Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Tumorimmunologie (Campus Virchow-Klinikum) der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Lymphomzell-Seneszenz als Wirkmechanismus des therapeutischen Antikörpers Rituximab

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jan <u>Henry</u> Matthias Däbritz aus Berlin

Datum der Promotion: 25.10.2013.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzı	ung	sverzeichnis	5
1	Ab	strakt/Abstract	7
2	Eir	nleitung	11
2.1	B-	Zell-Non-Hodgkin-Lymphome	11
2.2	Zy	tostatika wirken auf zelluläre Signal-Kaskaden	12
2.3	Se	neszenz als Effektor-Programm antineoplastischer Therapien	13
2.4	Rit	tuximab in der Behandlung maligner B-Zell-Lymphome	17
2.5	He	erleitung der wissenschaftliche Fragestellung, spezifische	
	Zie	elesetzungen und technische Umsetzung	19
3	Me	ethodik	23
3.1	Ku	ıltivierung humaner B-Zell-Linien	23
3.2	De	etektion Seneszenz-assoziierter-β-Galaktosidase-Aktivität	23
3.3	Dυ	rchflusszytometrie (FACS)	24
3.3	.1	Analysen von Streueigenschaften und Membran-Antigenen	24
3.3	.2	Zellzyklus-Analyse: Bromodeoxyuridin-Inkorporation/Propidiumjodid	25
3.3	.3	Messung intrazellulärer freier Sauerstoff-Radikale (ROS)	26
3.3	.4	Messung von Zytokin-Konzentrationen in Medium-Überständen	26
3.4	lm	munfluoreszenz	27
3.5	Qι	uantitative Real-Time-PCR (RQ-PCR)	28
3.6	We	estern Blots	29
3.7	Üb	perlegungen zur Anwendung statistischer Methoden und Testverfahren	31
3.8	eir	ngesetzte Stoffe und Geräte	32
4	Er	gebnisse	39
4.1	Na	ach DNA-schädigender Behandlung tritt in Lymphom-Linien	
	eir	n langfristiger Wachstumsarrest auf	39
4.2	Ex	perimentalbedingungen zur Analyse Zell-autonomer Wirkungen	
	eir	ner Rituximab-basierten Antikörper-Behandlung	40

Inhaltsverzeichnis

4.3	Gegen CD20 gerichtete Immuntherapie löst Lymphomzell-Seneszenz aus	. 44
4.4	Reaktive Sauerstoffradikale sind wichtige Mediatoren Rituximab-vermittelter Seneszenz	. 47
4.5	Rituximab sensibilisiert Lymphomzellen für Zytostatika-induzierte Seneszenz und DNA-Schädigungssignale	
4.6	Zusätzliche anti-CD20-Behandlung verstärkt den Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyp nach Chemotherapie	. 54
5	Diskussion	. 57
6	Literaturverzeichnis	. 65
7	Eidesstattliche Versicherung	. 71
8	Lebenslauf	. 73
9	Publikationsliste	. 74
10	Danksagung	. 75

Abkürzungsverzeichnis

ADR Adriamycin = Doxorubicin

Bcl-2 Onkogen "B-cell lymphoma 2"

BrdU 5-Bromo-2'-deoxyuridin

B-CLL chronisch lymphatische Leukämie der B-Zell-Reihe

B-NHL B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom

bzw. beziehungsweise

CD cluster of differentiation

CL "Cross-Linker": F(ab')₂-Fragment eines gegen humanes

Immunglobulin G gerichteten Antikörpers

DDR DNA damage response: zelluläre Antwort auf DNA-Schädigung

DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

d. h. das heißt

DLBCL diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom

DNA Desoxyribonukleinsäure

FACS Fluorescence-activated Cell Sorting

FBS fetales bovines Serum

Fitc Fluoresceinisothiocyanat

FL Fluoreszenzbereich am Durchflusszytometer

FSC forward scatter (Vorwärtsstreuung am Durchflusszytometer)

GAPDH Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase

IL-6 Interleukin 6
IL-8 Interleukin 8

min Minuten ml Milliliter

NAC N-Acetylcystein
PE Phycoerythrin
PI Propidiumjodid

PCR polymerase chain reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
rcf relative centrifugal force (Vielfaches der Erdbeschleunigung)

RNA Ribonukleinsäure

RTX Rituximab

RTX_{CL} Rituximab mit folgender Zugabe des Cross-Linkers

<u>Abkürzungsverzeichnis</u>

SA- β -Gal Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase

SASP Seneszenz-assoziierter sekretorischer Phänotyp

s. g. so genannt

SSC side scatter (Seitwärtsstreuung am Durchflusszytometer)

s. o. siehe obens. u. siehe unten

u. a. unter anderem

ub unbehandelte Kontrolle

vgl. vergleichez. B. zum Beispiel

z. T. zum Teil

1 Abstrakt/Abstract

Einleitung: Trotz seines in der Behandlung maligner B-Zell-Lymphome weit verbreiteten klinischen Einsatzes sind die antineoplastischen Wirkmechanismen des Antikörpers Rituximab bisher nicht hinreichend aufgeklärt. Zelluläre Seneszenz tritt als langfristiger Wachstumsarrest vitaler Malignom-Zellen nach zytostatischer Therapie auf und hat weitreichende Einflüsse auf die Tumorbiologie sowie -prognose. Ob Rituximab nach Immun-Effektor-Kaskaden Ligation seines Zielantigens CD20 neben und programmiertem Zelltod auch Lymphomzell-Seneszenz auslösen kann, war bisher unbekannt. Methodik: Ausgewählte B-Zell-Lymphom-Linien, in denen nach zellulärer zytostatischer Behandlung wesentliche Charakteristika Seneszenz nachweisbar waren, wurden, z.T. unter zusätzlichem Einsatz pharmakologischer Inhibitoren, in vitro mit Rituximab-basierter Immuntherapie oder Immunchemotherapie behandelt. Dabei wurden das Wachstumsverhalten, das Auftreten Seneszenz-typischer morphologischer und sekretorischer Veränderungen sowie der Aktivierungszustand ausgewählter, zelluläre Seneszenz regulierender Signalwege untersucht. Ergebnisse: Nach Rituximab-basierter Immuntherapie trat in den analysierten Zelllinien-Modellen - wenn auch in geringerem Ausmaß als durch Behandlung mit dem Anthrazyklin Adriamycin erreichbar – ein seneszenter Phänotyp auf. Dieser wurde intrazellulär offenbar vor allem durch reaktive Sauerstoff-Radikale vermittelt. In kombinierten Ansätzen zeigte sich eine deutliche Erhöhung der Fraktion seneszenter Zellen nach moderater Adriamycin-Behandlung durch zusätzliche gegen CD20 gerichtete Immuntherapie. Passend dazu wurden nach Immunchemotherapie eine im Vergleich zu alleiniger Adriamycin-Behandlung stärkere Aktivierung der DNA-Schadensantwort-Signalkaskade sowie die vermehrte Sekretion der Seneszenz-assoziierten Zytokine Interleukin 6 und Interleukin 8 beobachtet. Diskussion: Langfristig Zellkulturbedingungen adaptierte Zelllinien stellen keine idealen Modellsysteme für die mechanistische Dissektion zellulärer Seneszenz dar und die Übertragbarkeit der in ihnen gewonnenen Experimentalergebnisse auf primäre humane B-Zell-Lymphome muss daher noch kritisch geprüft werden. Dennoch weisen die dargelegten Beobachtungen auf Lymphomzell-Seneszenz als bisher nicht bekannte zellbiologische Wirkung des im klinischen Alltag häufig eingesetzten Antikörpers Rituximab hin und legen – in Übereinstimmung mit anderen Forschungsberichten – eine Erhöhung der Empfindlichkeit maligner Lymphomzellen für durch Zytostatika vermittelte DNA-

Abstrakt/Abstract

Schadenssignale als einen wesentlichen Wirkmechanismus gegen CD20 gerichteter Immuntherapien nahe. Aufgrund der weitreichenden tumorbiologischen und klinischen Implikationen in malignen Lymphomen nach Rituximab-Behandlung auftretender Seneszenz sollten weiterführende wissenschaftliche Untersuchungen zu deren besseren Verständnis durchgeführt werden.

Introduction: Despite its broad clinical application in lymphoma therapy, the mechanisms by which the antibody rituximab exerts its antineoplastic activity have not been fully elucidated. Malignant cells may enter cellular senescence, a permanent growth arrest with strong impact on tumor biology and prognostic relevance, in response to cytostatic agents. Whether ligation of its target antigen CD20 by rituximab, besides recruiting classical immune effector functions and triggering apoptotic cell death, may result in lymphoma cell senescence as well was not known. Methods: B-cell lymphoma cell lines, that had been selected based on their capability to display characteristic features of senescence after cytostatic treatment, were exposed to rituximab-based immunotherapy or immunochemotherapy in vitro, with additional application of pharmacological inhibitors in some experiments. Growth characteristics, morphological and secretory changes associated with cellular senescence as wells as activation of selected senescence-regulating signaling pathways were monitored. Results: Rituximab-based immunotherapy induced a senescent phenotype in cell lines derived from human B-cell lymphomas, albeit to a lower extent than the anthracycline adriamycin at optimal concentration. Rituximab-induced senescence seemed to be mediated by intracellular reactive oxygen species. When applied together with a moderate concentration of adriamycin, additional anti-CD20 treatment strongly enhanced the fraction of lymphoma cells entering cellular senescence. In line with this, after combined immunochemotherapy, stronger activation of the DNA damage response signaling cascade as well as enhanced secretion of senescence-associated cytokines interleukin 6 and interleukin 8 in comparison to single agent adriamycin treatment were detected. Discussion: Mechanistic dissection of cellular senescence in established multi-passage cell lines has fundamental limitations. Therefore, the findings of this work need to be critically reassessed in primary human B-cell lymphomas. However, the observations point towards cellular senescence as a hitherto unrecognized consequence of CD20-directed immunotherapy and underscore enhancement of lymphoma cell susceptibility to chemotherapy-induced DNA damage signaling as an essential antineoplastic mechanism of the standard anti-lymphoma compound rituximab. With regard to the broad implications of rituximab-mediated lymphoma cell senescence in tumor biology and clinical settings, further scientific analyses are needed in order to gain a better understanding of this antineoplastic principle.

2 Einleitung

2.1 B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome

Non-Hodgkin-Lymphome, maligne Neubildungen der Lymphozyten, stehen mit einer Inzidenzrate von 15,4 jährlichen Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner für Frauen und 18,1 für Männer an neunter bzw. zehnter Stelle der häufigsten erstdiagnostizierten bösartigen Tumoren in Deutschland (statistische Angaben ohne die im Bericht des Robert-Koch-Instituts gesondert analysierte Entität Plasmozytom, aktuellste verfügbare Daten für das Jahr 2008). Die Prognose von Lymphom-Erkrankungen muss mit einer (über alle Entitäten gemittelten) relativen 5-Jahres-Überlebensrate von 68 % für Frauen und 65 % für Männer als zwar im Vergleich zu vielen anderen malignen Neoplasien eher günstig, jedoch insgesamt noch unbefriedigend eingeschätzt werden.

Neben wesentlichen Unterschieden zwischen verschiedenen Lymphom-Arten in ihrem Spontanverlauf sowie ihrer therapeutischen Beeinflussbarkeit bestimmen für den individuellen Patienten typischerweise auch das Erkrankungsstadium, das Alter des Erkrankten und seine Ko-Morbiditäten die Wahrscheinlichkeit eines langfristigen Behandlungserfolgs. Auch wenn bekannt ist, dass einige Viruserkrankungen (z. B. Infektionen mit dem humanen Immundefizienz-Virus oder dem Ebstein-Barr-Virus) sowie angeborene oder erworbene Immundefekte das Erkrankungsrisiko für maligne Lymphome erhöhen und eine Vielzahl von Stoffen als mögliche Noxen diskutiert werden, bleibt in der Mehrzahl der Erkrankungsfälle kein spezifischer Auslöser nachweisbar. Auslöser

Nach dem Proliferationsindex und der Morphologie der bösartig entarteten Zellen können in der pathologischen Beurteilung "niedrigmaligne" von "hochmalignen" bzw. "aggressiven" Lymphomen unterschieden werden, wobei hochmaligne Lymphome (wie z.B. das diffus-großzellige B-Zell-Lymphom, DLBCL) typischeraber nicht notwendigerweise einen dramatischeren Spontanverlauf als niedrigmalige Lymphome (wie z. B. die chronisch-lymphatische Leukämie der B-Zell-Reihe, CLL) aufweisen.⁴ Der histologisch durch die diese Erkrankung definierenden "Sternberg-Reed-" und "Hodgkin-Zellen" sowie ein überwiegendes Begleitinfiltrat nicht-maligner charakterisierte "Morbus Hodgkin" wird als eigenständige Erkrankungsgruppe von den "Non-Hodgkin-Lymphomen" abgegrenzt.⁴ Non-Hodgkin-Lymphome der B-Zell-Reihe treten deutlich häufiger als die in dieser Arbeit wie das Hodgkin-Lymphom nicht diskutierten malignen Entartungen der T- oder NK-Zellen auf. 1,3

Die bemerkenswerte Tatsache. viele Lymphom-Entitäten dass typische morphologische und biologische Eigenschaften einer jeweils charakteristischen Entwicklungsstufe der Lymphozyten-Reifung widerspiegeln, wird in der aktuellen Erkrankungsklassifikation für lymphatische Neoplasien der "World Health Organization" berücksichtigt. 4,6,7 Während der Reifung zu terminal differenzierten B-Zellen mit höchstmöglicher Immunglobulin-Spezifität für ein einziges Antigen finden – durch temporäre Anschaltung genetischer Rekombinationsgezielte Mutationsmechanismen – mehrere irreversible Modifikationen der B-lymphozytären DNA statt.⁷ Die aus einem bei diesen DNA-Modifikationen auftretenden Fehler möglicherweise resultierende konstitutive Aktivierung zellulärer Onkogene kann (z. B. über eine Erhöhung der Schwelle für Apoptose durch die konstitutive Anschaltung von Bcl-2) zu einem Wachstums- und/oder Überlebensvorteil der betroffenen Zelle auf ihrer erreichten Reifungsstufe führen und so die für die Entartung zum malignen Lymphom notwendige Akkumulation weiterer genetischer Defekte begünstigen.⁷ Daher sind in Non-Hodgkin-Lymphomen mit zyto- und molekulargenetischen Methoden gehäuft charakteristische genetische Alterationen (wie etwa Translokationen zellulärer Onkogene unter Beteiligung des für die schwere Immunglobulin-Kette kodierenden IgH-Lokus) nachweisbar.4,8

In den letzten Jahren gerät neben der chronischen Stimulation maligner Zellen durch Antigene vor allem auch die Interaktion entarteter Lymphomzellen mit ihrer nichtmalignen Umgebung ("Microenvironment") als bei vielen Entitäten für das maligne Wachstum essentiell und den Erkrankungsverlauf wesentlich beeinflussend in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses.⁸⁻¹⁰ Da das DLBCL, die häufigste Lymphom-Genexpressionsanalysen als Entität, mithilfe von heterogene Gruppierung abgrenzbarer, von verschiedenen pathogenetischen Prozessen abhängiger Erkrankungen mit divergierender Prognose charakterisiert werden konnte, werden derartige Untersuchungen hochwahrscheinlich Grundlage zukünftiger eine Erkrankungsklassifikationen und Risiko-adaptierter Behandlungskonzepte für maligne Lymphome bilden. 3,10,11

2.2 Zytostatika wirken auf zelluläre Signal-Kaskaden

Die systemische Applikation von Zytostatika stellt seit Jahrzehnten eine Hauptsäule gegen Lymphome gerichteter Behandlungsstrategien dar, wobei meist Kombinationen antineoplastisch wirksamer Substanzen mit verschiedenen zellulären Angriffspunkten und Nebenwirkungsprofilen die Wirksamkeit auf die maligne Zellen bei möglichst geringer Toxizität für gesunde Gewebe maximieren und einer Resistenzentstehung im Tumor entgegenwirken sollen. Der typische Wirkmechanismus konventioneller Zytostatika ist der störende Eingriff in den für das maligne Wachstum essentiellen Prozess der Zellteilung, am häufigsten durch direkte Schädigung des DNA-Stoffwechsels ("DNA damage"). So wirkt z. B. die Medikamentengruppe der Anthrazykline, zu der die in dieser Arbeit verwendete Substanz Adriamycin (Doxorubicin) gehört, vor allem über eine Inhibierung des für die DNA-Replikation essentiellen Enzyms Topoisomerase II. 15

Seit langer Zeit ist bekannt, dass Zytostatika maligne Zellen nicht unselektiv "vergiften", sondern wie andere externe Stressoren (z. B. ionisierende Strahlung) den Aktivierungszustand intrazellulärer Signalkaskaden (insbesondere der "DNA damage response"-Signalwege) modulieren und dadurch zelluläre Effektor-Programme wie Apoptose, Autophagie, mitotische Katastrophe und Seneszenz initiieren können. ¹⁶⁻¹⁸

Nach der Detektion Zytostatika-induzierter DNA-Doppelstrangbrüche wird an deren Lokalisationen die Histon H2.A-Variante H2A.X von der DNA-abhängigen Protein-Kinase ATM ("ataxia telangiectasia-mutated") an Serinrest 139 phosphoryliert. ¹⁹ Daher ist der Nachweis des an Serin 139 phosphorylierten H2A.X (γ-H2A.X) als früher Marker für DNA-Doppelstrangbrüche etabliert. ¹⁴ ATM vermittelt (über dessen Phosphorylierung an Serinrest 15) weiterhin die Stabilisierung und Aktivierung des Tumor-Suppressors p53, der dann – in Abhängigkeit von der Stärke des DNA-Schadens – eine Reparatur des Schadens, apoptotischen Zelltod oder zelluläre Seneszenz (nach transkriptioneller Aktivierung des p53-Zielgens p21, s. u.) initiieren kann. ^{17,20} Die vorhandene bzw. verlorene genetische Integrität DNA-Schadenssignale und -Reparatur vermittelnder Signalkaskaden in einer Tumorzelle bestimmt somit wesentlich deren Empfindlichkeit und Antwort gegenüber einer festen Dosierung eines Zytostatikums. ¹⁶

2.3 Seneszenz als Effektor-Programm antineoplastischer Therapien

Wie bereits dargestellt, kann eine antineoplastische Behandlung mit DNAschädigenden Substanzen einen terminalen Zellzyklus-Arrest vitaler, Stoffwechselaktiver Tumorzellen verursachen. Der dabei auftretende Phänotyp besitzt bemerkenswerte morphologische und biochemische Ähnlichkeiten mit dem seit Jahrzehnten bekannten, bei der Kultur nicht maligne transformierter Körperzellen nach circa 40-60 mitotischen Teilungen (s. g. "Hayflick Limit") wahrscheinlich als Folge der mitotischen Telomer-Verkürzungen zu beobachtenden irreversiblen Teilungsstopp ("replikative Seneszenz") und wird daher zusammen mit anderen akut induzierbaren Seneszenz-Formen als "prämature Seneszenz" bezeichnet. 21-25 Die erhaltene Fähigkeit maligne entarteter B-Zellen zur Anschaltung zellulärer Seneszenz als Antwort auf DNA-schädigende Therapien ("Therapie-induzierte Seneszenz") ist in einem präklinischen Modellsystem bereits als prognostisch günstig erkannt worden. 26

Nach aktuellem Forschungsstand wird prämature Seneszenz, die auch im Falle einer Aktivierung zellulärer Onkogene in zuvor gesunden Zellen deren maligne Transformation als "Anti-Tumor-Barriere" durch terminale Wachstumsarretierung verhindern kann ("Onkogen-induzierte Seneszenz"), über dauerhafte epigenetische Abschaltung proliferationsfördernder Genaktivitäten vermittelt (z. B. durch die spezifische Trimethylierung des Histons H3 an Lysinrest 9 durch die Histon-Methyltransferase Suv39h1 und die lokale Konversion von Eu- in Heterochromatin). ²⁷⁻³²

Die Fähigkeit zur Exekution und Aufrechterhaltung zellulärer Seneszenz ist in den meisten, jedoch jeweils nicht allen untersuchten Modellsystemen von intakten Funktionen der Tumor-Suppressoren p53, Retinoblastoma-Protein, p21^{CIP1} und p16^{INK4a} sowie einer dauerhaften Aktivierung der DDR-Signalkaskaden abhängig.^{26,29,30,33-36}

Sogar in dauerhaft an Zellkultur-Bedingungen adaptieren, etablierten Tumorlinien mit genetischen Defekten in Zellzyklus- und Apoptose-regulierenden Signalwegen lassen sich nach zytostatischer Behandlung typische Merkmale zellulärer Seneszenz nachweisen.^{23,24}

Da ein absolut spezifischer Marker für den seneszenten Zustand bisher noch nicht identifiziert werden konnte, gelingt die schlüssige Zuordnung als "seneszent" nur durch den gleichzeitigen Nachweis mehrerer mit Seneszenz assoziierter Eigenschaften (s. u.), was durch die molekulare Heterogenität von Seneszenz-Programmen in verschiedenen Zelltypen verkompliziert wird. 17,37 Lichtmikroskopisch imponieren seneszente Zellen verglichen mit Kontrollen größer und vermehrt granuliert, da sie durch eine deutliche Expansion ihres Zytoplasmas und des lysosomalen Kompartimentes charakterisiert sind. 17 Als bester Surrogat-Marker für den seneszenten Zellzustand hat sich passend dazu die Detektion einer in seneszenten, nicht aber etwa durch Kontaktinhibition temporär wachstumsarretierten Zellen verstärkten lysosomalen Galaktosidase-Aktivität (s. g. "Seneszenz-assoziierte β-Galaktosidase", SA-β-Gal) durchgesetzt. 38

Klassischerweise sind seneszente Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus arretiert; allerdings wurden auch seneszente Zustände in der S-Phase und der G2-Phase beschrieben. Seneszente Zellen sezernieren eine Vielzahl löslicher Faktoren ("Seneszenz-assoziierter sekretorischer Phänotyp", SASP), die auto- sowie parakrine Effekte vermitteln. Hierdurch können einerseits eine Immunantwort gegen einen Tumor und "sekundäre Seneszenz" in benachbarten Tumorzellen (*Dörr et al., Manuskript in Revision*) als therapeutisch erwünschte Effekte ausgelöst werden. Andererseits besteht auch die Möglichkeit einer wachstumsfördernden Beeinflussung der Mikroumgebung durch Faktoren des SASP. Als wesentliche Komponenten des SASP wurden in verschiedenen Zelltypen Interleukin 6 und Interleukin 8 identifiziert.

