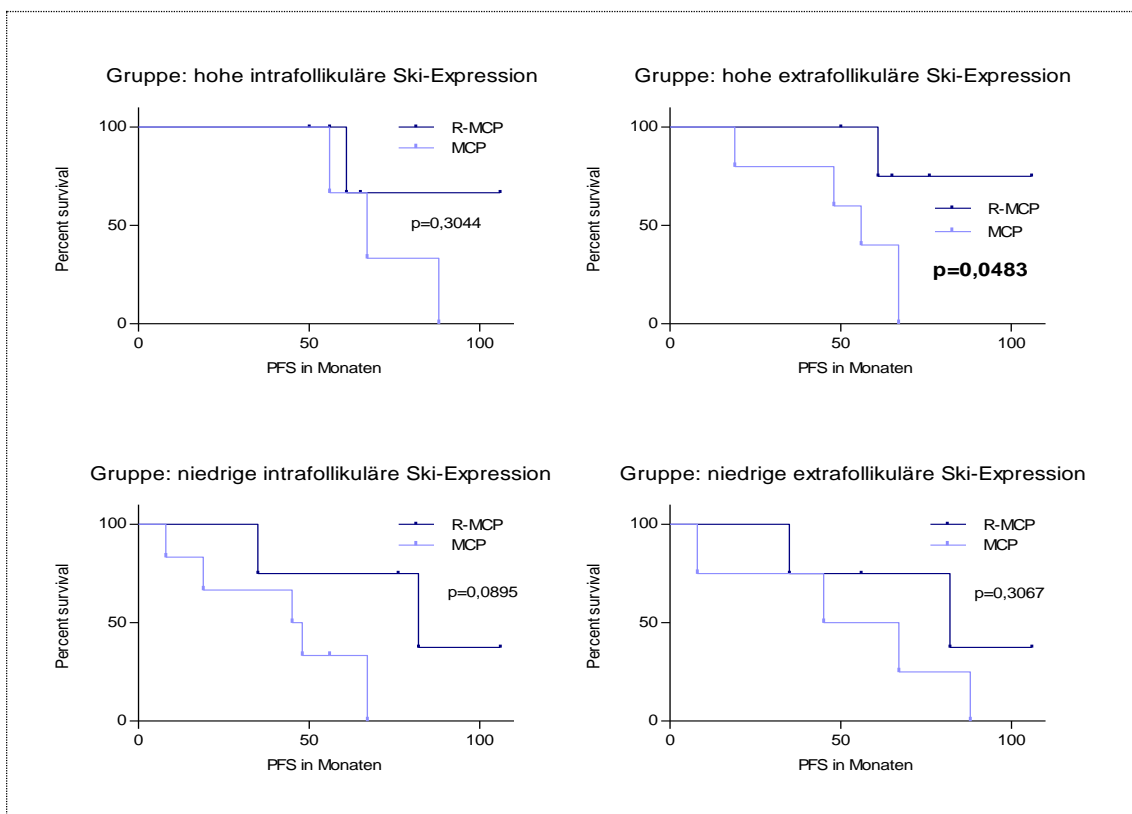


Abbildung 27: Vergleich der Therapie-Regime für das Protoonkogen Ski

### 3.2.11 S100

Lediglich 8 Patienten zeigen eine intrafollikuläre Expression von S100, so dass hier erneut in positive und negative Ausprägung unterteilt wurde. Der Median der extrafollikulären Ausprägung liegt hier bei 25 positiven Zellen.

Betrachtet man die intrafollikuläre Ausprägung, so zeigt sich kein Überlebensvorteil einer Gruppe (medianes Überleben jeweils 67 Monate,  $p=0,7057$ ).

Extrafollikulär ist eine Tendenz für ein verlängertes PFS in der Gruppe mit niedriger Anzahl S100-positiver Zellen erkennbar (medianes PFS: 67 vs. 85 Monate), wobei der Unterschied nicht signifikant ist (Verhältnis 0,7882, 95%KI 0.4831 - 1.093). Auch der Vergleich der Kaplan-Meyer-Kurven ergibt keinen Anhalt für einen Einfluss der S100-Expression auf das PFS ( $p=0,3492$ ).

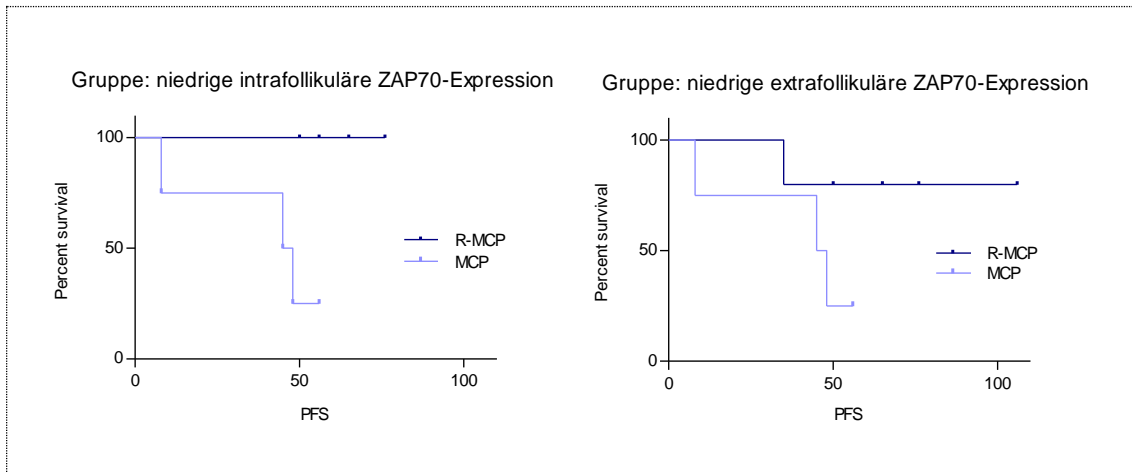
Alle Patienten scheinen von der Zugabe von Rituximab zu profitieren, wobei sich besonders in der Gruppe mit niedriger S100-Zellzahl ein höheres PFS für die mit Rituximab behandelten Patienten erkennen lässt. Eine Signifikanz liegt hier jedoch nicht vor (S100 negativ intrafollikulär:  $p=0,0536$ , Hazard Ratio 0,1938, 95%KI 0.03663 to 1.026, niedrige S100 Zellzahl extrafollikulär:  $p=0,1261$ , Hazard Ratio 0,2205, 95%KI 0.03177 to 1.530).

### **3.2.12 ZAP70**

Der Median der ZAP70 Expression liegt innerhalb der Follikel bei 157 und außerhalb bei 232 positiven Zellen pro Bildfläche.

Es zeigt sich innerhalb dieser Stichprobe kein signifikanter Unterschied im PFS der Patienten mit hoher und niedriger Ausprägung (intrafollikulär  $p=0,9822$ , Hazard ratio 1,017, 95%KI 0.2386 - 4.332, extrafollikulär  $p=0,9045$ , Hazard ratio 1,080, 95%KI 0.3077 - 3.790).

Betrachtet man nun die Expressionsgruppen separat, fällt wiederum die Überlegenheit des Rituximab-Regimes auf, welche sich in der Gruppe mit niedriger ZAP70-Zellzahl ausgeprägter zeigt (siehe Abbildung 28).



**Abbildung 28:** Vergleich der Therapieregime innerhalb der Patientengruppe niedriger Anzahl ZAP70-positiver Zellen (intrafollikulär  $p=0,0401$ , extrafollikulär  $p=0,1452$ )

Hier besteht ein signifikanter Unterschied für die Gruppe mit niedriger intrafollikulärer ZAP70-Expression ( $p=0,0401$ , Hazard Ratio 0,08859, 95%KI 0.008754 - 0.8966). Extrafollikulär liegt hier keine Signifikanz vor ( $p=0,1452$ , Hazard Ratio 0,2241, 95%KI 0.02994 - 1.677).

Für eine hohe Expression von ZAP70 lässt sich kein Unterschied zwischen den Therapiegruppen nachweisen (intrafollikulär  $p=0,2501$ , extrafollikulär  $p=0,2615$ ).

