
Aus dem Bereich Klinische Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Die Bedeutung der Fcγ-Rezeptor Polymorphismen (FcγRIIA 131 H/R und FcγRIIIA 158 V/F) bei älteren Patienten mit einem diffusen großzelligen B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom (DLBCL), die mit kombinierter CHOP-Chemotherapie mit oder ohne Rituximab behandelt wurden.

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2014**

vorgelegt von
Manfred Ahlgrimm
geboren am 08.04.1980
in Neubrandenburg

Aus der Klinik für Innere Medizin I
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. M. Pfreundschuh

Tag der Promotion

Dekan

Berichterstatter



Meiner Familie

Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht unter:

- I. Ahlgrimm M, Pfreunds Schuh M, Kreuz M, Regitz E, Preuss KD, Bittenbring J.
The impact of Fc-gamma receptor polymorphisms in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with CHOP with or without rituximab. Blood. October, 2011;118(17):4657-4662.

- II. Ahlgrimm M, Regitz E, Preuss K-D, Grass S, Poeschel V, Kreuz M, Pfreunds Schuh M.
Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) of FC-Gamma-RIIA and FC-Gamma-RIIIA in Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma Have No Impact On Treatment Outcome of Elderly Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL) Treated with CHOP with and without Rituximab: Results From the RICOVER-60 Trial of the German High-Grade Non-Hodgkin Lymphoma Study Group (DSHNHL).
ASH Annual Meeting Abstracts. November, 2009;114(22):3956.

1. ZUSAMMENFASSUNG	7
2. EINLEITUNG	9
2.1. Diffuses großzelliges B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom	9
2.1.1. Definition	9
2.1.2. Epidemiologie	9
2.1.3. Stadieneinteilung	10
2.1.4. Diagnostik	12
2.1.5. Risikofaktoren	13
2.1.6. Prognose	14
2.1.7. B-Zell Oberflächenmarker CD20	14
2.2. Kombinierte Immun-Chemotherapie	16
2.2.1. CHOP-Chemotherapie	16
2.2.1.1. Historische Entwicklung von CHOP	17
2.2.1.2. Cyclophosphamid	18
2.2.1.3. Doxorubicin	18
2.2.1.4. Vincristin	18
2.2.1.5. Prednison	19
2.2.2. anti-CD20 Immuntherapie	19
2.2.2.1. Entdeckung von Rituximab	19
2.2.2.2. Rituximab	20
2.2.2.3. Wirkungsmechanismus von Rituximab	21
2.2.2.4. Klinischer Einsatz von Rituximab	21
2.2.2.4.1. Zulassung von Rituximab	21
2.2.2.4.2. Rituximab bei dem diffus großzelligem B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom	22
2.3. Fc-Gamma-Rezeptor (FcγR)	24
2.3.1. Allgemein	24
2.3.2. Einzelnukleotid-Polymorphismen des Fcγ-Rezeptor	27
2.3.2.1. Einzelnukleotid-Polymorphismus	27
2.3.2.2. Fcγ-Rezeptor IIA 131H/R Einzelnukleotid-Polymorphismus	29
2.3.2.3. Fcγ-Rezeptor IIIA 158 V/F Einzelnukleotid-Polymorphismus	30
2.3.3. Klinische Bedeutung der Fcγ-Rezeptor-Polymorphismen	31
2.4. Ziele der Arbeit	34
2.5. Material und Methoden	34
2.5.1. Therapie-Studie RICOVER-60	34
2.5.2. Genehmigungen	35
2.5.3. Patientenpopulation	35
2.5.4. Studiendesign/Therapiearme	37
2.5.5. Immun-Chemotherapie	39
2.5.5.1. Vorphase-Therapie	39
2.5.5.2. CHOP-Chemotherapie	39

Inhaltsverzeichnis

2.5.5.3. Rituximab.....	41
2.5.6. Probenakquirierung.....	41
2.5.7. Probenasservierung.....	42
2.6. Messungen.....	42
2.6.1. Materialien und Geräte.....	42
2.6.2. Isolierung der DNA.....	44
2.6.3. Probenverdünnung.....	45
2.6.4. Real-Time PCR.....	45
2.6.5. PCR-Reaktionsbedingungen.....	48
2.6.6. Auswertung der Messungen.....	49
2.6.7. Statistische Auswertung.....	50
3. ERGEBNISSE.....	51
3.1. Ergebnisse der RICOVER-60 Therapiestudie.....	51
3.2. Prävalenz der FcγRIIA 131 und FcγRIIIA 158 Genotypen.....	52
3.3. Klinische Präsentation.....	59
3.3.1. Nebenwirkungen.....	60
3.3.2. Therapieansprechen und Ergebnis.....	62
3.3.3. Multivariate Analysen.....	69
4. DISKUSSION.....	73
5. SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK.....	76
6. ANHANG.....	77
6.1. Abkürzungsverzeichnis.....	77
6.2. Abbildungsverzeichnis.....	79
6.3. Tabellenverzeichnis.....	80
6.4. Literaturverzeichnis.....	81
6.5. Publikationen.....	97
6.6. Danksagung.....	99

1. Zusammenfassung

Polymorphismen des Fcγ-Rezeptors haben einen Einfluss auf die durch den monoklonalen chimären anti-CD20 Antikörper Rituximab ausgelöste antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC). Von 512 Patienten, die in der RICOVER-60 Therapiestudie wegen eines diffusen großzelligen B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom behandelt wurden, zeigte sich bei homozygoten Trägern des Einzelnukleotid-Polymorphismus FcγRIIIA 158 V/V eine leicht verminderte Auftretenshäufigkeit für B-Symptomatik (158 V/V: 26%, V/F: 35%, F/F: 42%; $p = 0,037$). Unter Chemotherapie mit CHOP (Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednisolon) waren die Überlebenskurven der Gruppen mit allen Einzelnukleotid-Polymorphismen vergleichbar. Bei Patienten mit Rituximab-haltiger Chemotherapie und dem Genotyp F/F des Einzelnukleotid-Polymorphismus FcγRIIIA 158 zeigten sich tendenziell niedrigere Überlebenskurven im ereignisfreien (EFS) und progressionsfreien Überleben (PFS), nicht jedoch im Gesamtüberleben (OS), als bei Patienten mit einem V/F- und V/V-Genotyp. 3-Jahres-EFS: FcγRIIIA 158 F/F: 64,5%, 158 V/F: 70,2%, 158 V/V: 76,9% (Logrank-Test: $p = 0,224$ F/F vs. V/V; $p = 0,285$ F/F vs. V/F + V/V); 3-Jahres-PFS: FcγRIIIA 158 F/F: 68,3%, V/F: 76,1%, V/V: 80,5% (Logrank-Test: $p = 0,233$ für F/F vs. V/V; $p = 0,185$ für F/F vs. V/F + V/V). In den multivariaten Analysen, angepasst für den Internationalen Prognostischen Index, war das relative Risiko von F/F im Vergleich mit V/F plus V/V für das progressionsfreie Überleben 1,80 ($p = 0,052$) und für das ereignisfreie Überleben 1,55 ($p = 0,120$). Diese Interaktion einer Rituximab-haltigen CHOP-Chemotherapie mit dem Einzelnukleotid-Polymorphismus FcγRIIIA 158 eröffnet uns Möglichkeiten, durch speziell designte anti-CD20 Antikörper eine verbesserte ADCC zu induzieren.

Summary

Fcγ-Receptor polymorphisms have been shown to affect rituximab-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity. Of 512 patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the RICOVER-60 trial, carriers of Fcγ-R III 158 valine homozygous receptors (V/V) presented with a slightly decreased incidence of B-symptoms (158 V/V: 26%, V/F: 35%, phenylalanine receptors [F/F]: 42%; $p = .037$). Survival curves of all Fcγ-R single-nucleotide polymorphisms were superimposable after cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP); only after CHOP with rituximab (R-CHOP), event-free survival and progression-free survival, but not overall survival of Fcγ-R IIIA 158 F/F had a trend to be lower than those of 158 V/F and 158 V/V: 3-year EFS: Fcγ-R IIIA 158 F/F: 64.5%, 158 V/F: 70.2%, 158 V/V: 76.9% (log-rank test: $p = .224$ F/F vs. V/V; $p = .285$ F/F vs. V/F + V/V); 3-year PFS: Fcγ-R IIIA 158 F/F: 68.3%, V/F: 76.1%, V/V: 80.5% (log-rank test: $p = .233$ for F/F vs. V/V; $p = .185$ for F/F vs. V/F + V/V). In a multivariate analysis adjusting for the International Prognostic Index, relative risk of F/F compared with V/F plus V/V was 1.80 ($p = .052$) for progression-free survival and 1.55 ($p = .120$) for event-free survival. The interaction of R-CHOP, but not CHOP with Fcγ-R IIIA polymorphisms, opens a window of opportunity for anti-CD20 antibodies designed to mediate enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity.

2. Einleitung

2.1. Diffuses großzelliges B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom

2.1.1. Definition

Das diffuse großzellige B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom (DLBCL) ist eine Gruppe maligner Erkrankungen des lymphatischen Systems beim Menschen ausgehend von der B-Zellreihe. Sie sind durch einen aggressiven klinischen Verlauf charakterisiert und zählen zu den aggressiven (hochmalignen) Lymphomen. Unbehandelt führen sie rasch zum Tod [90,113].

Diffuse großzellige B-Zell-Lymphome sind eine inhomogene Gruppe von Lymphomen; sie umfassen die centroblastischen, immunoblastischen, anaplastisch großzelligen und die T-Zell-reichen B-Zell-Lymphome. Zu den aggressiven B-Zell-Lymphomen zählen auch die klassischen, atypischen und HIV-assoziierten Burkitt-Lymphome [113].

2.1.2. Epidemiologie

Diffuse großzellige B-Zell Non-Hodgkin-Lymphome sind die häufigsten lymphatischen Neoplasien mit einem Anteil von 30 - 40% aller Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) [27].

Die Anzahl der Erkrankungen im Vergleich zu den Hodgkin-Lymphomen nimmt jährlich mit einer Rate von 3 - 4% zu [33]. Die Gründe für diese Progression sind bislang unklar [48,113]. Als Erklärung für diese Dynamik reicht die Zunahme bei den HIV-assoziierten Erkrankungen alleine nicht aus [78]. Es zeigt sich ebenfalls eine Zunahme bei extranodalen Befall von aggressiven Lymphomen [33,54,78].

Die Inzidenz des diffusen großzelligen B-Zell Non-Hodgkin-Lymphoms beträgt 7 Fälle pro 100.000 Einwohner pro Jahr. Mehr als die Hälfte der Patienten ist bei Erstdiagnose über 60 Jahre alt [110]. Das mediane Alter bei Erstdiagnose ist 65 Jahre und der Altersgipfel liegt bei 80 - 85 Jahren [113,116]. Das Vorkommen steigt mit dem Alter von 0,3/100.000/Jahr (Alter: 35 - 39 Jahre) bis 26,6/100.000/Jahr (Alter: 80 - 84 Jahre) [77]. Unter Kaukasiern ist das DLBCL häufiger zu finden als unter Afrikanern oder Asiaten, zudem ist eine Häufung bei Männern zu verzeichnen [33,78,116].

Der größte Teil aller Lymphome (80%) stammt von B-Zellen ab [2,73] und in mehr als 90% der Fälle wird auf der Zelloberfläche das Antigen CD20 (Cluster of

Differentiation), ein transmembranäres Oberflächenmolekül, exprimiert [3,111]. Es wird auf den Zellen der B-Zell-Reihe, jedoch nicht von Stammzellen oder Zellen der anderen „Zellreihen“ exprimiert [83,111]. Großzellige B-Zell-Lymphome entstehen meistens de novo und entstehen nur relativ selten sekundär im Verlauf eines weniger aggressiven Lymphoms.

2.1.3. Stadieneinteilung

Die Stadieneinteilung des diffusen großzelligen B-NHL erfolgt nach den Kriterien der Ann-Arbor-Klassifikation mit Stadium I bis IV [64]. Neben einer primär nodalen wird auch häufig eine primär extranodale Manifestation beobachtet. Die Stadieneinteilung erfolgt durch Befunde aus der Anamnese des Patienten (B-Symptome), Karnofsky-Index [57], ECOG-Status [84], der körperlichen Untersuchung (Tonsillen, Lymphknoten, Leber, Milz, Ergüsse, sicht- oder tastbare Raumforderungen), bildgebende Befunde durch Computertomographien (CT) mit Kontrastmittel von Hals, Thorax und Abdomen sowie einer Knochenmarkbiopsie (einseitig; Aspiration und Trepanat von mindestens 2 cm Länge). Eine Übersicht zur Stadieneinteilung nach der Ann-Arbor-Klassifikation ist in der Tabelle 1 (Seite 11) aufgeführt. Die Definition der Lymphknotenregionen ist in Abbildung 1 (Seite 12) dargestellt. Mit B-Symptomatik ist unklares Fieber, Nachtschweiß mit Wäschewechsel und unklarer Gewichtsverlust bezeichnet (näheres hierzu siehe Zusatz B in Tabelle 1, Seite 11).

Tabelle 1: Modifizierte Stadieneinteilung nach der Ann-Arbor-Klassifikation.

Stadium	Definition
I	Nodaler Befall in einer einzigen Lymphknotenregion
I _E	Vorliegen eines einzigen extralymphatisch lokalisierten Herdes
II	Befall mehrerer Lymphknotenregionen auf einer Seite des Zwerchfells
II _E	Vorliegen eines einzigen extralymphatisch lokalisierten Herdes und Befall einer oder mehrerer Lymphknotenregionen auf einer Seite des Zwerchfells
III	Befall von Lymphknotenregionen auf beiden Seiten des Zwerchfells
III _E	Vorliegen eines einzigen extralymphatisch lokalisierten Herdes und Befall einer oder mehrerer Lymphknotenregionen auf beiden Seiten des Zwerchfells
IV	Diffuser Befall eines oder mehrerer extralymphatischer Organe [mehrere lokale Manifestationen in einer extranodalen Lokalisation sowie eine Beteiligung der Leber und/oder des Knochenmarks gelten als diffuser Befall)
Zusatz: S	Befall der Milz (gilt als Lymphknoten)
Zusatz: A	Keine der unter B definierten Allgemeinsymptome
Zusatz: B	Eines oder mehrere der folgenden drei Allgemeinsymptome: - nicht anderweitig erklärbares Fieber über 38° C, - nicht anderweitig erklärbarer Nachtschweiß mit Wäschewechsel, - nicht anderweitig erklärbarer Gewichtsverlust von mehr als 10 % des Körpergewichtes innerhalb von 6 Monaten

Beim Staging erfolgt entsprechend dem Lymphknotenbefall und der Nachbarschaft zu dem Zwerchfell, der Anwesenheit von B-Symptomatik (nicht anderweitig erklärbares Fieber über 38° C, nicht anderweitig erklärbarer Nachtschweiß mit Wäschewechsel, nicht anderweitig erklärbarer Gewichtsverlust von mehr als 10 % des Körpergewichtes innerhalb von 6 Monaten) und anhand extranodaler Manifestation die Stadieneinteilung modifiziert nach der Ann-Arbor-Klassifikation [64].

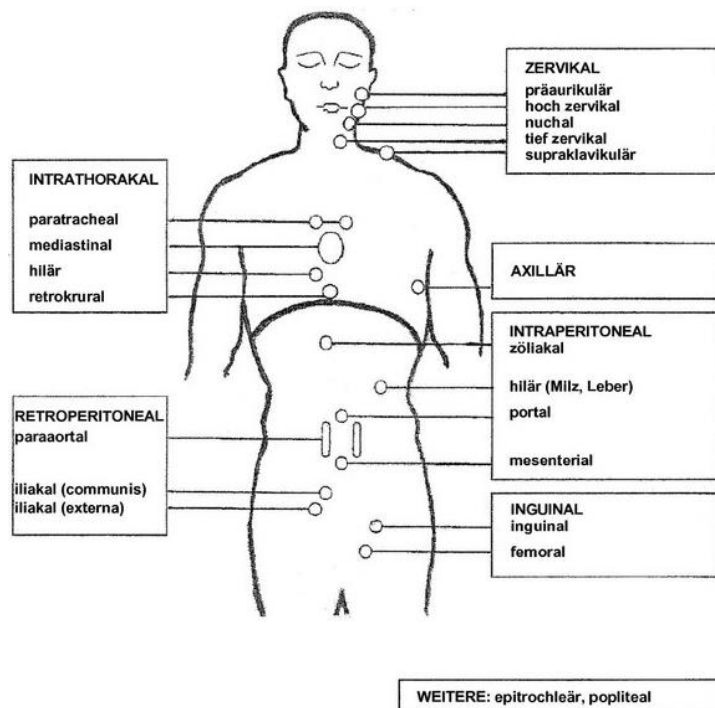


Abbildung 1: Lokalisationen und Bezeichnungen von Lymphom-Manifestationen. In der Abbildung zusammengefasst sind verschiedene Lymphknotenregionen und ihre regionäre Bezeichnungen als mögliche Manifestationsorte von Lymphomen. Quelle: <http://www.dgho-onkopedia.de/de/onkopedia/leitlinien/diffuses-grosszelliges-b-zell-lymphom>

2.1.4. Diagnostik

Zu der initialen Diagnostik (Stadieneinteilung, Beurteilung der Therapiefähigkeit) erfolgt bei Verdacht oder bereits histologischen Nachweis eines diffusen großzelligen B-Zell Non-Hodgkin-Lymphoms folgende Diagnostik:

- Anamnese (Beginn der Beschwerden, B-Symptome, Karnofsky Index, ECOG-Status)
- klinische Untersuchung
- CT Hals/Thorax/Abdomen/Becken
- Knochenmarkbiopsie (Histologie und Zytologie)
- Lumbalpunktion mit Liquorzytologie bei Risikobefall sowie bei Befall der Testes
- Echokardiographie (alternativ: nuklearmedizinische Bestimmung der Ejektionsfraktion) vor Therapiebeginn und Lungenfunktion
- Laboruntersuchungen: BSG, Blutbild mit Differentialblutbild, LDH, GPT, alkalische Phosphatase (Serum), γ -GT, Bilirubin, Gesamteiweiß + Albumin mit Eiweiß- und Immunelektrophorese, Immunglobuline (IgG, IgA, IgM), beta2-Mikroglobulin, Kreatinin
- Virusserologie (HIV und Hepatitis)

2.1.5. Risikofaktoren

Zur Evaluierung von Risikofaktoren konnten von Shipp et al. [110] fünf international anerkannte Prognosekriterien identifiziert werden. Durch die Metaanalyse, in die 16 internationale Arbeitsgruppen ihre Ergebnisse von 3373 Patienten eingebracht hatten, erwiesen sich diese fünf prätherapeutischen Risikofaktoren im Internationalen Prognostischen Index (IPI) als prognostisch relevant: Alter: > 60 Jahre, Stadium: III + IV [64], extranodaler Befall: > 1, schlechter Allgemeinzustand (ECOG [84]: 2, 3, 4) und erhöhter LDH-Wert.

Für die Patienten jünger als 60 Jahre wurde parallel hierzu der altersadjustierte Internationale Prognostische Index (aaIPI) als Prognosekriterium entwickelt. Im altersadjustierten Internationalen Prognostischen Index werden nur die drei Kriterien: Tumorstadium, LDH-Wert und Allgemeinzustand (Performancestatus: ECOG) berücksichtigt [110].

Tabelle 2: Der Internationale Prognostische Index (IPI, aaIPI)

IPI		aaIPI	
Risikogruppe	IPI-Faktor	Risikogruppe	IPI-Faktor
Gering	0 oder 1	Gering	0
Niedrig, mittel	2	Niedrig, mittel	1
Hoch, mittel	3	Hoch, mittel	2
Hoch	4 oder 5	Hoch	3

Die Ermittlung des IPI erfolgt anhand der IPI-Kriterien: Alter > 60 Jahre (nicht angewendet im aaIPI), extranodaler Befall > 1 (nicht angewendet im aaIPI), Lymphom Stadium III + IV, ECOG \geq 2 sowie erhöhter LDH-Wert.

Als hiervon zusätzlicher unabhängiger Risikofaktor ist die Bulk-Erkrankung zu nennen. Bei einem Bulk handelt es sich um einen Lymphomherd mit großer Ausdehnung. In einer Therapiestudie bei jungen Patienten (18 - 60 Jahre) mit DLBCL mit guter Prognose (aaIPI 0 - 1) im Stadium II - IV wurde die Bedeutung des maximalen Durchmessers eines Lymphomherdes (MTD) analysiert. In dieser Analyse zeigte sich, dass unter CHOP-haltiger Chemotherapie alleine, bei jedem beliebigen cut-off Wert für die Lymphomgröße zwischen 5 und 10 cm, ein Bulk mit einem signifikant schlechteren ereignisfreien- und Gesamtüberleben verknüpft ist. Auch unter kombinierter Immun-Chemotherapie lässt sich ab einem cut-off Wert von 6 cm ein signifikanter, aber im Vergleich zur Population ohne Rituximab deutlich

geringerer, Unterschied in Bezug auf das Gesamtüberleben nachweisen. Für das EFS liegt der cut-off Wert bei 10 cm, während der cut-off Wert für das OS bei 6 cm liegt. Die Hinzunahme von Rituximab führt demnach zu einer Abnahme des negativen Einflusses des MTD auf das Überleben, ohne diesen jedoch vollständig zu eliminieren. Diese ermittelten cut-off Werte beziehen sich auf Therapie-Ergebnisse unter Bulk-Bestrahlung, so dass ohne eine Bestrahlung eher noch niedrigere cut-off Werte für eine Bulk-Erkrankung als Risikofaktor angenommen werden müssen [90].

2.1.6. Prognose

Unbehandelt führt das diffuse großzellige B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom rasch zum Tod [113]. In einer Zusammenfassung durch Martelli et al. [69] (siehe Tabelle 3, Seite 14) von mehreren Phase-III Erstlinientherapien für ältere Patienten (n = 1130) mit diffusen großzelligem B-Zell Lymphom mit einem IPI von 0 - 5 unter Rituximabhaltiger CHOP-Chemotherapie waren die Raten kompletter Remission (CR) 76 - 78 %, das 3-Jahre-progressionsfreie Überleben 52 - 73,4 % und das 3-Jahre-Gesamtüberleben 58 - 78,1 %.

Tabelle 3 Prognose des diffusen großzelligen B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom

Studie	ECOG-4494	GELA	RICOVER-60	
Therapie	8x R-CHOP-21	8x R-CHOP-21	6x R-CHOP-14	8x R-CHOP-14
IPI	0 – 3 (aaIPI)	0 - 3 (aaIPI)	1 - 5	
Alter [Jahre]	> 60	60 - 80	61 - 80	
Anzahl [n]	318	202	306	304
CR	77 %	76 %	78 %	76 %
3J-PFS	52 %	58 %	73,4 %	68,8 %
3J-OS	67 %	58 %	78,1 %	72,5 %

Zusammenfassung durch Martelli et al. [69] der CR, des 3-Jahre-progressionsfreien Überleben und des 3-Jahre-Gesamtüberlebens der Phase-III-Studien (ECOG-4494, GELA und RICOVER-60) mit Rituximabhaltiger CHOP-Chemotherapie Erstlinientherapie beim älteren Patienten mit einem DLBCL.

2.1.7. B-Zell Oberflächenmarker CD20

Nachdem Nadler et al. [81] mit Hilfe eines monoklonalen Antikörper (anti-B1) eine Zelloberflächenstruktur auf mehrheitlich B-Zellen identifiziert hatten, wurde 1980 von Stashenko et al. [111] der Oberflächenmarker (B1) auf B-Zellen beschrieben. Hiermit eröffnete sich das Feld für weitergehende Forschungen und Analysen zur

Kategorisierung von B-Zell-Reihen als auch maligner hämatologischer Erkrankungen. Stashenko et al. fanden heraus, dass B1 auf mehr als 95% aller B-Zellen im peripheren Blut zu finden war und dass dieses Antigen nicht in Verbindung zu anderen bereits bekannten Oberflächenmarkern zum Beispiel dem Oberflächen-Immunglobulin (sIg) stand. Zudem beobachteten sie, dass die Entfernung dieser B1-positiven Zellen, durch zum Beispiel komplementvermittelte Zytolyse (CDC), die Zellpopulation eliminierte, welche im weiteren Verlauf durch Zelldifferenzierung zu Immunglobulin sezernierenden Plasmazellen differenzieren [111].

Durch Oettgen et al. [83] als auch durch Anderson et al. [3] wurde bestätigt, dass dieser neubeschriebene Oberflächenmarker konstant von B-Zellen exprimiert und daher immunzytologisch auch bei Lymphomen und Leukämien der B-Zell-Reihe zur Diagnostik und Klassifizierung genutzt werden konnte.

Durch Expressionsklonierung konnte 1988 von Einfeld et al. [35] gezeigt werden, dass es sich bei B1 um ein hydrophobes, nicht-glykosyliertes Phosphoprotein mit einer Größe von rund 35 kD handelt. Dieses B1 Antigen, mittlerweile in CD20 umbenannt, ist phosphoryliert an Serin und Threonin [83]. Seine transmembranäre Domäne umspannt viermal die Membran [9,36], jedoch verbleiben Amino- als auch Carboxyende auf der zytoplasmatischen Seite. Somit werden 41 Aminosäuren (AS-Position: 142 - 182) als exponierte Struktur auf der Zelloberfläche präsentiert [35]. CD20 ist im humanen Genom auf dem Chromosom 11 lokalisiert [115]. Ein Strukturmodell von CD20 in der Zellmembran der B-Zelle ist in Abbildung 2 (Seite 16) zu sehen.

Bei Analysen der Funktion von CD20 wurde gezeigt, dass CD20 auf der Oberfläche der B-Zellen, von der prä-B-Zelle bis zur Differenzierung zur Plasmazelle, exprimiert wird.