Für eine große Bedeutung zellulärer Seneszenz in der Pathogenese und Therapieantwort humaner Tumoren spricht der Nachweis Seneszenz-assoziierter Veränderungen in typischerweise über lange Zeit größenkonstanten prämalignen Läsionen (etwa in Naevuszell-Naevi) und frühen Tumorstadien sowie in nach antineoplastischer Behandlung gewonnenen Tumorproben. ^{23,29,30} Zusätzlich sind lange Patientenverläufe mit Tumormanifestationen stabiler Ausdehnung ("stable disease") nach zytostatischer Behandlung, die in individuellen Fällen bei vielen malignen Erkrankungen beobachtet werden, suggestiv für das Auftreten Therapie-bedingter Tumorzell-Seneszenz in vivo. 17 Kürzlich konnte unsere Arbeitsgruppe eine im Vergleich zu nicht seneszenten Kontrollen überraschenderweise stark erhöhte Abhängigkeit nach Behandlung seneszenter Tumorzellen Glucose zytostatischer von als Stoffwechselsubstrat und die therapeutische Nutzbarkeit dieser Abhängigkeit zur selektiven Eliminierung seneszenter Zellen nachweisen (Dörr et al., Manuskript in Revision).

Zusammengefasst liegt die intellektuelle Attraktivität einer wissenschaftlichen Beschäftigung mit Tumorzell-Seneszenz als Resultat antineoplastischer Therapien also vor allem in dem (im Gegensatz zum Auftreten jeder Form des Zelltods) langfristig vitalen, jedoch phänotypisch und metabolisch modifizierten Verbleib seneszenter Malignom-Zellen im Tumorverband sowie den sich daraus ergebenden biologischen Implikationen wie Immunaktivierung, parakriner Beeinflussung umgebender Tumorzellen und einem denkbaren Wiedereintritt in den Zellzyklus zu einem späteren Zeitpunkt. 40-42 Tabelle 1 gibt einen Überblick über Auslöser zellulärer Seneszenz, wesentliche Eigenschaften seneszenter Zellen und mögliche tumorbiologische Effekte seneszenter Malignom-Zellen.

Seneszenz-auslösende Stressoren:

DNA-Schädigung:

- dysfunktionelle Telomere
- Replikationsstress
- Aktivierung von Onkogenen (z. B. RAS)
- zytostatische Therapie (z. B. Anthrazykline)
- energiereiche Strahlung
- reaktive Sauerstoff-Spezies

Ohne DNA-Schädigung

- Aktivierung von Onkogenen (z. B. BCR-ABL)
- Zytokine (z. B. TGF-β)

typische Eigenschaften seneszenter Zellen

Morphologie

- Zunahme der Zellgröße
- vermehrte Granularität, verstärkte Vakuolisierung des Zytoplasmas
- "verschwommene" Zellgrenzen

Stoffwechsel

- vermehrte SA-β-Gal-Aktivität (Expansion des lysosomalen Kompartimentes)
- langfristiger Zellzyklus-Arrest, fehlende DNA-Synthese
- dauerhafte Aktivierung der "DNA damage response" (z. B. Nachweis von γ-H2A.X)
- Chromatin-Modifikationen (z. B. H3K9me3)
- Expression Seneszenz-assoziierter Marker (u. a. p53, p16^{INK4a}, p21^{CIP})
- Seneszenz-assoziierter sekretorischer Phänotyp (u. a. IL-6, IL-8)

Erwiesene und implizierte Einflüsse seneszenter Malignom-Zellen auf die Tumorbiologie

prognostisch günstig

- langfristiger Teilungsstopp seneszenter Tumorzellen
- Tumor-spezifische Aktivierung des Immunsystems
- "sekundäre" Seneszenz weiterer Tumorzellen durch parakrine Signale
- verstärkte Glucose-Abhängigkeit als Seneszenz-spezifische Vulnerabilität

prognostisch nachteilig

- Förderung von Überleben, Wachstum, Metastasierung und Therapieresistenz nicht-seneszenter Tumorzellen durch parakrine Signale
- Wiedereintritt in die Zellteilung durch Seneszenz-aufhebende Stimuli

Tabelle 1.: Wichtige Seneszenz-auslösende Stressoren, Eigenschaften seneszenter Zellen und Einflüsse seneszenter Malignom-Zellen auf die Tumorbiologie. Die Aufstellung erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit. TGF- β : transforming growth factor β , γ -H2A.X: an Serinrest 139 phosphorylierte Histon H2A-Variante H2A.X, H3K9me3: an Lysin 9 trimethyliertes Histon H3. Tabelle modifiziert und ergänzt nach¹⁷.

2.4 Rituximab in der Behandlung maligner B-Zell-Lymphome

Mit der Einführung des gegen das CD20-Antigen gerichteten monoklonalen, murinhuman chimären $IgG1\kappa$ -Antikörpers Rituximab in die Behandlung lymphatischer Neoplasien konnte die Erkrankungsprognose vieler Lymphom-Entitäten – insbesondere durch den Einsatz von Rituximab in Kombination mit Zytostatika – deutlich verbessert werden. Allerdings besitzt auch Rituximab als Einzelsubstanz antitumorale Aktivität. Die derzeit im klinischen Einsatz als Standard verwendete Rituximab-Dosierung von 375 mg je Quadratmeter Körperoberfläche wurde ebenso wie die üblichen Dosierintervalle rein empirisch bestimmt und basiert nicht auf dem Nachweis einer optimalen Wirkung bei der so im Patienten erreichten Antikörper-Konzentration.

Die Attraktivität des B-Zell-spezifischen Oberflächenmoleküls CD20 als Angriffsstruktur einer die Zielzelle eliminierenden Immuntherapie ergibt sich einerseits aus seiner Expression auf den Tumorzellen vieler B-Zell-Lymphom-Entitäten, nicht jedoch auf (gesunden) lymphatischen Stamm- oder terminal differenzierten B-Zellen. Andererseits wird CD20 nach Rituximab-Bindung kaum internalisiert und besitzt eine nur geringe Ablöserate von der Zellmembran, auch wenn insbesondere für das Mantelzell-Lymphom das s. g. "Shaving" als Resistenzmechanismus gegenüber Rituximab beschrieben wurde. A3,52,53 Da auch nicht maligne entartete B-Zellen CD20 exprimieren, stellt der Einsatz von Rituximab keine auf ein Krebs-spezifisches Merkmal zielende Behandlung (s. g. "targeted therapy" im engeren Sinne) dar.

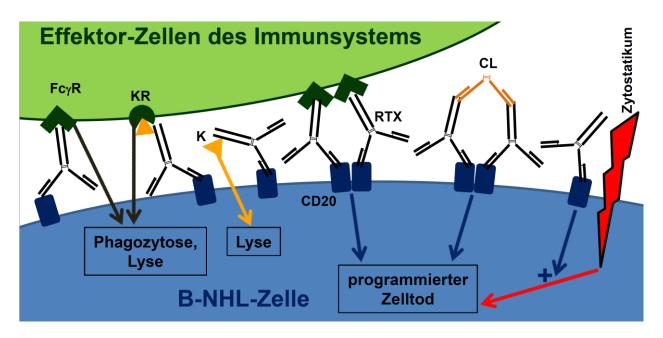
Trotz der breiten therapeutischen Nutzung von Rituximab sind sowohl der über den Therapieerfolg im Patienten entscheidende Wirkmechanismus dieses Antikörpers als auch die physiologische Bedeutung seines Zielantigens CD20 noch nicht vollständig aufgeklärt. ^{51,52,54,55} CD20-Knock-out-Mäuse zeigen keinen offensichtlichen Phänotyp und die Identifikation eines physiologischen Liganden für CD20 ist bisher nicht gelungen. ^{51,56,57} Allerdings stützen Untersuchungen eine Rolle von CD20 als an der Signaltransduktion des B-Zell-Rezeptors beteiligtem Calcium-Kanal. ^{51,58} Neuere Forschungsergebnisse implizieren zudem eine Bedeutung des CD20-Antigens bei der Regulation T-Zell-unabhängiger B-Zell-Immunantworten (Antikörperproduktion) im Menschen. ⁵⁹

Der Beitrag typischer Antikörper-Effektor-Mechanismen wie Antikörper-mediierte zelluläre Zytotoxizität, Phagozytose und Komplement-vermittelte Zytotoxizität zur Zerstörung CD20-exprimierender Zellen durch gegen dieses Oberflächenantigen

gerichtete Antikörper wurde sowohl *in vitro* als auch in präklinischen Modellsystemen nachgewiesen. Die fehlende Vorhersagbarkeit des therapeutischen Nutzens von Rituximab für den individuellen Patienten aus der Höhe der CD20-Expression eines Lymphoms oder *in vitro*-Untersuchungen der Komplement-Lyse-Fähigkeit legt jedoch zusätzliche, Zell-autonome Wirkmechanismen wie etwa die inzwischen detektierte direkte Induktion programmierten Zelltodes (u. a. Apoptose) durch gegen CD20 gerichtete Antikörper nahe. ⁶³⁻⁶⁶

In vitro-Analysen Zell-autonomer Wirkungen (d. h. ohne die Zugabe von immunologischen Effektor-Zellen oder Komplement-Bestandteilen) gegen CD20 und Zelloberflächen-Antigene gerichteter Antikörper nutzen Effektverstärkung durch die zusätzliche Applikation gegen Immunglobulin G gerichteter F(ab)₂-Antikörperfragmente.^{63,64} Durch diesen als ("Hyper-)"Cross-Linking" bezeichneten Ansatz soll im Falle von Rituximab über eine Vernetzung vieler CD20gebundener Rituximab-Moleküle eine für die Signaltransduktion auf intrazelluläre Kaskaden notwendige lokale Multimerisierung von CD20-Komplexen in der Zellmembran erreicht werden.⁵² Dabei wird vermutet, dass *in vivo* ähnliche Vorgänge durch die Interaktion B-Zell-gebundener Antikörper mit Fcγ-Rezeptor-tragenden Immunzellen zur Erzeugung lokal sehr hoher Konzentrationen von Rituximab-CD20-Komplexen in begrenzten Bereichen der B-Zell-Membran (s. g. "Clustering") und zur führen.^{52,63} intrazellulären Signaltransduktion Darüber hinaus implizieren Forschungsarbeiten für verschiedene gegen B-Zell-Antigene (u. a. auch CD20) gerichtete Antikörper eine deutliche Erhöhung der Signalstärke auf ihre Zielzelle durch Homo-Dimerisierung, die in hohen Konzentrationen auch spontan auftreten kann. 67,68

Auch wenn die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern, die Translokation von CD20-Molekülen in s. g. "lipid rafts" innerhalb der Zellmembran und die negative Beeinflussung verschiedener zellulärer "Überlebenssignalwege" als zelluläre Reaktionen auf die Bindung von anti-CD20-Antikörpern beschrieben wurden, besteht kein wissenschaftlicher Konsens über die intrazelluläre Signaltransduktion nach CD20-Ligation. 52,58,63,69-75 Mehrere Arbeiten legen eine Erhöhung des intrazellulären Gehalts an reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) als zentrales Ereignis nach der Behandlung mit Rituximab und anderen anti-CD20-Antikörpern nahe. 76-78



Wirkmechanismen Abbildung 1: Vereinfachtes Schema antineoplastischer Antikörpers Rituximab. An auf der Zellmembran von B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomzellen (B-NHL-Zellen) exprimiertes CD20 gebundenes Rituximab (RTX) vermittelt über seinen Fc-Teil die Phagozytose und Lyse durch Fc₂-Rezeptor(Fc₂R)-exprimierende Effektor-Zellen Immunsystems wie Makrophagen und natürliche Killerzellen. Nach Aktivierung Komplement-Systems (K) durch zellgebundenes Rituximab werden Lymphomzellen einerseits durch Komplement-mediierte Lyse zerstört. Darüber hinaus vermitteln an Rituximab gebundene Komplement-Bestandteile die Interaktion mit Komplement-Rezeptoren (KR) von Immunzellen. Außerdem wird eine verstärkte lokale Konzentrierung von CD20-Rituximab-Komplexen in begrenzten Bereichen der Lymphomzell-Membran bei deren Interaktion mit Fcγ-Rezeptoren als Voraussetzung für die Initiierung über CD20-vermittelter Zelltod-Signale angenommen, da in vitro direkte zytotoxische Rituximab-Effekte bei zusätzlichem Einsatz Antikörper-vernetzender F(ab')2-Fragmente ("Cross-Linker", CL) beobachtet werden. Rituximab verstärkt bei kombinierter Anwendung auch die Wirksamkeit konventioneller Zytostatika. Abbildung modifiziert nach^{51,52,66,79,80}

2.5 Herleitung der wissenschaftliche Fragestellung, spezifische Zielesetzungen und technische Umsetzung

Wie unter 2.4 diskutiert, ist der entscheidende Wirkmechanismus des in der Behandlung maligner B-Zell-Neoplasien breit eingesetzten Antikörpers Rituximab trotz intensiver Forschung zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht vollständig aufgeklärt. 51,52,54

Den Ausgangspunkt dieser Arbeit stellt einerseits die für Rituximab-Behandlung nachgewiesene Auslösung programmierten Zelltodes humaner Lymphomzellen unabhängig von der Rekrutierung typischer Effektor-Mechanismen des Immunsystems dar. Andererseits ist seit langer Zeit bekannt, dass verschiedene Zytostatika in malignen Zellen insbesondere im Falle deren genetisch kompromittierter Apoptose-Fähigkeit (etwa durch die auch bei humanen B-Zell-Neoplasien häufige Überexpression

des Proteins Bcl-2) zelluläre Seneszenz als prognostisch günstigen, terminalen Wachstumsarrest induzieren können. 23,24,26

zu typischerweise Seneszenz-auslösenden Zytostatika Gegensatz lm wie Anthrazyklinen interferiert Rituximab jedoch nicht direkt mit dem DNA-Stoffwechsel, sondern vermittelt als CD20-spezifischer Antikörper seine Zell-autonomen Wirkungen (vergleichbar mit einem Zytokin) indirekt über die Signaltransduktion Zellmembrankomplexes CD20. Interessanterweise sind sowohl die Induktion zellulärer Seneszenz durch parakrine Zytokin-Sekretion als auch deren Auftreten ohne obligate "Triggerung" durch eine "DNA damage response" in den letzten Jahren entdeckt worden.81,82 Zusätzlich gibt es inzwischen erste Hinweise auf Seneszenz-vermittelnde Eigenschaften des gegen den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) gerichteten therapeutischen Antikörpers Cetuximab sowie des den "Vascular Endothelial Growth Factor" (VEGF) neutralisierenden Antikörpers Bevacizumab, der ebenfalls in der Krebsbehandlung eingesetzt wird. 83,84

Somit ergibt sich als die zentrale Fragestellung dieser Dissertation:

Trägt durch Rituximab-Behandlung ausgelöste Lymphomzell-Seneszenz zur antineoplastischen Wirksamkeit dieses Antikörpers bei?

Unter Würdigung der diskutierten Vorerkenntnisse und der im klinischen Alltag überwiegenden Anwendung von Rituximab als Kombinationstherapie mit konventionellen Zytostatika wurden folgende **spezifische Zielsetzungen** aus dieser Fragestellung abgeleitet:

- 1. Identifikation eines geeigneten Testsystems zur Untersuchung der Fragestellung
- 2. Überprüfung wesentlicher Charakteristika und Regulatoren zellulärer Seneszenz nach Rituximab-Behandlung in diesem Testsystem
- 3. Analyse einer möglichen Verstärkung oder Abschwächung unter konventioneller Chemotherapie auftretender Seneszenz bei zusätzlicher Rituximab-Behandlung
- 4. Untersuchungen sekretorischer Eigenschaften (als für die Beeinflussung des Mikromilieus entscheidende Seneszenz-assoziierter Stoffwechsel-Änderung) von Lymphomzellen nach Rituximab-Therapie

Aufgrund der fehlenden Bindungsfähigkeit von Rituximab an murinem CD20 standen etablierte Maus-Lymphommodelle für die **technische Umsetzung des geplanten Forschungsvorhabens** leider nicht zur Verfügung.^{52,85} Da überdies posttherapeutische Biopsien primärer humaner B-Zell-Lymphome derzeit (noch?) keinen Teil der klinischen Routinediagnostik darstellen und sich die *in vitro*-Kultivierung menschlicher Lymphome

überdies als sehr schwierig erwiesen hat, konnten in dieser Arbeit ausschließlich Untersuchungen an etablierten B-Zell-Linien erfolgen.

Für geeignete Zelllinien-Testsysteme zur Bearbeitung der Frage nach Seneszenz-Induktion durch Rituximab waren im Wesentlichen zwei Eigenschaften als rationale Voraussetzungen zu fordern:

- 1. Eine substanzielle Membranexpression des Zielantigens CD20. Alle dem Autor bekannten wissenschaftlichen Arbeiten zeigen für Rituximab in Übereinstimmung mit den Erwartungen an die spezifische Interaktion eines Antikörpers mit seinem Ziel-Antigen auf CD20-exprimierende Tumorzellen beschränkte antineoplastische Effekte.
- 2. Die genetische Integrität eines Seneszenz-Programmes in der Tumorzelle. Als Test-Stimulus für die Analyse der Fähigkeit zu Therapie-induzierter Seneszenz wurde daher in der vorliegenden Arbeit die als "klassischer" Seneszenz-Auslöser bekannte und in der Lymphom-Therapie seit Jahrzehnten standardmäßig angewandte Substanz Adriamycin eingesetzt. 12,24,44 Im Anschluss an den Nachweis der Seneszenz-Fähigkeit unter Adriamycin-Behandlung für eine bestimmte Zelllinie sollte dann deren Verhalten nach Rituximab-Zugabe analysiert werden. Aus diesem Vorgehen ergab sich die Einschränkung, dass eine denkbare Seneszenz-Auslösung durch Rituximab über gänzlich andere als für Anthrazykline bekannte Signalwege (selektiv kompromittierte Seneszenz-Fähigkeit nach Anthrazyklin-Behandlung bei gleichzeitig noch bestehender Möglichkeit der Seneszenz-Vermittlung durch Rituximab) nicht erkannt würde.

3 Methodik

3.1 Kultivierung humaner B-Zell-Linien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden in 90% RPMI 1640-Medium nach Supplementierung mit 10% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin-Konzentrat in Mikrotiter-Zellkulturplatten (meist 6-Well-Platten) kultiviert. Alle Ansätze wurden jeweils ab der frühestmöglichen Experimentalstufe als im Folgenden getrennt bearbeitete Dreifachansätze und in mindestens zwei zeitlich unabhängigen Wiederholungen durchgeführt.