## 4 Diskussion

### 4.1 Der prognostische Einfluss der Bystander-Zellen

Gleichzeitig mit der Entwicklung der monoklonalen Antikörper ist die Frage, in welchem Maße die Bystanderzellen des Immunsystems die Prognose des FL beeinflussen, Gegenstand vieler Studien geworden. Zusammenfassend wird Tumor-infiltrierenden T-Zellen insgesamt ein positiver Einfluss zugeschrieben, wohingegen Makrophagen mit einem verkürzten Überleben assoziiert werden. Einige Studien liefern allerdings auch Daten, die den positiven Zusammenhang zwischen der T-Zell-Zahl und der Prognose widerlegen oder überhaupt keinen Zusammenhang feststellen konnten.<sup>6</sup>

Es ist strittig, ob die zur Datenerhebung angewandten immunhistochemischen Methoden ausreichend reproduzierbar und somit in verschiedenen Zentren generierte Ergebnisse vergleichbar sind.<sup>26</sup> Des Weiteren zeigte sich der Einfluss der Immunzellen auf die Prognose als entscheidend von der durchgeführten Therapie abhängig, wie de Jong et al. in einer 2009 veröffentlichten retrospektiven Analyse darstellten.<sup>25</sup> Dies bietet eine Erklärung für die oben erwähnten widersprüchlichen Ergebnisse von Studien, welche auf unterschiedlichen Therapieprotokollen basieren, und könnte ebenfalls die Wertigkeit von Analysen herabsetzen, die an mit unterschiedlichen Chemotherapeutika behandelten Patientengruppen erfolgten.

Aufgrund dieser Beobachtungen war es interessant, im Rahmen dieser Arbeit ein nach einem einheitlichen Therapieprotokoll (MCP) bei randomisiertem Einsatz von Rituximab behandeltes Patientenkollektiv zu untersuchen.

Im Folgenden soll zunächst auf den Einfluss der Bystanderzellen an sich und anschließend auf deren Bedeutung in Zusammenhang mit der Immunotherapie mit Rituximab eingegangen werden.

Aufgrund der kleinen Kollektivgröße war eine multivariate Analyse unter Berücksichtigung zusätzlicher Parameter wie dem FLIPI, dem Alter und weiterer Nebenerkrankungen nicht möglich, so dass leider ein möglicher Einfluss dieser Variablen nicht berücksichtigt werden konnte.

## 4.1.1 Die Rolle der Bystanderzellen

### 4.1.1.1 T-Zellen vs. Makrophagen

Besondere Aufmerksamkeit bei der Ermittlung der Bedeutung der Bystanderzellen im FL wurde dem Einfluss der T-Zellen und der Makrophagen gewidmet. In einer 2004 veröffentlichten Studie identifizierten Dave et al. zwei Gen-Signaturen, die sich unabhängig voneinander mit dem Überleben der FL-Patienten assoziieren lassen.<sup>24</sup> Immunantwort 1 zeigte sich mit einer guten Prognose vergesellschaftet und beinhaltet Gene, die für T-Zell-Marker kodieren. Immunantwort 2 war durch Gene gekennzeichnet, die in Makrophagen exprimiert werden und war mit einer schlechteren Prognose assoziiert. 2008 konnte die Studiengruppe im Weiteren darstellen, dass mit steigender Anzahl der vorhandenen T-Zellen der limitierende Einfluss auf den Progress der Erkrankung zuzunehmen scheint.<sup>23</sup>

Janikova et al. erstellten mittels Gen-Expressionsanalyse ebenfalls 2 Profile (ein „T-Zell“- vs. ein „Proliferations“-Profil) und konnten die Hypothese bestätigen, dass die Anzahl der vorhandenen T-Zellen eine entscheidende Rolle in der Entwicklung und Prognose von FL spielt.<sup>53</sup>

Zusammengefasst zeigten oben genannte Studien einen Zusammenhang zwischen der Quantität der infiltrierenden Immunzellen und der Prognose der Patienten. Möglicherweise liegt hier jedoch eine Beeinflussung des Bystanderkompartments durch die malignen Zellen selbst vor. Dave vermutete, dass bei zu hoher Proliferationsrate der Tumorzellen die Fähigkeit der Interaktion verloren geht und man folglich weniger T-Zellen im untersuchten Material findet.<sup>23</sup>

In der vorliegenden Arbeit ließ sich zeigen, dass eine hohe Infiltration der Follikelzentren durch CD5-positive T-Zellen sowie eine hohe interfollikuläre Anzahl von CD3-positiven Zellen mit einem tendenziell verlängerten PFS einhergeht, wobei hier keine statistische Signifikanz vorliegt (für CD5  $p = 0,0891$ , für CD3  $p = 0,5020$ ).

Die in einer Studie von Farinha et al. 2005 erhobenen Daten boten Anhalt dafür, dass ein hoher Anteil von Makrophagen (identifiziert über CD68), einen nachteiligen prognostischen Faktor darstellt.<sup>31</sup> In der bereits erwähnten Studie von Dave

et al. bilden Makrophagen die Gruppe der Immunantwort 2 und sind mit einer negativen Prognose assoziiert.<sup>24</sup> Im Gegensatz zu den diversen Veröffentlichungen bezüglich der Rolle der T-Zellen scheint also die Rolle der Makrophagen im FL relativ klar. Lediglich Alvaro et al. ordneten sie in die Gruppe des Immunkontroll-Musters ein und schrieben ihnen somit eine Verbesserung der Prognose zu.<sup>7</sup>

Wir konnten im Rahmen dieser Arbeit keine signifikante Differenz im PFS von Patienten mit hoher und niedriger CD68-Expression in der Gesamtkohorte nachweisen.

#### 4.1.1.2 T-Zell-Subtypen und Infiltrationslokalisation

Obgleich zunächst eine vielversprechende Erkenntnis, erwies sich die Quantität der T-Zellen allein als unzureichender Prediktor der Prognose von Patienten mit follikulärem Lymphom. Auch unsere Daten zeigten bei isolierter Betrachtung der Höhe der Zellinfiltration keinen Überlebensvorteil. Studiengruppen konzentrierten sich im Verlauf vermehrt auf die genauen Parameter und die Art der Infiltration der befallenen Lymphknoten durch die T-Zellen (s.u.). Hierbei zeigte sich die Bedeutung des Ortes der Infiltration (Follikel oder interfollikuläre Zone) wie auch die Wichtigkeit der Unterscheidung verschiedener T-Zell-Subtypen für die Prognose:

Alvaro et al. bestätigten das Vorhandensein von verschiedenen T-Zell-Subtypen inmitten des Pools maligner B-Zellen und berichteten über die Existenz von zwei spezifischen Mustern: einem „immuno-surveillance“- (Immunkontroll)-Muster bestehend aus T-Lymphozyten und Makrophagen, welches sich mit einem blanderem Verlauf assoziieren ließ, und einem „immune-escape“-Muster (CD57+ T-Zellen), welches mit dem vermehrten Auftreten von B-Symptomen und Knochenmarkbeteiligung in Bezug gebracht werden konnte.<sup>8</sup>

Lee et al. stellten dar, dass ein hoher Prozentsatz von extrafollikulären regulatorischen T-Zellen, unabhängig vom FLIPI der Patienten, mit einem verlängerten Gesamtüberleben einhergeht.<sup>59 17</sup>

Die wichtige Rolle der regulatorischen T-Zellen wurde ebenfalls 2006 von Carreras et al. beschrieben, die in einem Kollektiv von FL-Patienten nachweisen

konnten, dass ein positiver Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein eines hohen Prozentsatzes an FOXP3-positiven regulatorischen T-Zellen und der längeren 5-Jahres-Überlebensrate besteht, während sehr niedrige Zellzahlen mit einer höheren Transformationswahrscheinlichkeit und Therapieresistenz verbunden waren. Die prognostische Bedeutung der Zellen zeigte sich als vom FLIPI unabhängig. Eine Erklärung könnte im direkten inhibitorischen Effekt der FOXP3-positiven Zellen auf die neoplastischen Zellen begründet sein.<sup>17</sup>

CD4- und CD8-positive Zellen zeigten sich im FL unabhängig vom FLIPI mit einem blanden Verlauf assoziiert.<sup>91</sup> Glas et al. veröffentlichten 2007, dass eine hohe Anzahl CD4-exprimierender Zellen im Follikelzentrum, im Gegensatz zur Infiltration interfollikulär, mit einer schnelleren Transformation und somit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet sind.<sup>37</sup> Im Umkehrschluss zeigten Wahlin et al. 2010, dass CD8-positive Zellen vor allem wenn interfollikulär in größerer Anzahl als follikulär vorhanden, mit einem verlängerten Überleben assoziiert sind.<sup>90</sup>

Auch wir fanden vermehrt CD8-exprimierende Zellen in der interfollikulären Zone, wobei auffiel, dass eine hohe extrafollikuläre Infiltration mit konsekutiv noch höherer intrafollikulärer Infiltration einherging. Patienten mit hoher CD8-Zellzahl innerhalb der neoplastischen Follikel wiesen ein tendenziell verlängertes PFS auf ( $p = 0,0839$ ), wobei hier keine Signifikanz vorlag. Einen Überlebensvorteil für Patienten mit hoher extrafollikulärer Expression konnten wir nicht nachweisen.