CD20 übernimmt einen regulierenden Schritt in der Aktivierungskaskade des Zellzyklus [23,44,114] und ist auch bei der von Tedder et al. [35,115] beobachteten Steuerung der Zelldifferenzierung beteiligt. Beschrieben ist zudem die Funktion von CD20 als Calcium-Kanal [106]. Mit Antikörpern gegen CD20 konnten durch Reff et al. [96] in vitro eine komplementabhängige Zytolyse (CDC), eine antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) sowie in vivo im Javaneraffen eine B-Zell-Depletion als Mechanismus identifiziert werden.

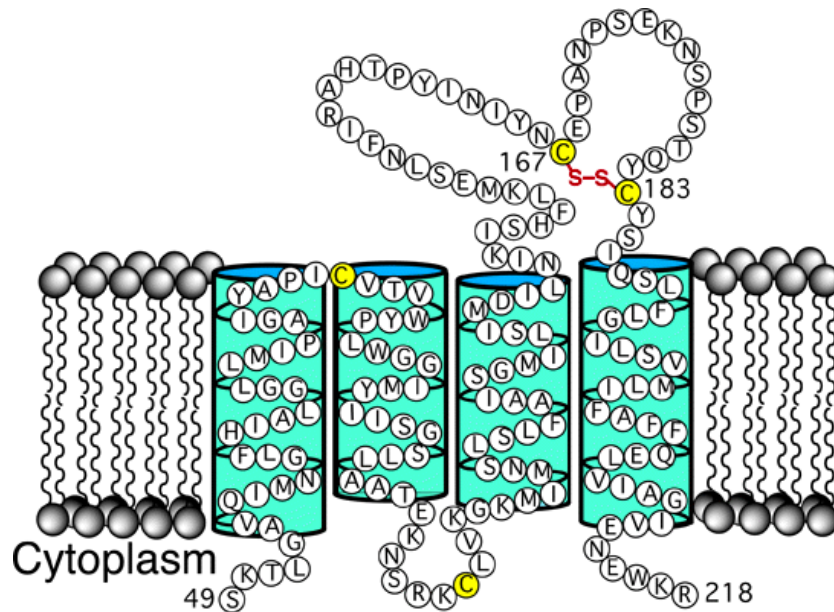


Abbildung 2: Strukturansicht von CD20 in der Zellmembran einer B-Zelle. Darstellung der Lipid-Doppelschicht einer Zellmembran nach Ernst et al. [36] mit extrazellulärer- und zyttoplasmatischer Seite, im Besonderen die Struktur von CD20 in der Zellmembran der B-Zelle. Viermal umspannt CD20 die Membran, wobei das Amino- als auch das Carboxyende sich auf der zytoplasmatischen Seite befinden. Die zweite Schleife des Peptid besteht aus 41 Aminosäuren (AS-Position: 142 - 182), befindet sich zwischen der dritten und vierten transmembranären Helix und ist die exponierte Struktur von CD20 auf der Zelloberfläche. Die identifizierte Disulfid-Brücke zwischen C167 und C183 ist gelb hervorgehoben, hierüber erfolgt die Bindung des monoklonalen anti-CD20 Antikörper Rituximab [9,35].

2.2. Kombinierte Immun-Chemotherapie

2.2.1. CHOP-Chemotherapie

Die Therapie des diffusen großzelligen B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom erfolgt mit Chemotherapie. Die Zusammenstellung der heute weiterhin als Standard eingesetzten Kombinationschemotherapie CHOP basiert auf den Studien von McKelvey et al. [72] von 1976. Die Anfangsbuchstaben der in dem Therapiekonzept eingesetzten Medikamente bilden den Kurztitel der Kombinationschemotherapie mit dem Namen CHOP. Bestandteil von CHOP ist das Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin, Oncovin und das Prednison. Eine Auflistung der Medikamente mit Dosierung, Applikationsform sowie Wiederholung der Chemotherapie sind in Tabelle 4 (Seite 17) zu finden.

Tabelle 4: CHOP-Chemotherapie (Handelsnamen, Dosis und Applikationsart)

Abkürzung	Wirkstoff	Handelsnamen	Applikation
C	<u>C</u> yclophosphamid	Endoxan®	i.v.
H	<u>H</u> ydroxydaunomycin	Adrimedac®	i.v.
O	Vincristin	<u>O</u> ncovin®	i.v.
P	<u>P</u> rednison	Decortin®	p.o.

In der CHOP-Chemotherapie werden die Medikamente Cyclophosphamid, Doxorubicin und Vincristin an Tag 1 eines jeden Zyklus intravenös appliziert. Die Applikation von Cortison (Prednison) erfolgt oral an den Tagen 1 - 5.

2.2.1.1. Historische Entwicklung von CHOP

Nachdem zunächst Mono-Chemotherapien nur geringe Raten kompletter Remissionen bei Lymphomen erzielen konnten [56], zeigten McKelvey et al. [72] 1976 die Vorteile einer Polychemotherapie bei malignen Lymphomen. In dieser Studie wurde an 420 Patienten mit fortgeschrittenen Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) die kombinierte Polychemotherapie CHOP (Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin, Oncovin und Prednison) mit der kombinierten Polychemotherapie HOP (Hydroxydaunorubicin, Oncovin und Prednison) verglichen. Zudem wurde die Applikation eine Erhaltungstherapie mit zwei verschiedenen Therapiearmen COP (Cyclophosphamid, Oncovin und Prednison) beziehungsweise OAP (Oncovin, Arabinosylcytosin und Prednison) geprüft.

Unter den 204 auswertbaren Patienten im CHOP-Therapiearm hatten 71 % komplette Remissionen; im Vergleich hierzu gab es im Therapiearm mit HOP-Chemotherapie (n = 216) 61 % komplette Remissionen. Es zeigten sich ein vergleichbares Gesamttherapieansprechen (ORR) im CHOP-Therapiearm mit 92 % und 88 % im HOP-Therapiearm. Die Rate kompletter Remission in dieser Therapiestudie war im Vergleich mit anderen zu dieser Zeit durchgeführten Kombinationschemotherapien vorteilhaft.

Im Hydroxydaunorubicin-haltigen Therapiearm zeigte sich durch diese Therapieerweiterung ein signifikanter Unterschied von 10 % in der Rate kompletter Remissionen im Vergleich zu dem anderen Therapiearm.

In weiteren Analysen mit Fokus auf die Lymphom-Histologie konnte zudem bei niedrig-malignen Lymphomen eine signifikant höhere Rate kompletter Remissionen

im Vergleich zu den hoch-malignen Lymphomen gesehen werden (78 % zu 67 % im CHOP-Therapiearm, beziehungsweise 67 % zu 60 % im HOP-Therapiearm).

Unter der Erhaltungstherapie waren nach dem 1.Jahr im COP-Therapiearm 86 % der Patienten und im OAP-Therapiearm 86 % der Patienten weiterhin ohne Rezidiv.

Diese Analysen und Ergebnisse waren eine eindeutig positive Empfehlung für die Verwendung von Hydroxydaunorubicin in der Behandlung von Lymphomen im Vergleich mit anderen zuvor berichteten Kombinationschemotherapien [6,66].

In den folgenden Jahren konnten keine Verbesserungen der Ergebnisse in der Therapie von hochmalignen Non-Hodgkin-Lymphomen verzeichnet werden. Es gab Bemühungen zur Intensivierung der Therapien mit Dosisescalation einzelner oder durch Hinzunahmen neuer Zytostatika in die Therapieschemata der sogenannten zweiten und dritten Generation, vielmehr zeigte sich hierdurch eine Zunahme der Toxizität [40,45,117-119,130].

2.2.1.2. Cyclophosphamid

Durch Cytochrom P450 Aktivierung wird Cyclophosphamid in seine biologische aktive Form verstoffwechselt. Zu der Gruppe der Alkylantien gehörend besteht seine zytostatische Wirkung in einer Alkylierung der DNS und von Proteinen mit Aufbau von kovalenten Verbindungen (cross links) [105].

2.2.1.3. Doxorubicin

Das Anthrazyklin Doxorubicin wird durch Reduktion in der Leber in die biologisch aktive Form überführt. Nach einem Zwischenschritt erfolgt durch Reaktion mit Sauerstoff und Bildung von Radikalen die Hemmung der Topoisomerase II von Tyrosinkinasen und eine Induktion von Apoptose [105].

2.2.1.4. Vincristin

Vincristin, welches zur Gruppe der Vinca-Alkaloide gehört, ist ein Mitosehemmer. Durch Bindung an das Protein Tubulin wird die Tubulinsynthese blockiert und die Zellen in der Metaphase der Mitose arretiert, es folgen Störung der DNS- und RNS-Synthese sowie Induktion von Apoptose [105].

2.2.1.5. Prednison

Das ebenfalls im CHOP-Protokoll eingesetzte Prednison ist ein künstliches Glukokortikoid und gehört zu der Gruppe der Corticosteroide. Als Vorstufe wird es in der Leber in die aktive Form (Prednisolon) überführt. Es hat immunsupprimierende und immunmodulierende Eigenschaften (Beeinflussung des DNS- und RNS-Stoffwechsel lymphatischer Zellen) [105,128].

2.2.2. anti-CD20 Immuntherapie

2.2.2.1. Entdeckung von Rituximab

Bereits sehr rasch nach der Erstbeschreibung von CD-20 wurden Therapien gegen CD-20 entwickelt [111]. In ersten klinischen Versuchen mit monoklonalen anti-CD20 Antikörpern der Maus zeigte sich jedoch, dass bei der Anwendung die Anti-Tumorwirkung im Menschen beschränkt war. Die Wirkung der Maus-Antikörper war vermutlich durch Antigen-Modulation, der Entstehung menschlicher Anti-Maus Antikörper (HAMA) sowie der Entstehung von Antigen-negativen Tumorzellen beschränkt [95]. Es konnte aber auch gezeigt werden, dass diese Immuntherapie mit Antikörpern mit einer guten Verträglichkeit und nur minimalen Toxizität für den Empfänger einhergeht [95].

Von Reff et al. [96] beschrieben 1994 ein Verfahren zur Herstellung eines monoklonalen chimären (Maus-Mensch) anti-CD20 Antikörper C2B8.

In einem Tiermodell am Javaneraffen (*Macaca fascicularis*) konnten sie nach wöchentlichen Applikationen von C2B8 zeigen, dass durch diesen monoklonalen chimären anti-CD20 Antikörper 95 % der B-Zellen in peripheren Lymphknoten und im Knochenmark depletiert wurden. Im Gegensatz zu den zuvor erprobten Maus-Antikörpern konnte bei dem chimären Maus-Mensch Antikörper C2B8 zudem eine komplementabhängige Zytolyse (CDC) und eine antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) gezeigt werden. Zudem zeigte sich auch eine langanhaltende B-Zell-Depletion im peripheren Blut von Primaten nach C2B8-Therapie. Toxische Effekte der Therapie konnten in dem Tiermodell nicht beobachtet werden. Hiermit wurde von ihnen die Möglichkeit zu einer Verbesserung der Therapie von B-Zell Erkrankungen mittels chimärer monoklonaler anti-CD20-Antikörpern vorgeführt.

2.2.2.2. Rituximab

Bei C2B8 handelt es sich um einen rekombinant hergestellten monoklonalen chimären (Maus-Mensch) anti-CD20 IgG1_κ Antikörper. C2B8 besteht aus dem konstanten menschlichen Anteil (γ₁ schwere Kette und κ leichte Kette) verknüpft mit den variablen Maus-Regionen des Antikörpers (leichte Kette [light chain] und schwere Kette [heavy chain]) [19]. In der Strukturansicht bilden durch die Zusammenlagerung der Ketten diese die Form eines „Y“, der einarmige Teil des Antikörper wird hierbei Fc (kristallisierbares Fragment) genannt, während der zweiarmige Teil des Antikörper als Fab (Antigen-Bindungsdomäne) bezeichnet wird. In ihrer Funktion ist das Fab-Fragment die Antigen-Bindungsdomäne und das Fc-Fragment sowohl die Komplement- als auch Bindungsstelle für zelluläre Fc-Rezeptoren [97].

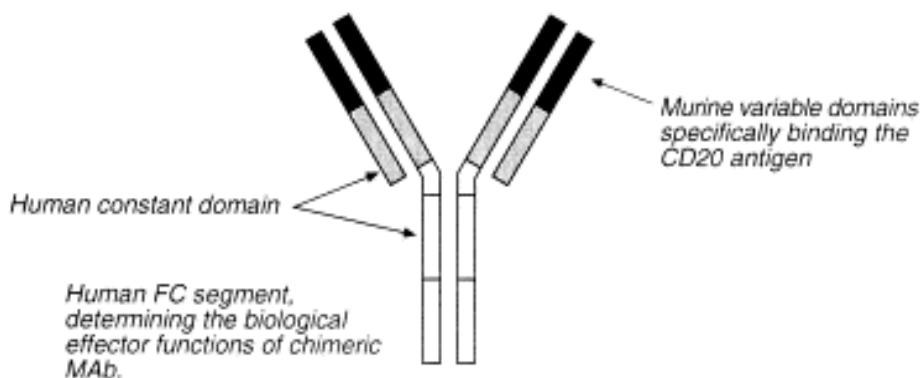


Abbildung 3: Strukturdarstellung von Rituximab. In der Strukturdarstellung des monoklonalen chimären anti-CD20 IgG1_κ Antikörper Rituximab ist die mit schwarz dargestellte Domäne die variable Maus-Domäne des Fab-Fragment, die grau dargestellte Domäne die menschliche konstante Region und die weiße Domäne das menschliche Fc-Fragment [100].

Der chimäre anti-CD20 Antikörper C2B8 besteht aus 1328 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 144 kDa. Dieser initial von Reff et al. noch C2B8 genannte Antikörper erhielt für die Zulassung den generischen Namen Rituximab (Mabthera®; F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz). Eine Strukturansicht von Rituximab (C2B8) ist in der Abbildung 3 (Seite 20) zu sehen.

Rituximab wurde im Jahr 1997 erstmalig von der US Bundesgesundheitsbehörde (FDA) in den USA zur Anwendung im Menschen zugelassen (Quelle: <http://www.fda.gov>).

2.2.2.3. Wirkungsmechanismus von Rituximab

Zu den wichtigsten Effektormechanismen von Rituximab in malignen hämatologischen Erkrankungen zählen: die Induktion einer Apoptose [13,106,107], Sensibilisierung der Tumorzellen für die zytostatische Wirkung der Chemotherapie [22,32], Einleitung einer Phagozytose [108], komplementabhängige Zytolyse [43,47,51,96] und die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität [20,51,106]. Wie Rituximab dazu in der Lage ist, die Empfindlichkeit primär resistenter humaner Lymphom-Zelllinien gegenüber dem zytotoxischem Effekt von Chemotherapie (Rizin, VP-16 und Adriamycin) zu erhöhen, ist bislang ungeklärt [22,32]. Minard-Colin et al. [74] zeigten, dass die B-Zell-Depletion durch anti-CD20 Antikörper durch Makrophagen über ihre Rezeptoren Fcγ-RI, Fcγ-RIII und Fcγ-RIV vermittelt wird. Clynes et al. [24] beobachteten, dass Rituximab an aktivierende (Fcγ-RIII) und inhibierende (Fcγ-RIIB) Immunglobulin-Rezeptoren bindet und dadurch sein gegensätzliches aktivierendes und hemmendes Potential vermittelt. Diese Rezeptoren finden sich auf NK-Zellen, Monozyten und Makrophagen. Trotz dieser Erkenntnisse besteht jedoch weiterer Klärungsbedarf zur Wirkungsweise von anti-CD20 Antikörpern in der Tumorthherapie [85].

2.2.2.4. Klinischer Einsatz von Rituximab

2.2.2.4.1. Zulassung von Rituximab

Nach Entwicklung des monoklonalen chimären anti-CD20 Antikörper Rituximab folgten klinische Studien: Phase-I Studien (Pharmakokinetik und Pharmakodynamik) von Einmalgaben von Rituximab bei rekurrenten B-Zell-Lymphomen [67], Phase-II Studien (Nachweis medizinischer Wirksamkeit) mit Anwendung von Rituximab bei Patienten mit Rezidiv eines niedrig-malignen Non-Hodgkin-Lymphom. Bei einer starken Anti-Lymphom-Wirkung zeigte die Rituximab-Immuntherapie auch in Kombination mit CHOP-Chemotherapie nur geringe Toxizität [28,39,68,73,123]. Im Jahr 1997 wurde deshalb Rituximab von der US-Bundesgesundheitsbehörde zur Therapie bei Patienten mit Rezidiv oder therapieresistentem niedrig-malignen oder follikulären B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom (Quelle: <http://www.fda.gov>) zugelassen.

2.2.2.4.2. Rituximab bei dem diffus großzelligen B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom

Es erfolgten weitere Untersuchungen und Studien zur Rituximab-Verwendung in Kombination mit Standardchemotherapie und die Ausweitung der Indikation auf weitere hämatologische Krankheitsentitäten. So untersuchten Coiffier et al. [27] in einer randomisierten Therapiestudie bei älteren Patienten mit diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom (DLBCL) die Erweiterung der Standard-Chemotherapie CHOP mit Rituximab gegen alleinige CHOP-Chemotherapie. In dieser Studie wurden Patienten im Alter von 60 - 80 Jahren mit neudiagnostiziertem unbehandeltem DLBCL in zwei Therapiearme zufällig verteilt, entweder 8 Zyklen CHOP-Chemotherapie alle 3 Wochen (CHOP-21) oder 8 Zyklen CHOP-Chemotherapie alle 3 Wochen mit Rituximab an Tag 1 der Chemotherapie eines jeden Zyklus (R-CHOP-21). Die Rate kompletter Remissionen war in der Gruppe mit Rituximab-haltiger CHOP-Chemotherapie (n = 197) höher als in der Gruppe mit alleiniger CHOP-Chemotherapie (n = 202) (76 % vs. 63 %, p = 0,005). Bei einer medianen Beobachtungszeit von 2 Jahren war das EFS und das OS in der Rituximab plus CHOP-Therapiegruppe signifikant besser (p < 0,001, beziehungsweise p = 0,007). Das Risiko eines Therapieversagens oder Tod war durch die Erweiterung der Standard-Chemotherapie CHOP mit Rituximab signifikant verringert worden (Risiko-Ratio, 0,58 [95 % Konfidenzintervall, 0,44 - 0,77] beziehungsweise 0,64 [0,45 - 0,89]). Klinisch bedeutsame Nebenwirkungen waren nicht signifikant häufiger bei R-CHOP als bei CHOP. Habermann et al. [46] bestätigten in einer Therapiestudie an 632 älteren Patienten (Alter > 60 Jahre) mit DLBCL, dass Rituximab plus CHOP-Chemotherapie signifikant das Überleben ohne Therapieversagen (failure-free survival) verlängerte. Kein Vorteil zeigte sich hierbei von Rituximab als zusätzliche Erhaltungstherapie nach vorangegangener R-CHOP-Chemotherapie.

In der MInT-Studie der MabThera International Trial Gruppe [89] zeigte sich, dass eine kombinierte Rituximab plus CHOP-ähnliche Chemotherapie bei jungen Patienten mit DLBCL und guter Prognose [kein Risiko-Faktor oder 1-Risiko Faktor in Übereinstimmung mit dem aalPI [110] im Stadium II - IV oder Stadium I mit Bulk] eine wirksame Therapie darstellt. Die insgesamt 823 Patienten im Alter von 18 - 60 Jahren wurden in den Therapiearm mit 6 Zyklen CHOP-ähnlicher Chemotherapie plus Rituximab (n = 413) oder in die Therapiegruppe mit 6 Zyklen einer CHOP-ähnlichen Chemotherapie ohne Rituximab (n = 411) randomisiert. Patienten mit Bulk oder extranodalen Befall erhielten eine zusätzliche Strahlentherapie. Nach einer

mittleren Beobachtungszeit von 34 Monaten hatten die Patienten aus der Rituximab plus Chemotherapie Gruppe ein verbessertes 3-Jahres-ereignisfreies Überleben verglichen mit den Patienten aus dem Therapiearm mit alleiniger Chemotherapie ohne Rituximab (79 % [95 % CI 75 - 83] vs. 59 % [54 - 64]; Unterschied zwischen den Gruppen 20 % [13 - 27], Logrank-Test $p < 0,0001$). Sie hatten zudem eine erhöhte 3-Jahres-Gesamtüberleben (93 % [90 - 95] vs. 84 % [80 - 88]; Unterschied in beiden Gruppen 9 % [3 - 13], Logrank-Test $p = 0,0001$). Das ereignisfreie Überleben wurde beeinflusst von Vorliegen von Bulk und dem aalPI; nach Chemotherapie und Rituximab. Es konnte eine günstige Subgruppe (IPI = 0, kein Bulk) von einer weniger vorteilhaften Subgruppe (IPI = 1 oder Bulk oder beides) differenziert werden. Nebenwirkungen unterschieden sich in beiden Therapiearmen nicht. In einer Martingale Analyse der Patienten im Rituximab-Therapiearm zeigte sich, dass mit der Therapieerweiterung mit Rituximab die negativen Auswirkungen des Maximalen-Tumor-Durchmesser (MTD) vermindert, jedoch nicht aufgehoben werden.

In der prospektiven Therapiestudie RICOVER-60 der Deutschen Studiengruppe für hochmaligne Non-Hodgkin-Lymphome (DSHNHL) konnte der signifikante Vorteil von Rituximab im Vergleich zu einer Chemotherapie ohne Rituximab im ereignisfreien, progressionsfreien und im Gesamtüberleben belegt werden [91]. Es handelt sich um die bisher größte Studie bei älteren Patienten mit insgesamt 1222 auswertbaren Patienten (Alter: 61 - 80 Jahre) mit neudiagnostiziertem unbehandelten aggressiven B-Zell-Lymphom. In der Studie wurde untersucht, ob 6 oder 8 Zyklen R-CHOP-14 im Vergleich zu 6 oder 8 Zyklen CHOP-14 ohne Rituximab den Therapieerfolg verbessern. 6 Zyklen R-CHOP-14 verbesserten signifikant das ereignisfreie, progressionsfreie und Gesamtüberleben gegenüber 6 Zyklen CHOP-14. Von den 4 Therapiearmen der RICOVER-60 Studie zeigte sich, dass der Therapiearm mit 8x Rituximab und 6x CHOP-14 zu bevorzugen ist.

Ein weiterer Ansatz zur Therapieverbesserung konnte von Pfreundschuh et al. [92] nach ergänzenden Analysen der Pharmakokinetik von Rituximab [98] gezeigt werden. Durch eine Dosis-Verdichtung von Rituximab konnten höhere Raten kompletter Remissionen und ereignisfreien Überlebens beim älteren Menschen mit diffusen großzelligen B-NHL gezeigt werden.

Durch die Einführung des chimären monoklonalen anti-CD20 Antikörper Rituximab zusätzlich zu der etablierten Polychemotherapie CHOP hat sich das Therapieansprechen für alle Subgruppen von Patienten signifikant verbessert [27,39,46,89,91,104]. Trotzdem gibt es Rezidivraten von 10 - 20 % bei Patienten mit niedrigem IPI und 30 - 50 % bei Patienten mit IPI > 2 [69].

2.3. Fc-Gamma-Rezeptor (Fc γ R)

2.3.1. Allgemein

Mit der Bindung von dem Fc-Teil von IgG-Antikörpern an den Immunglobulin-Rezeptor (Fc-Gamma-Rezeptor, Fc γ R, FCGR) der Effektorzellen erfolgt die Aktivierung von Signalkaskaden. Durch Aktivierung dieser Signalkaskaden erfolgt die Anti-Lymphom-Wirkung von anti-CD20 Antikörpern bei bösartigen B-Zell-Lymphomen [39,51,54,94,96].

Die Fc γ -Rezeptoren sind eine Gruppe heterogener Moleküle, die zu der Immunglobulin-Superfamilie gehören. Sie spielen verschiedene gegensätzliche Rollen bei der Immunantwort und bei der Wirkung von Immunglobulin-Antikörpern [21,25]. Die Familie der Fc γ -Rezeptoren wird durch insgesamt 8 Gene auf dem Chromosom 1 kodiert. Fc γ -Rezeptoren werden in drei Klassen von Rezeptoren für Immunglobulin-G (IgG) unterteilt: Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) und Fc γ RIII (CD16) [121]. Während die Rezeptoren Fc γ RI, Fc γ RII und Fc γ RIII aktivierende Rezeptoren sind, gehören die Rezeptoren Fc γ RIIb1 und Fc γ RIIb2 zu den inhibierenden Rezeptoren. Unter den verschiedenen ethnischen Bevölkerungsgruppen sind weltweit 12 Isoformen mit unterschiedlichen bedeutsamen Haplotypen der Fc γ -Rezeptoren beschrieben [109,121,129].

Die Fc γ -Rezeptoren setzen sich zusammen aus einer IgG-bindenden α -Kette mit zwei (Fc γ RII und Fc γ RIII) beziehungsweise drei (Fc γ RI) extrazellulären Immunglobulin-ähnlichen Domänen, einer transmembranären Region und dem intrazellulären Schwanz. Zusätzlich haben die Fc γ RI und Fc γ RIII eine Proteinkette (Fc γ subunit), welche mit der α -Kette interagiert [121]. In der Abbildung 4 (Seite 25) ist eine schematische Darstellung der heterogenen Fc-Rezeptor Familie und deren strukturelle Unterschiede zueinander gezeigt.