Für Kombinationsbehandlungen erfolgte die Zugabe von Reagenzien zu den Experimentalkulturen direkt nach deren Aussaat in einer Dichte von 1x10⁵ - 1,5x10⁵ vitalen Zellen je ml (1,0 x10⁵/ml für RC-K8, 1,5x10⁵/ml für EHEB) jeweils im Abstand einer Stunde in der zeitlichen Reihenfolge NAC oder Koffein, gefolgt von ADR oder RTX, und zuletzt CL. Für kombinierte "Immunchemotherapie"-Ansätze (d. h. Doppelbehandlungen mit RTX_{CL} und ADR) wurde ADR (5 oder 10 ng/ml) vier Stunden nach der CL-Zugabe hinzugefügt. Zur Vermeidung einer Kultursättigung mit konsekutivem Absterben bzw. Wachstumsarrest der Zellen wurden in allen Langzeitexperimenten sämtliche Kulturen zum Erhalt der Expansionsfähigkeit nach drei Tagen in frischem Medium und entsprechend der erreichten Dichte verdünnt neu ausgesät. Da (im Gegensatz zu ADR in optimaler Dosierung) die Zugabe von RTX_{CL} die Expansion der Zellpopulationen (für RC-K8) nicht vollständig stoppen konnte und somit von der Synthese neuer CD20-Komplexe während der Kultur auszugehen war, erfolgte nach der Neuaussaat an Tag 3 eine zweite Zugabe aller Reagenzien mit Ausnahme von ADR identisch zum Beginn der Experimente. Nach insgesamt sechs Tagen wurden die Kulturen "geerntet" und bezüglich ihrer Vitalität sowie der Zelldichte nach Trypanblau-Färbung in einer "Neubauer-improved"-Zählkammer guantifiziert.

Für die Messung von Zytokin-Konzentrationen in Zellüberständen wurden jeweils $1x10^6$ vitale Zellen in einem Milliliter FBS-freien RPMI-Mediums über Nacht kultiviert. Nach gründlicher Abzentrifugation und Abnahme des Medium-Überstandes wurde dieser für weitere Analysen tiefgefroren.

3.2 Detektion Seneszenz-assoziierter-β-Galaktosidase-Aktivität

Im sauren Milieu (pH 6,0) wird das zugesetzte Substrat -Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galaktosid in Abhängigkeit von der intrazellulären β-Galaktosidase-Aktivität und der

Inkubationszeit quantitativ gespalten. Über einen weiteren spontanen Oxidationsschritt entsteht aus dem Spaltprodukt 5-Bromo-4-Chloro-3-Hydroxyindol der wasserunlösliche Farbstoff 5,5'-Dibromo-4,4'-Dichloro-Indigo, der eine zytoplasmatische Blaufärbung in seneszenten Zellen mit im Vergleich zu nicht-seneszenten Kontrollen erhöhter β-Galaktosidase-Aktivität bewirkt.

Zu analysierende Zellpopulationen wurden nach ihrer Abzentrifugation in PBS gewaschen und 10-15 min bei Raumtemperatur in frisch angesetzter 2%-iger Paraformaldehyd-Lösung nach Zugabe von 0.25% Glutaraldehyd fixiert. Eine die Färbequalität mindernde Austrocknung der Proben musste dabei vermieden werden. Nach erneutem Waschen in 1 mM Magnesiumchlorid enthaltendem PBS (PBS_{MaCl2}) folgte die Inkubation bei 37°C unter Lichtabschluss in frisch angesetzter SA-β-Gal-Färbelösung. Die Färbeintensität von unbehandelter Kontrolle und behandelten Proben wurde zum Erreichen eines optimalen Färbeergebnisses jeweils im Abstand einiger Stunden an einem Aliquot lichtmikroskopisch untersucht, wobei für Proben derselben Zelllinie die Experimentalbedingungen (d. h. Färbezeiten) natürlich konstant zu halten waren. Nach Abschluss der Färbung und erneutem Waschen in PBS_{MgCl2} wurden die Proben auf Objektträger zytozentrifugiert und nach dem Trocknen mit Moviol eingedeckelt. Anschließend erfolgte die lichtmikroskopische Quantifizierung der SA-β-Gal-Reaktivität (Blaufärbung der Zelle) als positiver Anteil der Gesamt-Zellpopulation. In dieser Arbeit wurden jeweils mindestens 200 Zellen in drei verschiedenen Ausschnitten Zytospin-Präparates ausgezählt. Überdies erfolgte eine exemplarische Mikrograph-Fotodokumentation.

3.3 Durchflusszytometrie (FACS)

3.3.1 Analysen von Streueigenschaften und Membran-Antigenen

Die durchflusszytometrische Expressionsanalyse von Zelloberflächen-Antigenen (z. B. CD20) erfolgte nach etablierten Standard-Protokollen unter Einsatz der von den Herstellern vorgeschlagenen Konzentrationen Fluorochrom-konjugierter Antikörper. Dabei wurden stets eine Zelllinie mit gemäß den Angaben einer Referenzquelle (DSMZ in Braunschweig⁸⁶) suffizienter Expression des untersuchten Oberflächenantigens sowie eine das Antigen nicht exprimierende Linie als interne Positiv- und Negativkontrolle mitgeführt.

Die zu untersuchenden Zellpopulationen wurden zunächst dreimal in gekühltem PBS (4°C) gewaschen und im Anschluss für 30 min unter Lichtabschluss auf Eis mit dem vorverdünnten Antikörper inkubiert. Zur Reduktion unspezifischer Antikörper-Bindungen wurde vor der durchflusszytometrischen Analyse erneut dreimal in PBS gewaschen. Anhand der mitgeführten Negativ- und Positivkontrollen wurden die Parameter für Detektionsschwelle, Vorwärts- und Seitwärtsstreuung (FSC, SSC) sowie das zu analysierende Fluoreszenzniveau adjustiert, bevor üblicherweise 10.000 Ereignisse je Experimentalprobe aufgezeichnet wurden. Abhängig von der Fragestellung wurden in den folgenden Auswertungen entweder gesamte Zellpopulationen (inklusive toter Zellen) dargestellt oder (durch "Gating") ausschließlich vitale Zellen berücksichtigt.

3.3.2 Zellzyklus-Analyse: Bromodeoxyuridin-Inkorporation/Propidiumjodid

Der selektive Einbau des synthetischen Thymidin-Analogons 5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) als "falscher Baustein" in die innerhalb eines durch das Intervall zwischen BrdU-Zugabe und Lyse der Zellen definierten Zeitfensters neu synthetisierte DNA kann durch spezifische, Antikörper-basierte BrdU-Detektion (FL-1) zur Quantifizierung von DNA-Synthese (und damit indirekt Zellproliferation) genutzt werden. Bei zusätzlicher Analyse des DNA-Gehalt jeder Zelle durch den Einsatz des quantitativ interkalierenden Farbstoffs Propidiumjodid (PI, Analyse über FL-2) gelingt so eine Beschreibung des Wachstumsverhaltens einer Zellpopulation während der Inkubationszeit mit BrdU.

30 min nach Zugabe von BrdU (Endkonzentration 10 μM) sowie Inkubation unter Zellkulturbedingungen wurden die Kulturen abzentrifugiert und die pelletierten Zellen anschließend durch tropfenweise Zugabe von vorgekühltem 70%-igem Ethanol lysiert. Nach erneuter Zentrifugation, DNA-Denaturierung (zur Ermöglichung einer Bindung des anti-BrdU-Antikörpers an das inkorporierte BrdU) durch die Zugabe von TRIS-HCI und Pepsin sowie anschließende Neutralisierung mit Natriumborat wurde durch die Zugabe des "Zellzyklus-Mastermix" (Inkubation lichtgeschützt bei 4°C über Nacht) nun in der Probe enthaltene RNA (zur Vermeidung von Störeffekten) verdaut sowie in die DNA eingebautes BrdU vom Fluoreszenz-konjugierten Antikörper detektiert. Vor der durchflusszytometrischen Analyse wurde zuletzt PI (Endkonzentration 5 μg/ml) zugesetzt. Im Anschluss konnten (nach Fluoreszenz-Kompensation für FL-1 und -2) in der Darstellung BrdU-Inkorporation (FL-1 H) gegen DNA-Gehalt (FL-2-A) eine Zuweisung der Populationsanteile zu den verschiedenen Zellzyklusphasen sowie eine Quantifizierung des Anteils DNA-synthetisierender Zellen erfolgen. Die Analyse wurde

dabei unter Nutzung der nur für Einzelzellen (im Gegensatz zu die Auswertung verfälschenden Zellaggregaten) proportionalen Beziehung zwischen Impulsintegral (FL-2-A als Maß für den Gesamt-DNA-Gehalt) und -länge (FL-2-W) durch s. g. Puls-Prozessierung (Darstellung FL-2-A gegen FL-2-W) eingegrenzt.

3.3.3 Messung intrazellulärer freier Sauerstoff-Radikale (ROS)

Der Gehalt intrazellulärer freier Sauerstoff-Radikale (ROS) kann durch die Detektion der von der ROS-Konzentration abhängigen Oxidation Fluorescein-haltiger Farbstoffe indirekt gemessen werden. Die Polarität des oxidierten Farbstoffes Carboxy-H2DCFDA vermindert dabei dessen Abgabe aus der Zelle in das Kulturmedium.

Nach Beladung der Zellen mit dem Farbstoff (40 min in vorgewärmtem PBS, Endkonzentration des Farbstoffs 20 µM) und Waschung in PBS wurden die Zellen eine Stunde (s. g. "recovery time") in vorgewärmtem RPMI-Medium (ohne Phenol-Rot) inkubiert und anschließend auf ihre Fluoreszenz analysiert. Als Positivkontrolle wurden für eine Stunde mit TBHP (0.1%) behandelte, als Negativkontrolle unbehandelte Zellen mitgeführt. Leider ist die angewandte Methode gemäß den Herstellerangaben nicht für Experimentalbedingungen nutzbar, in denen eine Behandlung eine starke Änderung der Zellmorphologie und damit der zellulären Autofluoreszenz (wie etwa im seneszenten Zustand) bedingt. Daher konnten in der vorgelegten Arbeit ROS-Messungen nur nach Kurzzeit-Behandlungen (maximal 1 Tag) durchgeführt werden. Überdies wurde jeweils eine mit Adriamycin als der im Vergleich zu Rituximab die Zellmorphologie stärker modifizierenden Substanz (siehe Ergebnisse) als interne Kontrolle mitgeführt.

3.3.4 Messung von Zytokin-Konzentrationen in Medium-Überständen

Die Analyse von Zytokin-Konzentrationen (speziell für Interleukin 6 und Interleukin 8) in Medienüberständen erfolgte nach der Anleitung des "FlowCytomix Human Cardiovascular kit" (Bender MedSystems) und soll hier daher nur in Grundzügen dargestellt werden. Grundprinzip des Verfahrens ist der Einsatz einer Mischung durch spezifische Fluoreszenzstärken (Messung bei FL-1) und durch verschiedene Größen eindeutig charakterisierter Kugeln, an die gegen jeweils genau ein Zytokin gerichtete Antikörper gebunden sind. Nach Zugabe der Kugel-Mischung zum Analysat findet eine konzentrationsabhängige Bindung freier Zytokine im Medium an die Zytokinspezifischen Kugeln statt. Nach Waschen werden Biotin-konjugierte, ebenfalls Zytokinspezifische Antikörper zu den Kugeln zugesetzt, die nur im Falle einer vorherigen

Zytokin-Bindung an die spezifische Kugel binden können. Durch einen zuletzt zugegebenen Streptavidin-Phycoerythrin-Komplex wird eine von der ursprünglichen Zytokin-Konzentration im Medium abhängige, indirekte Fluoreszenz (Detektion als FL-2) der an die Zytokin-beladene Kugel gebundenen, biotinylierten Antikörper erreicht. Nach verschiedenen Größen FL-1-Fluoreszenzstärken Auftrennung der mit und durchflusszytometrisch eindeutia differenzierbaren, Zytokin-spezifischen Kugel-Populationen können dann Konzentrationsanalysen separat für jedes Zytokin erfolgen. Unter Mitführung einer Standard-Verdünnungsreihe mit bekannten Konzentrationen aller untersuchten Zytokine lassen im Folgenden aus den Messwerten jeder Probe die jeweiligen Zytokin-Konzentrationen im Kulturmedium berechnen.

3.4 Immunfluoreszenz

Immunfluoreszenz-mikroskopische Untersuchungen kamen in der vorliegenden Arbeit ausschließlich zum Nachweis der Bindung des als "Cross-Linker" (CL) eingesetzten, gegen humanes Immunglobulin G gerichteten F(ab')₂-Fragmentes an den Rituximab-CD20-Komplex der Zielzellen zum Einsatz. Dabei wurden RC-K8-Zellen nach Rituximab- und/oder CL-Behandlung mit einem gegen Kaninchen-Immunglobulin (und damit in den durchgeführten Experimenten selektiv gegen den zellgebundenen CL) gerichteten, Alexa Fluor 488-gekoppelten Antikörper inkubiert, zytozentrifugiert, mit Moviol eingedeckelt und im Anschluss am Fluoreszenz-Mikroskop qualitativ Fotodokumentiert.

3.5 Quantitative Real-Time-PCR (RQ-PCR)

Das Prinzip der RQ-PCR liegt in der quantitativen Detektion exponentiell amplifizierter cDNA-Moleküle durch spezifische Oligonukleotide, deren Fluorochromausschließlich nach an Markierung Bindung ihre **jeweils** komplementäre Nukleotidsequenz (d. h. neu synthetisierte, Transkript-spezifische cDNA) und Hydrolyse (durch die 5'→3'-Nuklease-Aktivität der Tag-DNA-Polymerase) während der PCR-Reaktion aktiv wird. Aus dem Verlauf der spezifischen Fluoreszenz-Zunahme während der PCR-Amplifikation zuvor (mit Oligo-dT-Nukleotiden) in cDNA revers-transkribierter zellulärer RNA kann so die Expression genspezifischer RNA-Transkripte in der Ausgangsprobe relativ zu einem mitgeführten Kontrollansatz errechnet werden.

Nach RNA-Isolation (TRIzol-Kit) und reverser Transkription (Superscript II-Kit, OligodT) wurden als Dreifachansatz 50 ng der gewonnenen cDNA mit einem für alle Proben vorbereiteten Gemisch aus "TaqMan Gene Expression master Mix" und Transkriptspezifischem Primer in einer Mikrotiter-Platte jeweils in einem Gesamtvolumen von 10 µl gemischt und unter Fluoreszenz-Monitoring sowie Standardbedingungen in einem "Step One Plus Real Time PCR System" über 45 Zyklen amplifiziert. GAPDH diente dabei als internes Kontroll-Transkript, von dessen Expression keine Änderung in Abhängigkeit von den experimentellen Interventionen zu erwarten war. Relative Expressionsniveaus für IL-6 und IL-8 wurden, Standard-Definitionen folgend, anhand der folgenden Parameter berechnet:

CT-Wert: PCR-Zyklus, bei dem das für ein Transkript spezifische Fluoreszenz-Signal

gegenüber dem Hintergrund klar detektierbar wird ("Schwellen-Zyklus")

ΔCT: Differenzen der CT-Werte des Ziel-Transkriptes (hier IL-6 oder IL-8)

und der internen Kontrolle (hier GAPDH) in demselben Well

 $\Delta\Delta$ CT: Differenz aus Δ CT der behandelten Probe und der unbehandelten

Kontrolle für dasselbe Transkript

Die relative Expression von IL-6 oder IL8 in einer Probe ergab sich damit als s. g. "RQ-Wert": RQ = $2^{\triangle\Delta CT}$.

3.6 Western Blots

Die in dieser Arbeit gezeigten Western Blots wurden unter der Anleitung und mit der Hilfe von Herrn Yong Yu durchgeführt.

3.6.1 Proteinisolation

Für die unfraktionierte Isolation zellulärer Proteine wurden zuvor bei -80°C gelagerte Zellpellets in NP-40-Puffer für 60 min auf Eis lysiert und vor Protease- sowie Phosphatase-Aktivitäten geschützt. Nach Abzentrifugation von Zellresten bei 4°C und 16100 rcf für 20 min wurde der die Proteine enthaltende Überstand in frische Reaktionsgefäße umgefüllt.

3.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford-Methode)

Die Ermittlung der Proteinkonzentration in den Zell-Lysaten erfolgte photometrisch (Absorptionsmessung bei 595 nm) mit der Roti-Quant-Bradford-Methode. Dabei wurde eine wässrige 1:5-Verdünnung der Bradford-Reagenz im Verhältnis 999:1 mit der zu untersuchenden Proteinprobe in Einmalküvetten versetzt und für 5 min Raumtemperatur inkubiert. Zur Kalibrierung des Photometers wurde eine Standard-Verdünnungsreihe mit bekannten Konzentrationen an bovinem Serumalbumin (0, 1, 4, 6, 8 und 10 μg/μl) vermessen, wobei eine einem Variationskoeffizienten <10% entsprechende Genauigkeit der Verdünnungsreihe als für der Analysen Experimentalproben ausreichend angesehen wurde.

3.6.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Vor der Gelelektrophorese wurden 30-40 µg jeder Proteinprobe mit 5-fach konzentriertem Laemmli-Puffer in einem Gesamtvolumen von 20 µl für 7 min bei 90°C denaturiert, um eine vollständige Proteinbeladung mit SDS zu erreichen. Die Elektrophorese erfolgte in einer vertikalen, mit Elektrophorese-Puffer gefüllten Kammer mit einem 12%-igen Trenn- und einem 5%-igen Sammelgel. Bis die Proben das Sammelgel durchlaufen hatten, wurde eine Spannung von 80 V angelegt, die danach auf 120 V erhöht wurde. In allen elektrophoretischen Proteinauftrennungen wurde ein standardisierter Größenmarker ("Page Ruler") mitgeführt.

3.6.4 Immunoblots

Der Transfer der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid-(PVDF)-Membran erfolgte durch ein standardmäßiges "Semi-Dry-Blotting"-Verfahren bei einer maximalen Spannung von 20 V und einer der Größe des Gels entsprechenden Stromstärke von x + 20 mA (x: zu blottende Oberfläche in cm²).

Nach Waschung der Membran in Methanol und destilliertem Wasser wurden Membran und Gel in Methanol-haltigem Transferpuffer äquilibriert, sodass überschüssiges SDS ausgewaschen wurde. Zwischen den Elektroden des Semi-Dry-Transfergerätes und Transfermembran mit dem die aufgetrennten Proteine enthaltenden Gel wurden jeweils drei in Transferpuffer getränkte Whatman-Filterpapier-Lagen platziert, wobei Luftblasen zwischen den Papierschichten regelmäßig durch Ausrollen mit einem Glasstab entfernt wurden.

Die Laufzeit des Transfers wurde entsprechend der Größe des Gels variiert, um eine vergleichbare Stromdichte zu erreichen. Der erfolgreiche Proteintransfer wurde mit einer Ponceau-S-Färbung kontrolliert.

3.6.5 Proteindetektion

Nach dem Auswaschen des Ponceau-S-Farbstoffes mit TBS-T und der Blockade unspezifischer Proteinbindungsstellen durch Äquilibrierung in Blockpuffer für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur folgte die Inkubation mit dem jeweiligen, in Blockpuffer vorverdünnten Primärantikörper über Nacht bei 4°C. Nach dreimaliger Waschung der Membran in TBS-T (jeweils 10 min), Zugabe eines gegen die Ursprungsspezies des primären Antikörpers (in Blockpuffer vorverdünnt) gerichteten Zweitantikörpers für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur und erneuter Membranwaschung erfolgte die Proteindetektion Chemielumineszenz-Prinzip. Dafür nach dem wurden das "SuperSignal West Pico"-Substrat (Thermo Scientific) und der Chemilumineszenz-Detektor LAS-4000 (FUJIFILM) verwendet. In den Analysen wurde Tubulin als interne Kontrolle einer für alle Proben identischen aufgetragenen Proteinmenge mituntersucht.

3.6.6 "Strippen" von Membranen

Um auf derselben Membran verschiedene Proteine ähnlicher Größe analysieren zu können, wurde in einigen Fällen der Primärantikörper durch "Stripping" wieder von der Membran gelöst. Hierfür wurde die Membran nach dreimaligem Waschen in PBS zweimal für jeweils 10 min rotierend in "Stripp"-Puffer inkubiert. Nach Waschschritten in 1 M TRIS bei einem pH-Wert von 6,8 und dreimal (jeweils 5 min) in PBS erfolgte zuletzt eine erneute Äquilibrierung in Blockpuffer, bevor die Membran mit einem anderen Primärantikörper behandelt werden konnte.