#### 4.1.1.3 Weitere in FL nachgewiesene Bystanderzellen

Dendritische Zellen zeigten sich gegenüber dem Nachweis in entzündlichen Erkrankungen in Lymphomen vermindert.<sup>50</sup> Ihnen wird als Antigen-präsentierenden Zellen eine wichtige Rolle in der Anti-Tumor-Immunantwort zugeschrieben. Ein 2007 von Chang et al. veröffentlichtes Paper beschreibt, dass das Vorhandensein von CD1a- und/oder S100-positiven dendritischen Zellen in DLBCL einen positiven prognostischen Einfluss bedeutet.<sup>20</sup> Wir haben ebenfalls Hinweise auf ein tendenziell verkürztes PFS bei niedriger bzw. nicht vorhandener Infiltration durch CD1a-exprimierende Zellen gefunden, wenn auch ohne

statistische Signifikanz ( $p=0,0581$ ). Eine verminderte Anzahl von dendritischen Zellen im Lymphknoten könnte also eine Reduktion der Tumor-Immunabwehr des Körpers bedeuten.

NK-Zellen, identifiziert über CD56, wurden bisher kaum innerhalb der FL nachgewiesen.<sup>37</sup> Wir fanden CD56 ebenfalls nur in weniger als der Hälfte aller Lymphknoten und es ließ sich kein Unterschied im PFS der Patienten bezüglich der CD56-Expression feststellen. Shafer et al konnten eine niedrige Anzahl von NK-Zellen im peripheren Blut mit einem verkürzten OS in zuvor unbehandelten Patienten mit folliculären Lymphomen in Zusammenhang bringen.<sup>81</sup>

#### **4.1.2 T-Zell-Signaltransduktion: die Rolle von ZAP70**

Die für die T-Zell-Signaltransduktion obligate Tyrosinkinase ZAP70 hat sich in der B-CLL als prognostischer Parameter herausgestellt, weshalb wir diesen Marker in unserer Arbeit ebenfalls untersucht haben. Es ist beschrieben, dass Patienten mit B-CLL bei niedriger ZAP-70-Expression ( $< 30\%$ ) einen deutlich günstigeren Krankheitsverlauf aufweisen als Patienten mit unmutiertem IgVH-Gen und entsprechend hoher ZAP-70-Expression ( $> 30\%$ ).<sup>61, 68</sup> Wir fanden keinen Unterschied im PFS der Patienten bezüglich der ZAP70-Expression. Carreras et al. wiesen 2005 in einer Analyse der ZAP70-Expression in NHL in 65% der untersuchten Patienten mit B-CLL eine Expression nach, in FL war keine Ausprägung nachweisbar.<sup>18</sup> Somit ist fraglich, ob die ZAP70-Ausprägung in FL eine Rolle spielt. Es ist anzunehmen, dass die in unserer immunhistochemischen Untersuchung für ZAP-70-positiven Zellen lediglich T- und NK- Zellen entsprechen.

### **4.1.3 Das Protoonkogen Ski**

In gastrointestinalen Tumoren konnte eine hohe Expression von Ski als negativer prognostischer Faktor identifiziert werden.<sup>66</sup> Auch innerhalb hämatologischer Erkrankungen ist Ski überexprimiert. In vitro unterdrückt Ski in AML-Zellen die Signaltransduktion durch all-trans Retinsäure (ATRA) und die Zelldifferenzierung.<sup>74</sup> Eine in unserer Klinik vorgenommene Studie konnte zeigen, dass eine hohe Ski-Ausprägung in der AML mit einem schlechteren Ansprechen auf die Therapie mit ATRA korrelierte, ein Unterschied im OS der Patienten mit hoher vs. niedriger Ski Expression fand sich hier jedoch nicht.<sup>87</sup> Für die CLL konnte Ski allerdings als positiver prognostischer Parameter herausgestellt werden.<sup>80</sup> Wir konnten im Rahmen unserer Untersuchungen keinen Einfluss der Ski-Expression auf das PFS feststellen.

## **4.2 Einfluss der Immunzellen auf die Therapie mit Rituximab**

### **4.2.1 B-Zellen und Rituximab**

Viele Studiengruppen haben sich seit der Zulassung des CD20-Antikörpers Rituximab mit dem Wirkmechanismus und verschiedenen Therapiestrategien im Einsatz des Antikörpers auseinander gesetzt. Nur wenige Erkenntnisse gibt es jedoch über die Rolle der Höhe der CD20-Expression auf den B-Zellen bezüglich des Ansprechens und der Wirksamkeit der Antikörpertherapie. Im Jahr 2001 veröffentlichten Golay et al., dass die CD20-Level in der B-CLL die in vitro-Empfindlichkeit auf Rituximab bestimmen.<sup>38</sup> Ist die Menge der CD20-positiven Zellen in vivo jedoch ein entscheidender Faktor für das Ansprechen und Überleben der Patienten unter Rituximab-Therapie?

Horvat und Prevodnik et al. veröffentlichten 2010 und 2011 mittels Durchflusszytometrie erhobene Daten, die eine hohe CD20-Expression mit einem verlängerten OS unter Rituximab-Therapie in Patienten mit B-Zell-Lymphomen assoziierten.<sup>49, 72</sup> Die erste 2010 im Oncology Report veröffentlichte Studie hatte gezeigt, dass in der Gruppe mit CD20 oberhalb eines vorab festgesetzten Cut-offs die

Response-Rate sowie das OS höher war. Die Dauer des Ansprechens (duration of response) auf die Rituximab-Erhaltungstherapie unterschied sich jedoch nicht signifikant zur Gruppe unterhalb des Cut-offs. 25% der Patienten mit B-Zell-Lymphomen wurden der Gruppe mit CD20-Level unterhalb des Schwellenwertes zugerechnet, davon litten die meisten Patienten (80%) an CLL und die wenigsten (6,7%) an FL.

In unserer Arbeit untersuchten wir den Einfluß der C20-Expression an Hand der Anzahl CD20-positiver Zellen unter Verwendung der medianen Zellzahl pro Fläche als Cut-off innerhalb der Stichprobe. Dabei ergab sich für die Patienten mit hoher Anzahl von CD20-positiven Zellen kein Unterschied des PFS im MCP und im R-MCP-Arm. Bei den Patienten mit niedriger Anzahl von CD20-Zellen zeigte sich jedoch ein tendenziell verlängertes PFS unter Therapie mit Rituximab, wobei sich für die Gruppe mit niedriger CD20-Zellzahl außerhalb des neoplastischen Follikel ein signifikant verlängertes PFS ergab ( $p=0,0328$ ).

Die Aussagekraft unserer Ergebnisse ist aufgrund der niedrigen Patientenzahl gering und lässt die Generierung von Hypothesen nur eingeschränkt zu. Im Falle einer Bestätigung unserer Daten durch Auswertung größerer Patientenkollektive könnten oben genannte Erkenntnisse darauf hindeuten, dass in FL gerade die Patienten mit niedriger Anzahl von CD20-positiven Zellen von einer Therapie mit Rituximab profitieren. Dies muss den zuvor erläuterten Daten von Horvat und Prevodnik nicht zwangsläufig widersprechen. Zu beachten ist, dass diese sich nicht ausschließlich auf FL beziehen und des Weiteren keinerlei Aussage zum Ort der CD20-Zellen erlauben. Auch lassen sich die Cut-off-Werte aufgrund der unterschiedlichen Methodik nur eingeschränkt vergleichen.

Unsere retrospektiv erhobenen Daten geben Anlass zur Aufstellung folgender Hypothesen, welche Gegenstand zukünftiger Untersuchungen werden könnten:

1. Der Antikörper Rituximab dringt bei hoher Anzahl extrafollikulär vorhandener B-Zellen möglicherweise nicht ausreichend ins Follikelzentrum vor um an allen vorhandenen Rezeptoren seine Wirkung zu entfalten.
2. Eine niedrige Anzahl extrafollikulärer CD20-positiver Zellen spricht für das Vorhandensein einer höheren Anzahl normaler B-Zellen im Lymphknoten und ist somit als prognostisch ungünstig zu werten.