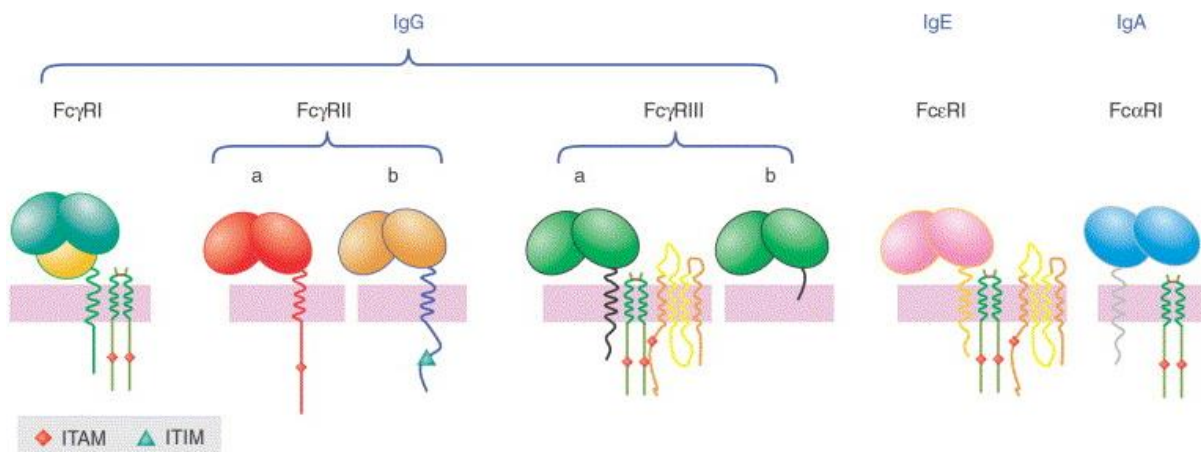


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Fc-Rezeptorfamilie. Darstellung der Familie der verschiedenen Fc-Rezeptoren für IgG, IgE und IgA. Ebenfalls dargestellt ist das aktivierende (■: ITAM-Sequenz; Immunrezeptor-Tyrosin-Aktivierungs-Motiv) als auch das hemmend wirkende Motiv (▲: ITIM-Sequenz; Immunrezeptor-Tyrosin-Inhibierungs-Motiv) im zytosomatischen Schwanz der Fc-Rezeptoren. Es gibt zudem 3 bekannte Spleiß-Varianten des intrazellulären Schwanzes von Fcγ-Rezeptor IIb (Fcγ-RIIb1, Fcγ-RIIb2, Fcγ-RIIb3) [50].

Von Bruhns et al. [12] wurde gezeigt, dass Immunglobulin-G1 (IgG1) und Immunglobulin-G3 (IgG3) an alle humanen Fcγ-Rezeptoren binden. Ebenfalls Bruhns et al. [12] zeigte, dass das Immunglobulin-G2 (IgG2) nicht nur an den FcγRIIA H131, sondern auch mit geringerer Affinität an den FcγRIIIA V158 und FcγRIIA R131 bindet. FcγRII und FcγRIII haben zudem eine schwächere Bindungsfähigkeit zu monomeren Immunglobulin-G (IgG) und binden effektiv nur multimere Immunkomplexe [109]. Der FcγRIIIA, auch als CD16a bezeichnet, wird auf Zellen des Immunsystems, im Besonderen auf NK-Zellen (natürliche Killerzellen) und Makrophagen exprimiert. Der FcγRIIA (CD32a) wird von neutrophilen Leukozyten und Makrophagen exprimiert. Nach Bindung der Immunglobuline mit ihrem Fc-Teil an den Fc-Bindungsdomäne der Fcγ-Rezeptor erfolgt die Einleitung der Signalkaskade.

In der Abbildung 5 (Seite 26) ist die Bindung eines Immunglobulin (IgG) an den Fcγ-Rezeptor dargestellt.



Abbildung 5: Interaktion eines Immunglobulin mit einem Fcγ-Rezeptor. In der Abbildung ist schematisch die Interaktion eines Immunglobulin (IgG) mit einem Fcγ-Rezeptor II (bzw. Fcγ-Rezeptor III) dargestellt. In der Abbildung dargestellt ist die Zellmembran [türkis], in jener der Fcγ-Rezeptor II (oder Fcγ-Rezeptor III) [blau] verankert ist. Es erfolgt die Bindung von dem Immunglobulin (IgG) [79] an den Fc-Rezeptor [25].

Fcγ-Rezeptoren initiieren ihre Signalkaskade über den hierzu bedeutenden Schritt des Immunrezeptor-Tyrosin-Aktivierungs-Motiv (ITAM) [86]. Dieses Immunrezeptor-Tyrosin-Aktivierungs-Motiv ist ebenfalls in der Abbildung 4 (Seite 25) dargestellt. Es handelt sich dabei um einen hochkonservierten Peptid-Abschnitt mit der Sequenz YxxL/I (Tyrosin,x,x,Leucin/Isoleucin), welche sich zweimal in kurzer Abfolge wiederholt und im Bereich des zytoplasmatischen Schwanzes lokalisiert ist (YxxL/I, X₍₆₋₈₎, YxxL/I) [4]. Durch Bindung des Liganden (Immunglobulin-G) an den Fcγ-Rezeptor erfolgt eine Phosphorylierung des Tyrosin-Restes des im Zytoplasma liegenden intrazellulären Immunrezeptor-Tyrosin-Aktivierungs-Motivs, wodurch wiederum die Signalkaskade innerhalb der Zelle ausgelöst wird.

Das Immunrezeptor-Tyrosin-Aktivierungs-Motiv wurde beim Fcγ-Rezeptor IIA nachgewiesen und aktiviert die Phagozytose von Makrophagen. Die Rezeptoren Fcγ-RIIIA und Fcγ-RI besitzen dieses Immunrezeptor-Tyrosin-Aktivierungs-Motiv nicht, können aber durch Interaktion mit einem weiteren Peptid die Aktivierung der Makrophagen auslösen. Bei diesem Peptid handelt es sich um die γ-Kette (Fc-γ subunit), zwei hochkonservierte Aminosäure-Sequenzen (YxxL), die die Charakteristik des ITAM haben [24,53,71,87]. Zur Aktivierung der Phagozyten ist daher die Anwesenheit der γ-Kette erforderlich [24,71].

Bei den inhibierenden Rezeptoren FcγRIIb1 und FcγRIIb2 mit ihrem Immunrezeptor-Tyrosin-Inhibierungs-Motiv (ITIM), liegt die bereits zuvor genannte Aminosäure-Sequenz (YxxL) nur einzeln vor. Durch das Fehlen der zweiten repetiven

Aminosäure-Sequenz ist es dem Immunrezeptor-Tyrosin-Inhibierungs-Motiv im Vergleich zu dem ITAM nicht möglich Zellen zu aktivieren. Hierdurch verläuft die Aktivierungskaskade inadäquat; sie wirken inhibierend.

Zu der Wirkungsweise von Fcγ-Rezeptoren wurde von Salmon et al. [102] beschrieben, dass durch den Fcγ-Rezeptor III die Aktinpolymerisation und die Phagozytose eingeleitet wird, welche wiederum vom Fcγ-Rezeptor II vermittelt wird.

2.3.2. Einzelnukleotid-Polymorphismen des Fcγ-Rezeptor

2.3.2.1. Einzelnukleotid-Polymorphismus

Bei einem Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) handelt es sich um eine Ergänzung, Austausch oder Ausfall eines einzelnen Nukleotids der 4 möglichen Nukleotid-Basen (Adenin, Guanin, Cytosin, Thymine) des DNA-Moleküls. Ein SNP ist eine DNA-Sequenzvariation, welche in der Bevölkerung häufig vorkommt. Bei einem SNP gibt es keine allein gültige Standardsequenz, stattdessen existieren zwei oder mehrere gleich akzeptable Alternativen der Nukleotidsequenz, definiert mit einer Häufigkeit in der Bevölkerung von > 1 %. Im Gegensatz hierzu handelt es sich bei einer Mutation um eine Veränderung der DNA-Sequenz mit einer Häufigkeit in der Bevölkerung von < 1 %. Das DNA-Molekül ist die Matrix für die Proteinbiosynthese; erfolgt der Austausch eines Nukleotids gegen ein anderes, beziehungsweise kommt es zu einem ersatzlosen Ausfall eines Nukleotids, so ändert sich die Abfolge der Nukleotide und dadurch die Zusammensetzung der durch sie kodierten Proteine. Proteine werden aus 23 möglichen Aminosäuren zusammengesetzt. Die für diese Proteinbiosynthese erforderlichen Informationen werden in der DNA-Doppelhelix verschlüsselt. Eine Aminosäure wird dabei durch eine Kombination aus 3 Nukleotiden der 4 Nukleotid-Basen (A, G, C, T) des DNA-Moleküls kodiert. Durch diese Form der Kodierung (3 Nukleotide = 1 Aminosäure), auch Triplett-Code genannt, ergeben sich ausreichend Kombinationsmöglichkeiten, um alle 23 Aminosäuren durch die lediglich 4 existierenden Nukleotid-Basen zu kodieren. Zum anderen bietet diese Form der Verschlüsselung eine Informationssicherheit, da nicht jeder Nukleotid-Austausch zu einer Veränderung der Proteinzusammensetzung führen muss.

Für die Übertragung der DNA-Information zur Proteinsynthese ist die Boten-RNA (mRNA) verantwortlich; chemisch ist bei der RNA anstelle von Thymin die Base Uracil (U) vertreten, bei ansonsten identischen Nukleotid-Basen (Adenin, Guanin und

Cytosin). In der Abbildung 6 (Seite 29) ist in Form der Code-Sonne die Verschlüsselung der 23 Aminosäuren sowie das Start-/Stopcodon durch den Triplet-Code der RNA dargestellt. Trotz dem Triplet-Code kann es jedoch durch einen einzelnen Nukleotid-Austausch zu einer Verschiebung des Leserasters bei der Proteinsynthese und somit zu einer Synthese einer anderen Aminosäure kommen.

Am Beispiel der Nukleotid-Sequenz (UAC) die für den Einbau von Tyrosin steht, wird bei einem Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) an der 2.Stelle in Form von UUC durch diese veränderte Nukleotid-Sequenz bereits eine andere Aminosäure (Phenylalanin) eingebaut. SNPs mit Änderung der durch sie kodierten Aminosäure werden auch als nicht-synonyme SNPs bezeichnet. Es kann jedoch auch durch einen SNP zu einem vorzeitigen Stopp der Proteinsynthese kommen, zum Beispiel mit Änderung an der 3.Stelle. Bei der Nukleotid-Sequenz UAGU handelt es sich um das Stopcodon und es erfolgt beim Ablesen im Rahmen der Proteinbiosynthese zu einem vorzeitigen Ende der Proteinsynthese. Ein Einzelnukleotid-Polymorphismus kann aber auch ohne Veränderung der durch sie kodierten Aminosäure einhergehen, zum Beispiel kodiert die Nukleotid-Sequenz UACC genauso wie UAUU die Aminosäure Tyrosin. SNP ohne Änderung der kodierten Aminosäure werden auch synonyme SNPs genannt.

Single-Nucleotid-Polymorphismen werden in Datenbanken katalogisiert, die von uns benutzte Datenbank war die des National Center für Biotechnologie Information (NCBI) und deren „Reference SNP(refSNP) Cluster Report“, Quelle:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

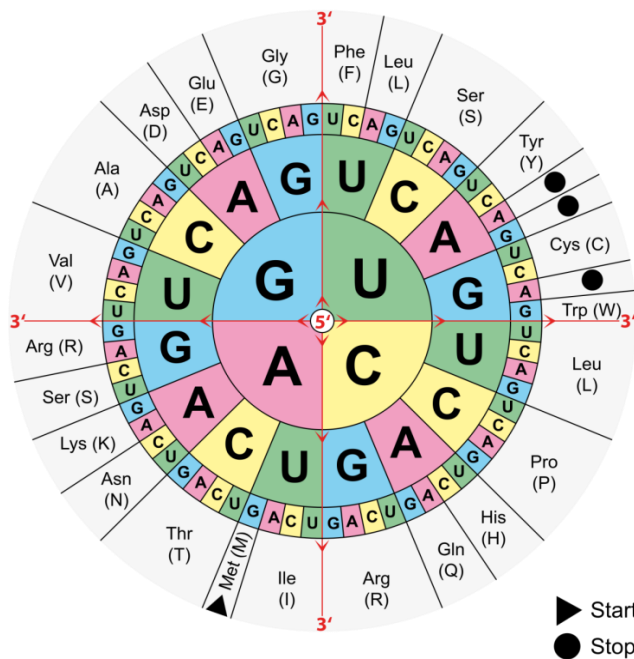


Abbildung 6: Sonnendarstellung des genetischen RNA-Codes. Die kodierende Nucleotid-Sequenz des Führungsstranges wird in der auch als Code-Sonne bezeichneten Sonnendarstellung vom 5' zum 3'-Ende abgelesen; am Beispiel für die Nucleotid-Sequenz UAU der RNA ist die Aminosäure Tyrosin kodiert. Quelle: http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:Aminoacids_table.svg&filetimestamp=20110902174059

2.3.2.2. Fcγ-Rezeptor IIA 131H/R Einzelnucleotid-Polymorphismus

In der NCBI-Datenbank ist für den Fcγ-Rezeptor IIA ein Polymorphismus an der Aminosäureposition 131 mit Variation der Aminosäure von Histidin (H) zu Arginin (R) durch einen Einzelnucleotid-Austausch von Cytosin zu Thymin dokumentiert. (NCBI Build 37.4: rs1801274). Experimentelle Beobachtungen von Warmerdam et al. [124] zeigten, dass die Aminosäureposition 131 des Fcγ-Rezeptor IIA die Bindungsfähigkeit für IgG2 beeinflusst. Ähnlich hierzu waren die Ergebnisse von Bruhns et al. [12], wonach IgG1 und IgG3 an alle Fcγ-R binden, jedoch interessanterweise IgG2 mit geringerer Affinität an den FcγRIIA R131, im Vergleich zu dem FcγRIIA H131 bindet. Norris et al. [82] bestätigten unterschiedliche Bindungseigenschaften von IgG an den Rezeptor durch Mutation im Fcγ-RIIA. Salmon et al. [103] beschrieben Polymorphismen der Fcγ-Rezeptoren IIA und –IIIB und deren unterschiedliche Wirkungen in Phagozyten.

Weng et al. [125] zeigten, dass Patienten mit einem folliculären Lymphom, die homozygot sind in Position 131 für Histidin (H: CAU/CUC) des FcγRIIA ein besseres Ansprechen auf Rituximab-Monotherapie haben als Patienten, die heterozygot oder homozygot sind in Position 131 für Arginin (R: CGU/CGC/CGA/CGG). Dies konnte jedoch nicht durch weitere Analysen bestätigt werden [10,18,38,42,58,122].

Rossi et al. [99] haben 2009 von 106 Patienten mit einem diffusen großzelligen B-NHL unter R-CHOP-21 Therapie insgesamt 19 verschiedene Einzelnukleotid-Polymorphismen analysiert. In den Analysen der 2 von ihnen betrachteten SNP des Fcγ-Rezeptor [FcγRIIA 166 (rs1801274) + FcγRIIIA 102 (rs10127939)] konnten keine Assoziationen für das ereignisfreie Überleben und der Polymorphismen der Fcγ-Rezeptoren identifiziert werden.

2.3.2.3. Fcγ-Rezeptor IIIA 158 V/F Einzelnukleotid-Polymorphismus

Von DeVries et al. [31] wurde 1996 ein ungewöhnlicher Fcγ-Rezeptor IIIA auf Natürlichen Killerzellen bei einem immundefizienten Patienten beobachtet. Identifiziert wurde ein Polymorphismus des Fcγ-Rezeptor IIIA mit Beeinflussung der Bindungsfähigkeit von Antikörpern bei der Immunabwehr. Für den Fcγ-Rezeptor IIIA ist ein Einzelnukleotid-Polymorphismus der Aminosäure 158 beschrieben; hierbei liegt ein Wechsel der Nukleotid-Base von Guanin zu Thymin vor, wodurch es zu einem Wechsel der Aminosäure von Valin (V) zu Phenylalanin (F) kommt (NCBI Build 37.4: rs396991). In weiteren Analysen dieses Polymorphismus von FcγRIIIA, an der Position 158 (Fcγ-RIIIA 158 V/F) zeigte sich, dass die Bindung von Immunglobulin (IgG1) an diesen Rezeptor beeinflusst wird [30,59,129].

Morgan et al. [76] zeigten die stärkste Assoziation mit Empfänglichkeit für Rheumatoide Arthritis für den Haplotyp des Fcγ-Rezeptor IIIA 158 V/V im Vergleich zu Polymorphismen der Fcγ-Rezeptoren IIA, IIB und IIIB, welche nicht mit Rheumatoider Arthritis assoziiert sind. Es wurde gezeigt, dass die Fcγ-Rezeptoren IIIA von NK-Zellen mit dem Genotyp 158 V/V besser den Fc-Teil des chimären anti-CD20 Antikörper Rituximab binden als jene Zellen mit Rezeptoren, die homozygot sind für Phenylalanin (FcγRIIIA 158 F/F), was zu einer effektiveren antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität führt [30]. In einer Studie bei Patienten mit einem diffusen großzelligen B-NHL konnte keine Assoziation des ereignisfreien Überlebens und der Polymorphismen der untersuchten Fcγ-Rezeptoren (FcγRIIA, FcγRIIIA) mit R-CHOP-21-Therapie identifiziert werden [99].

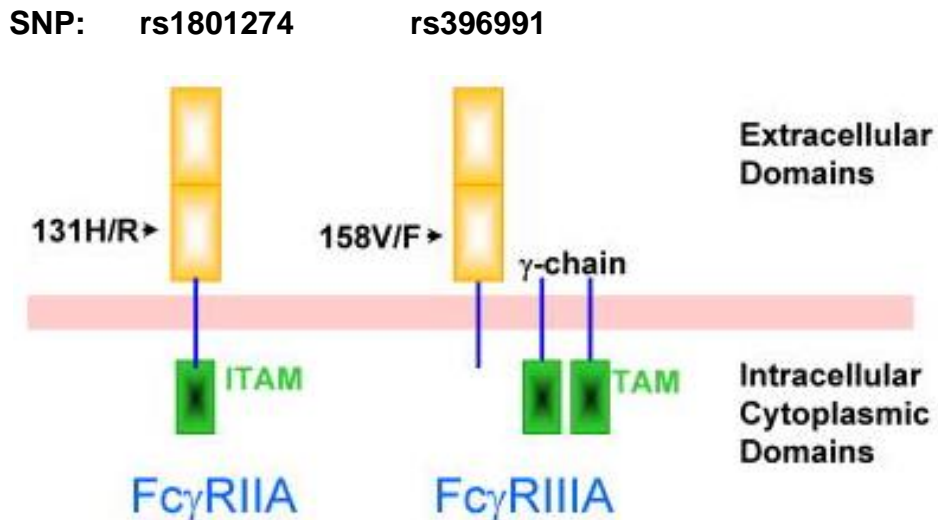


Abbildung 7: Lokalisation der Einzelnukleotid-Polymorphismen im Fcγ-Rezeptor. In der Abbildung ist die Position des Einzelnukleotid-Polymorphismus (rs1801274) des Fcγ-Rezeptor IIA und der Einzelnukleotid-Polymorphismus (rs396991) des Fcγ-Rezeptor IIIA in dem Fcγ-Rezeptor Molekül dargestellt. Durch Lokalisation des Aminosäureaustausch im extrazellulären Anteil des Fcγ-Rezeptor besteht die Möglichkeit zur Beeinflussung der Bindungsfähigkeit des Rezeptor für Immunglobuline [63].

2.3.3. Klinische Bedeutung der Fcγ-Rezeptor-Polymorphismen

Von Zhang et al. [131] wurde 2007 eine unabhängige Assoziation der Polymorphismen FcγRIIA 131 und FcγRIIIA 158 mit dem klinischen Ansprechen (PFS) von Patienten mit einem metastasierten Kolon-Karzinom unter Mono-Therapie mit dem chimären IgG1-(EGFR)-Antikörper Cetuximab (Erbitux®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gezeigt.

Bibeau et al. [8] zeigten 2009 ein verbessertes progressionsfreies Überleben bei Patienten mit einem metastasierten kolorektalen Karzinom unter der Antikörpertherapie mit Cetuximab bei homozygotem Rezeptorstatus des Fcγ-Rezeptor IIIA V/V und des Fcγ-Rezeptor IIA H/H. In multivarianten Analysen identifizierten sie die homozygoten Genotypen der Fcγ-Rezeptoren (kombiniert) als unabhängigen Risikofaktor für das progressionsfreie Überleben.

Patienten mit einem follikulären Lymphom [18,125] und Patienten mit Morbus Waldenström [120] mit einem V/V-Genotyp von FcγRIIIA 158, nicht jedoch Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie (CLL) [34,38], haben ein besseres Ansprechen auf Rituximab-Monotherapie als Patienten mit F/V- beziehungsweise F/F-Genotyp. Dies konnte nicht beobachtet werden, wenn Rituximab mit CHOP-Chemotherapie zusammen appliziert wurde [10,16,17].

Weng et al. [125] beobachteten zudem, dass die SNP FcγRIIIA 158 V/V und FcγRIIA 131 H/H unabhängig assoziiert sind mit der Ansprechrate und dem progressionsfreien Überleben bei Rituximab-Monotherapie des follikulären Lymphoms. Weng et al. [126] untersuchten zudem die Rolle der genetischen Polymorphismen (FcγRIIA 131, FcγRIIIA 158, FcγRIIb 232) auf das Therapieansprechen bei alleiniger Chemotherapie ohne Rituximab. Sie konnten keinen Einfluss der Polymorphismen bei follikulären Lymphomen beobachten. Es wurde zudem der Einfluss von Polymorphismen des inhibitorischen Fcγ-Rezeptor IIB im follikulären NHL unter Rituximab-Therapie [127], als auch bei dem diffusen großzelligen B-NHL unter R-CHOP-Therapie [14,21] geprüft. Auch hier konnte kein signifikanter Einfluss der untersuchten SNPs der Fcγ-Rezeptoren gesehen werden.

Mit der Ausweitung der Rituximab-Therapie auf aggressive NHL wurden auch für diese Krankheitsentität Analysen zu der Bedeutung verschiedener SNP der Fcγ-Rezeptoren durchgeführt. Bei 85 koreanischen Patienten mit einem diffusen großzelligen B-NHL, welche mit alleiniger CHOP-Chemotherapie behandelt wurden, zeigte sich das gleiche Therapie-Ansprechen bei den verschiedenen FcγRIIIA Polymorphismen. Im Vergleich hierzu zeigte sich bei 113 Patienten, welche mit Rituximab-haltiger CHOP-Chemotherapie behandelt wurden, dass Träger mit FcγRIIIA 158 V/V auf Rituximab-haltige CHOP-Chemotherapie besser ansprachen als Träger mit Phenylalanin (FcγRIIIA 158 F/V beziehungsweise FcγRIIIA 158 F/F) [58]. Diese Beobachtung konnte jedoch nicht in einer Studie von Mitrovic et al. [75] mit insgesamt 58 kaukasischen Patienten mit einem diffusen großzelligen B-NHL bestätigt werden. Von Levy et al. [62] wurde ebenfalls kein Einfluss des Polymorphismus FcγRIIA 131 H/R auf das Therapieansprechen, die Gesamtansprechraten, Gesamtüberlebenszeit oder das krankheitsfreie Überleben bei Patienten mit DLBCL unter R-CHOP-Therapie gefunden. In einer weiteren kleinen Studie von Fabisiewicz et al. [37] mit 87 Patienten konnte ebenfalls kein Einfluss von FcγRIIA 131 und FcγRIIIA 158 auf das Ansprechen unter R-CHOP-Therapie im DLBCL gesehen werden.

In einer kleinen Studie von Park et al. [88] zeigte sich in den Analysen von 72 Patienten mit einem diffusen großzelligen B-NHL, dass die Häufigkeit des Allel FcγRIIIA F/F höher war als in anderen bekannten Veröffentlichungen. Zudem zeigte sich nach Rituximab-haltiger CHOP-Chemotherapie ein signifikanter Unterschied

zwischen den Polymorphismen: die Gesamtüberlebensrate war 72 % bei Patienten mit F/F im Gegensatz zu 96 % bei Patienten mit V/V + V/F. Das progressionsfreie Überleben (24 Monate) war signifikant vermindert mit 41 % (F/F) zu 85 % (V/V + V/F). Als signifikant zeigte sich auch, dass rund 59 % der Patienten mit dem F/F-Genotyp ein Rezidiv mit der mittleren Zeit bis zur Tumorprogression von 30 Monaten bekamen, während in der V/V + V/F Gruppe mit 15 % Rezidiven die mittlere Zeit bis zur Tumorprogression in der 24 Monate Verlaufskontrolle nicht erreicht wurde.

Kein Unterschied bezüglich des Therapieansprechens bei den verschiedenen Genotypen des Fcγ-R11A Polymorphismus in der Aminosäure-Position 158 wurden in einer Studie mit 51 Patienten mit diffusen großzelligen B-NHL beobachtet. Der Polymorphismus des Fcγ-Rezeptor IIIA beeinflusste nicht die Prognose von mit R-CHOP behandelten Patienten mit einem diffusen großzelligen B-NHL. In der Auswertung war jedoch das ereignisfreie Überleben der Patienten mit homozygoten F/F Allel tendenziell weniger vorteilhaft als bei den homozygoten Allel-Trägern mit V/V; eine statistische Signifikanz konnte nicht gesehen werden. Die Kurven für das Gesamtüberleben wiederum waren für die einzelnen Genotypen wieder fast identisch. Eine Erklärung hierfür bleiben die Autoren schuldig, wobei sie jedoch anmerken, dass ihre Patientengruppe im Median relativ jung war mit 53,1 Jahren, womit sie auch jünger sind als vergleichbare Studien anderer Zentren [122].