3.7 Überlegungen zur Anwendung statistischer Methoden und Testverfahren

des methodischen Ansatzes der vorgelegten Dissertation experimentelle Studie an einer begrenzten Anzahl etablierter Zelllinien ist die Nutzung statistischer Methoden (z. B. die Prüfung auf "Signifikanz" von Unterschieden zwischen verschiedenen Behandlungen) – auch wenn in der wissenschaftlichen Literatur mangels Alternativen akzeptiert - generell kritisch zu betrachten, da im Gegensatz etwa zur Analyse verschiedener primärer Tumorproben hier berechnete Mittelwerte. Standardabweichungen und Signifikanzniveaus Qualitätskriterien für die technische Durchführung und Reproduzierbarkeit der jeweiligen Experimente, nicht jedoch Charakterisierungen von Unterschieden zwischen großen Gruppen verschiedener Einzelsubjekte darstellen.

Um mit statistischen Mitteln sinnvolle Aussagen über Differenzen zwischen verschiedenen Behandlungen etc. von Zelllinien treffen zu können, ist eine durchgehend getrennte Prozessierung der jeweiligen Zellpopulationen über den gesamten Experimentalverlauf unabdingbar. So würde z. B. das mehrmalige Auszählen derselben Proben am Ende eines Experimentes und die nachfolgende Darstellung als Mittelwert mit Standardabweichung lediglich die Streuung der Zählung selbst, nicht aber technische Fehler innerhalb des vorausgegangenen Experimentes (z. B. Pipettier-Fehler in individuellen Proben) erfassen. Zur Sicherung der Reproduzierbarkeit von Ergebnissen als einem der wichtigsten Gütekriterien für Experimente wurden im Rahmen dieser Arbeit alle Zellkulturexperimente in mindestens zwei zeitlich unabhängigen Wiederholungen und als ab der ersten Experimentalstufe getrennte Dreifach-Ansätze durchgeführt.

Unter Berücksichtigung der weiter oben diskutierten Einschränkungen bei der Interpretation von Experimentalergebnissen sowie unter der sinnvollen Annahme einer Normalverteilung der für die metrisch skalierten Variablen erhobenen Stichproben konnte zur Prüfung von Mittelwerten auf signifikante Unterschiede der t-Test für unverbundene Stichproben kombiniert mit dem Test von Levene auf Varianzgleichheit benutzt werden. Diagramm-Darstellungen in dieser Arbeit weisen – sofern nicht anders angegeben – für eine Datenreihe jeweils den Mittelwert, Fehlerbalken jeweils die Standardabweichungen aus.

3.8 eingesetzte Stoffe und Geräte

3.8.1 Reagenzien, Lösungen, Medien

- Aqua, destilliert
- Adriamycin (Doxorubicin, ADR), Bezug als Konzentrat-Lösung (2 mg/ml) aus der Zytostatika-Apotheke der Charité
- 4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid-Hydrochlorid (AEBSF), Sigma Aldrich
- Aprotinin, Sigma Aldrich
- Ammoniumpersulfat (APS), Sigma-Aldrich
- bovines Serumalbumin, New England Biolabs (Lösung 10g/l)
- 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galaktosid, Roth (Einsatz als Lösung 40 g/l in N,N-Dimethylformamid)
- 5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU), Sigma-Aldrich,
 (Einsatz als wässrige Lösung 10 mM)
- Bromphenolblau, Eurobio
- Carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein-Diacetat (Carboxy-H2DCFDA), Invitrogen (Einsatz als Konzentrat-Lösung 40 mM in Dimethylsulfoxid)
- Dithiothreitol (DTT), Serva
- Ethanol 96%, Roth
- Fetales bovines Serum (FBS), Sigma-Aldrich
- Glutaraldehyd, wässrige Lösung 50%, Roth
- Glyzerin, Roth
- Glycin, Roth
- Kaliumferricyanid (K₃Fe(CN)₆), Sigma-Aldrich
- Kaliumferrocyanid (K₄FE(CN)₆ x 3 H₂O), Sigma-Aldrich
- Koffein, ALEXIS Biochemicals
- Magnesiumchlorid, Roth
- 2-Mercapto-Ethanol, Sigma-Aldrich
- Methanol, Roth
- Milchpulver, Roth
- Moviol 4-88, Sigma-Aldrich
- N-Acetylcystein (NAC), konzentrierte Lösung 100 g/l (d. h. 0,613 mol/l), Hexal
- Natriumborat, Sigma-Aldrich (Einsatz als wässrige Lösung 0.1 M, pH 8,5)
- Natriumchlorid, Roth

- Natrium-Orthovanadat, Sigma
- NP-40, Sigma Aldrich
- Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder, Fermentas
- Paraformaldehyd, Sigma-Aldrich
- PBS ("phosphate-buffered saline"), Biochrom
- Penicillin/Streptomycin (Konzentratlösung 10.000 U/ml), Biochrom
- Pepsin, Sigma-Aldrich
- Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membranen, Millipore
- Ponceau-S Proteinfärbelösung, Roth
- Propidiumjodid, Sigma-Aldrich (Einsatz als wässrige Lösung 1 g/l)
- RNAse A, Sigma Aldrich (Einsatz als wässrige Lösung 10 g/l)
- Rotiphorese Gel Polyacrylamid-Mix 30%, Roth
- Roti-Quant Bradford-Reagenz, Roth
- RPMI 1640 Zellkultur-Medium, Gibco
- Salzsäure, rauchend 37%, Roth
- Sodiumdodecylsulfat (SDS), Roth
- TEMED, Roth
- Tert-butyl-Wasserstoffperoxid (TBHP), 70%ige wässrige Lösung, Sigma-Aldrich
- Tris-HCI, Merck
- Triton-X, Merck
- Trypanblau, Sigma-Aldrich
- Tween 20, Roth
- Whatman-Filterpapiere, Roth

3.8.2 Lösungen und Puffer

Blockpuffer für Immunoblots (Standard):

- 5% Milchpulver in 1xTBS-T

Blockpuffer für Immunoblots (Phosphoprotein-Detektion):

- 2,5% BSA in 1xTBS-T

Einfriermedium zur Kryokonservierung von Zelllinien:

- 20% FBS
- 10% DMSO
- 70% RPMI-Zellkultur-Medium

Gele für die SDS-PAGE:

Sammelgel (5%, ca. 10 ml):

- 6,8 ml Aqua dest.
- 1,7 ml, Polyacrylamidmix 30%
- 1,25 ml 1 M TRIS-Puffer, pH 6,8
- 0,1 ml 20% SDS
- 0,1 ml 10% APS
- 0,01 ml TEMED

Trenngel (12%, ca. 20 ml):

- 6,6 ml Aqua dest.
- 8,0 ml, Polyacrylamidmix 30%
- 5,0 ml 1,5 M TRIS-Puffer, pH 8,8
- 0,2 ml 20% SDS
- 0,2 ml 10% APS
- 0,004 ml TEMED

Kaliumcyanid-Konzentratlösung:

- 820 mg K₃Fe(CN)₆
- 1050 mg K₄FE(CN)₆ x 3 H₂O
- in 25 ml PBS Gesamtvolumen

<u>Laemmli-Ladepuffer</u> (wässrige Lösung):

- 2% Sodiumdodecylsulfat
- 50 mM Tris-HCl, pH 6,8
- 0,2 mg/ml Bromphenolblau
- 0,1 M DTT
- 10% Glyzerin

<u>Laufpuffer für die SDS-PAGE</u> (wässrige Lösung):

- 60 mM Tris-HCl, pH 6.8
- 10% Glyzerin
- 2% Natrium-Dodecylsulfat (SDS)
- 5% 2-Mercaptoethanol

NP-40 Protein-Lysepuffer (wässrige Lösung):

- 150 mM NaCl
- 50 mM Tris-HCl, pH 8,0
- 1% NP-40
- 1 mM 4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid-Hydrochlorid (AEBSF)
- 1 µg/ml Aprotinin
- 1 mM Natrium-Orthovanadat

SA-β-Gal-Färbelösung:

- 2,5% 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galaktosid
- 5,0% Kaliumcyanid-Konzentratlösung
- 1 mM Magnesiumchlorid
- 92,5 % PBS, pH 6,0

Salzsäure/Pepsin-Lösung (wässrige Lösung):

- 2 N Salzsäure
- 2 mg/ml Pepsin

"Stripp-Puffer" für Immunoblots (wässrige Lösung):

- 0,15 M Glycin (pH 2,5)
- 0,4% SDS

Transferpuffer für Immunoblots (wässrige Lösung):

- 0,29% TRIS
- 1,45% Glycin
- 20% Methanol

TBS(-T) (wässrige Lösung):

- 20 mM Tris-HCl, pH 7,6
- 120 mM NaCl
- (- 0,1% Triton-X)

"Zellzyklus-Mastermix" (Lösung in PBS):

- 0,5% Tween 20
- 1% bovines Serumalbumin
- 3,3% anti-BrdU-Antikörper
- 0,67 mg/ml RNAse A

3.8.3 Antikörper

Zellkultur:

- anti-human IgG (H & L) F(ab')₂, Spezies Kaninchen, Rockland 800-656-7625, Aliquotierung als konzentrierte wässrige Lösung (10 mg/ml)
- Rituximab, Roche, Bezug als konzentrierte Lösung (10 mg/ml) aus der Zytostatika-Apotheke der Charité

Durchflusszytometrie:

- anti-BrdU, Alexa-Fluor 488-konjugiert, Invitrogen Molecular Probes B35139
- anti-CD20, human, Phycoerythrin-konjugiert: Beckman Coulter IM 1451
- anti-human Anti-Ig, $\kappa,$ Fluoresceinisothiocyanat-konjugiert, BD Pharmingen 555791

<u>Immunfluoreszenz-Mikroskopie:</u>

- Esel gegen Kaninchen-IgG (H&L), alexa Fluor 488- konjugiert, Invitrogen Molecular Probes A21206

Western Blot:

- γ-H2AX, Cell Signaling, 9718, Verdünnung 1:1000
- H3K9me3, Abcam, ab8898, Verdünnung 1:1000
- p21^{CIP1}, Santa Cruz, sc-397, Verdünnung 1:200,
- p53, Santa Cruz, sc-126, Verdünnung 1:500
- p53-P-Ser15, Cell Signaling, 9284, Verdünnung 1:1000
- Tubulin, Sigma-Aldrich, T6199, Verdünnung 1:2000
- Sekundär-Antikörper (Merrettich-Peroxidase-gekoppelt):
 - ECL Anti-Mouse IgG, HRP-linked, GE Healthcare NXA931, Verdünnung 1:2000
 - ECL Anti-Rabbit IgG, HRP-linked, GE Healthcare, NA934V Verdünnung 1:2000

3.8.4 Oligonukleotide

Reverse Transkription:

- oligo-dT, Sigma Aldrich

RQ-PCR:

- TagMan Gene Expression Assays, Applied Biosystems:
 - GAPDH, Hs02758991_g1
 - Interleukin 6, Hs99999032_m1
 - Interleukin 8, HS01567913_g1

3.8.5 kommerzielle "Kits"

- FlowCytomix Human Cardiovascular kit, Bender MedSystems, BMS811FF
- TRIzol Reagent, Invitrogen 15596-018
- SuperScript II reverse Transcriptase 200U/µI, Invitrogen 18064-014
- SuperSignal West Pico Substrat, Thermo Scientific, 34087
- TaqMan Gene Expression master Mix, Applied Biosystems 4369016

3.8.6 ausgewählte Großgeräte

- Chemilumineszenz Detektor FUJIFILM LAS 4000
- Durchflusszytometer Facs Calibur, Becton Dickinson
- Immunfluoreszenz-Mikroskop Axioplan 100, Carl Zeiss, mit Kamera RT slide spot, Diagnostic Instruments
- Mikroskop CKX41 mit Kamera XC30, Olympus
- BioPhotometer, Eppendorf
- Step One Plus Real Time PCR System, Applied Biosystems
- Zytospin-Zentrifuge Rotina 35 R, Hettich-Zentrifugen

3.8.7 Software

Durchflusszytometrie:

- CellQuest Pro, Version 4.02, BD Biosciences
- WinMDI, Version 2.9, Joseph Trotter
- FlowCytomix Pro, Version 2.2, Bender MedSystems

Mikroskopie:

- Cell^A, Version 3.1, Olympus
- Spot advanced, Version 3.5.2, Diagnostic Instruments

RQ-PCR:

- StepOne Software, Version 2.0, Applied Biosystems

Statistik und graphische Darstellungen:

- Microsoft Office Home and Student 2010, Version 14.0.6123.5001, Microsoft
- Microsoft PowerPoint 2002, Microsoft
- Prism 5 for Windows, Version 5.01, GraphPad Software

Western Blot:

- ImageReader LAS-4000, Version 2.1, FUJIFILM
- Adobe Photoshop CS, Version 8.0.1, Adobe Systems Incorporated

4 Ergebnisse

4.1 Nach DNA-schädigender Behandlung tritt in Lymphom-Linien ein langfristiger Wachstumsarrest auf

Wie bereits unter 2.5 dargestellt, sind von geeigneten Testsystemen zur Untersuchung der Hauptfragestellung dieser Arbeit eine suffiziente Membranexpression des Rituximab-Zielantigens CD20 sowie die (epi-)genetische Integrität eines durch externe Stressoren anschaltbaren zellulären Seneszenz-Programmes zu fordern. Daher wurde zunächst der CD20-Expressionsstatus einer größeren Anzahl aus den Entitäten B-CLL, Burkitt-Lymphom, DLBCL, follikuläres Lymphom, Haarzell-Leukämie und Mantelzell-Lymphom etablierter "Standard"-Zelllinien durchflusszytometrisch analysiert. Dabei zeigte sich in einem nicht unerheblichen Anteil der gemäß ihrer Datenblatt-Spezifikation⁸⁶ als "C20-positiv" eingestuften Linien eine nur grenzwertige bzw. sehr schwache Zellmembran-Expression für CD20. In Abbildung 2 sind Ergebnisse der CD20-Expressionsuntersuchungen für ausgewählte Zelllinien dargestellt.

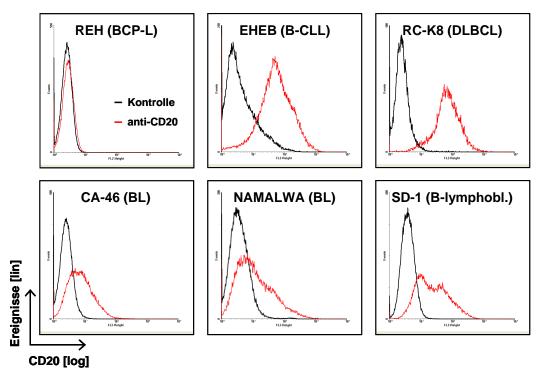


Abbildung 2: Exemplarische Darstellung durchflusszytometrischer CD20-Analysen in B-Zell-Linien. Die Abszissen (logarithmische Skalierung) der Histogramme zeigen die CD20-Expressionsstärke (detektiert bei FL-2), die Ordinaten (lineare Skalierung) geben die Anzahl der erfassten Ereignisse an. Die Untersuchungen wurden auf vitale Zellen eingegrenzt. In Klammern sind die korrespondierenden Entitäten aufgeführt. BCP-L: B-Zell-Vorläufer-Leukämie; BL: Burkitt-Lymphom; B-lymphobl.: lymhoblastoide Zellen der B-Zell-Reihe.

Im Anschluss wurden als CD20-exprimierend charakterisierte Linien in einem orientierenden "Screening"-Ansatz durch Zelldichte- und Vitalitätsbestimmungen (Trypanblau) bezüglich ihrer Langzeitantwort (d. h. Wachstum, Zelltod oder Wachstumsarrest bei erhaltener Viabilität) nach Behandlung mit steigenden Dosierungen (2-50 ng/ml) des Zytostatikums Adriamycin für insgesamt sechs Tage analysiert. Für die meisten der untersuchten Linien zeigten sich dabei eine Toleranz gegenüber der niedrigsten eingesetzten Adriamycin-Konzentration sowie ein konzentrationsabhängiges Absterben unter den höheren Dosisstufen (nicht gezeigt). Darüber hinaus waren für einige der Lymphom-Linien eine "gemischte" Antwort (aus Zelltod und Arrest) und in anschließenden Experimenten (nicht ausführlich dargestellt) partielle Seneszenz-assoziierte β-Galaktosidase-Reaktivität zu beobachten.

Insbesondere für die beiden CD20-positiven B-Zell-Lymphom-Linien EHEB (B-CLL) und RC-K8 (DLBCL) zeigte sich jedoch nach Zugabe einer Adriamycin-Konzentration von 10 ng/ml ein langfristiger Wachstumsarrest bei sehr hoher Vitalität und im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen deutlich verstärkt nachweisbarer Seneszenz-assoziierter-β-Galaktosidase-Reaktivität (SA-β-Gal). Daher wurden die folgenden Untersuchungen im Wesentlichen auf diese beiden nun als "Seneszenz-fähig" identifizierten Linien beschränkt.

Aus Gründen der Anschaulichkeit sind die Wachstums- und SA-β-Gal-Analysen nach Adriamycin-Behandlung für EHEB- und RC-K8-Zellen im Zusammenhang mit den folgenden Ergebnissen dargestellt, da bei Untersuchungen zum Auftreten zellulärer Seneszenz nach Rituximab-Applikation stets Adriamycin-behandelte Proben als interne "Seneszenz-Kontrollen" mitgeführt wurden.

4.2 Experimentalbedingungen zur Analyse Zell-autonomer Wirkungen einer Rituximab-basierten Antikörper-Behandlung

Unter der Annahme einer Effektmaximierung durch vollständige Okkupation der CD20-Antigene einer Zellpopulation erfolgten nun an den beiden Linien EHEB und RC-K8 (Die Linie RC-K8 wies in den FACS-Analysen eine im Vergleich mit anderen B-Zell-Linien relativ hohe CD20-Expression auf.) durchflusszytometrische Untersuchungen zur Definition der dafür einzusetzenden Rituximab-Konzentration bei den später als Startpunkt für Langzeitexperimente eingesetzten Zelldichten von 1,5x10⁵ (EHEB) bzw. 1x10⁵ (RC-K8) vitalen Zellen je ml. Dabei wurde einerseits der dosisabhängige Verlust

des CD20-spezifischen Fluoreszenz-Signals nach Rituximab-Bindung mit einem Fluorochrom-gekoppelten, gegen CD20 gerichteten Antikörper, der offensichtlich ein durch Rituximab-Bindung blockiertes CD20-Epitop detektierte, verfolgt (Abbildung 3). Zusätzlich wurde über den spezifischen Nachweis des κ-Leichtkettenbestandteils von dessen Zellmembran-Bindung an die Rituximab nach beiden überwiegend zytoplasmatisches Immunglobulin Gκ (EHEB) bzw. keine Immunglobuline (RC-K8) exprimierenden (und damit in der durchgeführten Oberflächen-Antigen-Analyse im Wesentlichen für die κ-Leichtkette negativen) Linien⁸⁶ die Rituximab-Dosisstufe mit maximal möglicher Bindungsstärke (d. h. einem maximalen κ-Fluoreszenz-Signal) ermittelt (Abbildung 3). Bei diesem Experimentalansatz konnte zusätzlich eine überwiegende Internalisierung des CD20-Rituximab-Komplexes nach Rituximab-Bindung ausgeschlossen werden, da im Falle der Internalisierung neben der verlorenen CD20-Detektierbarkeit kein hohes, Rituximab-spezifisches κ-Signals zu beobachten gewesen wäre.

Da überschüssige, nicht CD20-gebundene Rituximab-Moleküle in der Lösung durch Abbindung des in folgenden Experimenten zu verwendenden "Cross-Linkers" (CL) dessen Interaktion mit zellgebundenem Rituximab stören würde, sollte auch keine höhere als die zur vollständigen CD20-Sättigung benötigte Rituximab-Konzentration eingesetzt werden. Wie in Abbildung 3 dargestellt ist, konnte ab einer Konzentration von 20 µg/ml für Rituximab unter den gewählten Zelldichten für beide Linien eine *de facto* vollständige CD20-Okkupation nachgewiesen werden.