#### **4.2.2 Zusammenhang der Rituximab-Therapie und der Infiltration durch Bystanderzellen des Immunsystems**

Man nimmt an, dass in der Wirkung von Rituximab auf die Tumorzelle die Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC = antibody-dependend cellular cytotoxicity), die Komplement-abhängige Zytotoxizität (CDC = complement-dependend cytotoxicity) und die direkte Apoptoseinduktion eine Rolle spielen.<sup>19, 92</sup> Die ADCC wird beeinflusst durch Zellen des Immunsystems wie Makrophagen und NK-Zellen, wobei die Bindung des Fc-Fragmentes des Immunglobulins an den Rezeptor der Effektorzelle (FcR) die Ausschüttung zytotoxischer Substanzen auslöst.<sup>82</sup>

Bei isolierter Betrachtung der Infiltration durch einzelne Bystanderzellen ließ sich bei der Auswertung unserer Daten kein statistisch signifikanter Unterschied in der Prognose darstellen. In Zusammenhang mit der Therapie mit dem Antikörper Rituximab zeigte sich die Höhe der Ausprägung einige Antigene jedoch z.T. mit einem signifikant verlängerten PFS assoziiert, wobei sich hier ein bestimmtes Muster erkennen ließ: In unserem Kollektiv scheinen besonders die Patienten mit niedriger Anzahl intrafollikulärer T-Zellen von der Rituximab-Therapie zu profitieren. So zeigte sich innerhalb der Gruppe der Patienten mit niedriger Ausprägung der T-Zell-Marker CD3 ( $p=0,0221$ ) und CD8 ( $p=0,05$ ) sowie der auf T-Zellen vorhandenen Tyrosinkinase ZAP-70 ( $p=0,0401$ ) jeweils ein signifikanter Überlebensvorteil.

Möglicherweise lässt sich also der in den in Abschnitt 4.1.1.1 und 4.1.1.2 erwähnten Studien dargestellte prognostische Nachteil einer niedrigen T-Zell-Population innerhalb der neoplastischen Lymphknoten durch eine Therapie mit Rituximab überkommen, bzw. profitieren insbesondere die Patientin mit niedriger Anzahl von T-Zellen von einer zusätzlichen Therapie mit Rituximab. Dieser Effekt lässt sich ebenfalls im Falle der Infiltration durch Makrophagen beobachten (siehe Abschnitt 4.2.3).

Hilchey et al. konnten in einem 2009 veröffentlichten Artikel zeigen, dass die Immunotherapie mit Rituximab eine aktive FL-spezifische T-Zell-Antwort auslöst, so dass nach erfolgter Therapie eine Zunahme von FL-spezifischen T-Lymphozyten

nachgewiesen werden kann, welche sogar nach Abschluss der Therapie bestehen blieb.<sup>47</sup> Eine Erklärung für das verlängerte PFS von Patienten mit niedriger Anzahl intrafollikulärer T-Zellen unter Rituximab-Therapie könnte also in der vermehrten Induktion FL-spezifischer T-Zellen liegen.

Laurent et al. zeigten in einer 2011 veröffentlichten Studie, dass zwar eine hohe Anzahl extrafollikulärer CD8+-zytotoxischer T-Zellen für sich nicht mit einem verlängerten PFS korrelierte, jedoch in mit Rituximab behandelten Patienten eine höhere Aktivierung dieser Zellen über die Expression von Granzym B nachgewiesen werden konnte, was wiederum mit einem verlängerten PFS einherging.<sup>58</sup> Für eine hohe Expression von CD8 konnten wir keinen signifikanten Überlebensvorteil nachweisen ( $p=0,3167$ ). Eine hohe Ausprägung des T-Zell-Markers CD5 außerhalb der Follikel zeigte sich mit einem verlängerten PFS der Rituximab-Gruppe assoziiert ( $p=0,0399$ ), für die übrigen auf T-Zellen vorhandenen Antigene konnte jedoch im Rahmen unserer Auswertungen kein Zusammenhang hergestellt werden.

Fischer et al. hatten bereits 2006 nachgewiesen, dass der Einsatz von Rituximab in CD20+-B-Zell Non-Hodgkin-Lymphomen die Aktivität von zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen erhöht.<sup>32</sup>

Unsere Daten zeigen, dass eine hohe Anzahl den NK-Zell-spezifischen Oberflächenmarker CD56 ausprägenden Zellen in der interfollikulären Zone mit einem signifikant höheren PFS der mit Rituximab behandelten Patienten vergesellschaftet war. Dies könnte bedeuten, dass eine hohe Anzahl CD56-exprimierender Zellen dem Antikörper eine größere Angriffsfläche zur Entwicklung des Therapieeffektes bietet und somit mit einem vermehrten Ansprechen auf Rituximab und folglich einem verlängerten PFS einhergeht.

In einer Veröffentlichung von Lee et al. gehen die Autoren auf das Zusammenspiel von NK- und dendritischen Zellen in mit monoklonalen Antikörpern behandelten Malignomen ein: Die durch mAb-gesteuerte NK-Zell-Aktivierung wird durch stimulierende Zytokine und Oberflächenmoleküle der dendritischen Zellen erhöht.<sup>60</sup>

Wir identifizierten die dendritischen Zellen über das Oberflächenmolekül CD1a, wobei sich für Patienten mit hoher Infiltration mit CD1a-positiven dendritischen Zellen ein verlängertes PFS unter Rituximab Therapie zeigte, wenn auch ohne absolute statistische Signifikanz ( $p=0,0581$ ). Aufgrund der geringen Fallzahl dieser Patienten in unserem Kollektiv erlauben es die Daten nicht, hier valide Zusammenhänge herzustellen, wobei tendenziell in diesen Patienten ebenfalls eine hohe Zahl NK-Zellen gefunden werden konnte.

Die klinische Aktivität des Antikörpers scheint also durch die gegenseitige Aktivierung der NK- und der dendritischen Zellen gesteigert, eine Untersuchung auf Vorhandensein dieser Zellen im Lymphknoten könnte also als prognostischer Marker vor Beginn einer Behandlung mit Rituximab genutzt werden.<sup>60</sup>

#### **4.2.3 Einfluss der Makrophageninfiltration auf die Rituximabtherapie**

Den Makrophagen wird wie bereits erläutert ein negativer Einfluss auf die Prognose von FL zugeschrieben. Canoni et al. veröffentlichten 2009 Ergebnisse, die dies bestätigten, vermochten aber zu zeigen, dass dieser Umstand durch die Therapie mit Rituximab besser überkommen werden kann, als durch den alleinigen Einsatz einer Chemotherapie.<sup>14</sup> Der prognostische Marker verliert also seinen Stellenwert, oder die Rituximab-Therapie kehrt den Effekt sogar ins Positive um.<sup>86</sup>

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten vermögen dies zu bestätigen: Die Patienten mit hoher Makrophagenanzahl in unserem Kollektiv scheinen signifikant von der zusätzlichen Therapie mit Rituximab gegenüber der alleinigen Chemotherapie profitieren ( $p=0.0419$ ). Dabei ist es unerheblich, in welcher Position im Lymphknoten sich die Makrophagen befinden, bzw. die Patienten mit hoher intrafollikulärer Makrophagenzahl verfügen gleichzeitig auch über eine hohe extrafollikuläre Makrophagen-Infiltration.

Eine Erklärung könnte in der Rolle der Makrophagen in der Antikörper-abhängigen Zell-vermittelten Zytotoxizität liegen (ADCC), bedeutend, dass eine vermehrte Anzahl von Makrophagen in einer effektiveren Wirkung monoklonaler Antikörper resultiert.<sup>73</sup>

## 5 Ausblick

Ein entscheidender Schritt im Progress von Malignomen ist die Fähigkeit der Tumorzellen, dem Immunsystem durch Beeinflussung der Anti-Tumor-Immunantwort zu entgehen.