Unserem Wissen nach handelt es sich bei unserer Evaluation der Bedeutung der Polymorphismen von Fcγ-Rezeptor IIA beziehungsweise des Fcγ-Rezeptor IIIA auf das Ansprechen von Patienten mit einem einheitlich behandelten diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom um die erste Studie innerhalb einer prospektiven randomisierten Studie. Hierbei untersuchten wir die Korrelation der Einzelnukleotid-Polymorphismen FcγRIIA 131 H/R und FcγRIIIA 158 V/F bei Patienten mit Erstdiagnose eines diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom, die in die RICOVER-60 Studie [91] randomisiert und einheitlich innerhalb der RICOVER-60 Studie mit alleiniger CHOP-Chemotherapie oder der kombinierten Therapie (Rituximab plus CHOP-Chemotherapie) behandelt wurden. In der RICOVER-60 Studie wurden die Patienten in 4 Arme randomisiert: 6 oder 8 Zyklen einer zweiwöchentlichen CHOP-Chemotherapie, jedes wiederum mit oder ohne 8 Applikationen des monoklonalen anti-CD20 Antikörper Rituximab.

2.4. Ziele der Arbeit

Im Rahmen dieser Dissertation wurden die prospektiv asservierten DNA-Proben von Patienten und gesunden Kontrollgruppen untersucht, um die prognostische Bedeutung der Polymorphismen des Fcγ-Rezeptors IIA in der Aminosäure Position 131 (FcγRIIA 131 R/H) und von Fcγ-Rezeptor IIIA in der Aminosäure-Position 158 (FcγRIIIA 158 V/F) zu prüfen.

Es sollten je nach Expression der einzelnen Rezeptor-Polymorphismen (SNPs) Subgruppen definiert werden, die dann mit den dokumentierten und prospektiv erhobenen klinischen Daten korreliert wurden.

Insbesondere sollte dabei geprüft werden:

- A) Vergleich der Häufigkeit der Polymorphismen bei DLBCL-Patienten und gesunden Kontrollen.
- B) Einfluss der Einzelnukleotid-Polymorphismen auf den Therapieerfolg bei allen innerhalb der RICOVER-60 Studie behandelten Patienten hinsichtlich der Rate an kompletten Remissionen, an Progressen unter der Primärtherapie, sowie hinsichtlich des ereignisfreien, progressionsfreien und Gesamtüberlebens der Patienten.
- C) Einfluss der Einzelnukleotid-Polymorphismen auf die o. g. Verlaufsparemeter getrennt für Patienten, die CHOP plus Rituximab und solchen, die nur eine CHOP-Chemotherapie erhalten haben.
- D) Multivariate Analysen der Fcγ-Rezeptor Polymorphismen, adjustiert für die bisher bekannten Prognosefaktoren (erhöhte LDH, fortgeschrittene Stadien, schlechter Allgemeinzustand)

2.5. Material und Methoden

2.5.1. Therapie-Studie RICOVER-60

Die Rekrutierung der Patienten erfolgte aus dem Patientenpool der abgeschlossenen RICOVER-60 Studie der Deutschen Studiengruppe für hochmaligne Non-Hodgkin-Lymphome (DSHNHL, Studienleiter: Universitätsprofessor Dr. med. M. Pfreundschuh, Homburg/Saar, Deutschland).

Die DSHNHL koordiniert deutschlandweit Studien zur Therapieoptimierung von aggressiven Lymphomen und archiviert zusätzlich vor Therapiebeginn sowohl Serum- als auch Blutproben zentral in Homburg/Saar (Universitätsklinikum des

Saarlandes, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I, Homburg/Saar, Deutschland). Die vollständigen patientenspezifischen Daten (inkl. Basisuntersuchungen, Therapieansprechen, Nebenwirkungen, Auftreten von Krankheitsprogress/Todesfällen sowie Nachbeobachtungen) werden zentral durch die DSHNHL verwaltet und stehen zur Korrelation mit den experimentell erhobenen Ergebnissen zur Verfügung.

Aktuell lagen von den auswertbaren 1222 Patienten der RICOVER-60 Studie mit aggressivem Lymphom in Homburg 512 Proben vor Therapiebeginn vor und standen für wissenschaftliche Begleituntersuchungen zur Verfügung. Die Patienten, von denen Blutproben und damit DNA-Proben zu Verfügung standen, sind repräsentativ für die gesamte RICOVER-60 Patientenpopulation. Somit stellt die in Homburg archivierte Patientenpopulation eine weltweit einmalige Biobank von Patienten mit aggressivem Lymphom dar und eignet sich aufgrund der gleichzeitig zugänglichen klinischen Daten hervorragend für unsere Zielsetzung.

Eine Korrelation der erhobenen Daten erfolgte an DNA-Proben von gesunden Blutspendern ($n = 101$) aus dem „Institut für Transfusion-Medizin“ (Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar, Deutschland).

2.5.2. Genehmigungen

Die Studie wurde genehmigt von der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes. Nach den Regeln der Erklärung von Helsinki lagen schriftliche Einverständniserklärungen der an der Studie teilnehmenden Patienten vor. Genetische Experimente wurden mit der Genehmigung entsprechend der Gesetze der Landesregierung des Saarlandes durchgeführt. Die RICOVER-60 Studie der Deutschen Studiengruppe für hochmaligne Non-Hodgkin-Lymphom ist registriert im National Cancer Institute website, no. CT0052936 und als EU-20243. Aktenzeichen gentechnische Untersuchungen: E/3-C525.2.86-247/05-Jo, Saarländisches Ministerium für Umwelt.

2.5.3. Patientenpopulation

In die RICOVER-60 Therapiestudie wurden insgesamt 1222 Patienten randomisiert. Alle in der Studie teilnehmenden Patienten hatten ein unbehandeltes CD20-positives diffuses großzelliges B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom (DLBCL) nach den Kriterien der

WHO [113]. Alle an der Studie teilnehmenden Patienten hatten zum Studieneinschluss die unter Einschlusskriterien und Ausschlusskriterien genannten Bedingungen zu erfüllen.

Einschlusskriterien:

- CD20+ B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom
Histologie: Diagnose eines aggressiven Non-Hodgkin-Lymphoms, gesichert durch eine Exzisionsbiopsie eines Lymphknotens oder durch eine ausreichend große Biopsie eines extranodalen Befalls, wenn kein Lymphknotenbefall vorliegt.
- Alter: 61 - 80 Jahre
- alle Risikogruppen (altersadjustierter IPI: 0 - 3) [110]
- Allgemeinzustand: ECOG: 0 - 2 [84], Karnofsky: 60 - 100 % [57]
(Die Bestimmung des Allgemeinzustandes des Patienten erfolgte zum Zeitpunkt der Randomisation, also auch nach Beginn der Vorphase-Therapie, da diese erfahrungsgemäß zu einer Verbesserung des Allgemeinzustandes führt.)
- Vorliegen der Teilnahmeerklärung des Zentrums
- Vorliegen der schriftlichen Einverständniserklärung des Patienten

Ausschlusskriterien:

- schon begonnene Therapie des Lymphoms (außer Vorphase-Therapie)
- schwere Begleiterkrankung bzw. eingeschränkte Organfunktion, insbesondere:
 - Herz: Angina pectoris (CCS > 2) [15], Herzinsuffizienz (NYHA > 2) [11] bzw. in der Echokardiographie/nuklearmedizinische Untersuchung: EF (Ejektionsfraktion) < 50 % bzw. FS (fraktionelle Faserverkürzung) < 25 %
- Niere: Kreatinin > 2-fach des oberen Normwertes
- Leber: Bilirubin > 2-fach des oberen Normwertes
- Lunge: abnorme Blutgase; in diesem Falle lag ein Ausschlussgrund vor, wenn die daraufhin veranlasste Lungenfunktion einen FeV1 < 50 % des Sollwertes bzw. eine Diffusionskapazität < 50 % des Sollwertes zeigt
- nicht einstellbarer Diabetes mellitus
- Thrombozyten < 100.000/μl, Leukozyten < 2.500/μl
- Knochenmarkbefall > 25 %
- bekannte Überempfindlichkeit gegen eingesetzte Medikamente
- bekannte HIV-Positivität
- aktive Hepatitis Infektion
- Verdacht auf reduzierte Compliance des Patienten
- simultane Teilnahme an anderen Therapiestudien
- Chemo- oder Strahlentherapie bei früherer Erkrankung
- simultan vorliegende andere Tumorerkrankung
- Nichtvorliegen der Einschlusskriterien
- Patienten, deren Lymphom eindeutig auf das ZNS beschränkt ist oder vom Gastrointestinaltrakt ausgeht, waren nicht Gegenstand der RICOVER-Studie.

2.5.4. Studiendesign/Therapiearme

In diesem 2x2-armigen offenen multizentrischen prospektiven randomisierten Studiendesign einer Phase-III-Studie (Therapieoptimierungsversuch) wurden die Patienten in einen der 4 Therapiearme randomisiert, entweder: 6 Zyklen mit CHOP-14, 8 Zyklen von CHOP-14, 6 Zyklen CHOP-14 plus 8 Applikationen von Rituximab alle 2 Wochen oder 8 Zyklen von CHOP-14 plus 8 Applikationen von Rituximab alle 2 Wochen.

Nach Abschluss der Randomisierung folgte eine einarmige Beobachtungsstudie.

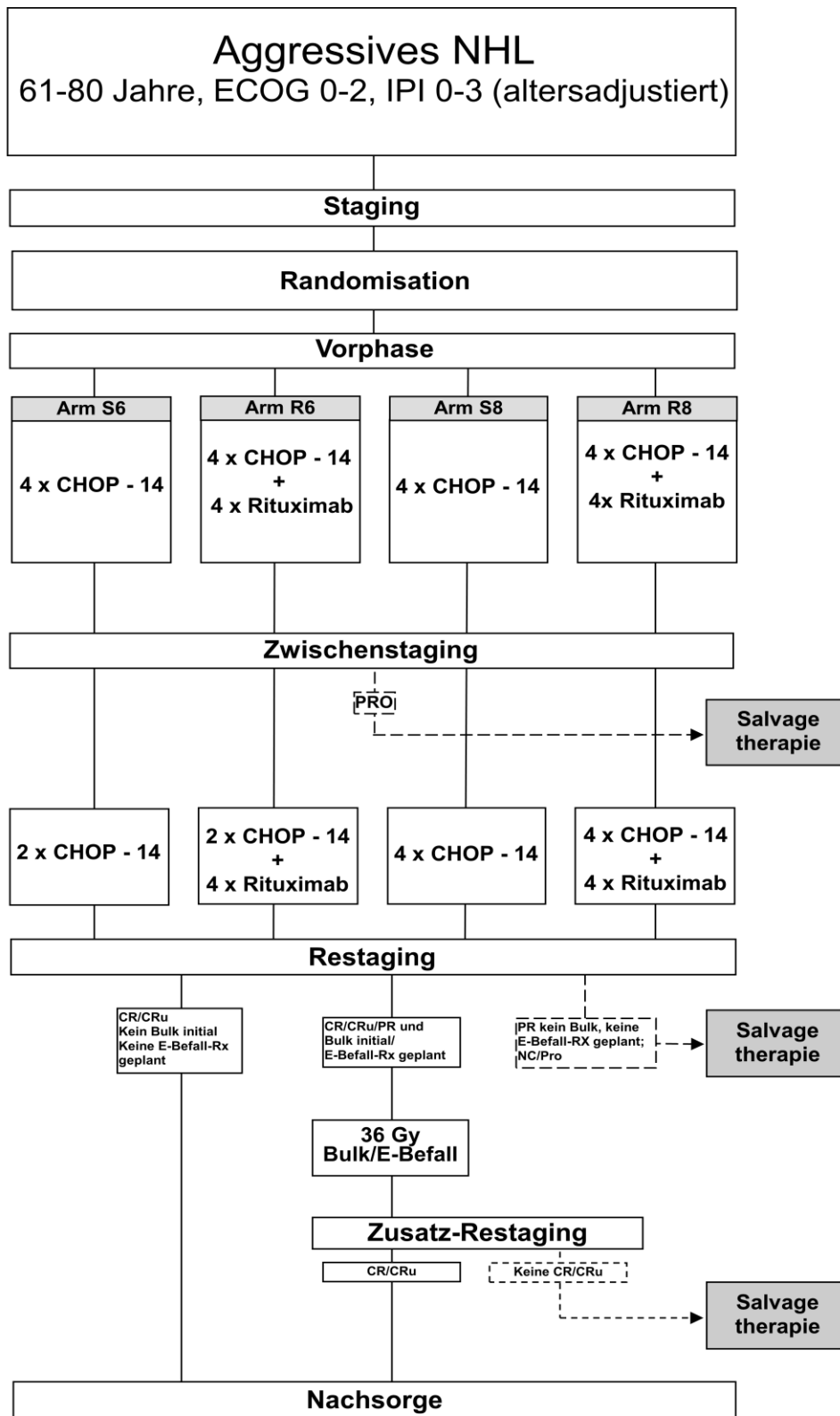


Abbildung 8: Flussdiagramm der Therapiestudie RICOVER-60. Ablaufschema der Therapiestudie RICOVER-60 mit Randomisation des Patienten bei Studieneinschluß in einen der 4 Therapiearme (6x CHOP-14, 6x CHOP-14 mit 8x Rituximab, 8x CHOP-14 und 8x CHOP-14 mit 8x Rituximab). Nach 4x Zyklen CHOP-Chemotherapie erfolgte ein Zwischenstaging, bei Therapieansprechen erfolgte die Kompletierung der Therapie entsprechend dem bei der Randomisation zugeteilten Therapiearm. Ein Restaging erfolgte nach Beendigung der Therapie.

2.5.5. Immun-Chemotherapie

2.5.5.1. Vorphase-Therapie

Alle Patienten erhielten vor Beginn eine circa einwöchige Vorphase bestehend aus Prednison und Vincristin. Zusammensetzung der Vorphase-Chemotherapie siehe Tabelle 5 (Seite 39). Die Vorphase ist ein wichtiges Element um die Toxizität bei älteren Patienten zu verringern. Die DSHNHL führte die Vorphase ein, nachdem sie beobachtet hatte, dass ältere Patienten einen ausgeprägten First-Cycle-Effekt entwickelten, sowohl bei CHOP-14-Chemotherapie als auch bei CHOP-21-Chemotherapie. Als bedrohliche und ausgeprägte Wirkung des First-Cycle-Effekt zählen: tiefer Leukozyten-Nadir, lange Dauer der Neutropenie und hohe Raten für therapieassoziierten Tod. Durch Einführung dieser Vorphase wird ein Tumorlyse-Syndrom bei großen Tumormassen verhindert, der Allgemeinzustand der Patienten verbessert und die Toxizität der Chemotherapie des ersten Zyklus verringert [49,69]. Eine Vorphase-Therapie war daher obligat. Eine ausreichende Flüssigkeitszufuhr war zu gewährleisten.

Tabelle 5: Vorphase-Therapie

Medikament	Dosis	Applikationsform	Applikationstag
Vincristin	1 mg	i.v.	Tag* -6 (einmalige Gabe!)
Prednison	100 mg	p.o.	Tag* -6 bis Tag 0

*Tag 1 = 1. Therapietag der CHOP-Chemotherapie.

2.5.5.2. CHOP-Chemotherapie

Die Zusammensetzung der CHOP-Chemotherapie erfolgt analog zu McKelvey et al. [72]. Die Dosierung von CHOP-14 ist in allen Armen gleich, lediglich die Gesamtanzahl der Zyklen waren verschieden (siehe Flussdiagramm der Studie, Abbildung 8, Seite 38) und wurden durch Randomisation bei Studieneinschluss für den jeweiligen Patienten festgelegt. Es erfolgte eine Wiederholung mit dem nächsten Zyklus CHOP-14 an Tag 15. Die Zusammensetzung der CHOP-Chemotherapie sowie Applikationsform, Applikationstag und Wiederholungsfrequenz ist in Tabelle 6 (Seite 40) dargestellt.

Tabelle 6: CHOP-Chemotherapie

Wirkstoff	Dosis	Applikationsform	Tag
Cyclophosphamid	750 mg/m ²	i.v.	1
Doxorubicin	50 mg/m ²	i.v.	1
Vincristin	2 mg (absolut)	i.v.	1
Prednison	100 mg (absolut)	p.o.	1 - 5

Die Medikamente Cyclophosphamid, Doxorubicin und Vincristin werden am Tag 1 eines jeden Zyklus der CHOP-Chemotherapie intravenös appliziert. Die Applikation des Cortison (Prednison) erfolgt oral an den Tagen 1 - 5. Eine Wiederholung des Zyklus erfolgt bei CHOP-21 am Tag 22 [72], eine Wiederholung bei CHOP-14 erfolgt am Tag 15 [91].

Voraussetzungen für die Fortsetzung der Therapie waren:

1. Durchschreiten des Nadirs der Leukozyten und Thrombozyten
2. Leukozytenzahl > 2.500/µl an Tag 15 nach Absetzen von G-CSF
3. Thrombozytenzahl > 80.000/µl an Tag 15
4. keine aktive Infektion
5. keine schwerwiegende Organ- oder sonstige Toxizität

Um die Voraussetzungen für den Start des nächsten Therapiezyklus am Tag 15 sicherzustellen, haben die Patienten von Tag 4 bis Tag 13 unabhängig von der Leukozytenzahl den Granulozyten-Wachstumsfaktor (G-CSF) erhalten, danach Absetzen von G-CSF. Bei weiterbestehender Leukozytopenie sollte die G-CSF Applikation bis zum Leukozytenanstieg > 2.500/µl fortgesetzt werden. Bei Nichterreichen der für die Fortsetzung erforderlichen Leukozytenzahl sollte G-CSF weiterhin gegeben werden (G-CSF: 1 Ampulle Granocyte 34, täglich einmal s.c.).

Bei Nichterreichen der Grenzwerte von Leukozyten und Thrombozyten am Tag 15 wurde der Beginn des nächsten Zyklus zunächst um 3 Tage, falls die Grenzwerte dann immer noch nicht erreicht wurden, um weitere 3 - 4 Tage verschoben. Die G-CSF-Gabe sollte in diesen Fällen fortgesetzt werden. Sollte mehr als 1 Woche Verzögerung nötig gewesen sein, so erfolgte eine Dosisreduktion der CHOP-Chemotherapie beim nächsten Zyklus entsprechend der Vorgaben in Tabelle 7 (Seite 41).

Wurden die Grenzwerte (Leukozyten > 2.500/µl und Thrombozyten > 80.000/µl) auch nach einem Therapieaufschub um 1 Woche am Tag 22 nach CHOP-14 nicht erreicht, wurde unter 3-tägigen Blutbildkontrollen abgewartet, bis diese Werte erreicht wurden.

Der nächste Zyklus erfolgte dann in reduzierter Dosis entsprechend der Vorgaben in Tabelle 7 (Seite 41).

Tabelle 7: Dosisanpassung bei Therapieverzögerung in der RICOVER-60 Studie

Therapieverzögerung	Dosisanpassung
1. Therapieverzögerung 0 - 7 Tage:	Keine Dosisreduktion
2. Therapieverzögerung 8 - 14 Tage:	Cyclophosphamid 75 %
	Doxorubicin 75 %
	Vincristin 100 %
	Prednison 100 %
	Rituximab 100 %
3. Therapieverzögerung > 14 Tage:	Cyclophosphamid 50 %
	Doxorubicin 50 %
	Vincristin 100 %
	Prednison 100 %
	Rituximab 100 %

Falls mehr als 1 Woche Verzögerung bei der Fortführung der Chemotherapie aufgrund hämatologischer Toxizität notwendig war, so wurde der nächste Zyklus der CHOP-Chemotherapie mit Cyclophosphamid 75% und Doxorubicin 75% dosisreduziert appliziert. Wurden die Grenzwerte für die Hämatopoese (Leukozyten > 2.500/ μ l und Thrombozyten > 80.000/ μ l) auch nach einem Therapieaufschub am Tag 22 nach CHOP-14 weiterhin nicht erreicht, erfolgte die Applikation des nächsten Zyklus Chemotherapie erst nach Erreichen der vorgegebenen Zielwerte mit reduzierter Dosis (Cyclophosphamid 50% und Doxorubicin 50%).

2.5.5.3. Rituximab

Die Patienten die in den Therapiearm mit Rituximab randomisiert wurden, erhielten Rituximab alle 2 Wochen unabhängig von der CHOP-Zyklus-Zahl insgesamt 8-mal. Rituximab wurde in einer Dosis von 375 mg/m² Körperoberfläche [67,68] intravenös jeweils 48 - 2 h vor Beginn der CHOP-Chemotherapie-Applikation infundiert.

2.5.6. Probenakquirierung

Die Proben für die Messungen stammten aus dem Patientenpool der prospektiven RICOVER-60 Studie der Deutschen Studiengruppe für hochmaligne Non-Hodgkin-Lymphom (DSHNHL). Im Rahmen dieser Therapiestudie erfolgte nach schriftlichem Einverständnis der Patienten mit Erstdiagnose eines diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom die Probengewinnung zu Forschungszwecken.

2.5.7. Probenasservierung

Die insgesamt 512 Vollblutproben der Patienten, die in der RICOVER-60 Studie mit einem diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom eingeschlossen und randomisiert wurden, wurden nach Probeneingang im Studienzentrum nach Trennung von Serum und Zellen auf mehrere Eppendorfgefäße aufgeteilt und in Heraeus HeraFreeze HFU 686 Basic (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bei -80 °C tiefgefroren.

2.6. Messungen

2.6.1. Materialien und Geräte

Die zur Durchführung der in der Arbeit beschriebenen Messungen benötigten Geräte sind in Tabelle 8 (Seite 42) und die Verbrauchsmaterialien in Tabelle 9 (Seite 43) aufgezählt.

Tabelle 8: Laborgeräte und Software

Geräte/Software	Hersteller
- Aqua Dest. Anlage	Merck Millipore, Billerica, USA
- Kühlschrank	Liebherr, Liebherr-Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen, Deutschland
- Labortiefkühlschrank Heraeus HeraFreeze HFU 686 Basic	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
- Multishaker MS1	IKA® Werke GmbH & Co.KG, Staufen, Deutschland
- Real-Time-PCR StepOnePlus™, - Software: Stepone v2.0 für Windows XP	Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA
- Spectrophotometer NanoDrop ND-1000 - Software: ND-1000 v3.7.1 für Windows XP	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
- Statistik-Software R (Version 2.9)	The R Foundation for Statistical Computing, GNI General Public License.
- Wasserbad GFL Typ1002	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
- Pipetten - Zentrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien

Material	Firma
<ul style="list-style-type: none"> - TaqMan® SNP Genotyping Assays (FcyRIIA 131 H/R) Assay ID: c__9077561_20 NCBI (Build 37.4): rs1801274 Lokalisation: Chr.1:161479745 (TaqMan® MGB Sonden, FAM™ und VIC® dye-labeled) Kontext: AATGGAAAATCCCAGAAATTCT CCC[A/G]TTTGGATCCCACCTTCTCCATCCCA - TaqMan® SNP Genotyping Assays (FcyRIIIA 158 V/F) Assay ID: c__25815666_10 NCBI (Build 37.4): rs396991 Lokalisation: Chr.1:161514542 (TaqMan® MGB Sonden, FAM™ and VIC® dye-labeled) Kontext: TCTGAAGACACATTTTTACTCC CAA[C/A]AAGCCCCCTGCAGAAGTAGGAGCCG - TaqMan® Universal PCR Master Mix (P/N 4304437) - TaqMan® SNP Genotyping Assay (20x) (P/N 4362691) - MicroAmp® Optical 96-Well Platte (N801-0560) - Klebefolie (P/N 4311971) 	Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA
- Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht, Deutschland
- Eppendorf Safe-Lock Tubes (Mikrozentrifugenröhrchen)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Ethanol (98 %)	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, Deutschland
- QiAamp DNA Blood Mini Kit (Cat.No: 51106)	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

2.6.2. Isolierung der DNA

Nach Identifizierung der Patientenproben erfolgte nach standardisierten Methoden mit Hilfe des DNA-Extraktionskits (QiAamp DNA Blood Mini Kit) für genomische DNA der Firma Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland) die Extraktion von DNA aus Vollblut. Vor Beginn der DNA-Extraktion wurden zur weiteren Probenaufbereitung die EDTA-Vollblutproben der Patienten und die der gesunden Spender bei Raumtemperatur aufgetaut.

Zur Vorbereitung der Reagenzien aus dem DNA-Extraktionsset wurde der im Set enthaltene Puffer AL durch Schütteln gut gemischt. Zudem wurden die als Konzentrat im Set enthaltenen Puffer AW1 und AW2 mit einem separat von der Firma Sigma-Aldrich (Hamburg, Deutschland) erhältlichen 98%igen Ethanol auf das erforderliche Volumen verdünnt. Die gefriergetrocknete Protease wurde mit dem im Set enthaltenen Protease-Lösungsmittel wie vorgeschrieben aufgelöst und in Lösung gebracht.

Nach diesen Vorbereitungsschritten wurden 200 µl der Protease in einem 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen vorgelegt, im Anschluss wurden 200 µl der homogenisierten Probe hinzupipettiert. Nach der Pipettierung von 200 µl Puffer AL erfolgte eine homogene Durchmischung der Reagenzien in dem Mikrozentrifugenröhrchen mittels Pulsation auf dem Multishaker für 15 Sekunden. Im Anschluss an diesen Schritt erfolgte zur Lyse die Inkubation der Reagenzien im Wasserbad für 10 Minuten bei 56 °C.