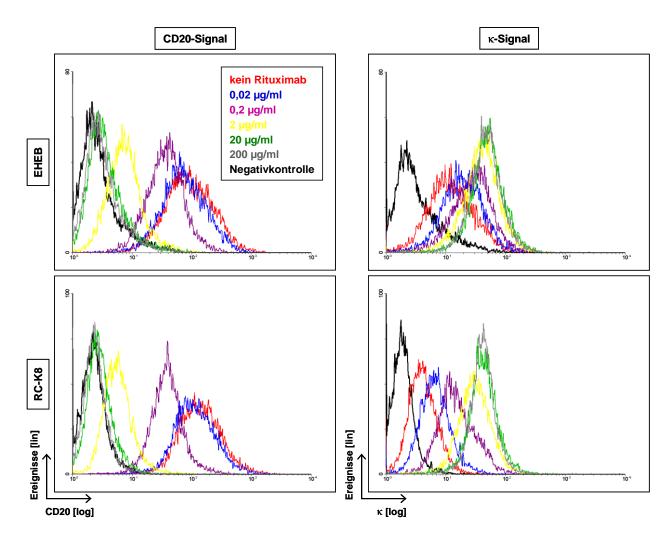


Abbildung 3: Verlust der CD20-Detektierbarkeit und Zugewinn eines κ -Signals als Korrelat dosisabhängiger Rituximab-CD20-Bindung an EHEB- und RC-K8-Zellen. Untersuchungen wurden 1 Stunde nach Rituximab-Zugabe mit einem gegen CD20 gerichteten, PE-gekoppelten Antikörper (FL-2, links), dessen Bindung im Falle einer vorherigen CD20-Ligation durch Rituximab blockiert wurde, sowie einem spezifisch die κ -Leichtkette humaner Immunglobuline G detektierenden, Fitc-konjugierten Antikörper (FL-1, rechts) durchgeführt. Im Gegensatz zu EHEB-Zellen zeigt die Linie RC-K8 keine Expression der Immungobulin-Leichtkette κ . Daher resultieren verschieden starke Signale für κ in den beiden Zelllinien ohne Rituximab-Zugabe (rote Kurven in den rechten Histogrammen). Die links oben aufgeführte Legende bezieht sich auf alle vier Histogramme. Analysen wurden auf vitale Zellen eingegrenzt.

Die Bestimmung einer für die als zusätzliche Vernetzer CD20-gebundener Rituximab-Moleküle verwendeten F(ab')₂-Fragmente ("Cross-Linker", CL, siehe 2.4) sinnvollen Konzentration erfolgte im Anschluss indirekt über deren dosisabhängige Effekte auf das Langzeit-Wachstum einer Population Rituximab-behandelter RC-K8-Zellen (d. h. Vitalität und Anzahl vitaler Zellen bezogen auf die Start-Zellzahl nach sechs Tagen). Bei diesen in Abbildung 4 dargestellten Zellkultur-Analysen wurde Rituximab in der zuvor als CD20-sättigend ermittelten Konzentration von 20 μg/ml eingesetzt. Unter der rationalen Annahme einer Übertragbarkeit der Ergebnisse auf andere B-Zell-Linien

wurde zur Begrenzung des experimentellen Aufwandes diese Untersuchung ausschließlich in der Linie RC-K8 durchgeführt. Außerdem konnte hier auf die ausschließliche Zugabe des F(ab')₂-Fragmentes (ohne Rituximab) in den analysierten Dosisstufen verzichtet werden, da ein entsprechender Kontroll-Ansatz in den folgenden Experimenten stets mitgeführt werden sollte.

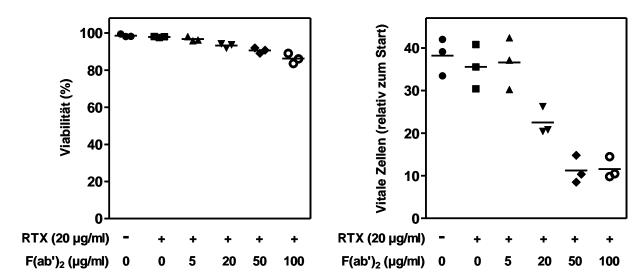


Abbildung 4: Ermittlung der niedrigsten maximal effektiven "Cross-Linker"-Konzentration in RC-K8-Zellen. Dargestellt sind Viabilität (Anteil vitaler Zellen der Zellpopulationen) sowie die Gesamtzahl vitaler Zellen im Vergleich zum Startzeitpunkt nach einer Kulturdauer von insgesamt sechs Tagen. Punktmarkierungen entsprechen einzelnen ermittelten Messwerten, horizontale Linien den arithmetischen Mitteln aus Dreifachansätzen für die angegebenen Behandlungsbedingungen.

Als für alle weiterführenden Untersuchungen einzusetzende Standard-Experimentalbedingung wurde dann mit 50 µg/ml die kleinste F(ab')₂-Konzentration gewählt, für die zusammen mit der Rituximab-Dosierung von 20 µg/ml ein maximaler Einfluss auf das Wachstumsverhalten nachgewiesen werden konnte. Im Folgenden wird für in dieser Konzentration eingesetzte F(ab')₂-Fragmente zur Vereinfachung daher die Bezeichnung "CL" ("cross linker") verwendet. Als interner "Seneszenz-Kontrollansatz" wurde in allen weiteren Experimenten eine mit ADR (10 ng/ml) behandelte Probe mitgeführt.

In exemplarischen Untersuchungen an Zelllinien ohne durchflusszytometrisch dokumentierbare substantielle CD20-Expression wurden erwartungsgemäß keine Effekte auf das Wachstumsverhalten durch die kombinierte Behandlung mit Rituximab und CL festgestellt (nicht detailliert gezeigt).

4.3 Gegen CD20 gerichtete Immuntherapie löst Lymphomzell-Seneszenz aus

Bei Einzelzugaben von entweder Rituximab oder CL unter den in 4.2 definierten Bedingungen zeigte sich für die Lymphom-Linien EHEB und RC-K8 keine als signifikant detektierbare Änderung ihrer langfristigen Wachstumskinetik (Abbildung 5). Im Gegensatz hierzu wurden bei sequentieller Applikation von sowohl RTX als auch CL (RTX_{CL}) in EHEB-Zellen ein nahezu vollständiger Wachstumsstopp sowie in RC-K8 eine im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle profunde Beeinträchtigung der Proliferation beobachtet (Abbildung 5).

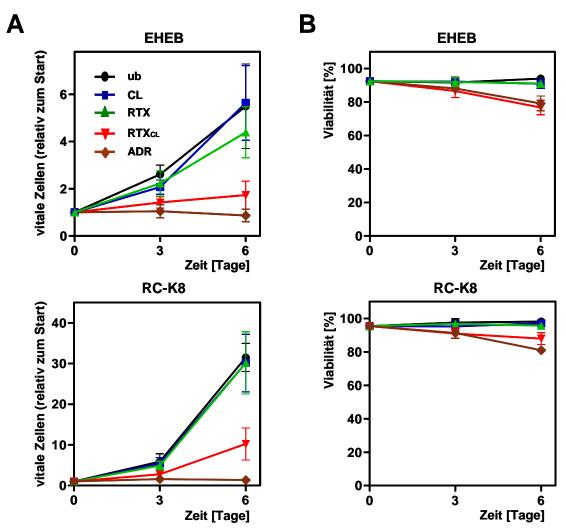


Abbildung 5: Wachstumscharakteristika von EHEB- und RC-K8-Zellen nach Rituximabbasierter Immuntherapie und ADR-Behandlung in vitro. A: Anzahl vitaler Zellen im Vergleich zum Start des Experimentes unter den angegebenen Konditionen. B: Viabilität im Experimentalverlauf. Dargestellt sind jeweils die aus zwei zeitlich getrennten, in unabhängigen Dreifachansätzen durchgeführten Experimenten gebildeten Mittelwerte. Vertikale Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen. Adriamycin wurde in der zur Seneszenz-Induktion hier optimalen Dosierung von 10 ng/ml eingesetzt. Die links oben dargestellte Legende gilt für alle vier Diagramme. ub: unbehandelte Kontrolle.

Neben einer verminderten Wachstumstendenz fiel eine deutliche Größenzunahme eines Teils der mit RTX_{CL} behandelten Zellpopulationen mit starker Ähnlichkeit zum weitestgehend homogenen Verhalten der Zellen bei ADR-Zugabe auf. Zur Objektivierung dieser Seneszenz-typischen morphologischen Veränderungen wurden Vorwärtsstreuung (FSC, Maß für die Zellgröße) und Seitwärtsstreuung (SSC, Korrelat der zellulären Granularität) der behandelten im Vergleich zu den Kontroll-Zellpopulationen durchflusszytometrisch dokumentiert (Abbildung 6).

Passend zu der beobachteten Beeinträchtigung der Wachstumskinetik und veränderten Zellmorphologie konnte in den mit RTX_{cl} behandelten Ansätzen ein substantieller und im Vergleich zu den mitgeführten Kontrollen signifikant erhöhter Anteil an Zellen mit verstärkter Aktivität Seneszenz-assoziierter β-Galaktosidase (Blaufärbung) nachgewiesen werden (Abbildung 6). Im Gegensatz zu einer in der Linie EHEB bereits in vielen unbehandelten Zellen detektierbaren und mit einer verhältnismäßig geringen Wachstumstendenz korrelierenden SA-β-Gal-Reaktivität war in RC-K8-Zellen als Modell eines aggressiven B-Zell-Lymphoms mit sehr hoher Wachstumstendenz "spontane Seneszenz" (d. h. SA-β-Gal-Reaktivität der Kontrolle) nur in einem sehr geringem Ausmaß (9,5% der unbehandelten Zellen) nachweisbar.

Die hier dargestellten Ergebnisse legten zunächst ähnliche Wirkmechanismen für ADR gewählten Experimentalbedingungen und RTX_{CL} unter den nahe. Interessanterweise konnte in RC-K8 jedoch durch RTX_{CL} (im Gegensatz zu ADR) kein vollständiger Wachstumsstopp bzw. keine überwiegende SA-β-Gal-Reaktivität der erreicht werden (Abbildungen 5 und 6). Durch diese behandelten Population Beobachtung lag die Möglichkeit einer den gegen aggressive B-Zell-Lymphome gerichteten klinischen Therapiestrategien entsprechenden Doppelbehandlung mit RTX_{CI} und ADR (im Sinne einer Immun-Chemotherapie in vitro) auf der Hand (siehe weiter unten).

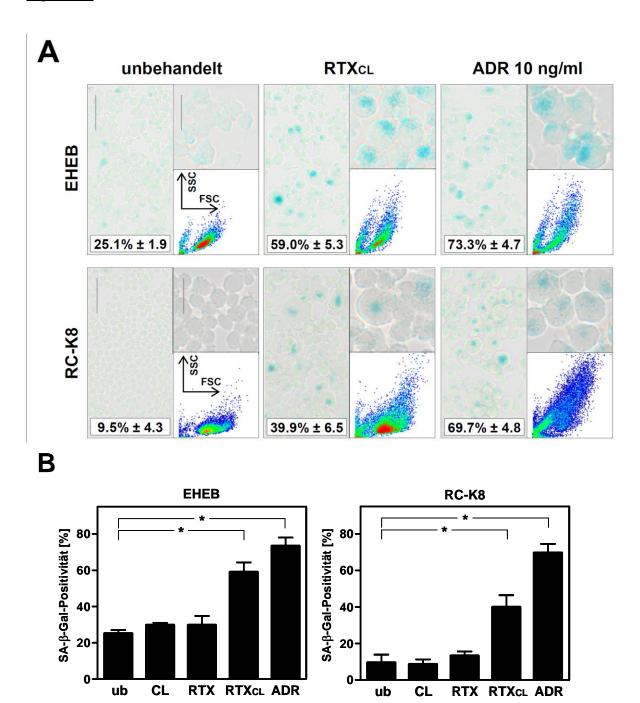


Abbildung 6: Detektion morphologischer Veränderungen und Seneszenz-assoziierter β-Galaktosidase-Aktivität (SA-β-Gal) in EHEB- und RC-K8-Zellen nach sechs Tagen. A: Repräsentative Mikrophotographien und durchflusszytometrische Morphologien (rechts unten, densitometrische Darstellung) der wie angegeben behandelten Zellpopulationen. In die Darstellung der Kontrollen eingefügte Maßstab-Balken entsprechen 50 µm (geringere Vergrößerung, links) bzw. 20 µm (hohe Vergrößerung, rechts oben) im Original; Prozentangaben geben Mittelwerte und Standardabweichungen der SA-β-Gal-positiven Anteile an den Zellpopulationen an. Zunahme der Zellgröße (FSC) und vermehrte Granularität (SSC) sind typische Merkmale seneszenter Zellen. Passend zu fehlenden Effekten auf die Wachstumskinetik nach Zugabe von RTX oder CL als Einzelkomponenten zeigten sich unter diesen Bedingungen keine Änderungen der Zellmorphologie (nicht dargestellt) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (ub). Graphische Darstellung B: (Mittelwerte Standardabweichungen) und statistischer Vergleich der SA-β-Gal-positiven Populationsanteile. ", " verweist auf signifikante Unterschiede (p< 0,05).

4.4 Reaktive Sauerstoffradikale sind wichtige Mediatoren Rituximab-vermittelter Seneszenz

Unter der Annahme ähnlicher Wirkmechanismen von ADR und RTX_{CL} wurde nun die Hypothese einer Manipulierbarkeit Rituximab-induzierter Seneszenz durch Interferenz mit der intrazellulären Vermittlung von DNA-Schadenssignalen (Blockade der "DNA damage response", DDR) in RC-K8-Zellen untersucht. Hierfür wurde Koffein, ein Inhibitor der für die Initiierung der DDR entscheidenden Kinasen ATM ("ataxia telangiectasia mutated") und ATR ("ATM and Rad3-related") eingesetzt.⁸¹

Entgegen einer erwartungsgemäß in deutlich geringerem Ausmaß auftretenden Seneszenz nach ADR-Behandlung bei Vorinkubation mit einer für RC-K8 langfristig tolerablen Koffein-Dosierung, zeigte sich in mit Koffein vorbehandelten RC-K8-Zellen überraschenderweise weiterhin eine unbeeinträchtigte Seneszenz-Auslösung durch RTX_{CL} (Abbildung 7).

Wissenschaftliche Vorarbeiten weisen auf eine zentrale Rolle reaktiver Sauerstoffradikale (ROS) bei der intrazellulären Wirkungsvermittlung gegen CD20 gerichteter Immuntherapien hin (siehe 2.4). Zusätzlich ist auch die Auslösung zellulärer Seneszenz durch ROS generierende Substanzen (wie z. B. Wasserstoffperoxid) bekannt.³⁴ Daher wurde die Beeinflussung Rituximab-vermittelter Seneszenz durch Vorbehandlung mit dem ROS neutralisierenden Agenz N-Acetylcystein (NAC) überprüft. Wie in Abbildung 7 dargestellt ist, führte die Vorinkubation mit NAC zu einer nahezu kompletten Aufhebung des Rituximab-induzierten seneszenten Phänotyps in RC-K8-Zellen, ohne dass diese Beobachtung durch eine verlorene CD20-Expression oder die massive Störung der Rituximab-Bindung an CD20 bzw. der Bindung des CL erklärbar gewesen wäre. Passend hierzu konnten in EHEB- und RC-K8-Zellen kurzfristig nach RTX_{CL}-Behandlung jeweils leicht erhöhte ROS-Konzentrationen gemessen werden (Abbildung 7).

Die hier dargestellten Beobachtungen legen (in Übereinstimmung zu den in der Einleitung diskutierten Vorarbeiten) die Abhängigkeit durch Rituximab-Behandlung ausgelöster Seneszenz von einem (moderat) erhöhten zellulären Gehalt an reaktiven Sauerstoffradikalen nahe und sprechen gegen eine direkte Abhängigkeit Rituximabmediierter Seneszenz von der zellulären "DNA damage response"-Signalkaskade.

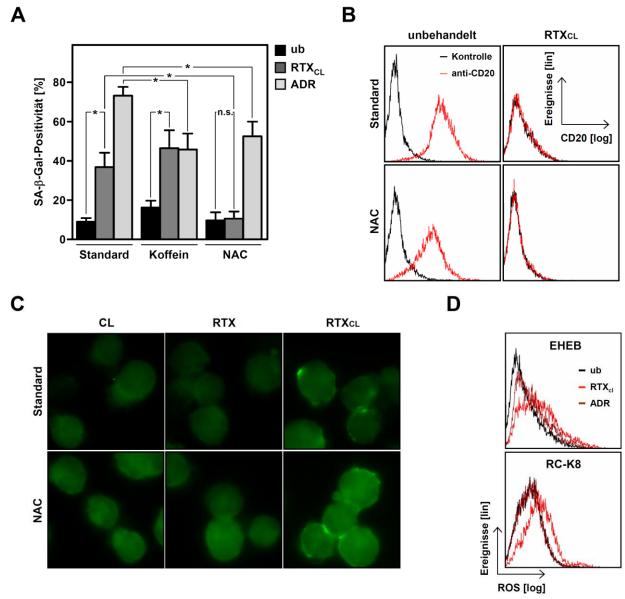


Abbildung 7: Selektive Blockade Rituximab-induzierter Seneszenz durch Ausschaltung reaktiver Sauerstoffradikale (ROS). A: Quantifizierungen und statistische Vergleiche seneszenter Populationsanteile nach sechs Tagen für RC-K8 bei Koffein- oder NAC-Vorbehandlung. "*": p<0,05. B und C: Durchflusszytometrischer Nachweis erhaltener Rituximab-Bindungsfähigkeit (B, vgl. Abbildung 3) und Immunfluoreszenz-basierte Detektion des CL (C) an zellgebundenem Rituximab auch nach Vorinkubation mit N-Acetylcystein (NAC). D: Detektion moderat erhöhter intrazellulärer ROS bei RTX_{CL}-Behandlung in EHEB- (nach 24 Stunden) und RC-K8-Zellen (nach 4 Stunden).

4.5 Rituximab sensibilisiert Lymphomzellen für Zytostatikainduzierte Seneszenz und DNA-Schädigungssignale

Da eine Rituximab-Behandlung insbesondere in der Therapie aggressiver Lymphome fast immer in Kombination mit konventionellen Zytostatika durchgeführt wird, 44,45 wurde im Folgenden die Frage nach einer möglichen Interferenz zwischen Rituximab- und Zytostatika-induzierter Seneszenz untersucht. Dabei wurde die Tatsache genutzt, dass (im Gegensatz zu den daher für diesen Ansatz nicht sinnvoll verwendbaren EHEB-Zellen) trotz vollständiger CD20-Okkupation bei der eingesetzten Rituximab-Dosierung (siehe Abbildung 3) in RC-K8 als Modell eines aggressiven Lymphoms nur eine partielle Wachstumsblockade und SA-β-Gal-Reaktivität erreicht werden konnte (vgl. Abbildungen 5 und 6), sodass eine Beeinflussung des Eintretens von Seneszenz durch eine zusätzliche Intervention erfassbar sein sollte.

Zunächst musste jedoch die formale Möglichkeit einer starken Änderung der Zelloberflächen-Expression von CD20 und einer somit möglicherweise verstärkten bzw. verminderten Empfindlichkeit der Zielzellen für Rituximab bei einer gleichzeitigen Adriamycin-Behandlung durchflusszytometrisch ausgeschlossen werden (Abbildung 8).

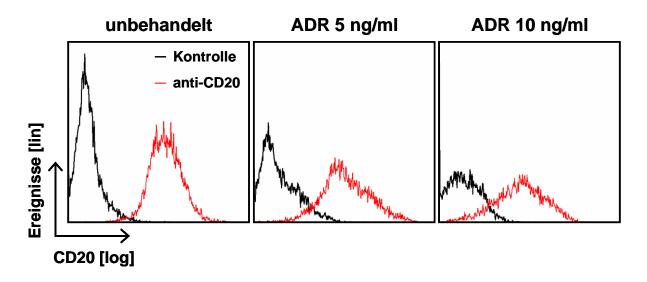


Abbildung 8: Adriamycin-Behandlung bewirkt in RC-K8-Zellen keine wesentliche Änderung der Oberflächen-Expression von CD20. CD20-Expression sechs Tage nach Behandlung mit den genannten ADR-Konzentrationen. Sehr ähnliche Ergebnisse wurden in Analysen nach Kurzzeit-Inkubation mit ADR (4 Stunden und 1 Tag, nicht dargestellt) gewonnen. Da ADR die Autofluoreszenz der untersuchten Zellen erhöhte, wurden die Negativkontrollen für jede Adriamycin-Konzentration auf den Fluoreszenzbereich zwischen 0 und 10 adjustiert. Auch bei identischen Einstellungen des Durchflusszytometers für alle Proben zeigten sich dieselben relativen Fluoreszenz-Zunahmen in Abhängigkeit von der Antikörperzugabe (nicht dargestellt).