Das wachsende Verständnis des FL als immunologische Erkrankung vermag Erklärungen zu geben für das bisher sehr unterschiedliche Outcome von Patienten und könnte beitragen zur Entwicklung eines neuen prognostischen Indexes. Es konnte die zu Beginn dieser Arbeit aufgestellte Hypothese bestätigt werden, dass die genauere Betrachtung der tumorinfiltrierenden Immunzellen Aufschluss über das Therapieansprechen auf den CD20-Antikörper Rituximab zu geben vermag.

Ungünstige prognostische Parameter wie eine niedrige T-Zell-Populationen oder hohe Makrophagen-Infiltration der neoplastischen Follikel können möglicherweise durch die zusätzliche Gabe von Rituximab zur konventionellen Chemotherapie überkommen werden. Eine immunhistochemische Färbung auf zytotoxische-T-Zellen, NK-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen könnte zukünftig als vor Beginn der Therapie erhobener Parameter genutzt werden, um den Therapieerfolg abzuschätzen. Dies müsste durch weitergehende Studien untersucht und unter standardisierten Bedingungen getestet werden.

Die gewonnenen Erkenntnisse über das komplexe Zusammenspiel der Immunzellen vermögen im Weiteren Ansätze aufzuzeigen für eine gezielte Therapie durch Beeinflussung des Mikroenvironments und die Entwicklung neuer immunologischer Therapien.

## Literaturverzeichnis

1. <http://www.unifr.ch/anatomy/elearningfree/allemand/biochemie/kardio/lymph/d-lymph.php>, 2004.
2. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood*. 1997;89(11):3909-3918.
3. <http://pathologyoutlines.com/cdmarkers.html>.
4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=921>.
5. Product Information Rituximab: European Medicines Agency.
6. Ai WYZ CD, Horning SJ, Allen J, Tibshirani R., R. L. Tumor-infiltrating T cells are not predictive of clinical outcome in follicular lymphoma. *Blood*. 2006;108(824a).
7. Alvaro T, Lejeune M, Salvadó M, et al. Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells. *Clin Cancer Res*. Feb 2005;11(4):1467-1473.
8. Alvaro T, Lejeune M, Salvadó M, et al. Immunohistochemical patterns of reactive microenvironment are associated with clinicobiologic behavior in follicular lymphoma patients. *J Clin Oncol*. Dec 2006;24(34):5350-5357.
9. Arnold S Freedman M, Jon C Aster, MD. Clinical manifestations, pathologic features, and diagnosis of follicular lymphoma. *UpToDate*.
10. Biagi J, Seymour J. Insights into the molecular pathogenesis of follicular lymphoma arising from analysis of geographic variation. *Blood*. Jun 2002;99(12):4265-4275.
11. Bilalovic N, Blystad AK, Golouh R, et al. Expression of bcl-6 and CD10 protein is associated with longer overall survival and time to treatment failure in follicular lymphoma. *Am J Clin Pathol*. Jan 2004;121(1):34-42.
12. Bosga-Bouwer A, van Imhoff G, Boonstra R, et al. Follicular lymphoma grade 3B includes 3 cytogenetically defined subgroups with primary t(14;18), 3q27, or other translocations: t(14;18) and 3q27 are mutually exclusive. *Blood*. Feb 2003;101(3):1149-1154.
13. Buske C, Hoster E, Dreyling M, Hasford J, Unterhalt M, Hiddemann W. The Follicular Lymphoma International Prognostic Index (FLIPI) separates high-risk from intermediate- or low-risk patients with advanced-stage follicular lymphoma treated front-line with rituximab and the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (R-CHOP) with respect to treatment outcome. *Blood*. Sep 2006;108(5):1504-1508.
14. Canioni D, Salles G, Mounier N, et al. High numbers of tumor-associated macrophages have an adverse prognostic value that can be circumvented by rituximab in patients with follicular lymphoma enrolled onto the GELA-GOELAMS FL-2000 trial. *J Clin Oncol*. Jan 2008;26(3):440-446.
15. Caraux A, Kim N, Bell SE, et al. Phospholipase C-gamma2 is essential for NK cell cytotoxicity and innate immunity to malignant and virally infected cells. *Blood*. Feb 1 2006;107(3):994-1002.
16. Carbone P, Kaplan H, Musshoff K, Smithers D, Tubiana M. Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. *Cancer Res*. Nov 1971;31(11):1860-1861.
17. Carreras J, Lopez-Guillermo A, Fox B, et al. High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *Blood*. Nov 2006;108(9):2957-2964.
18. Carreras J, Villamor N, Colomo L, et al. Immunohistochemical analysis of ZAP-70 expression in B-cell lymphoid neoplasms. *J Pathol*. Mar 2005;205(4):507-513.
19. Cartron G, Watier H, Golay J, Solal-Celigny P. From the bench to the bedside: ways to improve rituximab efficacy. *Blood*. Nov 2004;104(9):2635-2642.

20. Chang K, Huang G, Jones D, Lin Y. Distribution patterns of dendritic cells and T cells in diffuse large B-cell lymphomas correlate with prognoses. *Clin Cancer Res*. Nov 2007;13(22 Pt 1):6666-6672.
21. Cheson BD. Radioimmunotherapy of non-Hodgkin lymphomas. *Blood*. Jan 15 2003;101(2):391-398.
22. Colombat P, Salles G, Brousse N, et al. Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) as single first-line therapy for patients with follicular lymphoma with a low tumor burden: clinical and molecular evaluation. *Blood*. Jan 2001;97(1):101-106.
23. Dave S. Follicular lymphoma and the microenvironment. *Blood*. May 2008;111(9):4427-4428.
24. Dave S, Wright G, Tan B, et al. Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N Engl J Med*. Nov 2004;351(21):2159-2169.
25. de Jong D, Koster A, Hagenbeek A, et al. Impact of the tumor microenvironment on prognosis in follicular lymphoma is dependent on specific treatment protocols. *Haematologica*. Jan 2009;94(1):70-77.
26. de Jong D, Rosenwald A, Chhanabhai M, et al. Immunohistochemical prognostic markers in diffuse large B-cell lymphoma: validation of tissue microarray as a prerequisite for broad clinical applications--a study from the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. *J Clin Oncol*. Mar 2007;25(7):805-812.
27. Díaz-Alderete A, Doval A, Camacho F, et al. Frequency of BCL2 and BCL6 translocations in follicular lymphoma: relation with histological and clinical features. *Leuk Lymphoma*. Jan 2008;49(1):95-101.
28. Dölken G, Illerhaus G, Hirt C, Mertelsmann R. BCL-2/JH rearrangements in circulating B cells of healthy blood donors and patients with nonmalignant diseases. *J Clin Oncol*. Apr 1996;14(4):1333-1344.
29. Donato R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech*. Apr 15 2003;60(6):540-551.
30. eBioscience I. <http://www.ebioscience.com/ebioscience/whatsnew/humanacdchart.htm>. 2010.
31. Farinha P, Masoudi H, Skinnider B, et al. Analysis of multiple biomarkers shows that lymphoma-associated macrophage (LAM) content is an independent predictor of survival in follicular lymphoma (FL). *Blood*. Sep 2005;106(6):2169-2174.
32. Fischer L, Penack O, Gentilini C, et al. The anti-lymphoma effect of antibody-mediated immunotherapy is based on an increased degranulation of peripheral blood natural killer (NK) cells. *Exp Hematol*. Jun 2006;34(6):753-759.
33. Foran J, Gupta R, Cunningham D, et al. A UK multicentre phase II study of rituximab (chimaeric anti-CD20 monoclonal antibody) in patients with follicular lymphoma, with PCR monitoring of molecular response. *Br J Haematol*. Apr 2000;109(1):81-88.
34. Freedman A. Biology and management of histologic transformation of indolent lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2005:314-320.
35. Freedman A. Follicular lymphoma: 2011 update on diagnosis and management. *Am J Hematol*. Sep;86(9):768-775.
36. Gary-Gouy H, Lang V, Sarun S, Boumsell L, Bismuth G. In vivo association of CD5 with tyrosine-phosphorylated ZAP-70 and p21 phospho-zeta molecules in human CD3+ thymocytes. *J Immunol*. Oct 15 1997;159(8):3739-3747.
37. Glas A, Knoops L, Delahaye L, et al. Gene-expression and immunohistochemical study of specific T-cell subsets and accessory cell types in the transformation and prognosis of follicular lymphoma. *J Clin Oncol*. Feb 2007;25(4):390-398.
38. Golay J, Lazzari M, Facchinetti V, et al. CD20 levels determine the in vitro susceptibility to rituximab and complement of B-cell chronic lymphocytic leukemia: further regulation by CD55 and CD59. *Blood*. Dec 2001;98(12):3383-3389.