Im Anschluss daran wurden 200 µl des 98%igen Ethanol in das Mikrozentrifugenröhrchen pipettiert, danach auf dem Multishaker gleichmäßig vermischt. Mittels einer kurzen Zentrifugation (16.000 g, 2 Sekunden) wurden Tropfen am Reagenzgefäßdeckel nach unten zentrifugiert, damit die gesamte Reagenz im nachfolgenden Schritt auf die Mini-Säule aus dem Set, welche in einem weiteren neuen Mikrozentrifugenröhrchen positioniert war, übertragen werden konnte. Diese Mini-Zentrifugen-Säule wurde verschlossen und mit 6.000 g für 1 Minute zentrifugiert. Der Bodensatz im Mikrozentrifugenröhrchen wurde verworfen und die Mini-Säule in ein neues sauberes Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Im nun folgenden Schritt wurden 500 µl des Puffers AW1 auf die Mini-Säule pipettiert. Es erfolgte abermals ein Zentrifugierschritt (6.000 g, 1 Minute). Der Bodensatz wurde abermals verworfen und die Mini-Säule in einem neuen Mikrozentrifugenröhrchen

positioniert. Danach wurden 500 µl des Puffer AW2 auf die Mini-Säule pipettiert. Im Anschluss daran erfolgte eine Zentrifugation der Mikrozentrifugenröhrchen mit Mini-Säule bei 18.000 g für 3 Minuten. Der Bodensatz wurde abermals verworfen. Um mögliche Übertragungen des Puffer AW2 durch die Minisäule für die nächsten Reaktionsschritte zu minimieren, wurde die Mini-Säule nach der Zentrifugation in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen überführt und kurz (1 Minute bei 18.000 g) zentrifugiert.

Im nachfolgenden Reaktionsschritt wurde die rückstandsfreie Mini-Säule auf ein neues sauberes Mikrozentrifugenröhrchen platziert. Auf die Mini-Säule wurden dann 200 µl AE-Puffer als Eluierungsschritt pipettiert und das Ganze für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um danach bei 6.000 g für 1 Minute zentrifugiert zu werden. Bei dem Filtrat der letzten Zentrifugation handelt es sich um die gelöste DNA.

2.6.3. Probenverdünnung

Nach Aufbereitung des Patientenmaterials und Herstellung der jeweiligen DNA erfolgte eine Konzentrationsbestimmung der DNA mittels Photometer. Hierzu erfolgte am NanoDrop Spektrophotometer (ND-1000) der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) an einem 1 µl Tropfen der gelösten DNA die Konzentrationsbestimmung. Die Messergebnisse des Spektrophotometer und die Ablesung der dazugehörigen DNA-Konzentration erfolgten direkt in der Software ND-1000 v3.7.1 für Windows XP.

Nach Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte bei hoher Konzentration der DNA (DNA-Zielkonzentration: 10 - 20 ng/µl) eine Verdünnung der DNA-Probe mit Puffer AE auf die gewünschte Ziel-Konzentration. Die erstellten Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C im Kühlschrank (Liebherr, Deutschland) aufbewahrt.

2.6.4. Real-Time PCR

Die Bestimmung der Einzelnukleotid-Polymorphismen der Fcγ-Rezeptoren (FcγRIIA 131 H/R + FcγRIIA 158 V/F) erfolgten mit einem Genotypisierungs-Assay (Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA). Bei dem Genotypisierungs-Assay erfolgt in der Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (real-time PCR) die spezifische komplementäre Bindung (Annealing) eines Fragmentes an Sonden die einem der

Allele entsprechen [65]. Durch die Verwendung von 2 verschiedenen fluoreszierenden Sonden in jedem Reaktionsgefäß ist die Genotypisierung eines SNP möglich [29].

Mit Hilfe des Echtzeit-PCR Plattenmessgerät, dem StepOnePlus™ (Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA) können zu verschiedenen Zeitpunkten während der Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) Fluoreszenzdaten der Reaktionsgefäße gemessen werden. Es handelt sich hierbei um einen PCR-Cycler sowie um ein optisches Detektionsmodul, durch welches die einzelnen Fluoreszenzwerte der jeweiligen Reaktionsgefäße gemessen werden können. Im Besonderen ist es bei dem StepOnePlus™ durch die Bündelung von bis zu 96 Reaktionsgefäßen auf einer Platte (96-well plate) möglich, mehrere PCR-Ansätze inkl. Kontrollen gleichzeitig zu amplifizieren. Die Messung der Fluoreszenz bei diesem Genotypisierungs-Assay erfolgt am Ende der PCR [101]. Das erhobene Messergebnis ist die korrigierte Intensität des Signalfarbstoff (Rn). Die Auswertung der Farbsignale erfolgt mittels der Computersoftware des StepOnePlus™.

In jedem TaqMan® SNP Genotypisierungs-Assay sind zwei Sequenz-spezifische Primer (vorwärts und rückwärts) der zu amplifizierenden Zielstruktur enthalten. Im Weiteren sind Bestandteil des Reaktionsansatzes zwei Allel-spezifische TaqMan® MGB-stabilisierte Sonden, welche die gewünschten Einzelnukleotid-Polymorphismen detektieren [55].

Afonia et al. [1] zeigten, dass das Tripeptid 1,2-dihydro-(3H)-pyrrolo[3,2-e]indole-7-carboxylate (CDPI3) in der engeren Windung der DNA-Doppelhelix, der sogenannten minor groove, mit hoher Affinität bindet. Wenn dieser minor groove binder (MGB) an seinem 5'-Ende mit Oligodesoxynukleotiden konjugiert ist, so bildet dieses Konjugat ungewöhnlich stabile Hybriden mit der komplementären DNA, in welcher die gebundene CDPI3-Gruppe sich in der „Minor Groove“ befindet. Durch die hohe Bindungsaffinität können Konjugate mit 8 - 10 Nukleotiden für die Amplifizierung von DNA mit guter Spezifität und Effizienz genutzt werden. Afonia et al. demonstrierten, dass diese Konjugate als PCR-Primer verwendet werden können. Zudem konnte durch Kutuyavin et al. [60] bei Analysen von Schmelztemperaturen nachgewiesen werden, dass das konjugierte CDPI3 die Stabilität verbessert. Basierend auf den Forschungen [1,60] ermöglichen MGB Sonden somit eine höhere Differenz der Schmelztemperatur (T_m) und gleichzeitig kürzere komplementäre Sonden.

Unterschiede in der Schmelztemperatur zwischen komplementären und nicht-komplementären MGB Sonden verbessern die Effizienz und bewirken dadurch stabilere Ergebnisse in dem Genotypisierungs-Assay. Die verringerte Bindungsaffinität bei Fehlpaarungen der kurzen Sonden bewirkt eine verbesserte Selektionierung durch die AmpliTaq® Gold DNA Polymerase.

Die Allel-spezifischen TaqMan® minor groove binder (MGB) Sonden setzen sich zusammen aus einem spezifischen Oligo-Nukleotid mit einem Fluoreszenz emittierenden Reporter-Signalfarbstoff VIC® oder FAM™ an dem 5'-Ende der Sonde. Zudem tragen die TaqMan® MGB-stabilisierten Sonden an dem 3'-Ende des Oligonukleotid einen nicht-fluoreszierenden Unterdrückerfarbstoff (Quencher). Bei einer intakten Oligonukleotid-Sonde wird durch die Nachbarschaft des Quencher (Unterdrückerfarbstoff) zum Reporter-Fluoreszenzfarbstoff der Sonde die Emission des Reportersignals unterdrückt [41,61]. Während der PCR bindet jede TaqMan® MGB Sonde beim Auskühlen spezifisch an ihrer komplementären Sequenz. Die VIC®-markierte Sonde bindet hierbei spezifisch an die Nukleotidsequenz von Allel-1, während die FAM™-markierte Sonde spezifisch an die zweite Nukleotid-Zielsequenz bindet. Bei der Neustrangsynthese im Rahmen der PCR wird dann die hybridisierte TaqMan® MGB Sonde in kleine Fragmente durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase zerschnitten. Durch die Taq-Polymerase kommt es somit zu einer Trennung des Reporter-Farbstoffes von dem Quencher, wodurch es zu einer Zunahme der Fluoreszenz des Reportersignal kommt.

Das Fluoreszenz-Signal, welches durch die PCR Amplifikation freigesetzt wird, zeigt an, welches Allel in der Probe vorliegt.

Zur Veranschaulichung ist in der Abbildung 9 (Seite 48) das TaqMan® Genotypisierungs-Assay dargestellt.

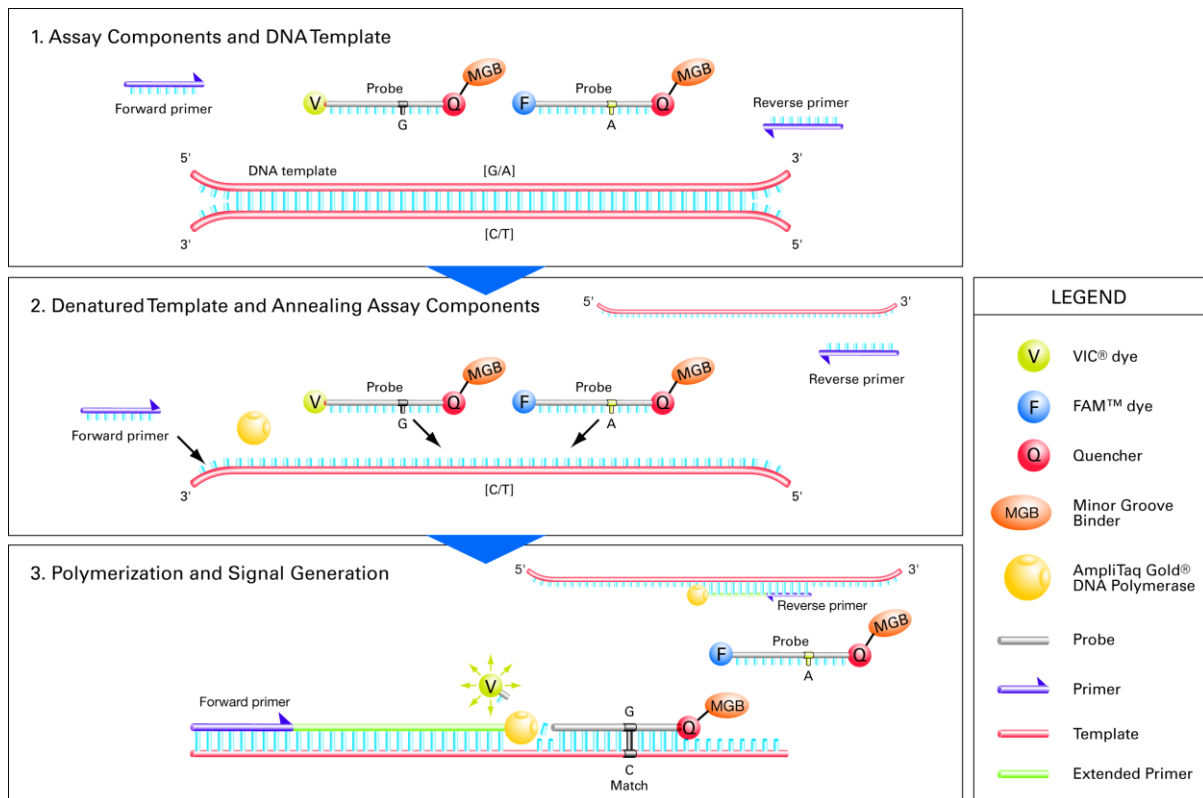


Abbildung 9: Schema der TaqMan® real-time PCR. In jedem Reaktionsgefäß befinden sich zwei Sonden. Eine Sonde mit dem VIC®-Fluoreszenzfarbstoff und eine Sonde mit dem FAM™-Reportersignalstoff. Während der Echtzeit-PCR bindet beim Auskühlen jede TaqMan® MGB Sonde spezifisch an ihrer komplementären Nukleotid-Sequenz, zwischen den Vorwärts- und Rückwärts-Primer. Bei einer ungeschnittenen TaqMan® MGB Sonde wird durch die Nachbarschaft des Quencher (Unterdrückerfarbstoff) zum Reporterfluoreszenzfarbstoff die Emission des Reportersignal unterdrückt [41,61]. Bei der Neustrangsynthese wird durch die Taq-Polymerase und ihre 5'-3'-Exonukleaseaktivität die hybridisierte TaqMan® MGB Sonde in kleine Fragmente zerschnitten. Hierdurch wird der Reporterfarbstoff vom Quencher getrennt und es kommt zu einer Emission der Fluoreszenz. Das durch die Taq-Polymerase freigesetzte Fluoreszenzsignal zeigt an, welches Allel in der Probe vorliegt. Ein alleinige Zunahme des VIC®-Fluoreszenzsignal bedeutet das Vorliegen eines homozygoten Allele 1 in der Probe, die alleinige Zunahme des FAM™-Fluoreszenzsignal signalisiert eine homozygotes Allele 2 der Probe. Kommt es zu einer Zunahme beider Fluoreszenzsignale (VIC® und FAM™), so ist die betreffende Probe heterozygot in Allel 1 und Allel 2. Quelle: TaqMan® SNP Genotyping Assay Protocol, (Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA)

2.6.5. PCR-Reaktionsbedingungen

In das jeweilige Reaktionsgefäß der 96-well Messplatte wurde ein PCR-Reaktionsansatz von insgesamt 5 µl Volumen pipettiert. Der PCR-Reaktionsansatz bestand aus 2,5 µl des TaqMan® Universal PCR Master Mix, hierzu wurden 0,25 µl TaqMan® Genotyping Assay Mix pipettiert, schließlich noch 2,25 µl der genomischen Proben-DNA.

Die Durchführungen der PCR und die Messungen der entstandenen Fluoreszenz erfolgten in dem Real-Time PCR-System StepOnePlus™ (Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA).

Die Reaktionsbedingungen für die PCR wurden entsprechend dem Protokoll des Genotypisierungs-Assay eingehalten. Hierbei erfolgte initial für 10 min bei einer Temperatur von 95 °C die Denaturierung der genomischen DNA. Danach erfolgte eine rasche Abkühlung der PCR-Reaktionsgefäße auf 60 °C für das Aushärten; die Anlagerung der Primer an den komplementären DNA-Einzelstrang und die Synthese des weiteren DNA-Stranges mit Hybridisierung der jeweiligen TaqMan® MGB Sonden spezifisch an ihre komplementäre Nukleotid-Sequenz. Nach diesem Schritt wurde zur Denaturierung der amplifizierten DNA-Doppelstränge erneut eine Temperaturerhöhung auf 92 °C für 15 Sekunden durchgeführt. Nach diesem ersten Zyklus erfolgten in dem StepOnePlus™ insgesamt 40 Zyklen zur Amplifizierung der DNA mit den in dem Messansatz zur Verfügung gestellten Sonden.

2.6.6. Auswertung der Messungen

Die Messung an dem StepOnePlus™ erfolgt in drei Phasen: 1. der Exzitationsphase, 2. der Emissionsphase und 3. der Datenerfassungsphase. In der Exzitationsphase wird durch Beleuchtung in jedem Reaktionsgefäß Fluoreszenz angeregt. In der Emissionsphase wird mit dem Detektionssystem die emittierte Fluoreszenz in den Reaktionsgefäßen gemessen. In der Datenerfassung wird die gemessene Fluoreszenz über einem definierten Zeitpunkt verglichen und ausgewertet.

Bei der Messung der Fluoreszenz wird zur Korrektur das passive Hintergrundsignal in den Reaktionsgefäßen herausgerechnet. Bei der Auswertung, der Allel-Differenzierung, trägt die StepOnePlus™ - Software für jedes Reaktionsgefäß in einem Allel-Differenzierungsdiagramm die korrigierte Intensität des Reportersignals (Rn) ein. Durch diesen Schritt wird die Reportersignalstoff-Intensität der Allel-spezifischen Sonden graphisch dargestellt. Ein Software-Algorithmus wiederum gruppiert die in diesem Diagramm eingetragenen Messdaten und benennt den Genotyp einer Gruppe und damit den Genotyp der beinhaltenden Proben anhand der Position in dem Allel-Differenzierungsdiagramm. Es erfolgt anhand der im Rahmen der Echtzeit-PCR kumulierten Reportersignale der Proben eine Differenzierung der Allele voneinander. Ein Software-Algorithmus ermittelt den Genotyp der Probe aus der Position der Probe in diesem Diagramm. Zur Veranschaulichung dieser Allel-Differenzierung des StepOnePlus™ ist in der Abbildung 10 (Seite 50) exemplarisch die Darstellung der Allele anhand der aufgetragenen Messungen graphisch dargestellt.

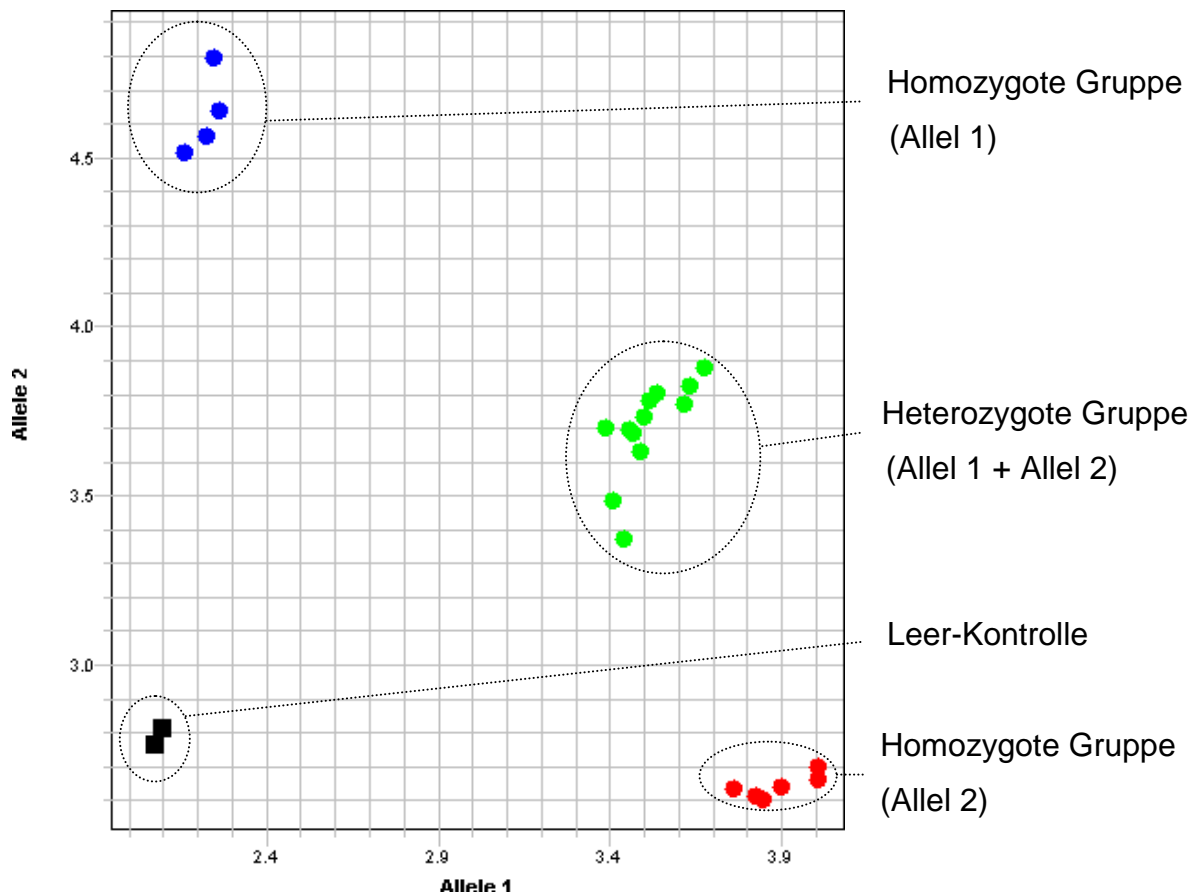


Abbildung 10: Plot der Allel Darstellung. Das Fluoreszenzsignal, welches durch die PCR Amplifikation freigesetzt wird, zeigt an, welches Allel in der Probe vorliegt. Nach Ablauf der PCR erfolgt die Endpunktmessung simultan für alle Proben der 96-well Platte. Eine deutliche Zunahme des VIC®-Fluoreszenzsignal bedeutet für die Probe das Vorliegen eines homozyoten Allele 1, eine Zunahme alleine des FAM™-Fluoreszenzsignal signalisiert für die Probe ein homozygoten Allele 2. Kommt es zu einer Zunahme beider Fluoreszenzsignale (VIC® und FAM™), so ist die betreffende Probe heterozygot in Allele 1 + Allele 2. Genotypbestimmungen der Proben erfolgen durch Eintragen des Reportersignalfarbstoffes für die jeweilige Probe in dem Plot zur Allel-Darstellung. Durch Eintragen aller Messungen in das Diagramm werden von einem Software-Algorithmus Gruppen (homozygot für Allele 1, homozygot für Allele 2, heterozygot für Allele 1 + Allele 2 oder Leerkontrolle) gebildet. Der Algorithmus in der Analyse-Software benennt dann den Genotyp der Gruppen und somit den jeweiligen Genotyp der in der Gruppe enthaltenen Probe. Die Gruppierung der Messpunkte in dem Plot zur Allel-Darstellung kann durch Unterschiede in der Intensität der Reportersignalfluoreszenz nach der PCR-Amplifikation variieren. Die Gruppierung der Messpunkte kann entlang der X-Achse (Allele 1), der Y-Achse (Allele 2) und in der Diagonale (Allele 1 + Allele 2) sich verschieben. Quelle: TaqMan® Genotyping Assay Reference Guide (Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA)

2.6.7. Statistische Auswertung

Die Allel-Frequenz der Patientenproben und der Kontrollen wurden mit dem exakten Fisher-Test (Chi-Quadrat-Test, Fisher-Yates-Test) verglichen. Ansprechen wurde definiert als die Proportion von Patienten mit kompletter Remission (CR) oder unbestätigter kompletter Remission nach Studientherapie (CRu) für alle Patienten die zur Beurteilung eines Ansprechens herangezogen werden konnten. Ansprechen wurde ermittelt mittels dem exakten Fisher-Test und dem Armitage Trend Test (Trend-Test nach Cochran-Armitage) [5]. Ereignisfreies Überleben (EFS) wurde

definiert als die Zeit von Beginn der Therapie bis zum Fortschreiten der Krankheit, Wiederauftreten (Rezidiv), Tod oder der Einleitung einer ergänzenden Therapie (außerhalb des Studien-Protokolls) oder Salvage-Therapie. Progressionsfreies Überleben (PFS) wurde definiert als die Zeit von Beginn der Therapie bis zum Fortschreiten der Krankheit, Rezidiv oder Tod. Gesamtüberleben (OS) wurde definiert als Zeit von Beginn der Therapie bis zum Tod aus jeglichen Gründen. EFS, PFS und OS wurden mittels Kaplan-Meier-Methoden geschätzt und unter Anwendung mit dem Logrank-Test verglichen. Für den Fall, dass kein Ereignis der Endpunkte von EFS, PFS und OS eintritt, wurden Kaplan-Meier Schätzungen bei 3 Jahren (Konfidenzintervall: 95 %) berechnet. Multivariate Analysen wurden unter Zuhilfenahme des proportionalen Hazardmodell (Cox proportional-hazard Model) durchgeführt, um die Hazard Ratio für ein Ereignis abzuschätzen. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als signifikant bezeichnet für p-Werte von 0,05 (2-sided).

Statistische Analysen wurden durchgeführt mit der Software R (Version 2.9) durch das Institut für medizinische Informatik, Statistik und Epidemiologie (IMISE) der Universität Leipzig [52].

3. Ergebnisse

3.1. Ergebnisse der RICOVER-60 Therapiestudie

Von insgesamt 1222 Patienten mit einem diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom der RICOVER-60 Studie der Deutschen Studiengruppe für hochmaligne Non-Hodgkin-Lymphome waren 512 DNA Proben verfügbar. Die Ergebnisse der RICOVER-60-Studie wurden bereits zuvor veröffentlicht [91].

In einem 2x2 randomisierten faktoriellen Studiendesign wurden die Patienten entweder in den Therapie-Arm mit 6 Zyklen CHOP-14, den Therapie-Arm mit 8 Zyklen von CHOP-14, den Arm mit 6 Zyklen CHOP-14 plus 8 Applikationen von Rituximab alle 2 Wochen oder den Therapie-Arm mit 8 Zyklen CHOP-14 plus 8 Applikationen von Rituximab alle 2 Wochen randomisiert. Diese 2 Therapie-Arme mit Rituximab-Applikation hatten eine signifikant verbesserte EFS und PFS im Vergleich mit dem Therapie-Arm mit 6 Zyklen CHOP-14 Chemotherapie ($p = 0,001$). Wobei jedoch nur im Therapie-Arm mit 6 Zyklen CHOP-14 plus 8 Applikationen von Rituximab, nicht jedoch im Therapie-Arm mit 8 Zyklen CHOP-14 plus 8 Applikationen

von Rituximab, sich eine signifikante Verbesserung des OS im Vergleich mit CHOP-14 Therapie zeigte ($p = 0,018$ beziehungsweise $p = 0,260$).

Die Protokolltreue war hervorragend: der Median der relativen Dosis für die myelosuppressive Therapie für die 6 Zyklen Chemotherapie war 98 % oder höher; [Range: 1 - 118] und für die Regime mit 8 Zyklen Chemotherapie 95 % oder höher; [Range: 7 - 111]. Der Median der Therapieabstände in allen Therapie-Armen und bei allen Zyklen war 14 Tage [Range: 8 - 92 Tage].

3.2. Prävalenz der FcγRIIA 131 und FcγRIIIA 158 Genotypen

Von den 1222 Patienten (61 - 80 Jahre), die in der RICOVER-60 Studie eingeschlossen wurden, standen von 512 Patienten Proben für die Einzelnukleotid Polymorphismus Analyse zur Verfügung: 263 Proben aus der Gruppe mit kombinierter R-CHOP-14 Therapie und 249 Patienten aus dem alleinigen CHOP-14 Therapie-Arm. Die Patienten-Charakteristiken sind in Tabelle 10 (Seite 53) für die gesamten Studienpopulation, in Tabelle 11 (Seite 54) für die Patienten des CHOP-14 Therapie-Arm und in Tabelle 12 (Seite 55) für die Patienten des Rituximab-haltigen Therapiearm (R-CHOP) gezeigt.