Ergebnisse

Um die Beeinflussung Chemotherapie-induzierter Seneszenz durch eine (in der klinischen Anwendung typischerweise vor der Zytostatika-Applikation erfolgende) zusätzliche Rituximab-Behandlung zu analysieren, wurden RC-K8-Zellen mit der gemäß Vorarbeiten für die Initiierung zell-autonomer Rituximab-Effekte als ausreichend anzusehenden zeitlichen Latenz von vier Stunden⁸⁷ nach RTX_{CL}-Zugabe zusätzlich mit Adriamycin behandelt. Dabei wurde neben einer nur in einer Minderheit der Zellen Seneszenz auslösenden ADR-Dosierung von 5 ng/ml auch die für die Induktion des seneszenten Phänotyps optimale ADR-Konzentration (10 ng/ml) eingesetzt, da eine "Seneszenz-Reduktion" bei Rituximab-Vorbehandlung im Vergleich zu alleiniger Adriamycin-Applikation nicht auszuschließen war. Abbildung 9 macht jedoch deutlich, dass die zusätzliche RTX_{CL}-Behandlung (im Sinne einer "Immunchemotherapie" *in vitro*) ein deutlich verstärktes Auftreten des seneszenten Phänotyps in der niedrigeren Adriamycin-Dosisstufe bewirkte und nicht zu einer Abschwächung des maximalen Seneszenz-Niveaus nach Adriamycin-Therapie führte.

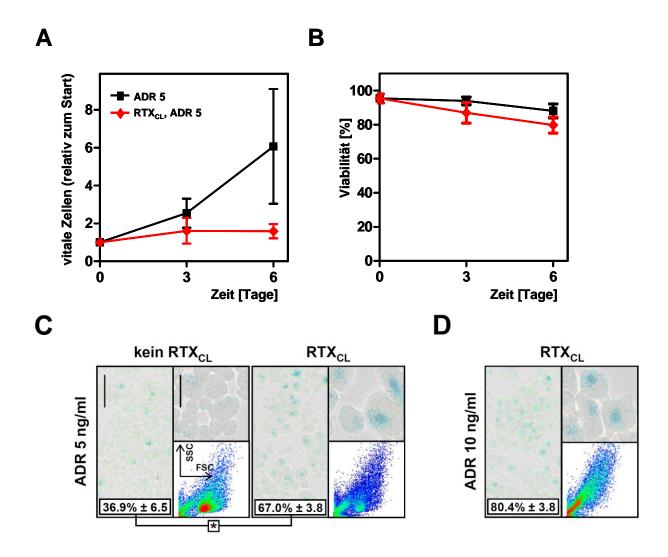


Abbildung 9: anti-CD20-Vorbehandlung verstärkt Adriamycin-induzierte Seneszenz in RC-K8-Zellen. Anzahl vitaler Zellen relativ zum Start des Experimentes (A) und Viabilität (B) nach alleiniger ADR-Behandlung (5 ng/ml) im Vergleich zu kombinierter "Immunchemotherapie" unter Einsatz derselben ADR-Dosierung. C und D: Repräsentative Mikrophotographien, Quantifizierungen seneszenter Populationsanteile und durchflusszytometrische Morphologien der Zellpopulationen (Einstellungen des Durchflusszytometers identisch zu Abbildung 6A) nach 6 Tagen für alleinige Behandlung mit 5 ng/ml ADR im Vergleich mit zusätzlichem RTX_{CL} (C) bzw. nach Behandlung mit RTX_{CL} zusammen mit 10 ng/ml ADR. Maßstab-Balken entsprechen 50 μm (geringere Vergrößerung) bzw. 20 μm (hohe Vergrößerung) im Original; Zahlenangaben Mittelwert und Standardabweichung des SA-β-Gal-positiven Zellanteils. "*": p<0,05. Vgl. Abbildung 6 für unbehandelte Kontrollen und die Einzelbehandlung mit 10 ng/ml ADR.

Passend zu diesem Ergebnis zeigten Zellzyklus-Analysen (Brdu/PI) eine deutliche Reduktion des Anteils DNA-synthetisierender (d. h. BrdU-positiver) Zellen in der S-Phase des Zellzyklus als Korrelat einer verringerten Proliferation durch zusätzliches RTX_{CL} im Vergleich zu ausschließlicher ADR-Behandlung (Abbildung 10) für beide untersuchte ADR-Dosisstufen. Darüber hinaus fiel – entgegen dem für "klassische" Seneszenz zu erwartenden Arrest in der G1-Phase – eine behandlungsabhängige

Ergebnisse

Akkumulation von RC-K8-Zellen in der G2-Phase des Zellzyklus auf. Wie in Abbildung 10 dargestellt ist, ließ sich durch die ausschließliche Applikation von RTX_{CL} oder der niedrigeren Adriamycin-Dosisstufe (5 ng/ml) zwar ebenfalls eine Zunahme des Populationsanteils in der G2-Phase, überraschenderweise jedoch keine signifikante Änderung in der DNA-synthetisierenden (d.h. BrdU-positiven) S-Phase gegenüber der unbehandelten Kontrolle quantifizieren.

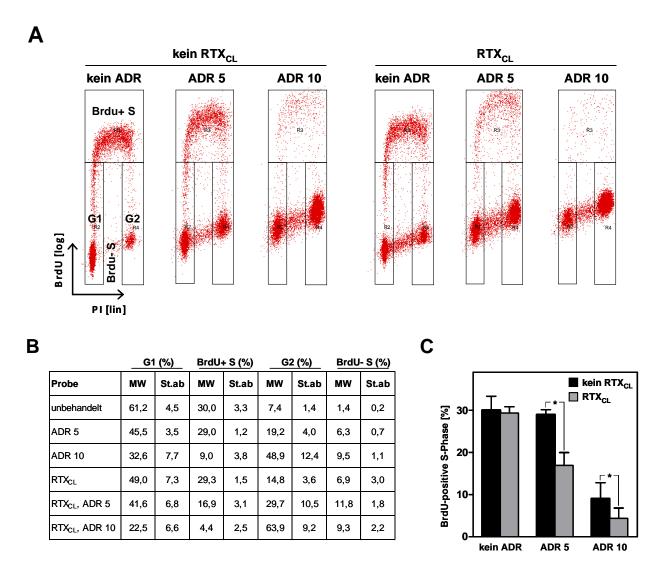


Abbildung 10: Zellzyklus-Analysen an RC-K8-Zellen nach Einzelbehandlungen und kombinierter Immunchemotherapie. A: Repräsentative Zellzyklus-Diagramme 6 Tage nach den angegebenen Behandlungen. Im Diagramm für die unbehandelte Kontrolle ist die Zuordnung zu den verschiedenen Proliferationsphasen markiert. B: Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (St.ab) für die verschiedenen Populationszustände aus zwei jeweils als unabhängige Dreifachansätze durchgeführten Experimenten. C: Statistischer Vergleich der Populationsanteile in BrdU-positiver S-Phase als Maß für die Proliferation nach 6 Tagen. Alle Konzentrationsangaben für ADR in ng/ml. "*": p<0,05.

Wie in der Einleitung dargestellt, sind das Auftreten und die Aufrechterhaltung zellulärer Seneszenz in vielen Modellsystemen von einer dauerhaften Aktivierung der DDR abhängig. In Zusammenarbeit mit Herrn Yong Yu, der in unserer Arbeitsgruppe als naturwissenschaftlicher Doktorand tätig ist, erfolgte daher eine proteinchemische Analyse ausgewählter DDR-Komponenten und mit Seneszenz assoziierter Signalwege (Abbildung 11) der *in vitro* (immun-)chemotherapeutisch behandelten RC-K8-Zellen.

Nach der alleinigen Inkubation mit RTX_{CL} war (wie für ADR auf der Dosisstufe 5 ng/ml und in Übereinstimmung mit der fehlenden Abschwächung Rituximabinduzierter Seneszenz durch Koffein) keine langfristige DDR-Aktivierung nachweisbar. Allerdings zeigten sich nach zusätzlicher RTX_{CL}-Behandlung im Vergleich zu alleiniger Adriamycin-Zugabe sowohl einen Tag als auch 6 Tage nach Behandlungsbeginn eine erhöhte Proteinexpression der an Serinrest 139 phosphorylierten Histon H2A-Variante H2A.X (γ-H2AX), einem Indikator für DNA-Doppelstrangbrüche, sowie eine deutlichere Aktivierung und Stabilisierung des Tumor-Suppressors p53 (stärkere Expression und Phosphorylierung an Serin 15) (Abbildung 11). Darüber hinaus wurden vor allem 6 Tage nach Beginn der Immunchemotherapie im Vergleich zu alleiniger ADR-Behandlung eine vermehrte Expression des Zellzyklus-Regulators p21^{CIP1} sowie eine verstärke, Transkriptions-repressive Trimethylierung von Histon H3 an Lysin 9 nachgewiesen (Abbildung 11).

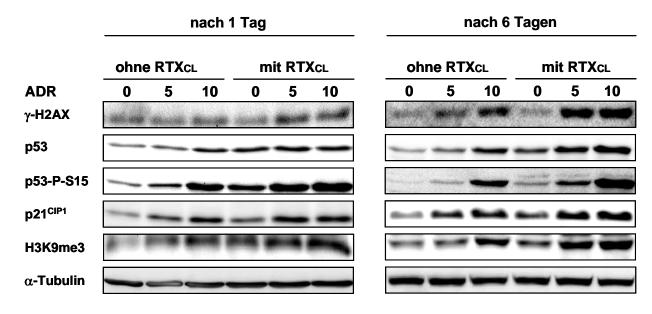


Abbildung 11: Western Blot-Untersuchungen von RC-K8-Zellen 1 Tag (links) und 6 Tage (rechts) nach Einzelbehandlungen mit ADR oder RTX $_{\text{CL}}$ und kombinierter Immunchemotherapie. γ -H2AX: an Serin 139 phosphorylierte Histon H2A-Variante H2A.X, p53-P-S15: an Serin 15-phosphoryliertes p53, H3K9me3: an Lysin 9 trimethyliertes Histon H3. Adriamycin-Konzentrationen in ng/ml.

Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass eine gegen CD20-gerichtete Antikörper-Therapie ihre Zielzelle gegenüber durch konventionelle Zytostatika ausgelösten DNA-Schadenssignalen sensibilisiert und dadurch zu einer verstärkten Auslösung zellulärer Seneszenz nach kombinierter immunchemotherapeutischer Behandlung beiträgt, auch wenn der nach alleiniger RTX_{CL}-Zugabe im untersuchten Modellsystem auftretende seneszente Phänotyp offenbar nicht primär von der DDR-Signalkaskade vermittelt wird.

4.6 Zusätzliche anti-CD20-Behandlung verstärkt den Seneszenzassoziierten sekretorischen Phänotyp nach Chemotherapie

Wie bereits in der Einführung diskutiert, stellt die Sekretion einer Vielzahl das Mikromilieu modulierender Zytokine ein wesentliches Merkmal seneszenter Zellen dar. Abschließend wurden daher die quantitative RNA-Expression und Proteinsekretion exemplarisch für IL-6 und IL-8 als prominente Bestandteile des Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyps (SASP)^{39,88} in RC-K8-Zellen nach Immunchemotherapie untersucht.

Wie in Abbildung 12 dargestellt ist, zeigte sich dabei sowohl für IL-6 als auch IL-8 nach Adriamycin-Behandlung eine deutliche, dosisabhängige Expressions induktion, wohingegen die alleinige Zugabe von RTX_{CL} eine nur geringe, wenn auch im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle signifikante Induktion bedingte. Allerdings bewirkte die zusätzliche Behandlung mit RTX_{CI} im Vergleich zu alleiniger Zugabe von 5 ng/ml ADR (passend zu dem bei diesem Ansatz beobachteten verstärkten Auftreten Therapiebedingter Seneszenz, s. o.) für beide Zytokine eine mehr als additive, signifikante Die auf Expressionsverstärkung. der ADR-Dosisstufe 10 ng/ml Unterschiede zwischen alleiniger Chemo- und Immunchemotherapie gemessenen Expressionsniveaus erwiesen sich (bei allerdings sehr großen Standardabweichungen der erhobenen Stichproben) als nicht signifikant verschieden.

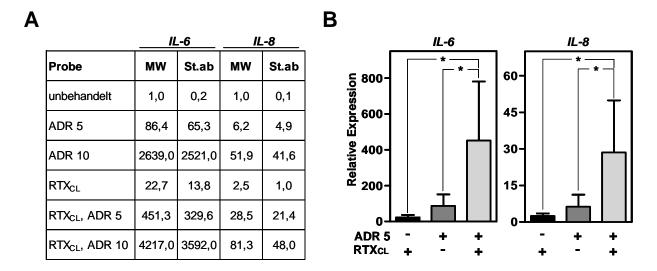
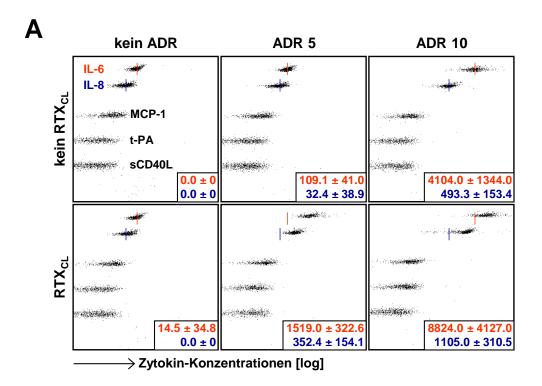


Abbildung 12: Relative RNA-Expression der Seneszenz-assoziierten Zytokine IL-6 und IL-8 in RC-K8-Zellen 6 Tage nach Therapiebeginn. A: Arithmetisch gemittelte RQ-Werte (MW) und ihre Standardabweichungen (St.ab) für die verschieden behandelten Populationen. B: Darstellung und statistische Prüfung von Expressionsunterschieden für IL-6 (links) und IL-8 (rechts) unter den Experimentalanordnungen mit Seneszenz-Verstärkung bei kombinierter immunchemotherapeutischer Behandlung. Alle ADR-Konzentrationen in ng/ml.

Im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle durchgeführte RNA-Expressionsanalysen erlauben keine Rückschlüsse auf tatsächlich sezernierte, absolute Proteinmengen, da sie einerseits Methoden-bedingt "nur" relative Ergebnisse liefern und überdies Regulationsschritte der Proteinbiosynthese und –sekretion nicht erfassen können. Daher wurden für den definitiven Nachweis einer Seneszenz-bedingten Zytokin-Sekretion ergänzend auch Protein-Konzentrationen für IL-6 und IL-8 in kontrolliert gewonnenen Medium-Überständen vorbehandelter RC-K8-Zellen bestimmt (Abbildung 13).

Auch dabei zeigte sich – wie erwartet – eine dem zunehmenden Anteil seneszenter Zellen entsprechende, von der Adriamycin-Dosis abhängige Zunahme der IL-6- und IL-8-Konzentration im Medium. Trotz des (am ehesten Methoden-bedingt) fehlenden Nachweises einer im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle detektierbaren Sekretionsänderung für RTX_{CL} wurden nach Behandlung mit 5 und 10 ng/ml ADR im Falle der zusätzlichen RTX_{CL}-Applikation deutlich und signifikant höhere Medium-Konzentrationen von IL-6 und IL-8 als bei alleiniger Chemotherapie gemessen (Abbildung 13).



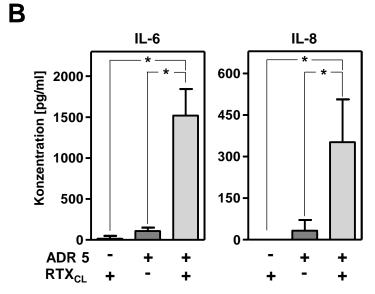


Abbildung 13: Bestimmung der Proteinkonzentrationen für Interleukin 6 und Interleukin 8 Medium-Überständen von RC-K8-Zellen nach Immunchemotherapie. Vorbehandlung für 6 Tage wurden jeweils 1x10⁶ vitale Zellen über Nacht in frischem, FBSfreiem Medium kultiviert, bevor Protein-Konzentrationsmessungen in zellfreien Überständen 3.3.4 beschrieben) durchgeführt wurden. A: Gezeigt sind repräsentative in Durchflusszytometrie-Diagramme. Rote (IL-6) und blaue (IL-8) Markierungen bezeichnen jeweils die mittleren Positionen der den beiden Zytokinen entsprechenden Kugel-Populationen für die angegebene ADR-Dosierung ohne zusätzliche Immuntherapie. Zahlenwerte unten rechts und IL-8 berechnete Konzentrationsmittelwerte (in pg/ml) Standardabweichungen. In Übereinstimmung mit publizierten Arbeiten⁸⁹ wurde auch eine dosisabhängig moderat erhöhte Konzentration für t-PA (tissue-type plasminogen activator) gemessen (Quantifizierung nicht gezeigt). Dies galt nicht für das ebenfalls als SASP-Komponente beschriebene MCP-1 (membrane cofactor protein-1) sowie den löslichen CD40-Liganden (sCD40L), der typischerweise nicht als Bestandteil des SASP angesehen wird. 33 B: Statistische Prüfung der Konzentrationsunterschiede für IL-6 und IL-8. "*": p<0,05.

5 Diskussion

Die Rationale der Fragestellung, ob durch den therapeutischen Einsatz des gegen das CD20-Antigen gerichteten Antikörpers Rituximab Lymphomzell-Seneszenz ausgelöst werden könnte, ergab sich aus der Zusammenführung zweier von anderen Wissenschaftlern vor der Arbeit an dieser Dissertation gewonnener Erkenntnisse: Einerseits war neben typischen Effektor-Mechanismen des Immunsystems auch die direkte Auslösung von Lymphomzell-Apoptose bzw. deren Verstärkung in Kombination mit zytotoxischer Chemotherapie als therapeutische Wirkung des Antikörpers Rituximab bekannt. Andererseits war bereits nachgewiesen worden, dass – vor allem im Falle einer kompromittierten Apoptose-Fähigkeit maligne entarteter Zellen – antineoplastische Behandlung zelluläre Seneszenz dieser Malignom-Zellen bewirken kann. 23,24

Die hier vorgelegte Arbeit beschreibt – nach dem Kenntnisstand des Autors erstmalig – einen zumindest einige wesentliche Merkmale zellulärer Seneszenz widerspiegelnden Phänotyp in etablierten humanen B-Zell-Lymphom-Linien nach einer Rituximabbasierten Immuntherapie *in vitro*. Auch wenn dieser Phänotyp bei RC-K8-Zellen in einem geringeren Ausmaß auftrat als nach Behandlung mit einer optimalen Konzentration des "klassischen" Seneszenz-Induktors Adriamycin,²³ konnte neben der verstärkten Detektion Seneszenz-assoziierter β-Galaktosidase-Aktivität auch ein deutlicher Effekt auf die Langzeit-Wachstumscharakteristika bei gleichzeitig über den gesamten Experimentalverlauf erhaltener hoher Vitalität der immuntherapeutisch behandelten Zellpopulationen nachgewiesen werden.

Überraschenderweise legen die durchgeführten pharmakologischen Interferenz-Untersuchungen mit Koffein und N-Acetylcystein dabei für Rituximab eine Seneszenz-Vermittlung über die Erhöhung des zellulären Gehalts an reaktiven Sauerstoffradikalen und (im Gegensatz zu Adriamycin) nicht primär über die Aktivierung einer DNA-Schädigungsantwort (DDR) nahe. Allerdings konnten – in Übereinstimmung mit publizierten Vorarbeiten⁷⁸ – bei (Methoden-bedingt nur vor der Manifestation des seneszenten Phänotyps möglichen) direkten Messungen reaktiver Sauerstoffradikale nur moderate Anstiege in Abhängigkeit von der Rituximab-basierten Behandlung detektiert werden.