39. Golay J, Zaffaroni L, Vaccari T, et al. Biologic response of B lymphoma cells to anti-CD20 monoclonal antibody rituximab in vitro: CD55 and CD59 regulate complement-mediated cell lysis. *Blood*. Jun 2000;95(12):3900-3908.
40. Goldin L, Björkholm M, Kristinsson S, Turesson I, Landgren O. Highly increased familial risks for specific lymphoma subtypes. *Br J Haematol*. Jun 2009;146(1):91-94.
41. Graninger W, Seto M, Boutain B, Goldman P, Korsmeyer S. Expression of Bcl-2 and Bcl-2-Ig fusion transcripts in normal and neoplastic cells. *J Clin Invest*. Nov 1987;80(5):1512-1515.
42. Guadagnolo BA, Li S, Neuberger D, et al. Long-term outcome and mortality trends in early-stage, Grade 1-2 follicular lymphoma treated with radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. Mar 1 2006;64(3):928-934.
43. Hainsworth J, Litchy S, Shaffer D, Lackey V, Grimaldi M, Greco F. Maximizing therapeutic benefit of rituximab: maintenance therapy versus re-treatment at progression in patients with indolent non-Hodgkin's lymphoma--a randomized phase II trial of the Minnie Pearl Cancer Research Network. *J Clin Oncol*. Feb 2005;23(6):1088-1095.
44. Harris N, Jaffe E, Diebold J, et al. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol*. Dec 1999;17(12):3835-3849.
45. Herold M, Haas A, Srock S, et al. Rituximab added to first-line mitoxantrone, chlorambucil, and prednisolone chemotherapy followed by interferon maintenance prolongs survival in patients with advanced follicular lymphoma: an East German Study Group Hematology and Oncology Study. *J Clin Oncol*. May 2007;25(15):1986-1992.
46. Herold M, Pasold Rita, Srock Stefanie, Neseser Sabine, Niederwieser Dietger, Neubauer Andreas, Dolken Gottfried, Naumann Ralph, Fietz Thomas, Freund Mathias, Rohrberg Robert, Hoeffken Klaus, Franke Astrid, Iltel Thomas H., Kettner. Results of a Prospective Randomised Open Label Phase III Study Comparing Rituximab Plus Mitoxantrone, Chlorambucile, Prednisolone Chemotherapy (R-MCP) Versus MCP Alone in Untreated Advanced Indolent Non-Hodgkin's Lymphoma (NHL) and Mantle-Cell-Lymphoma (M. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*. 2004;104(11).
47. Hilchey SP, Hyrien O, Mosmann TR, et al. Rituximab immunotherapy results in the induction of a lymphoma idiotype-specific T-cell response in patients with follicular lymphoma: support for a "vaccinal effect" of rituximab. *Blood*. Apr 16 2009;113(16):3809-3812.
48. Horning S. Natural history of and therapy for the indolent non-Hodgkin's lymphomas. *Semin Oncol*. Oct 1993;20(5 Suppl 5):75-88.
49. Horvat M, Kloboves Prevodnik V, Lavrencak J, Jezersek Novakovic B. Predictive significance of the cut-off value of CD20 expression in patients with B-cell lymphoma. *Oncol Rep*. Oct 2010;24(4):1101-1107.
50. Hussin HN, Zulkifli FN, Phang KS, Cheong SK. Dendritic cell distribution in lymphomas. *Malays J Pathol*. Dec 2009;31(2):105-112.
51. Jäeger G, Neumeister P, Brezinschek R, et al. Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) as consolidation of first-line CHOP chemotherapy in patients with follicular lymphoma: a phase II study. *Eur J Haematol*. Jul 2002;69(1):21-26.
52. Jaffe E. The 2008 WHO classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009:523-531.
53. Janikova A, Tichy B, Supikova J, et al. Gene expression profiling in follicular lymphoma and its implication for clinical practice. *Leuk Lymphoma*. Jan 2011;52(1):59-68.
54. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin*.56(2):106-130.
55. Kahn HJ, Marks A, Thom H, Bauml R. Role of antibody to S100 protein in diagnostic pathology. *Am J Clin Pathol*. Mar 1983;79(3):341-347.
56. Kim SW, Tanimoto TE, Hirabayashi N, et al. Myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for non-Hodgkin lymphoma: a nationwide survey in Japan. *Blood*. Jul 1 2006;108(1):382-389.

57. Koolmann J, Röhm K-H. *Taschenatlas der Biochemie*. Vol 3. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2003.
58. Laurent C, Muller S, Do C, et al. Distribution, function, and prognostic value of cytotoxic T lymphocytes in follicular lymphoma: a 3-D tissue-imaging study. *Blood*. Nov 2011;17:118(20):5371-5379.
59. Lee A, Clear A, Calaminici M, et al. Number of CD4+ cells and location of forkhead box protein P3-positive cells in diagnostic follicular lymphoma tissue microarrays correlates with outcome. *J Clin Oncol*. Nov 2006;24(31):5052-5059.
60. Lee SC, Srivastava RM, Lopez-Albaitero A, Ferrone S, Ferris RL. Natural killer (NK):dendritic cell (DC) cross talk induced by therapeutic monoclonal antibody triggers tumor antigen-specific T cell immunity. *Immunol Res*. Aug 2011;50(2-3):248-254.
61. Limbach L. <http://www.labor-limbach.de/ZAP-70-Expression.303.0.html>.
62. Lister T. Improved survival for patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol*. Aug 2005;23(22):4830-4831.
63. Lo Coco F, Gaidano G, Louie D, Offit K, Chaganti R, Dalla-Favera R. p53 mutations are associated with histologic transformation of follicular lymphoma. *Blood*. Oct 1993;82(8):2289-2295.
64. Marcus R, Imrie K, Solal-Celigny P, et al. Phase III study of R-CVP compared with cyclophosphamide, vincristine, and prednisone alone in patients with previously untreated advanced follicular lymphoma. *J Clin Oncol*. Oct 2008;26(28):4579-4586.
65. Montoto S, Davies A, Matthews J, et al. Risk and clinical implications of transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. Jun 2007;25(17):2426-2433.
66. Nakao T, Kurita N, Komatsu M, et al. Expression of thrombospondin-1 and Ski are prognostic factors in advanced gastric cancer. *Int J Clin Oncol*. Apr 2011;16(2):145-152.
67. O'Shea D, O'Riain C, Taylor C, et al. The presence of TP53 mutation at diagnosis of follicular lymphoma identifies a high-risk group of patients with shortened time to disease progression and poorer overall survival. *Blood*. Oct 2008;112(8):3126-3129.
68. Orchard J, Ibbotson R, Best G, Parker A, Oscier D. ZAP-70 in B cell malignancies. *Leuk Lymphoma*. Dec 2005;46(12):1689-1698.
69. Pittaluga S, Ayoubi T, Wlodarska I, et al. BCL-6 expression in reactive lymphoid tissue and in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *J Pathol*. Jun 1996;179(2):145-150.
70. Plosker G, Figgitt D. Rituximab: a review of its use in non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia. *Drugs*. 2003;63(8):803-843.
71. Preis D, ed *Taschenbuch Onkologie, interdisziplinäre Empfehlungen zur Therapie*. München 2010/11.
72. Prevodnik VK, Lavrencak J, Horvat M, Novakovic BJ. The predictive significance of CD20 expression in B-cell lymphomas. *Diagn Pathol*. 2011 6:33.
73. Prochazka V, Papajik T, Jarosova M, Indrak K. Prognostic factors in follicular lymphoma in the rituximab era: how to identify a high-risk patient? *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. Jun 2011;155(2):99-108.
74. Ritter M, Kattmann D, Teichler S, et al. Inhibition of retinoic acid receptor signaling by Ski in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. Mar 2006;20(3):437-443.
75. Rohatiner A, Gregory W, Peterson B, et al. Meta-analysis to evaluate the role of interferon in follicular lymphoma. *J Clin Oncol*. Apr 2005;23(10):2215-2223.
76. Ross C, Ouillette P, Saddler C, Shedden K, Malek S. Comprehensive analysis of copy number and allele status identifies multiple chromosome defects underlying follicular lymphoma pathogenesis. *Clin Cancer Res*. Aug 2007;13(16):4777-4785.