Tabelle 10: Charakteristik aller Patienten der RICOVER-60 Studie.

	FcγRIIA 131				FcγRIIA 158			
	R/R n=64	R/H n=235	H/H n=213	p-Wert	V/V n=145	V/F n=271	F/F n=96	p-Wert
Männlich	36 (56 %)	131 (56 %)	105 (49 %)	0,340	81 (56 %)	139 (51 %)	52 (54 %)	0,656
Alter, Median (Range)	67 [61-80]	68 [61-80]	68 [61-80]	0,252	68 [61-80]	69 [61-80]	67 [61-79]	0,143
LDH > ONB	28 (44 %)	125 (53 %)	97 (46 %)	0,184	66 (46 %)	137 (51 %)	47 (49 %)	0,623
ECOG > 1	9 (14 %)	32 (14 %)	26 (12 %)	0,870	16 (11 %)	37 (14 %)	14 (15 %)	0,669
Stadium III/ IV	29 (45 %)	128 (54 %)	101 (47 %)	0,223	73 (50 %)	137 (51 %)	48 (50 %)	1,000
Extranodaler Befall > 1	8 (13 %)	44 (19 %)	32 (15 %)	0,405	25 (17 %)	47 (17 %)	12 (13 %)	0,511
IPI 1	22 (34 %)	63 (27 %)	79 (37 %)	0,210	48 (33 %)	87 (32 %)	29 (30 %)	0,319
2	21 (33 %)	65 (28 %)	49 (23 %)		44 (30 %)	65 (24 %)	26 (27 %)	
3	12 (19 %)	68 (29 %)	54 (25 %)		28 (19 %)	76 (28 %)	30 (31 %)	
4, 5	9 (14 %)	39 (17 %)	31 (15 %)		25 (17 %)	43 (16 %)	11 (11 %)	
Bulk- Manifestation	23 (36 %)	103 (44 %)	80 (38 %)	0,311	52 (36 %)	111 (41 %)	43 (45 %)	0,368
B-Symptome	16 (25 %)	86 (37 %)	70 (33 %)	0,214	38 (26 %)	94 (35 %)	40 (42 %)	0,037
KM-Infiltration	4 (6 %)	10 (4 %)	14 (7 %)	0,518	7 (5 %)	16 (6 %)	5 (5 %)	0,965

Unsere DNA-Analysen erfolgten anhand von 512 Patienten der RICOVER-60 Therapiestudie (n = 1222) von denen Blut zur Analyse vor Therapiebeginn vorlag. Hierbei wurden 263 Patienten mit Rituximab-haltiger CHOP-14-Chemotherapie und 249 Patienten mit alleiniger CHOP-14-Chemotherapie ohne Rituximab behandelt. Mit Ausnahme einer längeren Verlaufskontrolle waren diese Patienten repräsentativ für die gesamte RICOVER-60 Patientenpopulation. Unter den 512 Patienten waren 64 (12,5 %) Träger von FcγRIIA 131 R/R, 235 (45,9 %) mit R/H und 213 (41,6 %) mit H/H. In der Betrachtung des Polymorphismus von FcγRIIA 158 war die Verteilung V/V 145 (28,3 %); V/F 271 (52,9 %) und F/F 96 (18,8 %). Die beobachteten Genotyp-Verteilungen wichen nicht von den erwarteten Verteilungen entsprechend dem Hardy-Weinberg-Gesetz ab.

Tabelle 11: Patientencharakteristik der Patienten im CHOP-Therapiearm.

	FcγRIIA 131					FcγRIIIA 158				
	R/R n=33	R/H n=114	H/H n=102	Total	p-Wert	V/V n=69	V/F n=131	F/F n=49	Total	p-Wert
Männlich	20 (61 %)	64 (56 %)	47 (46 %)	131	0,212	40 (58 %)	69 (53 %)	22 (45 %)	131	0,371
Weiblich	13 (39 %)	50 (44 %)	55 (54 %)	118		29 (42 %)	62 (47 %)	27 (55 %)	118	
Alter, Median [range]	67 [61-77]	68 [61-80]	68 [61-79]		0,256	68 [61-78]	70 [61-80]	67 [61-79]		0,048
LDH > ONB	13 (39 %)	65 (57 %)	48 (47 %)	126	0,133	31 (45 %)	68 (52 %)	27 (55 %)	126	0,510
ECOG > 1	1 (3 %)	18 (16 %)	14 (14 %)	33	0,155	6 (9 %)	15 (11 %)	12 (24 %)	33	0,038
Stadium III/IV	14 (42 %)	65 (57 %)	51 (50 %)	130	0,288	38 (55 %)	65 (50 %)	27 (55 %)	130	0,709
Extranodaler Befall >1	3 (9 %)	21 (18 %)	12 (12 %)	36	0,290	9 (13 %)	19 (15 %)	8 (16 %)	36	0,862
IPI 1	14 (42 %)	23 (20 %)	35 (34 %)	72	0,125	21 (30 %)	42 (32 %)	9 (18 %)	72	0,446
2	10 (30 %)	36 (32 %)	26 (25 %)	72		23 (33 %)	33 (25 %)	16 (33 %)	72	
3	6 (18 %)	38 (33 %)	26 (25 %)	70		15 (22 %)	39 (30 %)	16 (33 %)	70	
4, 5	3 (9 %)	17 (15 %)	15 (15 %)	35		10 (14 %)	17 (13 %)	8 (16 %)	35	
Bulk- Manifestation	9 (27 %)	61 (54 %)	35 (34 %)	105	0,003	25 (36 %)	54 (41 %)	26 (53 %)	105	0,181
B-Symptome	8 (24 %)	41 (36 %)	39 (38 %)	88	0,348	18 (26 %)	47 (36 %)	23 (47 %)	88	0,063
KM-Infiltration	1 (3 %)	2 (2 %)	7 (7 %)	10	0,133	2 (3 %)	6 (5 %)	2 (4 %)	10	0,913

Die Charakteristik der Patienten im CHOP-Therapiearm unterschied sich nicht von den Patienten, die im R-CHOP-Therapiearm behandelt wurden. Die beobachteten Genotyp-Verteilungen waren vergleichbar für die beiden Therapiearme und wichen nicht von den erwarteten Verteilungen entsprechend dem Hardy-Weinberg-Gesetz ab. Es zeigte sich ein Ungleichgewicht für den Polymorphismus FcγRIIA 131 bezogen auf Bulk-Manifestation mit R/R 27 %, R/H 54 % und H/H 34 % ($p = 0,003$). Ergänzend hierzu zeigte sich ebenfalls im CHOP-Therapiearm ein leichtes Ungleichgewicht für den Polymorphismus FcγRIIIA 158 bezogen auf das Alter ($p = 0,048$) und den ECOG >1 ($p = 0,038$), nicht jedoch in der R-CHOP-Therapiegruppe. Anhand der Vielzahl durchgeführter statistischer Analysen ohne Signifikanz haben sich die beobachteten Ungleichgewichte möglicherweise als zufällig herausgestellt.

Tabelle 12: Patientencharakteristik des R-CHOP-Therapiearm.

	FcγRIIA 131					FcγRIIIA 158				
	R/R n=31	R/H n=121	H/H n=111	Total	p-Wert	V/V n=76	V/F n=140	F/F n=47	Total	p-Wert
Männlich	16 (52 %)	67 (55 %)	58 (52 %)	141	0,881	41 (54 %)	70 (50 %)	30 (64 %)	141	0,261
Weiblich	15 (48 %)	54 (45 %)	53 (48 %)	122		35 (46 %)	70 (50 %)	17 (36 %)	122	
Alter, Median (range)	67 [61-80]	69 [61-80]	68 [61-80]		0,681	69 [61-80]	68 [61-80]	67 [61-78]		0,501
LDH > ONB	15 (48 %)	60 (50 %)	49 (44 %)	124	0,705	35 (46 %)	69 (49 %)	20 (43 %)	124	0,706
ECOG > 1	8 (26 %)	14 (12 %)	12 (11 %)	34	0,093	10 (13 %)	22 (16 %)	2 (4 %)	34	0,114
Stadium III/IV	15 (48 %)	63 (52 %)	50 (45 %)	128	0,574	35 (46 %)	72 (51 %)	21 (45 %)	128	0,647
Extranodaler Befall >1	5 (16 %)	23 (19 %)	20 (18 %)	48	0,949	16 (21 %)	28 (20 %)	4 (9 %)	48	0,149
IPI 1	8 (26 %)	40 (33 %)	44 (40 %)	92	0,587	27 (36 %)	45 (32 %)	20 (43 %)	92	0,210
2	11 (35 %)	29 (24 %)	23 (21 %)	63		21 (28 %)	32 (23 %)	10 (21 %)	63	
3	6 (19 %)	30 (25 %)	28 (25 %)	64		13 (17 %)	37 (26 %)	14 (30 %)	64	
4, 5	6 (19 %)	22 (18 %)	16 (14 %)	44		15 (20 %)	26 (19 %)	3 (6 %)	44	
Bulk- Manifestation	14 (45 %)	42 (35 %)	45 (41 %)	101	0,448	27 (36 %)	57 (41 %)	17 (36 %)	101	0,714
B-Symptome	8 (26 %)	45 (37 %)	31 (28 %)	84	0,259	20 (26 %)	47 (34 %)	17 (36 %)	84	0,449
KM- Infiltration	3 (10 %)	8 (7 %)	7 (6 %)	18	0,741	5 (7 %)	10 (7 %)	3 (6 %)	18	1,000

Die Charakteristik der Patienten im CHOP-Therapiearm (n = 249) unterschied sich nicht von den Patienten, die im R-CHOP-Therapiearm (n = 263) behandelt wurden. Die beobachteten Genotyp-Verteilungen waren vergleichbar für die beiden Therapiearme und wichen nicht von den erwarteten Verteilungen entsprechend dem Hardy-Weinberg-Gesetz ab. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Polymorphismus FcγRIIA 131 und FcγRIIIA 158 bei den mit Rituximab behandelten Patienten.

Abgesehen von einer längeren Verlaufsbeobachtung sind die 512 Patienten, von denen DNA-Analysen durchgeführt wurden, repräsentativ für die gesamte Patientenpopulation der RICOVER-60 Therapiestudie (Tabelle 13, Seite 56).

Tabelle 13: Charakteristik der RICOVER-60 Patienten

	vorhandene DNA n=512 (42 %)	fehlende DNA n=710 (58 %)	RICOVER-60 n=1222 (100 %)	p-Wert
Männlich	272 (53 %)	378 (53 %)	650 (53 %)	1,000
Weiblich	240 (47 %)	332 (47 %)	572 (47 %)	
Alter, Median [range]	68 [61-80]	68 [61-80]	68 [61-80]	0,830
LDH > ONB	250 (49 %)	354 (50 %)	604 (49 %)	0,728
ECOG > 1	67 (13 %)	109 (15 %)	176 (14 %)	0,284
Stadium III/IV	258 (50 %)	361 (51 %)	619 (51 %)	0,908
Extranodaler Befall >1	84 (16 %)	132 (19 %)	216 (18 %)	0,362
IPI 1	164 (32 %)	208 (29 %)	372 (30 %)	0,624
2	135 (26 %)	204 (29 %)	339 (28 %)	
3	134 (26 %)	179 (25 %)	313 (26 %)	
4, 5	79 (15 %)	119 (17 %)	198 (16 %)	
Bulk-Manifestation	206 (40 %)	257 (36 %)	463 (38 %)	0,152
B-Symptome	172 (34 %)	227 (32 %)	399 (33 %)	0,578
KM-Infiltration	28 (5 %)	45 (6 %)	73 (6 %)	0,544
Therapiearm:				0,469
6xCHOP-14	127 (25 %)	180 (25 %)	307 (25 %)	
8xCHOP-14	122 (24 %)	183 (26 %)	305 (25 %)	
6xCHOP-14 + 8xR	124 (24 %)	182 (26 %)	306 (25 %)	
8xCHOP-14 + 8xR	139 (27 %)	165 (23 %)	304 (25 %)	

In der RICOVER-60 Therapiestudie wurden insgesamt 1222 Patienten mit einem diffusen großzelligen B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom behandelt. Von 512 Patienten der RICOVER-60 Studie existierten Blutproben vor Therapiebeginn zur DNA-Analyse. Hierbei wurden 263 Patienten mit kombinierter Rituximab-haltiger CHOP-Chemotherapie und 249 Patienten mit alleiniger CHOP-Chemotherapie ohne Rituximab behandelt. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen Patientengruppen, es gab auch keine signifikanten Unterschiede zwischen der Patientengruppe mit vorhandenem DNA-Material und denen ohne DNA-Analyse.

Von den 512 Patienten zeigten sich für den Polymorphismus FcγRIIA 131 mit dem Allel R/R 64 Träger (12,5 %), mit R/H 235 Träger (45,9 %) und mit H/H 213 Träger (41,6 %).

Für den Einzelnukleotid-Polymorphismus FcγRIIIA 158 zeigte sich eine Verteilung mit V/V bei 145 Patienten (28,3 %), V/F bei 271 Patienten (52,9 %) und F/F bei 96 Patienten (18,8 %). Die beobachteten Verteilungen wichen nicht von den erwarteten Verteilungen entsprechend dem Hardy-Weinberg-Gesetz ab [112].

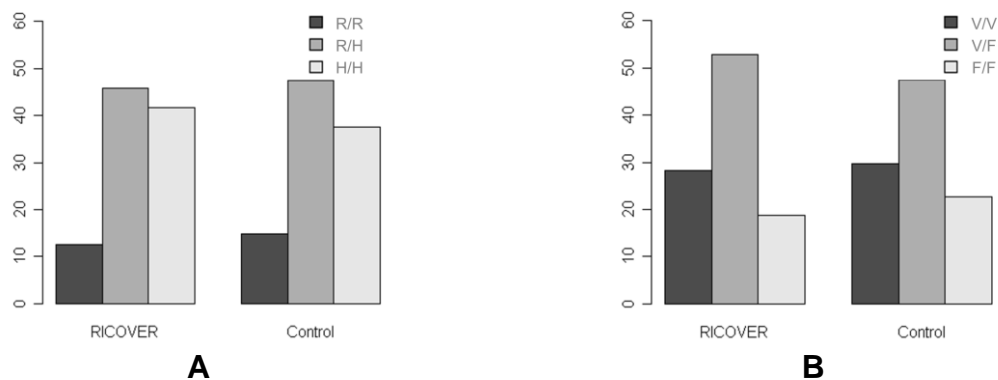


Abbildung 11: Genotyp-Häufigkeiten der RICOVER-60 Patienten und gesunden Kontrollen. In Abbildung A ist die Häufigkeit der Genotypen des Polymorphismus FcγRIIA 131 unter den RICOVER-60 Patienten und den gesunden Kontrollen graphisch dargestellt. In Abbildung B ist die Häufigkeit der Genotypen des Polymorphismus FcγRIIIA 158 unter den RICOVER-60 Patienten und den gesunden Kontrollen graphisch dargestellt. Die beobachteten Verteilungen wichen nicht von den erwarteten Verteilungen entsprechend dem Hardy-Weinberg-Gesetz ab.

Die Genotypen für den SNP FcγRIIA 131H/R und den SNP FcγRIIIA 158V/F waren nur sehr schwach assoziiert ($R^2 = 0,026$).

Die Charakteristiken der Patienten, von denen DNA-Proben existierten, unterschieden sich nicht von den Patienten, welche mit kombinierter R-CHOP-Therapie beziehungsweise alleiniger CHOP-Therapie (ohne Rituximab) behandelt wurden [Tabelle 11 (Seite 54) + Tabelle 12 (Seite 55)]. Als Gemeinsamkeiten zeigte sich, dass die Genotyp-Häufigkeiten ähnlich waren in beiden Therapie-Armen (Tabelle 14, Seite 58).

Tabelle 14: Frequenz der Genotypen in dem CHOP- und R-CHOP-Therapiearm.

		CHOP (n=249)	R-CHOP (n=263)	Alle (n=512)
FcγRIIA 131	R/R	33 (13,3 %)	31 (11,8 %)	64 (12,5 %)
	R/H	114 (45,8 %)	121 (46,0 %)	235 (45,9 %)
	H/H	102 (41,0 %)	111 (42,2 %)	213 (41,6 %)
FcγRIIIA 158	F/F	49 (19,7 %)	47 (17,9 %)	96 (18,8 %)
	V/F	131 (52,6 %)	140 (53,2 %)	271 (52,9 %)
	V/V	69 (27,7 %)	76 (28,9 %)	145 (28,3 %)

Die Genotyp-Häufigkeiten für den FcγRIIA 131 Polymorphismus und den FcγRIIIA 158 Polymorphismus waren ähnlich in beiden Therapie-Armen (R-CHOP-14 bzw. CHOP-14). Für den FcγR IIA Polymorphismus war der Exakte Fisher-Test für R-CHOP vs. CHOP p-Wert = 0,863. Für den FcγR IIIA Polymorphismus war der Exakte Fisher-Test für R-CHOP vs. CHOP p-Wert = 0,873. Es zeigte sich keine Signifikanz der Genotyp-Häufigkeiten zwischen den Therapiegruppen mit R-CHOP oder CHOP-Chemotherapie.

Tabelle 15: Genotyp-Häufigkeiten von FcγRIIA 131 / FcγRIIIA 158 bei RICOVER-60 Patienten und gesunden Kontrollen.

Polymorphismus	Genotyp	RICOVER	Kontrolle
FcγRIIA	R/R	64 (12,5 %)	15 (14,85 %)
	R/H	235 (45,9 %)	48 (47,52 %)
	H/H	213 (41,6 %)	38 (37,62 %)
FcγRIIIA	V/V	145 (28,32 %)	30 (29,7 %)
	V/F	271 (52,93 %)	48 (47,52 %)
	F/F	96 (18,75 %)	23 (22,77 %)

Unter den 512 Patienten, der RICOVER-60 Therapiegruppe mit Möglichkeit zur DNA-Analyse waren 64 (12,5 %) Träger von FcγRIIA 131 R/R, 235 (45,9 %) mit R/H und 213 (41,6 %) von H/H. Die Verteilung für den Polymorphismus FcγRIIIA 158 war V/V 145 (28,3 %); für V/F 271 (52,9 %) und F/F mit 96 (18,8 %). Die beobachteten Verteilungen wichen nicht von den erwarteten Verteilungen entsprechend dem Hardy-Weinberg-Gesetz ab. In der Kontrolle aus 101 gesunden Spendern war die Genotyp Verteilung für FcγRIIA 131 für R/R 15 (14,9 %), für R/H 48 (47,5 %) und für H/H 38 (37,6 %). Für den FcγRIIIA 158 Polymorphismus war die Verteilung 30 (29,7 %) für V/V, 48 (47,5 %) für V/F und 23 (22,8 %) für F/F. Die Genotyp-Häufigkeiten in den Kontrollproben wichen nicht von den erwarteten Verteilungen entsprechend dem Hardy-Weinberg-Gesetz ab. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotyp-Häufigkeiten von dem SNP FcγRIIA 131 oder FcγRIIIA 158 bei Lymphompatienten und den gesunden Kontrollen.

Zudem zeigte sich ein geringes Ungleichgewicht für den Fcγ-Rezeptor IIIA Polymorphismus bezogen auf das Alter ($p = 0,048$) und ECOG > 1 ($p = 0,038$) (Tabelle 11, Seite 54) jedoch nicht in der Gruppe mit Rituximab-haltiger Therapie.

In den Gruppen die mit Rituximab behandelt wurden, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den von uns analysierten Polymorphismen des Fcγ-Rezeptor IIA und Fcγ-Rezeptor IIIA (Tabelle 12, Seite 55).

Wie in der Tabelle 11 (Seite 54) und in der Tabelle 12 (Seite 55) ersichtlich, haben sich aufgrund der Vielzahl der durchgeführten statistischen Tests die dargestellten Ungleichgewichte möglicherweise als zufällig herausgestellt. Von den 101 Blutproben der gesunden kaukasischen Bevölkerung wurden ebenfalls DNA-Analysen des SNP von FcγRIIA 131 und FcγRIIIA 158 durchgeführt und als Kontrollgruppe verwendet. In der Kontrollgruppe war die Verteilung des Genotyps von Fcγ-Rezeptor IIA Polymorphismus 131: 15 Probanden (14,9 %) mit R/R, 48 (47,5 %) mit R/H und 38 (37,6 %) mit H/H. Für den SNP FcγRIIIA 158 ergab die Verteilung 30 Probanden mit V/V (29,7 %); 48 mit V/F (47,5 %) und 23 mit F/F (22,8 %). Die beobachteten Verteilungen der Genotypen der Kontrollproben wichen nicht von den erwarteten Verteilungen entsprechend dem Hardy-Weinberg-Gesetz ab [112]. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Genotyp-Häufigkeit von Lymphompatienten und den gesunden Probanden der Kontrollgruppe gefunden werden, weder für den Polymorphismus FcγRIIA 131 oder den Polymorphismus FcγRIIIA 158 (Tabelle 14, Seite 58).

3.3. Klinische Präsentation

In der Gruppe mit alleiniger CHOP-Chemotherapie zeigte sich ein Ungleichgewicht für das Vorkommen von Bulk-Manifestationen des Lymphom bei dem Einzelnukleotid-Polymorphismus FcγRIIA 131: R/R hatte 27 %, R/H 54 % und H/H 34 % ($p = 0,003$).

Träger des Genotyp V/V des Polymorphismus FcγRIIIA 158 zeigten eine leicht erhöhte Häufigkeit für B-Symptomatik (158 V/V 26 %; V/F 35 %; F/F 42 %; $p = 0,037$).

Abgesehen davon war keine weitere Assoziation des Trägerstatus der beiden von uns untersuchten SNP (FcγRIIA 131 + FcγRIIIA 158) mit der Patientencharakteristik gefunden worden. Insbesondere war der Trägerstatus für die verschiedenen SNP nicht korreliert mit dem Internationalen Prognostischen Index (IPI), Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status, Stadium, erhöhter LDH vor Therapieeinleitung, sowie > 1 Extranodaler Beteiligung (Tabelle 10, Seite 53).

3.3.1. Nebenwirkungen

Hinsichtlich der Nebenwirkungen zeigte sich eine Tendenz (Exakte Fisher-Test, $p = 0,007$; Armitage Trend Test, $p = 0,091$) dafür, dass die Chemotherapie-induzierte Anämie mit Grad 3 oder 4 weniger häufig war bei dem Genotyp R/R des SNP FcγRIIA 131 (5 von 63 [Daten zur Toxizität von 1 Patient fehlend oder 7,9 %; 95 % CI, 2,6 - 17,6) im Vergleich mit dem Genotyp R/H (56 von 220 oder 25,5 %; 95 % CI, 19,8 - 31,7) und dem Genotyp H/H (47 von 205 oder 22,9 %; 95 % CI, 17,4 - 29,3).

Die Anzahl der Leukozytopenien, Thrombozytopenien als auch der Infektionsrate mit Grad 3 oder 4 zeigte keine Unterschiede zwischen dem von uns untersuchten Polymorphismus von FcγRIIA und FcγRIIIA (Tabelle 16, Seite 60; Tabelle 17, Seite 61 und Tabelle 18, Seite 61). Die Rate der Therapie-assoziierten Todesfälle war für FcγRIIA 131 R/R 10,9 % (4,5 % - 21,2 %), für FcγRIIA 131 R/H 5,5 % (3,0 % - 9,3 %) und 5,2 % (2,6 % - 9,1 %) für FcγRIIA 131 H/H ($p = 0,220$). Es gab keine Unterschiede der Therapie-assoziierten Todesfälle zwischen den Genotypen des Polymorphismus FcγRIIIA 158.

Tabelle 16: Auftreten von Leukozytopenie in Abhängigkeit von dem SNP FcγRIIA 131 und FcγRIIIA 158.

FcγRIIA			
	0	1	Total
R/R	87 (45,07 %)	72 (41,14 %)	159
R/H	86 (44,56 %)	84 (48,00 %)	170
H/H	20 (10,36 %)	19 (10,85 %)	39
Total	193 (52,44 %)	175 (47,55 %)	368

FcγRIIIA			
	0	1	Total
V/V	55 (28,49 %)	42 (24,00 %)	97
V/F	105 (54,40 %)	98 (56,00 %)	203
F/F	33 (17,09 %)	35 (20,00 %)	68
Total	193 (52,44 %)	175 (47,55 %)	368

Die Anzahl der Leukozytopenien mit Grad 3 oder 4 zeigten keine Unterschiede zwischen dem SNP FcγRIIA 131 und FcγRIIIA 158. Für FcγRIIA 131 war im Exakten Fisher-Test der p-Wert = 0,761358 und im Armitage Trendtest der p-Wert = 0,518394. In der Betrachtung für den Einzelnukleotid-Polymorphismus FcγRIIIA 158 ist im Exakten Fisher-Test der p-Wert = 0,560193 und im Armitage Trendtest p-Wert = 0,286426.

Tabelle 17: Auftreten von Thrombozytopenie getrennt betrachtet für den SNP FcγRIIA 131 und FcγRIIIA 158.

FcγRIIA 131			
	0	1	Total
R/R	128 (41,96 %)	20 (38,46 %)	148
R/H	143 (46,88 %)	25 (48,07 %)	168
H/H	34 (11,14 %)	7 (13,46 %)	41
Total	305 (85,43 %)	52 (14,56 %)	357

FcγRIIIA 158			
	0	1	Total
V/V	80 (26,23 %)	14 (26,92 %)	94
V/F	165 (54,09 %)	30 (57,69 %)	195
F/F	60 (19,67 %)	8 (15,38 %)	68
Total	305 (85,43 %)	52 (14,56 %)	357

Die Anzahl der Thrombozytopenien mit Grad 3 oder 4 zeigte keine Unterschiede zwischen dem Polymorphismus von Fcγ-Rezeptor IIA und IIIA. Für FcγRIIA 131 war im Exakten Fisher-Test der p-Wert = 0,808113 und im Armitage Trendtest der p-Wert = 0,55851. Für FcγRIIIA 158 war im Exakten Fisher-Test der p-Wert = 0,807137 und im Armitage Trendtest der p-Wert = 0,620064.