Passend zu der für diese Lymphom-Entität klinisch evidenten Prognoseverbesserung durch die kombinierte Gabe von Rituximab mit konventioneller chemotherapeutischer

Behandlung, 44-46,51 zeigte sich in den untersuchten diffus-großzelligen RC-K8-Lymphomzellen ein verstärktes Auftreten zellulärer Seneszenz nach immunchemotherapeutischen Kombinationsbehandlungen im Vergleich zur alleinigen Applikation einer nur anteilig Seneszenz-auslösenden Adriamycin-Dosis. Diese Ergebnisse konnten durch die Charakterisierung zweier wesentlicher, typischerweise bei seneszenten Zellen nachweisbaren Stoffwechselveränderungen – Aktivierung von DDR und $SASP^{34-36}$ – durch proteinbiochemische Untersuchungen sowie RNA-Expressionsanalysen in derselben Experimentalanordnung zumindest exemplarisch bestätigt werden. Bemerkenswerterweise zeigten sich bezüglich der Expression und Sekretion der Zytokine Interleukin 6 und Interleukin 8 als typische Vertreter des SASP³⁹ jeweils nur geringe bzw. fehlende Anstiege durch die alleinige immuntherapeutische Behandlung trotz deutlicher Seneszenz-Induktion und Beeinflussung des langfristigen Wachstumsverhaltens. Allerdings wurden (passend zur "Seneszenz-permissiven Wirkung" von RTX_{CI}) in den Kombinationsbehandlungen von RTX_{CI} mit Adriamycin eine deutlich verstärkte Aktivierung der DDR sowie mehr als additive (d. h. synergistische) Zytokin-Induktionen beobachtet.

Unter Berücksichtigung der einerseits offenbar bestehenden primären Unabhängigkeit Rituximab-vermittelter Lymphomzell-Seneszenz von der DDR sowie Vergleich alleiniger Adriamycin-Behandlung der dennoch im zu nach Immunchemotherapie (aus im Rahmen dieser Dissertation letztendlich nicht vollständig aufgeklärten Gründen) deutlich verstärkt detektierten DDR-Aktivierung befinden sich diese Beobachtungen in Übereinstimmung mit Daten aus der Forschergruppe um Judith Campisi. Diese legen eine positive Korrelation der Stärke des Sekretionsniveaus Seneszenz-assoziierter Zytokine eher mit der jeweiligen DDR-Aktivierung als mit dem Auftreten des seneszenten Phänotyps per se nahe³⁴.

Interessanterweise wurde in den letzten Jahren eine Reihe wissenschaftlicher Arbeiten publiziert, die indirekt auf eine mögliche Bedeutung akut auftretender Lymphomzell-Seneszenz für die therapeutische Aktivität von Rituximab hindeuten: So wurden mehrere auto- oder parakrin sezernierte Zytokine, die – ähnlich wie Rituximab – über spezifische Zellmembran-Rezeptoren auf den intrazellulären Stoffwechsel wirken und keine direkte DNA-Schädigung bedingen, als bei der Auslösung und der Aufrechterhaltung zellulärer Seneszenz-Programme entscheidend beteiligt charakterisiert. 39,88 Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass zelluläre Seneszenz nicht in

jedem Fall zwingend von einer DDR-Aktivierung begleitet sein muss und durch einen erhöhten Gehalt der Zelle an reaktiven Sauerstoffspezies vermittelt werden kann. ^{34,81,82} Bei der Charakterisierung neuerer gegen CD20 gerichteter therapeutischer Antikörper rücken reaktive Sauerstoffradikale als Vermittler der Wirkung auf die Zielzellen zunehmend in den Vordergrund der wissenschaftlichen Forschung. ^{78,90} Eine Arbeitsgruppe berichtete zudem das Auftreten von Autophagie, einem Prozess, der vermutlich auch eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung zellulärer Seneszenz spielt, in Rituximab-behandelten Burkitt-Lymphom-Linien. ^{91,92} Nicht zuletzt soll in diesem Zusammenhang erneut erwähnt werden, dass zwischenzeitlich eine Seneszenz-auslösende bzw. begünstigende antineoplastische Wirkung für die ebenfalls in der Tumortherapie eingesetzten synthetischen Antikörper Cetuximab und Bevacizumab beschrieben wurde. ^{83,84}

Der Nachweis durch Rituximab als in der Behandlung vieler B-Zell-Lymphom-Erkrankungen etablierter therapeutischer Standard induzierbarer Lymphomzell-Seneszenz besitzt potentiell weitreichende klinische Implikationen: Einerseits hat sich die Integrität eines durch antineoplastische Behandlung auslösbaren Seneszenz-Programmes in einem präklinischen Modell aggressiver B-Zell-Lymphom-Erkrankungen als prognostisch günstig erwiesen.²⁶ Darüber hinaus wurde bereits gezeigt, dass Tumorzellpopulationen eine gegen Malignom seneszente das gerichtete Abwehrreaktion des Immunsystems verursachen können. 40 Eine Seneszenz-bedingte Immunaktivierung nach Rituximab-Behandlung könnte daher die ohnehin durch Rituximab rekrutierten zellulären Effektor-Funktionen des Immunsystems ebenso wie einen von mehreren Autoren für Rituximab implizierten "Impfeffekt" in deren Effizienz deutlich verstärken und damit zu einem verbesserten Therapieansprechen von Seneszenz-fähigen B-Zell-Lymphomen beitragen. 54,80

In den letzten Jahren rücken potentiell für die Tumorbehandlung nachteilige biologische Eigenschaften seneszenter Zellen, die auch nach Rituximab-Behandlung denkbar sind, in das Interesse der Forschung: Von seneszenten Zellen sezernierte Zytokine wirken in bestimmten Modellsystemen anti-apoptotisch, teilungs- sowie metastasierungsfördernd auf benachbarte Tumorzellen und könnten im Patienten dadurch zum Tumorprogress bzw. schlechteren Therapieansprechen beitragen. 33,39,93 Darüber hinaus weisen noch nicht publizierte präklinische Ergebnisse aus unserer Arbeitsgruppe auf ein besonders aggressives Wachstum maligner Lymphomzellen und ihren Zugewinn an Stammzell-Eigenschaften im Falle eines (trotz des meist als

langfristig irreversibel postulierten Arrestes seneszenter Zellen) auch in Primärtumoren denkbaren Wiedereintritts in die Zellteilung aus dem seneszenten Zustand hin (Milanovic et. al, Manuskript in Vorbereitung).

Interessanterweise konnte unsere Arbeitsgruppe zusätzlich zeigen, dass seneszente Zellen (und insbesondere Therapie-bedingt seneszente Lymphomzellen) im Vergleich zu proliferierenden Kontrollen und nicht Seneszenz-fähigen Tumoren eine erhöhte Abhängigkeit von intrazellulär verfügbarer Glucose als Stoffwechselsubstrat besitzen, die in einem präklinischen Lymphom-Modell therapeutisch zur spezifischen Eliminierung seneszenter Tumorzellen mit konsekutiver Verbesserung des Gesamtüberlebens genutzt werden kann (Dörr et. al, Manuskript in Revision). Ein nach antineoplastischer Behandlung seneszentes und deshalb im Sinne einer nicht vollständigen Rückbildung noch nachweisbares Lymphom-Gewebe stellt sich daher trotz seines (wahrscheinlich) terminalen Wachstumsarrestes in [18F]fluoro-Deoxy-Glucose-basierten Positronen-Emissionstomographien (FDG-PET) als Stoffwechsel-aktiv dar (Dörr et. al, Manuskript in Revision). Die wesentliche Differenzierung zwischen proliferierendem und seneszentem Tumor kann nach aktuellem Kenntnisstand also nur durch histologische Untersuchung des nach der Behandlung verbliebenen Lymphom-Gewebes gelingen.

Die Bewertung der Rolle Therapie-induzierter Seneszenz in der Tumorbiologie menschlicher Lymphom-Erkrankungen (und eine Übertragbarkeit der dargestellten präklinischen Forschungsergebnisse auf die Patientenbehandlung) wird durch die Tatsache erschwert, dass die Gewinnung posttherapeutischer Biopsien, an denen Lymphomzell-Seneszenz in vivo untersucht werden könnte, bisher nur in seltenen Fällen dem klinischen Standardvorgehen entspricht, da das mit der jeweiligen Intervention verbundene Risiko ethisch nur durch eine folgende therapeutische Konsequenz (und nicht allein durch wissenschaftliches Interesse) zu rechtfertigen ist. Ohnehin gewonnene posttherapeutische Lymphom-Biopsien sollten unbedingt auf das Vorhandensein seneszenter Tumorzellen untersucht und dieses mit dem weiteren Erkrankungsverlauf des jeweiligen Patienten korreliert werden. Weiterhin könnte der Versuch unternommen werden, etwa durch Genexpressionsanalysen prätherapeutischer Gewebeproben derselben Patienten eine für das Auftreten Therapie-bedingter Seneszenz prädiktive "Gensignatur" zu erstellen, die dann als "Seneszenz-Surrogat-Marker" deren Bedeutung für den Erfolg einer (z. B. Rituximabenthaltenden) Behandlung aufklären könnte. Unter Nutzung ähnlicher Experimentalansätze wurden bereits wegweisende Erkenntnisse über die Tumorbiologie verschiedener Lymphom-Entitäten gewonnen und Erkrankungssubtypen mit deutlich divergierender Langzeitprognose charakterisiert. 9-11

Die für die Untersuchung von Langzeit-Effekten wie Therapie-induzierte Seneszenz notwendige Kultivierung und Behandlung menschlicher Lymphomproben unter Laborbedingungen hat sich als extrem schwierig erwiesen. Daher muss selbst in hochrangig publizierten Arbeiten für eine Verbindung in Modellsystemen erhobener mechanistischer Befunde mit primären Lymphom-Erkrankungen des Menschen häufig auf Nachweise zytotoxischer Effekte an aus dem peripheren Blut isolierten Tumorzellen an chronisch-lymphatischen Leukämien leidender Patienten zurückgegriffen werden (z. B. 78,90). Im Rahmen des bearbeiteten Projektes durchgeführte (jedoch hier nicht detailliert dargestellte) Versuche zum Nachweis zellulärer Seneszenz in primären Lymphomproben nach Rituximab-Behandlung *in vitro* verliefen aufgrund langfristig weitestgehend fehlender Proliferation bereits in unbehandelten Kontrollen frustran.

Ebenso blieben Bemühungen, in aggressiven, Eμ-*myc*-transgenen B-Zell-Lymphomen der Maus durch retrovirale Transduktion die Expression eines humanen CD20-Konstruktes zu erreichen und damit Rituximab-Wirkungen in vivo nachvollziehen zu können, leider aus technischen Gründen erfolglos. (Vermutlich störte dabei in den B-Zellen vorhandenes murines CD20, an das Rituximab nicht binden kann, 52,85 die korrekte intrazelluläre Prozessierung des ektop exprimierten humanen CD20.) Daher mussten die durchgeführten Untersuchungen auf die Analysen etablierter B-Zell-Linien beschränkt bleiben. Dies ist insofern bedeutsam, als in an das von ihrer natürlichen Mikroumgebung unabhängige Wachstum unter Zellkultur-Bedingungen adaptierten Lymphom-Zelllinien häufiger als in lymphatischen Primärtumoren genetische und epigenetische Alterationen in Apoptose und Seneszenz-kontrollierenden Signalwegen vorliegen. 94 Daher können aus der (geringen) Häufigkeit einer erhaltenen Seneszenz-Fähigkeit bei der initial für diese Arbeit untersuchten Auswahl an Zelllinien keine Schlussfolgerungen auf eine (möglicherweise nur geringe) Bedeutung zellulärer Seneszenz in der Biologie primärer humaner Lymphom-Erkrankungen gezogen werden. Auch stellt die Zelllinie EHEB aufgrund ihres aus den abgebildeten Wachstumskurven ersichtlichen geringen Proliferationspotentials und ihrem bereits spontan hohem Anteil SA-β-Gal-reaktiver Zellen kein ideales Modell für Untersuchungen Therapie-bedingter Seneszenz dar.

Weiterhin ist zu vermuten, dass die in den RC-K8-Zellen therapieabhängig beobachtete Akkumulation in der G2-Phase des Zellzyklus (im Gegensatz zu "klassischer" Seneszenz als G1-Phasen-Arrest) durch einen Linien-inhärenten (epi-)genetischen Defekt des G1-S-Checkpoints bedingt ist und keine alleinig Rituximab-vermittelte Zellantwort darstellt, da in RC-K8 auch nach Seneszenzauslösender Chemotherapie im Wesentlichen ein G2-Arrest detektiert wurde. Auch wenn formal ein Wachstumsarrest (Verlust an BrdU-positiver S-Phase) nach alleiniger Immuntherapie oder ADR-Behandlung auf der Dosisstufe 5 ng/ml nicht bewiesen werden konnte, legen die in den Zelldichtebestimmungen eindeutig nachgewiesene Reduktion des Langzeitwachstums für diese Experimentalbedingungen zusammen mit dem eindeutigen Nachweis von Zellen mit seneszentem Phänotyp viel eher technische Probleme oder Grenzen bei der Durchführung der Untersuchungsmethode als das biologischen Fehlen eines Wachstumsarrestes nahe.

Eine Alternative, die Untersuchungen zum Auftreten zellulärer Seneszenz bei gegen CD20 gerichteter Immuntherapie in präklinischen, genetisch manipulierbaren B-Zell-Lymphom-Modellen ermöglichen würde, wäre der Einsatz gegen murines CD20 gerichteter Antikörper. Allerdings würde sich aus den dabei gewonnenen Ergebnissen stets die Fragen nach deren Übertragbarkeit auf humane Lymphom-Erkrankungen und den Einsatz von Rituximab ergeben, da neben Unterschieden in der Biologie von CD20 zwischen den Spezies auch deutlich divergierende Zielzell-Effekte verschiedener gegen CD20 gerichteter Antikörper bekannt sind. Sein sein der Spezies auch deutlich divergierende Zielzell-Effekte verschiedener gegen CD20 gerichteter Antikörper bekannt sind.

Selbstkritisch bleibt anzumerken, dass das für diese Arbeit gewählte methodische Vorgehen (zunächst Identifikation Chemotherapie-Seneszenz-fähiger B-Zell-Linien mit deutlicher CD20-Oberflächenexpression, dann Untersuchung der Rituximab-Wirkung in diesen Linien) die potentiell bestehende Möglichkeit selektiv durch Rituximab (nicht aber Adriamycin) induzierbarer Seneszenz in anderen Linien nicht erfassen konnte: Wenn Rituximab zwar Chemotherapie-induzierte DNA-Schadenssignale verstärkt, selbst aber davon unabhängig über reaktive Sauerstoff-Spezies Seneszenz induziert, bedeutet einerseits Seneszenz-Induzierbarkeit durch Adriamycin nicht zwangsläufig auch deren Auslösbarkeit bei gegen CD20 gerichtete Immuntherapie. Andererseits könnten Zelllinien und Lymphome mit kompromittierter DDR noch für Seneszenz-Induktion durch Rituximab empfänglich sein. Diese Hypothese wird derzeit in weiterführenden Experimenten derzeit bearbeitet.

Weiterhin wird aus den im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Analysen nicht klar, warum trotz durchflusszytometrischem Nachweis einer (auch langfristig) vollständigen CD20-Okkution durch Rituximab in der eingesetzten Dosierung in den RC-K8-Zellen (im Gegensatz zur optimalen Adriamycin-Konzentration) nur in weniger als der Hälfte der als weitestgehend homogenen anzusehenden Zelllinien-Population ein seneszenter Phänotyp entsteht. Neben der stochastisch verteilten Antwort auf ein externes Signal moderater Stärke als nach Ansicht des Autors wahrscheinlichster Erklärung kommen als denkbare Ursachen hierfür auch eine Abhängigkeit der Antwort auf die Immuntherapie von individuell verschiedenen CD20-Expressionshöhen, ROS-Konzentrationen oder den Zellzyklusphasen einzelner Zellen bei Behandlungsbeginn infrage. Darüber hinaus lässt sich bis auf die für die eingesetzten F(ab')2-Fragmente ab einer Konzentration von 50 µg/ml beobachtete Wirkungssättigung keine Aussage über die Effektivität des "Cross-Linkers" treffen. Mit anderen an CD20 gebundene Rituximab-Moleküle vernetzenden Agenzien wäre also prinzipiell die Auslösung von Seneszenz in noch höherem Ausmaß denkbar. Da in immunchemotherapeutischen Kombinationsbehandlungen das Zeitintervall zwischen Rituximab- und Adriamycin-Behandlung nicht variiert wurde, muss die darin detektierte Wirkungsverstärkung der Therapiekomponenten ebenfalls nicht der maximal biologisch möglichen entsprechen.

Globale Analysen an Extrakten unselektierter Zellpopulationen können naturgemäß keine Informationen über Änderungen der Signalweg-Aktivierung, ROS-Konzentration oder Zytokin-Expression einzelner Zellen liefern, sondern vermitteln vielmehr nur ein "Durchschnittsbild" der gesamten Zellmenge. Dies ist insbesondere aufgrund der inhomogenen Antwort (nur partielle Seneszenz-Induktion) der untersuchten RC-K8-Zellen auf die Rituximab-basierte Behandlung von Bedeutung. Die Charakterisierung der Rituximab-seneszenten Zellen nach "Aufreinigung" aus der Gesamtpopulation würde daher wahrscheinlich deutlichere Unterschiede im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen nachweisen. Zusätzlich weisen die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Inhibitoren N-Acetylcystein und Koffein neben den beabsichtigten Wirkungen unspezifische Toxizitäten und Effekte (z. B. Hemmung der Proliferation) auf, sodass ihr Einsatz Experimentalergebnisse einer im Vergleich zur spezifischen Abschaltung von Genaktivitäten durch RNA-Interferenz geringerer Güte liefert.

Die von mehreren Autoren beobachtete starke Konzentrierung von CD20-Rituximab-Komplexen in lokalen Bereichen der Zellmembran – eine für die Signaltransduktion mehrerer Oberflächenrezeptoren bekannte Notwendigkeit – durch Fcγ-Rezeptorexprimierende Zellen *in vivo* als Rationale für den Einsatz von F(ab')₂-Fragmenten als CL, der für die Detektion der meisten Lymphomzell-intrinsischen Antworten (und auch des seneszenten Phänotyps) auf Rituximab *in vitro* notwendig ist, bleibt in der wissenschaftlichen Diskussion kontrovers.^{52,63,80} Passend zu einer im Vergleich mit Monomeren deutlich erhöhten antitumoralen Aktivität von Rituximab-Homodimeren *in vitro* wird auch vermutet, dass eine F(ab')₂-basierte Vernetzung zellgebundenen Rituximabs im Körper langfristig (ohne zusätzliche Vernetzung) auftretende, milde Effekte verstärkt und erst so in den verhältnismäßig kurzzeitigen *in vitro*-Assays detektierbar macht.^{80,98}

Zumindest in einigen Modellsystemen wird nach Blockade von Immun-Effektor-Mechanismen ein vollständiger Wirkungsverlust von Rituximab beobachtet. Gegen die alleinige Erklärung antineoplastischer Wirkungen auf CD20 gerichteter immuntherapeutischer Ansätze durch Komplement-vermittelte Zell-Lyse, Phagozytose und Antikörper-mediierte Zytotoxizität sprechen allerdings die Wirksamkeit von Rituximab im nahezu Komplement- und Immunzell-freien Liquor sowie die bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen genutzte vollständige Effektor-Zell-Blockade nach Rituximab-Applikation.