77. Roulland S, Navarro J, Grenot P, et al. Follicular lymphoma-like B cells in healthy individuals: a novel intermediate step in early lymphomagenesis. *J Exp Med.* Oct 2006;203(11):2425-2431.
78. Salles G, Mounier N, de Guibert S, et al. Rituximab combined with chemotherapy and interferon in follicular lymphoma patients: results of the GELA-GOELAMS FL2000 study. *Blood.* Dec 2008;112(13):4824-4831.
79. Salles GA. Clinical features, prognosis and treatment of follicular lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2007:216-225.
80. Schweighofer CD, Coombes KR, Barron LL, et al. A two-gene signature, SKI and SLAMF1, predicts time-to-treatment in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *PLoS One.* 2011;6(12):e28277.
81. Shafer D, Smith MR, Borghaei H, et al. Low NK cell counts in peripheral blood are associated with inferior overall survival in patients with follicular lymphoma. *Leuk Res.* Oct 2013;37(10):1213-1215.
82. Shuptrine CW, Surana R, Weiner LM. Monoclonal antibodies for the treatment of cancer. *Semin Cancer Biol.* Feb 2012;22(1):3-13.
83. Solal-Céligny P, Roy P, Colombat P, et al. Follicular lymphoma international prognostic index. *Blood.* Sep 2004;104(5):1258-1265.
84. Stein H, Gerdes J, Mason D. The normal and malignant germinal centre. *Clin Haematol.* Oct 1982;11(3):531-559.
85. Swenson W, Wooldridge J, Lynch C, Forman-Hoffman V, Chrischilles E, Link B. Improved survival of follicular lymphoma patients in the United States. *J Clin Oncol.* Aug 2005;23(22):5019-5026.
86. Taskinen M, Karjalainen-Lindsberg ML, Nyman H, Eerola LM, Leppa S. A high tumor-associated macrophage content predicts favorable outcome in follicular lymphoma patients treated with rituximab and cyclophosphamide-doxorubicin-vincristine-prednisone. *Clin Cancer Res.* Oct 1 2007;13(19):5784-5789.
87. Teichler S, Schlenk RF, Strauch K, Hagner NM, Ritter M, Neubauer A. Expression of the nuclear oncogene Ski in patients with acute myeloid leukemia treated with all-trans retinoic acid. *Haematologica.* Jul 2008;93(7):1105-1107.
88. Toze CL, Barnett MJ, Connors JM, et al. Long-term disease-free survival of patients with advanced follicular lymphoma after allogeneic bone marrow transplantation. *Br J Haematol.* Nov 2004;127(3):311-321.
89. Vignais ML. [Ski and SnoN: antagonistic proteins of TGFbeta signaling]. *Bull Cancer.* Feb 2000;87(2):135-137.
90. Wahlin B, Aggarwal M, Montes-Moreno S, et al. A unifying microenvironment model in follicular lymphoma: outcome is predicted by programmed death-1--positive, regulatory, cytotoxic, and helper T cells and macrophages. *Clin Cancer Res.* Jan 2010;16(2):637-650.
91. Wahlin B, Sander B, Christensson B, Kimby E. CD8+ T-cell content in diagnostic lymph nodes measured by flow cytometry is a predictor of survival in follicular lymphoma. *Clin Cancer Res.* Jan 2007;13(2 Pt 1):388-397.
92. Winiarska M, Glodkowska-Mrowka E, Bil J, Golab J. Molecular mechanisms of the antitumor effects of anti-CD20 antibodies. *Front Biosci.* 2011;16:277-306.
93. Witzig T, Vukov A, Habermann T, et al. Rituximab therapy for patients with newly diagnosed, advanced-stage, follicular grade I non-Hodgkin's lymphoma: a phase II trial in the North Central Cancer Treatment Group. *J Clin Oncol.* Feb 2005;23(6):1103-1108.
94. Xu Y, McKenna RW, Kroft SH. Assessment of CD10 in the diagnosis of small B-cell lymphomas: a multiparameter flow cytometric study. *Am J Clin Pathol.* Feb 2002;117(2):291-300.
95. Young R, Longo D, Glatstein E, Ihde D, Jaffe E, DeVita VJ. The treatment of indolent lymphomas: watchful waiting v aggressive combined modality treatment. *Semin Hematol.* Apr 1988;25(2 Suppl 2):11-16.
96. Zola H, Swart B, Nicholson I, et al. CD molecules 2005: human cell differentiation molecules. *Blood.* Nov 1 2005;106(9):3123-3126.

## **Abkürzungsverzeichnis**

ADCC - Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität, engl antibody dependent cellular cytotoxicity

AK - Antikörper

ALL - akute lymphatische Leukämie

AML - akute myeloische Leukämie

Bcl - engl. B-cell-lymphoma

BOP - Bendamustin + Vincristin + Prednison

CD - engl. Cluster of differentiation

CHOP - Cyclophosphamid + Doxorubicin + Vincristin + Prednison

CLL - Chronische lymphatische Leukämie

CR - Komplettremission, engl. complete remission

CVP - Cyclophosphamid + Vincristin + Prednison

DLBCL - Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom, engl. diffuse large B-cell-lymphoma

EDTA - Ethylendiamintetraessigsäure

FC - Fludarabin + Cyclophosphamid

FCM - Fludarabin + Cyclophosphamid + Mitoxantron

FISH - Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

FL - Follikuläres Lymphom

FLIPI - Follicular Lymphoma International Prognostic Index

FOXP3 - engl. forkhead box protein 3

HLA - Humanes Leukozytenantigen

Hpf - engl. high power field

KM - Knochenmark

KI - Konfidenzintervall

LK - Lymphknoten

mAK - monoklonaler Antikörper

MCP - Mitoxantron + Chlorambucil + Prednison

MHC - engl. major-histocompatibility-complex

NCAM - engl. neural cell adhesion molecule

NHL - Non-Hodgkin-Lymphom

NK-Zellen - natürliche Killerzellen

OS - Gesamtüberleben, engl. overall survival

PCR - Polymerase Kettenreaktion, engl. polymerase chain reaction

PFS - Progressionsfreies Überleben, engl. progression free survival

PLC  $\gamma$  - Phospholipase-C- $\gamma$

R - Rituximab

ZAP-70 - Zeta-assoziiertes Protein 70

## Zusammenfassung

Patienten mit follikulären Lymphomen weisen große Unterschiede bezüglich des Verlaufs, Therapieansprechens und des Überlebens auf, wobei das Tumorgrading sowie der Follicular Lymphoma International Prognostic Index (FLIPI) nicht immer eindeutig mit der Prognose korrelieren. Einen vielversprechenden prädiktiven Faktor stellt die Untersuchung des Microenvironment dar, der Tumor-infiltrierenden Zellen des Immunsystems. Die Hypothese, dass das follikuläre Lymphom eine immunologische Erkrankung ist, in der die Interaktion der Tumorzellen mit den umgebenden Bystanderzellen das gesamte klinische Bild prägt, gilt mittlerweile als bestätigt. Den Tumor-infiltrierenden T-Zellen und dendritischen Zellen wird ein positiver, den Makrophagen ein negativer prognostischer Einfluss zugeschrieben. Der Antikörper Rituximab hat in mehreren Studien seine therapeutische Wertigkeit in der Behandlung follikulärer Lymphome unter Beweis gestellt. In seiner Funktionsweise spielen direkte Apoptoseinduktion, Komplement vermittelte Zytotoxizität aber auch die Vermittung Zell gebundener Zytotoxizität eine Rolle.

**Ziel der Arbeit:** Die in dieser Arbeit untersuchten Patienten und Daten stammen aus der von Herold et al. 2007 veröffentlichten Studie, welche den positiven prognostischen Einfluss des CD20-Antikörpers Rituximab gegenüber alleiniger Chemotherapie in Patienten mit follikulären Lymphomen zeigt. Ziel war es zu untersuchen, ob die Bedeutung bestimmter Bystanderzellen in einem einheitlich chemotherapeutisch behandelten Kollektiv durch die Gabe von Rituximab beeinflusst wird.

**Methoden:** Mithilfe immunhistochemischer Färbung von spezifischen Oberflächenmerkmalen von T-, natürlichen Killer (NK)- und dendritischen Zellen, Monozyten, dem intrazellulären Protein Ski, PLC  $\gamma$  und ZAP 70, wurden die entsprechenden Zellen computergestützt quantifiziert. 18 Patienten wurden an Hand des Infiltrationsgrades (hoch/niedrig) in zwei Gruppen aufgeteilt, wonach jeweils bezogen auf die Lokalisation der Zellen (intra-/extrafollikulär) die Untersuchung des progressionsfreien Überleben (PFS) erfolgte.