Tabelle 18: Anzahl von Infektion getrennt betrachtet für den SNP FcγRIIA 131 und FcγRIIIA 158.

FcγRIIA 131			
	0	1	Total
R/R	148 (42,04 %)	60 (41,66 %)	208
R/H	160 (45,45 %)	65 (45,13 %)	225
H/H	44 (12,50 %)	19 (13,19 %)	63
Total	352 (70,96 %)	144 (29,03 %)	496

FcγRIIIA 158			
	0	1	Total
V/V	101 (28,69 %)	39 (27,08 %)	140
V/F	185 (52,55 %)	76 (52,77 %)	261
F/F	66 (18,75 %)	29 (20,13 %)	95
Total	352 (70,96 %)	144 (29,03 %)	496

Die Anzahl der Infektionen mit Grad 3 oder 4 zeigte keine Unterschiede zwischen dem Polymorphismus von Fcγ-Rezeptor II und III. Für FcγRIIA war im Exakten Fisher-Test der p-Wert = 0,980228 und im Armitage Trendtest der p-Wert = 0,873033. Für FcγRIIIA war im Exakten Fisher-Test der p-Wert = 0,895688 und im Armitage Trendtest der p-Wert = 0,656836.

3.3.2. Therapieansprechen und Ergebnis

Der Beobachtungszeitraum für alle Varianten der Fcγ-Rezeptor Polymorphismen war gleich. In der Rate kompletter Remissionen gab es keine Unterschiede zwischen den Genotypen des SNP FcγRIIA 131. Hinsichtlich der Genotypen des SNP FcγRIIIA 158 war die Anzahl der mit CHOP behandelten Patienten und CR/CRu: 73,9 % für V/V, 77,1 % für V/F und 63,3 % für F/F (Exakter Fisher-Test: $p = 0,17$; Armitage Trendtest: $p = 0,27$). Die Rate kompletter Remissionen von Patienten mit R-CHOP-Therapie war für den Genotyp V/V 86,8 %, 81,4 % mit V/F und 74,5 % mit F/F; exakter Fisher-Test: $p = 0,23$; Armitage Trendtest $p = 0,08$ (Tabelle 19, Seite 62).

Tabelle 19: Rate kompletter Remissionen (CR/CRu) aufgelistet für den jeweiligen Genotyp von FcγRIIA 131 und FcγRIIIA 158.

FcγRIIA 131		
	CHOP-14 (n = 249)	R-CHOP-14 (n = 263)
R/R (n = 64)	23/33 (69,7 %)	25/31 (80,6 %)
R/H (n = 235)	86/114 (75,4 %)	98/121 (81,0 %)
H/H (n = 213)	74/102 (72,5 %)	92/111 (82,9 %)
Exakter Fisher-Test: p-Wert	0,75	0,90
Armitage Trendtest	0,95	0,70

FcγRIIIA 158		
V/V (n = 145)	51/69 (73,9 %)	66/76 (86,8 %)
V/F (n = 271)	101/131 (77,1 %)	114/140 (81,4 %)
F/F (n = 96)	31/49 (63,3 %)	35/47 (74,5 %)
Exakter Fisher-Test: p-Wert	0,17	0,23
Armitage Trendtest	0,27	0,08

Zwischen den Genotypen des SNP FcγRIIA 131 waren die Raten kompletter Remissionen gleich. Es zeigte sich für die Rate kompletter Remissionen (CR/CRu) der Patienten im CHOP-Therapiearm für die genetische Varianten des SNP FcγRIIIA 158: V/V mit 73,9 %, 77,1 % für V/F und 63,3 % für F/F (Exakte Fisher-Test: $p = 0,17$; Armitage Trendtest: $p = 0,27$). Im Gegensatz hierzu zeigte sich für die Genotypen des SNP FcγRIIIA 158 bei den Patienten im R-CHOP-Therapiearm eine Rate kompletter Remissionen (CR/CRu) mit 86,8 % (V/V), 81,4 % (V/F) und 74,5 % (F/F); (exakter Fisher-Test: $p = 0,23$; Armitage Trendtest $p = 0,08$).

Für die Patienten, die CHOP-14 Chemotherapie erhielten (Abbildung 12, Seite 64; Abbildung 13, Seite 65; Abbildung 14, Seite 66) gibt es keine Unterschiede der Überlebenskurven hinsichtlich der verschiedenen Polymorphismen. Die Überlebenskurven nach R-CHOP-14 Therapie bezogen auf die SNP sind für das EFS in (Abbildung 12, Seite 64), für das PFS in Abbildung 13 (Seite 65) und für das OS in Abbildung 14 (Seite 66) gezeigt.

Es zeigten sich keine Unterschiede in den Überlebenskurven der Polymorphismus-Varianten des FcγRIIA bei Rituximab-haltiger oder alleiniger CHOP-Chemotherapie. In den Überlebenskurven für die genetischen Varianten des SNP FcγRIIIA 158 bei alleiniger CHOP-Chemotherapie zeigte sich kein Unterschied. Im Gegensatz hierzu zeigten sich bei Patienten mit Rituximab-haltiger CHOP-Chemotherapie tendenziell niedrigere Überlebenskurven von EFS und PFS, jedoch nicht für das OS, bei dem Genotyp FcγRIIIA 158 F/F, im Vergleich mit den Genotypen V/F und V/V. Die 3-Jahres-ereignisfreien Überlebensraten für den Polymorphismus FcγRIIIA 158 F/F betragen 64,5 % (50,5 - 78,5 %), verglichen mit 70,2 % (62,5 - 78,0 %) für V/F und 76,9 % (67,3 - 86,6 %) für V/V (Logrank-Test, $p = 0,224$ für F/F im Vergleich zu V/V; $p = 0,285$ für F/F im Vergleich zu V/F + V/V).

Für das 3-Jahre PFS waren die Raten 68,3 % (54,6 % - 82,1 %) für den FcγRIIIA 158 F/F verglichen mit 76,1 % (68,7 % - 83,5 %) für V/F und 80,5 % (71,2 % - 89,7 %) für V/V (Logrank-Test, $p = 0,233$; für F/F im Vergleich zu V/V; $p = 0,185$ für F/F im Vergleich zu V/F + V/V). In der Abbildung 12 (Seite 64) sind die Überlebenskurven für das EFS der Patienten mit Rituximab-haltiger CHOP-Therapie beziehungsweise alleiniger CHOP-Chemotherapie und die Einzelnukleotid-Polymorphismen FcγRIIA 131 und FcγRIIIA 158 dargestellt.

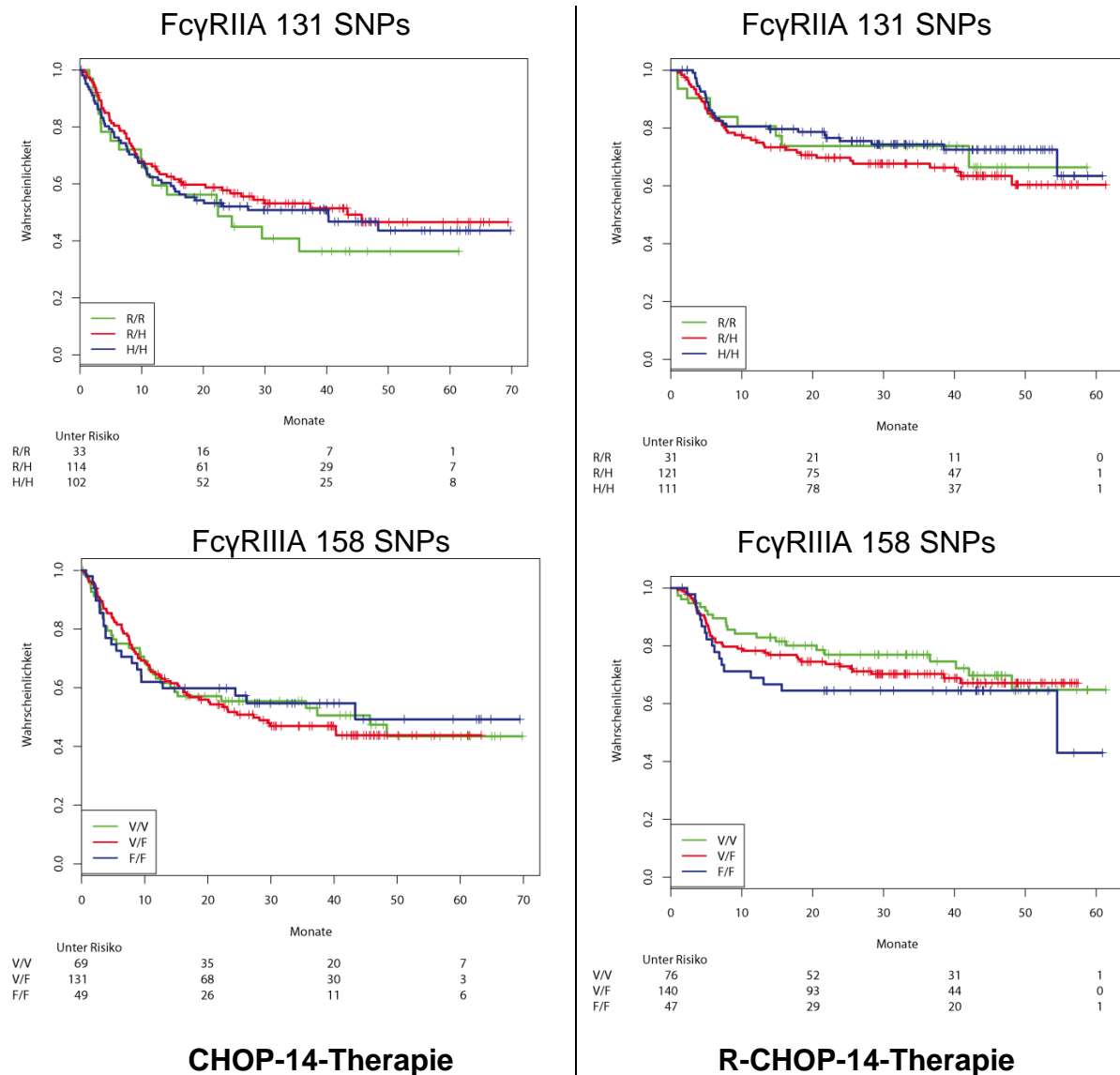


Abbildung 12: Ereignisfreies Überleben der Patienten jeweils im CHOP-14-Therapiearm und im R-CHOP-14-Therapiearm in Abhängigkeit vom Fcγ-Rezeptor Polymorphismus. Die Beobachtungszeit war bei allen Varianten von FcγRIIA und FcγRIIIA gleich. Die Überlebenskurven (Verglichen unter Anwendung des Logrank-Test) unterschieden sich nicht für den Polymorphismus des FcγRIIA sei es für den CHOP-Therapiearm als auch für den R-CHOP-Therapiearm. Die Überlebenskurven der Patienten im CHOP-Therapiearm zeigten keinen Unterschied im Bezug auf den Polymorphismus von FcγRIIIA. Im Gegensatz hierzu zeigte sich für Patienten im R-CHOP-Therapiearm mit FcγRIIIA F/F tendentiell ein schlechteres ereignisfreies Überleben als bei Patienten mit den Genotypen V/F oder V/V. Die 3-Jahres-ereignisfreien Raten für den Genotyp FcγRIIIA 158 F/F waren 64,5 % (50,5 - 78,5 %), verglichen mit 70,2 % (62,5 - 78,0 %) für V/F und 76,9 % (67,3 - 86,6 %) für V/V (Logrank-Test, p = 0,224 für F/F im Vergleich zu V/V; p = 0,285 für F/F im Vergleich zu V/F + V/V).

Die Überlebenskurven für das PFS der Patienten, die CHOP-14 beziehungsweise R-CHOP-14 erhielten, in Abhängigkeit der Genotypen des Einzelnukleotid-Polymorphismus FcγRIIA 131 und FcγRIIIA 158, sind in der Abbildung 13 (Seite 65) dargestellt.

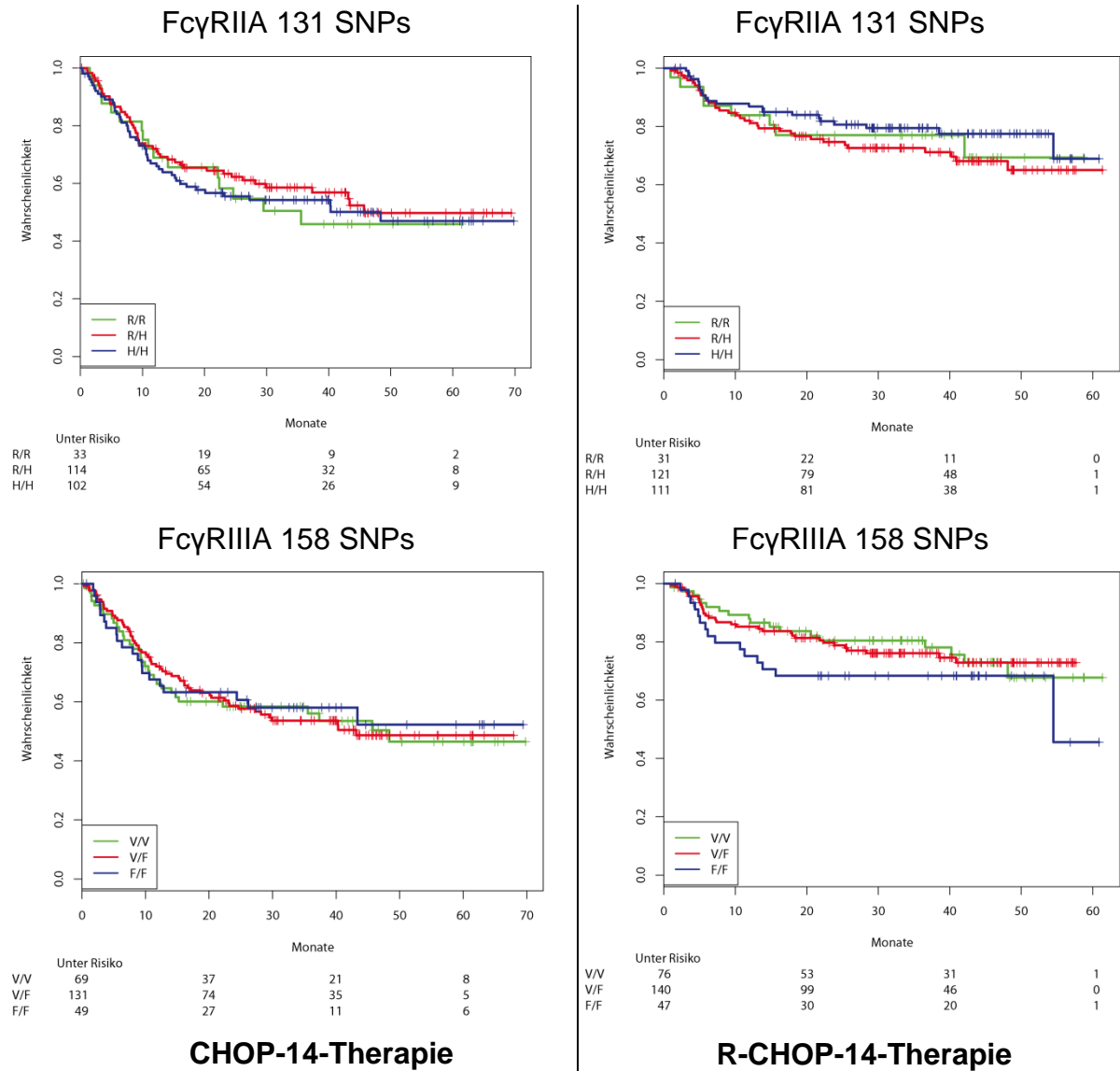


Abbildung 13: Progressionsfreies Überleben der Patienten im CHOP-14-Therapiearm und dem R-CHOP-14-Therapiearm in Abhängigkeit von dem Einzelnukleotid-Polymorphismus FcγRIIA 131 und FcγRIIIA 158. Die Beobachtungszeit war bei allen Varianten von FcγRIIA und FcγRIIIA gleich. Die Überlebenskurven (Verglichen unter Anwendung des Logrank-Test) unterschieden sich nicht für den Polymorphismus des FcγRIIA 131 sei es für den CHOP-Therapiearm als auch für den R-CHOP-Therapiearm. Die Überlebenskurven der Patienten im CHOP-Therapiearm zeigten keinen Unterschied im Bezug auf den Polymorphismus von FcγRIIIA 158. Im Gegensatz hierzu zeigte sich für Patienten im R-CHOP-Therapiearm mit FcγRIIIA 158 F/F ein deutlicher Trend für ein schlechteres progressionsfreies Überleben als bei den Genotypen mit V/F oder V/V. Für das 3-Jahres-progressionsfreie Überleben waren die Raten 68,3 % (54,6 % - 82,1 %) für F/F verglichen mit 76,1 % (68,7 % - 83,5 %) für V/F und 80,5 % (71,2 % - 89,7 %) für V/V (Logrank-Test, p = 0,233; für F/F im Vergleich zu V/V; p = 0,185 für F/F im Vergleich zu V/F + V/V).

Die Überlebenskurven für das Gesamtüberleben der Patienten, die CHOP-14 beziehungsweise R-CHOP-14-Therapie erhielten, in Abhängigkeit der Genotypen der SNPs FcγRIIA 131 und FcγRIIIA 158, ist in der Abbildung 14 (Seite 66) dargestellt.

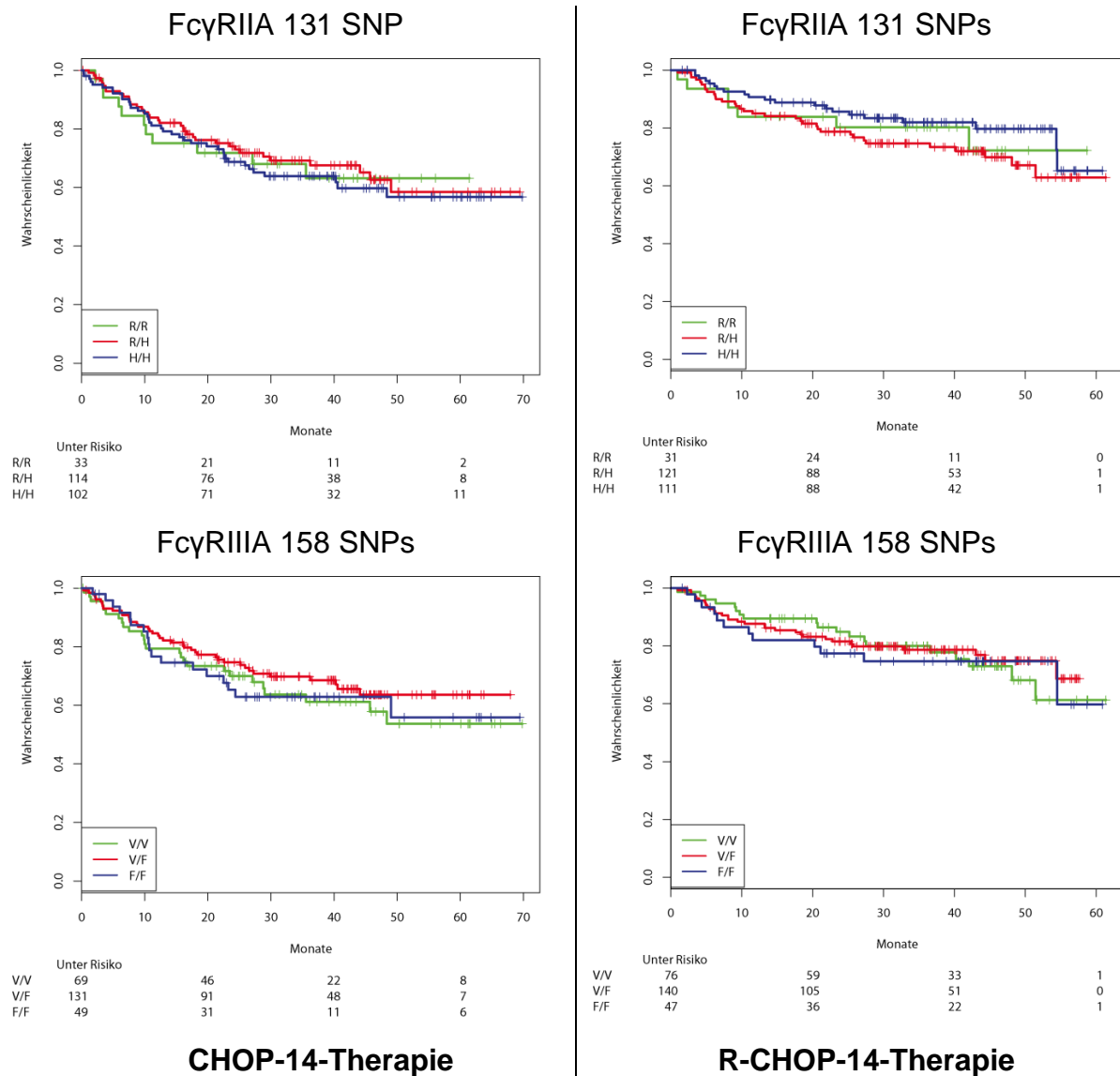


Abbildung 14: Gesamtüberleben der Patienten im CHOP-14-Therapiearm und im R-CHOP-14-Therapiearm in Abhängigkeit von dem Fcγ-Rezeptor Polymorphismus (FcγRIIA 131 und FcγRIIIA 158). Die Beobachtungszeit war bei allen Varianten von FcγRIIA 131 und FcγRIIIA 158 gleich. Die Überlebenskurven (Verglichen unter Anwendung des Logrank-Test) unterschieden sich nicht für den Polymorphismus des FcγRIIA 131 oder FcγRIIIA 158 sei es für den CHOP-Therapiearm, als auch für den R-CHOP-Therapiearm. Die Überlebenskurven der Patienten im CHOP-Therapiearm zeigten keinen Unterschied bezogen auf den SNP FcγRIIIA 158.

In der Tabelle 20 (Seite 67) ist die Anzahl der Ereignisse der verschiedenen Genotypen für EFS, PFS und OS gezeigt.

Tabelle 20 Anzahl der Ereignisse für die jeweiligen Allel-Genotypen.

Ereignisfreies Überleben		
FcγRIIA 131	CHOP	R-CHOP
H/H	52 (50,98 %)	29 (26,13 %)
R/H	54 (47,37 %)	42 (34,71 %)
R/R	19 (57,58 %)	9 (29,03 %)
FcγRIIA 158	CHOP	R-CHOP
F/F	22 (44,90 %)	17 (36,17 %)
V/F	69 (52,67 %)	42 (30,00 %)
V/V	34 (49,28 %)	21 (27,63 %)

Progressionsfreies Überleben		
FcγRIIA 131	CHOP	R-CHOP
H/H	48 (47,06 %)	23 (20,72%)
R/H	48 (42,11 %)	35 (28,93%)
R/R	16 (48,49 %)	8 (25,81%)
FcγRIIA 158	CHOP	R-CHOP
F/F	20 (40,82 %)	15 (31,92 %)
V/F	60 (45,80 %)	33 (24,57 %)
V/V	32 (46,38 %)	18 (23,68 %)

Gesamtüberleben		
FcγRIIA 131	CHOP	R-CHOP
H/H	38 (37,26 %)	21 (18,92 %)
R/H	36 (31,58 %)	34 (28,10 %)
R/R	11 (33,33 %)	7 (22,58 %)
FcγRIIA 158	CHOP	R-CHOP
F/F	18 (36,74 %)	12 (25,53 %)
V/F	41 (31,30 %)	31 (22,14 %)
V/V	26 (37,68 %)	18 (25,00 %)

Die Protokolltreue war hervorragend: die relative Dosis für die myelotoxischen Medikamente Cyclophosphamid und Doxorubicin betrug 98 % im Therapiearm mit 6 Zyklen und 96 % im Therapiearm mit 8 Zyklen CHOP-Chemotherapie. Bezüglich der Protokolltreue zeigten sich keine Unterschiede zwischen den verschiedenen geprüften Polymorphismen der Fcγ-Rezeptoren. Es gab ebenfalls keine Unterschiede in der Anzahl von Patienten, die aus der Therapiestudie ausschieden oder die zu einer Therapie außerhalb des Studienprotokolls wechselten (Tabelle 21: Seite 68; Tabelle 22, Seite 69).

Tabelle 21: Patienten mit zusätzlicher Chemotherapie.

FcγRIIA 131			
	0	1	Total
H/H	209 (98,12 %)	4 (1,87 %)	213 (41,60 %)
R/H	229 (97,44 %)	6 (2,55 %)	235 (45,89 %)
R/R	62 (96,87 %)	2 (3,12 %)	64 (12,50 %)
Gesamt	500	12	512

FcγRIIA 158			
	0	1	Total
F/F	95 (98,95 %)	1 (1,04 %)	96 (18,75 %)
V/F	262 (96,67 %)	9 (3,32 %)	271 (52,93 %)
V/V	143 (98,62 %)	2 (1,37 %)	145 (28,32 %)
Gesamt	500	12	512

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Polymorphismen FcγRIIA 131 beziehungsweise FcγRIIA 158 hinsichtlich der Anzahl von Patienten, die zusätzliche Chemotherapie erhalten haben. Für FcγRIIA 131 ist der Exakte Fisher-Test $p = 0,7114964$, der Exakte Fisher-Test für den Polymorphismus FcγRIIA 158 $p = 0,4134462$.

Tabelle 22: Patienten mit Wechsel der Therapie.