Bemerkenswerterweise wird in hochrangig publizierten Arbeiten, die in Kurzzeit-Untersuchungen mit gegen CD20 gerichteten Antikörpern der neuen Generation eine höhere Zelltod-Rate detektieren, eine dadurch bedingte langfristige Beeinträchtigung der Wachstumskinetik der jeweiligen Lymphom-Modelle allenfalls erwähnt, jedoch nicht als Datum gezeigt. Andere Forscher wiesen überdies auf die nicht unwahrscheinliche Möglichkeit einer methodisch bedingten Überschätzung des unter gegen CD20 gerichteter Antikörper-Therapie gemessenen Zelltodes in diesen Arbeiten hin. Bis zum aktuellen Zeitpunkt existiert (noch?) kein direkter klinischer Vergleich, der eine therapeutische Überlegenheit eines neueren anti-CD20-Antikörpers gegenüber Rituximab gezeigt hat, sodass Rituximab zumindest in den kommenden Jahren ein wichtiges Standardtherapeutikum in der Lymphombehandlung bleiben wird. 51

Aus Sicht des Autors sollte der Zustand "zelluläre Seneszenz" bei weiterführenden Analysen zellbiologischer Wirkungen des Antikörpers Rituximab und anderer therapeutischer Ansätze in der Lymphom-Behandlung stets berücksichtigt werden, nicht zuletzt, weil bereits ein geringer Anteil seneszenter Zellen in einem Tumor dessen langfristiges Wachstumsverhalten entscheidend beeinflussen kann.⁸¹

6 Literaturverzeichnis

- Krebs in Deutschland 2007/2008 (ed 8). Berlin: Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). 2012.
- 2. Ziepert M, Hasenclever D, Kuhnt E, et al. Standard International prognostic index remains a valid predictor of outcome for patients with aggressive CD20+ B-cell lymphoma in the rituximab era. *J Clin Oncol.* 2010;28(14):2373-2380.
- 3. 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.
- 4. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Isaacson PG. Classification of lymphoid neoplasms: the microscope as a tool for disease discovery. *Blood*. 2008;112(12):4384-4399.
- 5. Fisher SG, Fisher RI. The epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma. *Oncogene*. 2004;23(38):6524-6534.
- 6. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (ed 4). Lyon: IARC Press; 2008.
- 7. Nogai H, Dorken B, Lenz G. Pathogenesis of non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol.* 2011;29(14):1803-1811.
- 8. Kuppers R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(4):251-262.
- 9. Dave SS, 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*. 2004;351(21):2159-2169.
- 10. Lenz G, Wright G, Dave SS, et al. Stromal Gene Signatures in Large-B-Cell Lymphomas. *N Engl J Med*. 2008;359(22):2313-2323.
- Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000;403(6769):503-511.
- 12. McKelvey EM, Gottlieb JA, Wilson HE, et al. Hydroxyldaunomycin (Adriamycin) combination chemotherapy in malignant lymphoma. *Cancer*. 1976;38(4):1484-1493.
- 13. Chabner BA, Roberts TG, Jr. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(1):65-72.
- 14. Lord CJ, Ashworth A. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature*. 2012;481(7381):287-294.
- 15. Zhang S, Liu X, Bawa-Khalfe T, et al. Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat Med.* 2012;18(11):1639-1642.
- 16. Schmitt CA. Senescence, apoptosis and therapy--cutting the lifelines of cancer. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(4):286-295.
- 17. Schmitt CA. Cellular senescence and cancer treatment. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1775(1):5-20.
- 18. Long JS, Ryan KM. New frontiers in promoting tumour cell death: targeting apoptosis, necroptosis and autophagy. *Oncogene*. 2012;31(49):5045-5060.
- 19. Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem.* 2001;276(45):42462-42467.
- 20. Al-Ejeh F, Kumar R, Wiegmans A, Lakhani SR, Brown MP, Khanna KK. Harnessing the complexity of DNA-damage response pathways to improve cancer treatment outcomes. *Oncogene*. 2010;29(46):6085-6098.

- 21. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 1961;25585-621.
- 22. Hayflick L. THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS. *Exp Cell Res.* 1965;37614-636.
- 23. te Poele RH, Okorokov AL, Jardine L, Cummings J, Joel SP. DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 2002;62(6):1876-1883.
- 24. Chang BD, Broude EV, Dokmanovic M, et al. A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents. *Cancer Res.* 1999;59(15):3761-3767.
- 25. Shay JW, Wright WE. Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000;1(1):72-76.
- 26. Schmitt CA, Fridman JS, Yang M, et al. A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell*. 2002;109(3):335-346.
- 27. Braig M, Lee S, Loddenkemper C, et al. Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature*. 2005;436(7051):660-665.
- 28. Collado M, Gil J, Efeyan A, et al. Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature*. 2005;436(7051):642.
- 29. Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, et al. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature*. 2005;436(7051):725-730.
- 30. Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, et al. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature*. 2005;436(7051):720-724.
- 31. Narita M, Nunez S, Heard E, et al. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell.* 2003;113(6):703-716.
- 32. Funayama R, Ishikawa F. Cellular senescence and chromatin structure. *Chromosoma*. 2007.
- 33. Coppe JP, Patil CK, Rodier F, et al. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol.* 2008;6(12):2853-2868.
- 34. Rodier F, Coppe JP, Patil CK, et al. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol*. 2009;11(8):973-979.
- 35. Bartkova J, Rezaei N, Liontos M, et al. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature*. 2006;444(7119):633-637.
- 36. Di Micco R, Fumagalli M, Cicalese A, et al. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature*. 2006;444(7119):638-642.
- 37. Sharpless NE, DePinho RA. Cancer: crime and punishment. *Nature*. 2005;436(7051):636-637.
- 38. Dimri GP, Lee X, Basile G, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(20):9363-9367.
- 39. Kuilman T, Michaloglou C, Vredeveld LC, et al. Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell*. 2008;133(6):1019-1031.

- 40. Xue W, Zender L, Miething C, et al. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature*. 2007;445(7128):656-660.
- 41. Kuilman T, Peeper DS. Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(2):81-94.
- 42. Kahlem P, Dorken B, Schmitt CA. Cellular senescence in cancer treatment: friend or foe? *J Clin Invest*. 2004;113(2):169-174.
- 43. Reff ME, Carner K, Chambers KS, et al. Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood*. 1994;83(2):435-445.
- 44. Coiffier B, Lepage E, Briere J, et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med.* 2002;346(4):235-242.
- 45. Pfreundschuh M, Trumper L, Osterborg A, et al. CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: a randomised controlled trial by the MabThera International Trial (MInT) Group. *Lancet Oncol.* 2006;7(5):379-391.
- 46. Sehn LH, Donaldson J, Chhanabhai M, et al. Introduction of combined CHOP plus rituximab therapy dramatically improved outcome of diffuse large B-cell lymphoma in British Columbia. *J Clin Oncol.* 2005;23(22):5027-5033.
- 47. Schulz H, Bohlius J, Skoetz N, et al. Chemotherapy plus Rituximab versus chemotherapy alone for B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007(4):CD003805.
- 48. McLaughlin P, Grillo-Lopez AJ, Link BK, et al. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol*. 1998;16(8):2825-2833.
- 49. Pfreundschuh M. How I treat elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2010;116(24):5103-5110.
- 50. Edwards JC, Cambridge G. B-cell targeting in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(5):394-403.
- 51. Maloney DG. Anti-CD20 antibody therapy for B-cell lymphomas. *N Engl J Med.* 2012;366(21):2008-2016.
- 52. Deans JP, Li H, Polyak MJ. CD20-mediated apoptosis: signalling through lipid rafts. *Immunology*. 2002;107(2):176-182.
- 53. Li Y, Williams ME, Cousar JB, Pawluczkowycz AW, Lindorfer MA, Taylor RP. Rituximab-CD20 complexes are shaved from Z138 mantle cell lymphoma cells in intravenous and subcutaneous SCID mouse models. *J Immunol.* 2007:179(6):4263-4271.
- 54. Tsirigotis P, Economopoulos T. Monoclonal antibodies in the treatment of lymphoid malignancies. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2008;108(3-5):267-271.
- 55. Beers SA, Chan CH, French RR, Cragg MS, Glennie MJ. CD20 as a target for therapeutic type I and II monoclonal antibodies. *Semin Hematol.* 2010;47(2):107-114.
- 56. Uchida J, Lee Y, Hasegawa M, et al. Mouse CD20 expression and function. *Int Immunol*. 2004;16(1):119-129.
- 57. Teeling JL, Mackus WJ, Wiegman LJ, et al. The biological activity of human CD20 monoclonal antibodies is linked to unique epitopes on CD20. *J Immunol*. 2006;177(1):362-371.
- 58. Walshe CA, Beers SA, French RR, et al. Induction of cytosolic calcium flux by CD20 is dependent upon B Cell antigen receptor signaling. *J Biol Chem.* 2008;283(25):16971-16984.

- 59. Kuijpers TW, Bende RJ, Baars PA, et al. CD20 deficiency in humans results in impaired T cell-independent antibody responses. *J Clin Invest*;120(1):214-222.
- 60. Uchida J, Hamaguchi Y, Oliver JA, et al. The innate mononuclear phagocyte network depletes B lymphocytes through Fc receptor-dependent mechanisms during anti-CD20 antibody immunotherapy. *J Exp Med*. 2004;199(12):1659-1669.
- 61. Beum PV, Lindorfer MA, Taylor RP. Within peripheral blood mononuclear cells, antibody-dependent cellular cytotoxicity of rituximab-opsonized Daudi cells is promoted by NK cells and inhibited by monocytes due to shaving. *J Immunol*. 2008;181(4):2916-2924.
- 62. Minard-Colin V, Xiu Y, Poe JC, et al. Lymphoma depletion during CD20 immunotherapy in mice is mediated by macrophage FcgammaRI, FcgammaRIII, and FcgammaRIV. *Blood.* 2008;112(4):1205-1213.
- 63. Shan D, Ledbetter JA, Press OW. Apoptosis of malignant human B cells by ligation of CD20 with monoclonal antibodies. *Blood*. 1998;91(5):1644-1652.
- 64. Mathas S, Rickers A, Bommert K, Dorken B, Mapara MY. Anti-CD20- and B-cell receptor-mediated apoptosis: evidence for shared intracellular signaling pathways. *Cancer Res.* 2000;60(24):7170-7176.
- 65. Stolz C, Hess G, Hahnel PS, et al. Targeting Bcl-2 family proteins modulates the sensitivity of B-cell lymphoma to rituximab-induced apoptosis. *Blood*. 2008;112(8):3312-3321.
- 66. Glennie MJ, French RR, Cragg MS, Taylor RP. Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies. *Mol Immunol*. 2007;44(16):3823-3837.
- 67. Ghetie MA, Podar EM, Ilgen A, Gordon BE, Uhr JW, Vitetta ES. Homodimerization of tumor-reactive monoclonal antibodies markedly increases their ability to induce growth arrest or apoptosis of tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(14):7509-7514.
- 68. Rossi EA, Goldenberg DM, Cardillo TM, Stein R, Wang Y, Chang CH. Novel designs of multivalent anti-CD20 humanized antibodies as improved lymphoma therapeutics. *Cancer Res.* 2008;68(20):8384-8392.
- 69. Meyer zum Buschenfelde C, Feuerstacke Y, Gotze KS, Scholze K, Peschel C. GM1 expression of non-Hodgkin's lymphoma determines susceptibility to rituximab treatment. *Cancer Res.* 2008;68(13):5414-5422.
- 70. Bonavida B. Rituximab-induced inhibition of antiapoptotic cell survival pathways: implications in chemo/immunoresistance, rituximab unresponsiveness, prognostic and novel therapeutic interventions. *Oncogene*. 2007;26(25):3629-3636.
- 71. Suzuki E, Umezawa K, Bonavida B. Rituximab inhibits the constitutively activated PI3K-Akt pathway in B-NHL cell lines: involvement in chemosensitization to druginduced apoptosis. *Oncogene*. 2007;26(42):6184-6193.
- 72. Jazirehi AR, Huerta-Yepez S, Cheng G, Bonavida B. Rituximab (chimeric anti-CD20 monoclonal antibody) inhibits the constitutive nuclear factor-{kappa}B signaling pathway in non-Hodgkin's lymphoma B-cell lines: role in sensitization to chemotherapeutic drug-induced apoptosis. *Cancer Res.* 2005;65(1):264-276.
- 73. Kheirallah S, Caron P, Gross E, et al. Rituximab inhibits B-cell receptor signaling. *Blood*. 2009.
- 74. Leseux L, Laurent G, Laurent C, et al. PKC zeta mTOR pathway: a new target for rituximab therapy in follicular lymphoma. *Blood*. 2008;111(1):285-291.
- 75. Alas S, Bonavida B. Rituximab inactivates signal transducer and activation of transcription 3 (STAT3) activity in B-non-Hodgkin's lymphoma through inhibition

- of the interleukin 10 autocrine/paracrine loop and results in down-regulation of Bcl-2 and sensitization to cytotoxic drugs. *Cancer Res.* 2001;61(13):5137-5144.
- 76. Bellosillo B, Villamor N, Lopez-Guillermo A, et al. Complement-mediated cell death induced by rituximab in B-cell lymphoproliferative disorders is mediated in vitro by a caspase-independent mechanism involving the generation of reactive oxygen species. *Blood.* 2001;98(9):2771-2777.
- 77. Jak M, van Bochove GG, van Lier RA, Eldering E, van Oers MH. CD40 stimulation sensitizes CLL cells to rituximab-induced cell death. *Leukemia*. 2011;25(6):968-978.
- 78. Honeychurch J, Alduaij W, Azizyan M, et al. Antibody-induced non-apoptotic cell death in human lymphoma and leukemia cells is mediated through a novel reactive oxygen species dependent pathway. *Blood*. 2012;119(15):3523-3533.
- 79. Taylor RP, Lindorfer MA. Drug insight: the mechanism of action of rituximab in autoimmune disease--the immune complex decoy hypothesis. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2007;3(2):86-95.
- 80. Weiner GJ. Rituximab: mechanism of action. Semin Hematol. 2010;47(2):115-123.
- 81. Reimann M, Lee S, Loddenkemper C, et al. Tumor Stroma-Derived TGF-beta Limits Myc-Driven Lymphomagenesis via Suv39h1-Dependent Senescence. *Cancer Cell.* 2010;17(3):262-272.
- 82. Wajapeyee N, Wang SZ, Serra RW, et al. Senescence induction in human fibroblasts and hematopoietic progenitors by leukemogenic fusion proteins. *Blood*. 2010;115(24):5057-5060.
- 83. Wang M, Morsbach F, Sander D, et al. EGF receptor inhibition radiosensitizes NSCLC cells by inducing senescence in cells sustaining DNA double-strand breaks. *Cancer Res.* 2011;71(19):6261-6269.
- 84. Hasan MR, Ho SH, Owen DA, Tai IT. Inhibition of VEGF induces cellular senescence in colorectal cancer cells. *Int J Cancer*. 2011;129(9):2115-2123.
- 85. Gong Q, Ou Q, Ye S, et al. Importance of cellular microenvironment and circulatory dynamics in B cell immunotherapy. *J Immunol*. 2005;174(2):817-826.
- 86. DSMZ. German Collection of Microorganisms and Cell Cultures: INFORMATION SHEET FOR CELL LINES. 2007607.
- 87. Stel AJ, Ten Cate B, Jacobs S, et al. Fas receptor clustering and involvement of the death receptor pathway in rituximab-mediated apoptosis with concomitant sensitization of lymphoma B cells to fas-induced apoptosis. *J Immunol*. 2007;178(4):2287-2295.
- 88. Acosta JC, O'Loghlen A, Banito A, et al. Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell.* 2008;133(6):1006-1018.
- 89. Coppe JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol.* 2010;599-118.
- 90. Ivanov A, Beers SA, Walshe CA, et al. Monoclonal antibodies directed to CD20 and HLA-DR can elicit homotypic adhesion followed by lysosome-mediated cell death in human lymphoma and leukemia cells. *J Clin Invest*. 2009;119(8):2143-2159.
- 91. Turzanski J, Daniels I, Haynes AP. Involvement of macroautophagy in the caspase-independent killing of Burkitt lymphoma cell lines by rituximab. *Br J Haematol.* 2009;145(1):137-140.
- 92. Young AR, Narita M, Ferreira M, et al. Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev.* 2009;23(7):798-803.

- 93. Campisi J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell.* 2005;120(4):513-522.
- 94. Drexler HG. Review of alterations of the cyclin-dependent kinase inhibitor INK4 family genes p15, p16, p18 and p19 in human leukemia-lymphoma cells. *Leukemia*. 1998;12(6):845-859.
- 95. Hamaguchi Y, Xiu Y, Komura K, Nimmerjahn F, Tedder TF. Antibody isotypespecific engagement of Fcgamma receptors regulates B lymphocyte depletion during CD20 immunotherapy. *J Exp Med*. 2006;203(3):743-753.
- 96. Chan HT, Hughes D, French RR, et al. CD20-induced lymphoma cell death is independent of both caspases and its redistribution into triton X-100 insoluble membrane rafts. *Cancer Res.* 2003;63(17):5480-5489.
- 97. Cragg MS, Glennie MJ. Antibody specificity controls in vivo effector mechanisms of anti-CD20 reagents. *Blood*. 2004;103(7):2738-2743.
- 98. Ghetie MA, Bright H, Vitetta ES. Homodimers but not monomers of Rituxan (chimeric anti-CD20) induce apoptosis in human B-lymphoma cells and synergize with a chemotherapeutic agent and an immunotoxin. *Blood*. 2001;97(5):1392-1398.
- 99. de Haij S, Jansen JH, Boross P, et al. In vivo cytotoxicity of type I CD20 antibodies critically depends on Fc receptor ITAM signaling. *Cancer Res.* 2010;70(8):3209-3217.
- 100. Golay J, Bologna L, Andre PA, et al. Possible misinterpretation of the mode of action of therapeutic antibodies in vitro: homotypic adhesion and flow cytometry result in artefactual direct cell death. *Blood*. 2010;116(17):3372-3373.

7 Eidesstattliche Versicherung

"Ich, Jan <u>Henry</u> Matthias Däbritz, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema "Lymphomzell-Seneszenz als Wirkmechanismus des therapeutischen Antikörpers Rituximab" selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe "Uniform Requirements for Manuscripts (URM)" des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Datum	Unterschrift

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Entfällt, da bisher keine Projekt-spezifischen Publikationen (peer-reviewed) erfolgt sind.

8 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

9 Publikationsliste

9.1 Publizierte Arbeiten, peer-reviewed

Dörr, J.R., Yu, Y., Milanovic, M., Beuster, G., Zasada, C., <u>Däbritz, J.H.M.</u>, Lisec, J., Lenze, D., Gerhardt, A., Schleicher, K., Kratzat, S., Purfürst, B., Walenta, S., Mueller-Klieser, W., Gräler, M., Hummel M., Keller, U., Buck, A.K., Dörken, B., Willmitzer, L., Reimann, M., Kempa, S., Lee, S., and Schmitt, C.A. (2013). **Synthetic Lethal Metabolic Targeting of Cellular Senescence in Cancer Therapy.** *Nature*.

Kaiser, A.D., Schuster, K., Gadiot, J., Borkner, L., <u>Daebritz, H.</u>, Schmitt, C., Andreesen, R., and Blank, C. (2011). **Reduced tumor-antigen density leads to PD-1/PD-L1 mediated impairment of partially exhausted CD8(+) T cells.** *The European Journal of Immunology.*

9.2 Kongressbeiträge

<u>Däbritz, J.H.M.</u>, Yu, Y., Beuster, G., Rosenfeldt, M.T., Dörken, B., and Schmitt, C.A. **CD20-directed Immunotherapy facilitates Senescence Entry of human Lymphoma Cells in Response to DNA damaging Chemotherapy.** *Internationale Konferenz "Senescence in Cancer"***,** *Berlin***, 2011. (Poster).**

<u>Däbritz, J.H.M.</u>, Yu, Y., Rosenfeldt, M.T., Dörken, B., and Schmitt, C.A. **Anti-CD20 Immunotherapy Augments the Chemotherapy-Induced Senescence Response In Human Lymphoma Cells.** *The American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, Orlando 2010.* (*Poster*).

<u>Däbritz, J.H.M.</u>, Rosenfeldt, M.T., Dörken, B., and Schmitt, C.A. Anti CD20 immunotherapy and DNA damage signaling converge in a senescence-like phenotype. *Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizer Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie, Mannheim, 2009. (Poster).*

Flörcken, A., <u>Däbritz, H.</u> Riess, H., Dörken, B., and Thuss-Patience, P.C. **Hepatic arterial infusion chemotherapy for liver metastases from gastric cancer.** *Jahrestagung der Deutschen*, Österreichischen und Schweizer Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie, Wien, 2008. (Poster).

Rosenfeldt, M.T., <u>Däbritz, H.</u>, Kahlem, P., Braig, M, Dörken, B., and Schmitt, C.A. **The anti-CD20 antibody Rituximab induces senescence in human B-cell lymphoma cells.** *Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizer Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie, Hannover, 2005. (Vortrag).*

9.3 Manuskript in Vorbereitung

<u>Däbritz, J.H.M.</u>, Yu, Y., Kaufmann, A.M., Rosenfeldt, M.T., Dörken, B., and Schmitt, C.A. **CD20** targeting promotes cellular senescence in B-cell lymphoma. (*Manuskript in Vorbereitung*)

10 Danksagung

Der Autor dankt zunächst Herrn Prof. Clemens Schmitt für die Überlassung des Themas, die Einführung in den Prozess des wissenschaftlichen Arbeitens und Denkens, vor allem aber für seine durchgehende Unterstützung des Projektes auch während schwieriger Phasen bei der Fertigstellung dieser Dissertation. Darüber hinaus gilt mein Dank den WissenschaftlerInnen der von Herrn Prof. Schmitt geleiteten Arbeitsgruppe für ihre Hilfe beim Erlernen der angewandten Experimentaltechniken sowie die konstruktive Diskussion der im Rahmen des bearbeiteten Projektes erhobenen Daten. Ganz besonders möchte ich mich auch bei meiner Familie für ihr stets aufmerksam begleitendes Interesse und ihren bedingungslosen Rückhalt während meiner gesamten Promotionszeit bedanken.