**Ergebnisse:** Bei isolierter Betrachtung der Infiltration durch einzelne Bystanderzellen ließ sich bei der Auswertung unserer Daten kein Unterschied in der Prognose darstellen.

In Zusammenhang mit der Rituximab-Therapie zeigte sich die Ausprägung einiger Antigene jedoch mit einem verlängerten PFS assoziiert, wobei sich hier ein bestimmtes Muster erkennen ließ. Insbesondere Patienten mit einem in der Literatur vorbeschrieben nachteiligem Infiltrationsmuster profitierten von der zusätzlichen Therapie mit dem CD20-AK: In unserem Kollektiv war das PFS der Patienten mit niedriger Anzahl intrafollikulärer T-Zellen in der Rituximab-Gruppe signifikant verlängert (identifiziert über CD3 ( $p=0,0221$ ), CD8 ( $p=0,0500$ ) und ZAP70 ( $p= 0,0401$ )). Desweiteren profitierten Patienten mit hoher Makrophagenanzahl von der Rituximab-Therapie ( $p=0,0419$ ). Es lässt sich also vermuten, dass eine zusätzliche Gabe von Rituximab den prognostischen Nachteil von Patienten mit o.g. Infiltrationsmuster überkommen kann, bzw. sich der therapeutische Effekt bei diesen Patienten deutlicher beobachten lässt.

Desweiteren zeigte sich eine hohe Anzahl extrafollikulärer NK-Zellen (identifiziert über CD56) mit einem verlängerten PFS in der Rituximab-Kohorte vergesellschaftet, was möglicherweise durch eine stärkere Antikörper vermittelte Zytotoxizität zur Entwicklung des Therapieeffektes zu erklären ist.

Bezüglich des primären Angriffspunktes von Rituximab war in der Gruppe mit niedriger Anzahl extrafollikulärer CD20-positiver Zellen unter Rituximab das PFS verlängert. Dies lässt möglicherweise den Rückschluss zu, dass der Antikörper bei hoher Anzahl extrafollikulärer B-Zellen nicht ausreichend ins Follikelzentrum vordringen kann, und eine Dosissteigerung einen besseren therapeutischen Effekt bedeuten könnte.

**Ausblick:** Insbesondere auch unter der Therapie mit Rituximab scheint die genauere Betrachtung der tumorinfiltrierenden Bystanderzellen des Immunsystems einen prognostischen Wert zu haben. Die hier gewonnen Ergebnisse sollten jedoch an einem größeren einheitlich behandelten Patientenkollektiv validiert werden.

## Summary

Patients with Follicular Lymphoma show great differences in the progression, response to therapy and survival, whereas the tumor grading and the Follicular Lymphoma Prognostic Index (FLIPI) do not always correlate unambiguously with the prognosis. A promising predicting factor could be found in the examination of the microenvironment, the tumor infiltrating cells of the immune system. The supposition, that the follicular lymphoma can be viewed as an immunological disease, in which the interaction between tumor-cells and bystander-cells give distinction to the clinical features, is generally accepted. Tumor-infiltrating T-Lymphocytes as well as dendritic cells is ascribed a positive, macrophages a negative prognostic effect. The antibody Rituximab was able to prove its therapeutic value in treatment of follicular lymphoma in multiple studies. Direct induction of apoptosis, complement mediated lysis and antibody dependent cellular cytotoxicity play a role in its mode of operation.

**Purpose:** This thesis was conducted following up on a study which Herold et al published in 2007, showing the positive prognostic impact of the CD20-antibody Rituximab in comparison to exclusively applied chemotherapy in treatment of patients with follicular lymphoma. Our purpose was to investigate whether the significance of specific bystander-cells is influenced by Rituximab in a uniformly chemotherapeutically treated cohort.

**Methods:** With help of immunohistochemical staining of specific surface antigens of T-, natural killer (NK)- and dendritic cells, monocytes, the intracellular protein Ski, PLC $\gamma$  and ZAP70 we were able to quantify the cells by a computerized method. For each antigen, the 18 investigated patients were subdivided into groups by the amount of infiltrating cells (high/low) and, regarding the location of the cells (intra-/extrafollicular), the progression free survival was investigated.

**Results:** Investigation of the amount of infiltrating bystander cells alone showed no significant difference in prognosis. In correlation with the Rituximab-therapy

however the expression of some antigens could be associated with prolonged PFS and we were able to detect certain patterns:

Patients with infiltration patterns, which were priorly described in literature as having an adverse effect on prognosis, particularly benefitted from therapy with the CD20-antibody. PFS of patients with low amounts of intrafollicular T-Cells in the Rituximab-cohort was significantly increased (identified by CD3 ( $p=0,0221$ ), CD8 ( $p=0,0500$ ) und ZAP70 ( $p= 0,0401$ )). Furthermore, patients with high counts of macrophages showed prolonged PFS under therapy with Rituximab ( $p=0,0419$ ). Hence it may be presumed, that an additional therapy with Rituximab can overcome the prognostic disadvantage of patients with above mentioned infiltration patterns, or respectively, that the therapeutic effect shows more distinctly with those patients.

Furthermore a high amount of extrafollicular NK-cells (identified by CD56) was associated with longer PFS in the Rituximab-cohort, which can possibly be explained by an increased antibody dependent cellular cytotoxicity to develop the therapeutic effect. Concerning the prime object of the CD20-antibody, PFS under Rituximab-therapy was prolonged in the subgroup with low counts of infiltrating CD20-positive cells in the extrafollicular region ( $p=0,0328$ ). This could possibly lead to the conclusion that a higher dose of the antibody might be needed to reach the b-cells in the center of the follicle in patients with high extrafollicular CD20-cell-counts.

**Perspective:** Especially under therapy with Rituximab, the close investigation of tumor infiltrating bystander-cells of the immune system also seems to hold an important prognostic value. The results of this study should however be validated by further investigations within a larger, uniformly treated collective.

## **Verzeichnis der akademischen Lehrer**

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren bzw. Privat-Dozenten

### Universität Marburg:

Aumüller, Barth, Basler, Bauer, Baum, Becker, Berger, Bien, Cetin, Christian-  
sen, Czubayko, Daut, Dietrich, Feuser, Görg, Gress, Grimm, Griss, Gotzen,  
Hertel, Herzum, Hofbauer, Hoffmann, Hoyer, Kaltenborn, Kann, Klose, Krieg,  
Kretschmer, Lill, Löffler, Löffler, Maier, Maisch, Mandrek, Meyer, Moll, Mutters,  
Mueller, Müller, Oertel, Neubauer, Renz, Remschmidt, Richter, Röhm, Roth-  
mund, Rößer, Ruchholtz, Schäfer, Vogelmeier, Wagner, Weihe, Werner, West-  
ermann, Wulf

### Universität Stellenbosch, Südafrika:

Apffelstaedt, Warren

## **Danksagung**

Ich danke meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. Neubauer, für die motivierte und motivierende Betreuung meiner Doktorarbeit, für die zahlreichen Anregungen und Ideen, die Hilfe bei der Interpretation der Ergebnisse und für das Wecken von Begeisterung für die Thematik.

Besonderer Dank gebührt auch Herrn Dr. Christian Wilhelm für die geduldige Unterstützung und Herrn Dr. Jörg Jäckel sowie den Mitarbeitern des Institutes für Pathologie für die Anfertigung der Präparate und die Hilfeleistung bei der Auswertung.

Sehr wichtig für mich war jedoch auch die Unterstützung meiner Familie, Freunde und Kollegen, bei denen ich mich ganz herzlich bedanken möchte. Meiner Mutter danke ich, obgleich manche Motivationsreden zum Teil auf taube Ohren stießen, von ganzem Herzen für die selbigen. Bei Klaus Giersiepen bedanke ich mich herzlich für die Hilfe bei der Interpretation der Daten. Meinem Freund Johannes Frevel danke ich sehr für die Hilfe bei der Formatierung und Gestaltung, aber ganz besonders auch für die seelische Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit. Nicht zuletzt möchte ich allen Danke sagen, die mir beim letzten großen Schritt, der Disputation, zur Seite gestanden haben, ihr wart mir eine große Stütze.