FcyRIIA 131			
	0	1	Total
H/H	206 (96,71 %)	7 (3,28 %)	213 (41,60 %)
R/H	226 (96,17 %)	9 (3,83 %)	235 (45,89 %)
R/R	61 (95,31 %)	3 (4,68 %)	64 (12,50 %)
Gesamt	493	19	512

FcyRIIIA 158			
	0	1	Total
F/F	93 (96,87 %)	3 (3,12 %)	96 (18,75 %)
V/F	259 (95,57 %)	12 (4,42 %)	271 (52,93 %)
V/V	141 (97,24 %)	4 (2,75 %)	145 (28,32 %)
Gesamt	493	19	512

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Polymorphismen von FcyRIIA 131 beziehungsweise FcyRIIIA 158 hinsichtlich der Anzahl von Patienten, bei denen ein Wechsel der Chemotherapie erfolgte. Für FcyRIIA 131 ist der Exakte Fisher-Test $p = 0,8037335$, der Exakte Fisher-Test für den Polymorphismus FcyRIIIA 158 ist $p = 0,7767527$.

3.3.3. Multivariate Analysen

Basierend auf den Ergebnissen der univariaten Analysen haben wir den Einfluss des SNP FcyRIIIA 158 in der R-CHOP-Therapiegruppe unter Zuhilfenahme eines multivariaten Cox-Modells mit Anpassung an den IPI analysiert. In unseren Vergleichen von F/F mit V/F und V/V war das relative Risiko für PFS 1,80 ($p = 0,052$) für EFS 1,55 ($p = 0,120$) und für das OS 1,35 ($p = 0,360$). Die Ergebnisse der multivariaten Analyse innerhalb der R-CHOP-Therapiegruppe sind in der Tabelle 23 (Seite 70) gezeigt.

Tabelle 23: Multivariate Analyse des ereignisfreien, des progressionsfreien und des Gesamtüberlebens des FcγRIIIA 158 Polymorphismus adjustiert an IPI im R-CHOP-Therapiearm.

Ereignisfreie Überleben				
Variable	Exp (coef)	untere 0.95 CI	obere 0.95 CI	p
F/F vs. V/F / V/V	1,55	0,898	2,68	0,120
LDH	1,84	1,126	3,02	0,015
ECOG > 1	1,35	0,759	2,41	0,310
Stadium III/IV	1,58	0,904	2,77	0,110
Extranodaler Befall ≥ 2	1,47	0,847	2,56	0,170

Progressionsfreie Überleben				
Variable	Exp (coef)	untere 0.95 CI	obere 0.95 CI	p
F/F vs. V/F / V/V	1,80	0,996	3,25	0,052
LDH	2,18	1,257	3,78	0,006
ECOG > 1	1,45	0,777	2,71	0,240
Stadium III/IV	1,59	0,847	2,98	0,150
Extranodaler Befall ≥ 2	1,68	0,921	3,05	0,091

Gesamtüberleben				
Variable	Exp (coef)	untere 0.95 CI	obere 0.95 CI	p
F/F vs. V/F / V/V	1,35	0,708	2,56	0,360
LDH	2,30	1,294	4,09	0,005
ECOG > 1	1,44	0,761	2,73	0,260
Stadium III/IV	1,40	0,742	2,66	0,300
Extranodaler Befall ≥ 2	1,44	0,770	2,69	0,250

In den Untersuchungen zur Interaktionen von Rituximab und dem Polymorphismus FcγRIIIA 158 war das Relative Risiko für das progressionsfreie Überleben im Vergleich von F/F gegen V/F + V/V 1,80 ($p = 0,052$), für das ereignisfreie Überleben 1,55 ($p = 0,120$) und für das Gesamtüberleben 1,35 ($p = 0,360$).

Für weitere Untersuchungen der Interaktionen zwischen Rituximab und dem Polymorphismus FcγRIIIA 158 haben wir den kompletten Datensatz benutzt, um ein Cox-Modell, angepasst für Rituximab, dem SNP FcγRIIIA 158 und der Interaktion zwischen beiden, durchzuführen. Das beobachtete relative Risiko für eine Interaktion war für PFS 1,57 ($p = 0,24$), für EFS 1,47 ($p = 0,28$) und für OS 1,01, die Ergebnisse sind in Tabelle 24 (Seite 71) gezeigt.

Tabelle 24: Multivariate Analyse des ereignisfreien Überleben des Polymorphismus FcγRIIIA 158 adjustiert für Rituximab.

Ereignisfreie Überleben		
Variable	Exp (coef)	p
F/F vs. V/F / V/V	0,917	0,71
Rituximab	0,488	< 0,001
Interaktion	1,470	0,29

Progressionsfreie Überleben		
Variable	Exp (coef)	P
F/F vs. V/F / V/V	0,946	0,82
Rituximab	0,450	< 0,001
Interaktion	1,565	0,24

Gesamtüberleben		
Variable	Exp (coef)	p
F/F vs. V/F / V/V	1,15	0,610
Rituximab	0,64	0,017
Interaktion	1,01	0,980

Verwendung des kompletten Datensatz zur Anwendung eines COX-Modell für Rituximab, dem Polymorphismus FcγR IIIA 158 und der Interaktion zwischen beiden. Das beobachtete relative Risiko für eine Interaktion war für das progressionsfreie Überleben 1,565 ($p = 0,24$), für das ereignisfreie Überleben 1,470 ($p = 0,29$) und für das Gesamtüberleben 1,01 ($p = 0,980$).

Obwohl nicht signifikant, zeigen diese Analysen einen starken Trend in Richtung eines ungünstigen Ergebnisses für den Genotyp F/F von dem SNP FcγRIIIA 158 unter einer Rituximab-haltigen CHOP-Chemotherapie.

Unter Berücksichtigung dieses Trends in der univariaten Analyse ermittelte eine Analyse bei der Probenanzahl unserer Studie in dem Rituximab-haltigen CHOP-Chemotherapiearm (n = 263) eine Power für das PFS von 28 % und für das EFS von 21 %. Für eine Power von 80 % wäre für das PFS eine Probenanzahl von n = 1100 oder für das EFS sogar eine Probenanzahl von n = 1600 erforderlich gewesen.

4. Diskussion

Die von uns untersuchten Fcγ-Rezeptor Polymorphismen (FcγRIIA 131 und FcγRIIIA 158) sind nicht assoziiert mit klinischen Parametern, welche bei Patienten mit einem diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom auftreten, mit Ausnahme von der B-Symptomatik, welche bei Trägern des Polymorphismus FcγRIIIA 158 V/V seltener auftrat ($p = 0,037$). Diese Beobachtung sollte jedoch vorsichtig interpretiert werden, denn verschiedene klinische Parameter wurden auf eine mögliche Assoziation mit Fcγ-Rezeptor Polymorphismen getestet und daher kann die beobachtete Assoziation auch zufällig sein.

Der Schwerpunkt unserer Studie war es, Interaktionen zwischen Polymorphismen von Fcγ-Rezeptoren und dem Verlauf von Patienten, die mit Rituximab-haltiger CHOP-Chemotherapie behandelt wurden, zu identifizieren. Es wurde gezeigt, dass die Spiegel der CD20-Expression von Lymphomzellen [73], eine hohe Tumorlast bei Therapiebeginn [26], sowie geringe Rituximab-Serumspiegel-Konzentrationen beziehungsweise der schnellere Abbau von Rituximab [7,73,80,93] die ungenügende Wirkung von Rituximab bei einigen Patienten erklären könnten.

Als erster zeigte Cartron et al. [18], dass Polymorphismen im FcγRIIIA Gen assoziiert sind mit dem Therapieansprechen von Patienten mit einem follikulären Lymphom unter alleiniger Rituximab-Therapie. Weng und Levy [125] zeigten ebenfalls für Patienten mit einem follikulären Lymphom unter alleiniger Rituximab-Therapie eine unabhängige Assoziation der Genotypen FcγRIIIA 158 V/V und FcγRIIA 131 H/H mit der Ansprechrate und Freiheit von Krankheitsprogression. Bei Patienten mit Morbus Waldenström zeigte Treon et al. [120] ein signifikant höheres Therapieansprechen unter Rituximab-Therapie bei dem Genotyp FcγRIIIA 158 V/V und V/F gegenüber F/F. Zur Bedeutung des Fcγ-Rezeptor Polymorphismus bei dem hoch-malignen B-NHL, dem diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom, gibt es bislang nur wenige Veröffentlichungen. In einer koreanischen Studie [58] wurde beobachtet, dass der Fcγ-Rezeptor IIIA Polymorphismus, nicht aber der Polymorphismus des Fcγ-Rezeptor IIA mit dem Verlauf nach R-CHOP-Therapie assoziiert ist, wobei eine kleine europäische Studie keine Unterschiede in den Fcγ-Rezeptor Allelen beobachtete [75]. Von Park et al. [88] wurde in einer einarmigen Studie bei 72 Patienten nach Rituximab-haltiger CHOP-Chemotherapie ein signifikant besseres OS und PFS für den Genotyp V/F und V/V des SNP FcγRIIIA 158 im Vergleich zu F/F

gezeigt. Der Polymorphismus FcγRIIA 131 hatte in ihren Analysen keine Assoziation oder signifikante Bedeutung. Kritisch zu betrachten sind bei all diesen Studien die geringe Anzahl der in der jeweiligen Studie eingeschlossenen Patienten. Zudem beschränkte sich keine der Studien in ihrer Analyse auf Patienten, die standardisiert einheitlich in einer prospektiven Studie behandelt wurden.

Unsere Studie ist die erste, die sich auf eine einzige große prospektive Studie stützt; die RICOVER-60 Therapiestudie [91]. Wir konnten keinen Einfluss des Polymorphismus FcγRIIA 131 auf den Verlauf der Patienten im Therapiearm mit alleiniger CHOP-Chemotherapie oder dem Rituximab-haltigen CHOP-Chemotherapiearm sehen. Es zeigte sich jedoch bei Patienten mit Rituximab-haltiger Chemotherapie, aber nicht bei alleiniger CHOP-Therapie, eine Interaktion des Polymorphismus Fcγ-RIIIA 158 F/F mit einem Trend in Richtung einer niedrigeren Rate ereignisfreien Überlebens und progressionsfreien Überlebens.

Obwohl es sich hierbei bei weitem um die größte Studie zur Rolle der Fcγ-Rezeptor Polymorphismen bei dem diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom handelt, konnte bei den Unterschieden zwischen den Fcγ-Rezeptor Polymorphismen keine Signifikanz gezeigt werden. Ein Extrapolationsmodell hat zudem bestätigt, dass dieses auch nicht gezeigt worden wäre, selbst wenn von allen 1222 Patienten mit einem diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom, die in der RICOVER-60 Studie behandelt wurden, Proben verfügbar gewesen wären. Für eine Power von 80% für das progressionsfreie Überleben wären von 1100 Patienten-Proben nötig gewesen und sogar 1600 Patienten-Proben für eine Power von 80% für das ereignisfreie Überleben. Dennoch war die Interaktion von Fcγ-Rezeptor IIIA mit Rituximab-haltiger CHOP-Chemotherapie für das PFS und EFS relevant. Die beobachteten relativen Risiken für diese Interaktion war für PFS 1,57 ($p = 0,24$) und für EFS 1,47 ($p = 0,28$) (Tabelle 24, Seite 71).

Obwohl nicht signifikant, zeigen diese Analysen doch einen Trend in Richtung eines ungünstigeren Verlaufs für Träger mit FcγRIIIA 158 F/F unter der Rituximab-haltigen Chemotherapie. Dies wurde ähnlich zu unseren Daten auch kürzlich von Váróczy et al. [122] beobachtet. Ein ähnlicher Trend wurde zudem in der koreanischen Studie [58] bei den R-CHOP-behandelten Patienten berichtet. Die Unterschiede im Verlauf der Patienten unserer Studie bezogen auf den Polymorphismus FcγRIIIA 158 hatten keine Signifikanz, obwohl in unserer Studie eine erheblich höhere Anzahl von

Patienten eingeschlossen wurde. Dies könnte auch daran liegen, dass die koreanischen Patienten drei-wöchentlich Therapie erhielten im Vergleich mit unseren Patienten, welche alle zwei-wöchentlich Rituximab erhielten. Die höheren Rituximab-Serumspiegel, welche bei der Applikation alle zwei Wochen erzielt werden [80], heben möglicherweise die Unterschiede in der Bindungsaffinität der Fc γ -Rezeptoren auf.

In weiteren Analysen der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik konnte ein Einfluss des Geschlechtes auf den Rituximab-Abbau und die Serum-Elimination identifiziert werden. Ältere Frauen haben demnach eine signifikant verlangsamte Clearance von Rituximab und damit eine längere Plasmapräsenz und längere Wirkungszeit, während hierzu im Vergleich bei Männern die Rituximab-Serum-Clearance 1,5-fach gesteigert ist. Die Rituximab-Serum-Clearance ist umkehrt proportional mit der Eliminationshalbwertszeit. So ist beim Mann die Eliminationshalbwertszeit von Rituximab signifikant vermindert mit $t_{1/2\beta} = 24,7$ Tagen im Vergleich zu der Eliminationshalbwertszeit bei Frauen mit $t_{1/2\beta} = 30,7$ Tagen ($p = 0,003$) [80,93].

Unterschiede zwischen der koreanischen Studie und kaukasischen Bevölkerung in unserer Studie sind vielfältig, wobei auch bislang nicht identifizierte genetische Unterschiede ebenfalls Einfluss haben können. In der Betrachtung der Studien, die die Fc γ -Rezeptor Polymorphismen bei Patienten, die mit monoklonalen Antikörpern behandelt wurden, untersuchten, wird deutlich, dass die Interaktionen zwischen dem Polymorphismus Fc γ RIIIA und dem Verlauf wiederholt beobachtet wurden, auch wenn die Antikörpertherapie mit Chemotherapie kombiniert wurde. Für den Polymorphismus Fc γ RIIA 131 wurde keine Interaktion berichtet, wenn Rituximab mit Chemotherapie kombiniert wird.

5. Schlussfolgerung und Ausblick

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass wir eine relevante Interaktion des Polymorphismus FcγR IIIA 158 bei Rituximab-haltiger CHOP-Chemotherapie, jedoch nicht bei alleiniger CHOP-Chemotherapie gefunden haben. Diese Daten wurden hierbei an der größten Studienpopulation von Patienten mit einem diffusen großzelligen B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom erhoben, welche einheitlich in der RICOVER-60 Studie randomisiert und behandelt wurden. Ob sich diese relevante Interaktion in signifikante Unterschiede im Verlauf von Patienten mit unterschiedlichen FcγRIIIA Polymorphismen übersetzt, hängt von mehreren Faktoren ab, von denen nur wenige identifiziert werden konnten (auch aufgrund der beobachteten Patientenzahlen).

Durch diese Interaktion zwischen den Polymorphismen von FcγRIIIA und Rituximab eröffnen sich Möglichkeiten zur Entwicklung spezieller monoklonaler Antikörper, welche diese Unterschiede bei der Bindung des Fc-Teil berücksichtigen und überwinden [70,79,108].

Als Alternative hierzu, bis neu entwickelte Antikörper vorliegen, besteht die Möglichkeit, die bisherige etablierte Therapie weiter zu optimieren. Für die optimale Rituximab-Therapie und damit die optimale Therapie des diffusen großzelligen B-Zell-Lymphoms ist auch ein besseres Verständnis der Zusammenhänge der Pharmakodynamik und der Pharmakokinetik notwendig. Auch die Einflussfaktoren der Pharmakodynamik und der Pharmakokinetik können hierbei indirekt eine entscheidende Rolle spielen. Das detaillierte Wissen über Bindungsaffinitäten der Immuntherapie könnte zukünftig zu verschiedenen Dosierungen von Rituximab bei verschiedene Lymphom-Histologien, dem Geschlecht und dem Genotyp führen [20].

6. Anhang

6.1. Abkürzungsverzeichnis

aalPI	altersadjustierter IPI (<u>a</u> ge- <u>a</u> djusted <u>I</u> PI)
ADCC	antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (<u>a</u> ntibody- <u>d</u> eependent <u>c</u> ellular <u>c</u> ytotoxicity)
BSG	<u>B</u> lutsenkung <u>g</u> eschwindigkeit
CCS	Klassifikation - <u>C</u> anadian <u>C</u> ardiovascular <u>S</u> ociety-Classification
CDC	komplementabhängige Zytolyse (<u>C</u> omplement <u>D</u> eependent <u>C</u> ytolysis)
CHOP	<u>C</u> yclophosphamid, <u>H</u> ydroxydaunorubicin, <u>O</u> ncovin & <u>P</u> rednison
CD	Oberflächenerkennungsmoleküle (<u>c</u> luster of <u>d</u> ifferentiation)
CI	Vertrauensbereich (<u>c</u> onfidence <u>i</u> nterval)
CLL	<u>c</u> hronisch <u>l</u> ymphatische <u>L</u> eukämie
CR	Komplette Remission (<u>c</u> omplete <u>r</u> emission)
CRu	Unbestätigte komplette Remission (<u>c</u> omplete <u>r</u> emission <u>u</u> nconfirmed)
CT	<u>C</u> omputertomographie
DLBCL	Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (<u>d</u> iffuse <u>l</u> arge <u>B</u> - <u>c</u> ell <u>l</u> ymphoma)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<u>d</u> esoxyribonucleic <u>a</u> cid)
DSHNHL	<u>D</u> eutschen <u>S</u> tudiengruppe für <u>H</u> ochmaligne <u>N</u> on- <u>H</u> odgkin- <u>L</u> ymphome
ECOG	<u>E</u> astern <u>C</u> ooperative <u>O</u> ncology <u>G</u> roup performance status
EDTA	<u>E</u> thylendiamintetraacetat
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (<u>e</u> pidermal <u>g</u> rowth <u>f</u> actor <u>r</u> eceptor)
EF	<u>E</u> jektionsfraktion
EFS	ereignisfreie Überleben (<u>E</u> vent <u>F</u> ree <u>S</u> urvival)
Fab	Antigenbindungsdomäne (<u>F</u> ragment <u>a</u> ntigen <u>b</u> inding)
FDA	US-Bundesgesundheitsbehörde (U.S. <u>F</u> ood and <u>D</u> rug <u>A</u> dmistration)
FEV1	Einsekundenkapazität (<u>F</u> orced <u>E</u> xpiratory <u>P</u> ressure in <u>1</u> Second)
Fc	kristallisierbares Fragment (<u>c</u> rystallisable <u>f</u> ragment)
FcyR	<u>Fc</u> - <u>G</u> amma- <u>R</u> ezeptor (auch FCGR)
FFS	Überleben ohne Therapieversagen (<u>f</u> ailure- <u>f</u> ree <u>s</u> urvival)
FS	fraktionelle Faserverkürzung (<u>f</u> ractional <u>s</u> hortening)
GELA	Französische Lymphom-Studiengruppe (<u>G</u> roupe d' <u>E</u> tude des <u>L</u> ymphomes de l' <u>A</u> dulte)
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (<u>G</u> ranulocyte- <u>C</u> olony <u>S</u> timulating <u>F</u> actor)
GPT	<u>G</u> lutamat- <u>P</u> yruvat- <u>T</u> ransaminase
γ-GT	<u>G</u> amma- <u>G</u> lutamyl- <u>T</u> ransferase
HAMA	menschlicher Anti-Maus Antikörper (<u>h</u> uman <u>a</u> nti <u>m</u> ouse <u>a</u> ntibody)
HIV	Humane Immundefizienz-Virus (<u>h</u> uman <u>i</u> mmunodeficiency <u>v</u> irus)
Ig	<u>I</u> mmunglobulin
IgG	<u>I</u> mmunglobulin- <u>G</u> amma
IMISE	<u>I</u> nstitut für <u>m</u> edizinische <u>I</u> nformatik, <u>S</u> tatistik und <u>E</u> pidemiologie
IPI	<u>I</u> nternationaler <u>P</u> rognostischer <u>I</u> ndex

ITAM	Immunrezeptor Tyrosin-basiertes aktivierendes Motiv (i mmunoreceptor t yrosine-based a ctivation m otif)
ITIM	Immunrezeptor Tyrosin-basiertes inhibierendes Motiv (i mmunoreceptor t yrosine-based i nhibition m otif)
i.v.	i ntrav e nös
kDa	K ilodalton
KOF	K örper o ber f läche
LDH	L aktat- D ehydrogenase
mRNA	Boten-RNA (m essenger R NA)
MGB	Bindung in der kleinen Drehung (m inor g roove b inder)
MInT	Therapiestudie der M abThera I nternational T rial Gruppe
MTD	maximaler Lymphomdurchmesser (m aximum t umour d iameter)
NHL	Nicht-Hodgkin-Lymphom (N on- H odgkin- L ymphoma)
NYHA	Herzinsuffizienz Klassifikation - N ew Y ork H ear A ssociation Classification
NCBI	N ational C enter for B iot e chnology I nformation
ONB	o berhalb des N orm b ereich
OS	Gesamtüberleben (o verall s urvival)
ORR	Gesamtansprechrade (O verall R esponse R ate)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (p olymerase c hain r eaction)
PFS	Progressionsfreie Überleben (P rogression f ree s urvival)
p.o.	p er o ral
RA	r heumatoide A rthritis
RNA	Ribonukleinsäure (r ibon u cleic a cid)
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (s ingle n ucleotid p olymorphism)
slg	Oberflächen-Immunglobuline (s urface i mmunoglobulin)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (W orld H ea O rganization)

6.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Lokalisationen und Bezeichnungen von Lymphom-Manifestationen. ...	12
Abbildung 2: Strukturansicht von CD20 in der Zellmembran einer B-Zelle.....	16
Abbildung 3: Strukturdarstellung von Rituximab.	20
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Fc-Rezeptorfamilie.	25
Abbildung 5: Interaktion eines Immunglobulin mit einem Fc γ -Rezeptor.	26
Abbildung 6: Sonnendarstellung des genetischen RNA-Codes.....	29
Abbildung 7: Lokalisation der Einzelnukleotid-Polymorphismen im Fc γ -Rezeptor....	31
Abbildung 8: Flussdiagramm der Therapiestudie RICOVER-60.	38
Abbildung 9: Schema der TaqMan® real-time PCR.	48
Abbildung 10: Plot der Allel Darstellung.	50
Abbildung 11: Genotyp-Häufigkeiten der RICOVER-60 Patienten und gesunden Kontrollen.	57
Abbildung 12: Ereignisfreies Überleben der Patienten jeweils im CHOP-14- Therapiearm und im R-CHOP-14-Therapiearm in Abhängigkeit vom Fc γ -Rezeptor Polymorphismus.	64
Abbildung 13: Progressionsfreies Überleben der Patienten im CHOP-14-Therapiearm und dem R-CHOP-14-Therapiearm in Abhängigkeit von dem Einzelnukleotid- Polymorphismus Fc γ RIIA 131 und Fc γ RIIIA 158.....	65
Abbildung 14: Gesamtüberleben der Patienten im CHOP-14-Therapiearm und im R- CHOP-14-Therapiearm in Abhängigkeit von dem Fc γ -Rezeptor Polymorphismus (Fc γ RIIA 131 und Fc γ RIIIA 158).....	66

6.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Modifizierte Stadieneinteilung nach der Ann-Arbor-Klassifikation.....	11
Tabelle 2: Der Internationale Prognostische Index (IPI, aaIPI)	13
Tabelle 3 Prognose des diffusen großzelligen B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom.....	14
Tabelle 4: CHOP-Chemotherapie (Handelsnamen, Dosis und Applikationsart)	17
Tabelle 5: Vorphase-Therapie	39
Tabelle 6: CHOP-Chemotherapie	40
Tabelle 7: Dosisanpassung bei Therapieverzögerung in der RICOVER-60 Studie ..	41
Tabelle 8: Laborgeräte und Software	42
Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien	43
Tabelle 10: Charakteristik aller Patienten der RICOVER-60 Studie.	53
Tabelle 11: Patientencharakteristik der Patienten im CHOP-Therapiearm.....	54
Tabelle 12: Patientencharakteristik des R-CHOP-Therapiearm.	55
Tabelle 13: Charakteristik der RICOVER-60 Patienten	56
Tabelle 14: Frequenz der Genotypen in dem CHOP- und R-CHOP-Therapiearm. ..	58
Tabelle 15: Genotyp-Häufigkeiten von FcγRIIA 131 / FcγRIIIA 158 bei RICOVER-60 Patienten und gesunden Kontrollen.....	58
Tabelle 16: Auftreten von Leukozytopenie in Abhängigkeit von dem SNP FcγRIIA 131 und FcγRIIIA 158.....	60
Tabelle 17: Auftreten von Thrombozytopenie getrennt betrachtet für den SNP FcγRIIA 131 und FcγRIIIA 158.	61
Tabelle 18: Anzahl von Infektion getrennt betrachtet für den SNP FcγRIIA 131 und FcγRIIIA 158.....	61
Tabelle 19: Rate kompletter Remissionen (CR/CRu) aufgelistet für den jeweiligen Genotyp von FcγRIIA 131 und FcγRIIIA 158.	62
Tabelle 20 Anzahl der Ereignisse für die jeweiligen Allel-Genotypen.	67
Tabelle 21: Patienten mit zusätzlicher Chemotherapie.....	68
Tabelle 22: Patienten mit Wechsel der Therapie.	69
Tabelle 23: Multivariate Analyse des ereignisfreien, des progressionsfreien und des Gesamtüberlebens des FcγRIIIA 158 Polymorphismus adjustiert an IPI im R-CHOP- Therapiearm.	70
Tabelle 24: Multivariate Analyse des ereignisfreien Überleben des Polymorphismus FcγRIIIA 158 adjustiert für Rituximab.	71

6.4. Literaturverzeichnis

1. Afonina I, Zivarts M, Kutuyavin I, Lukhtanov E, Gamper H, Meyer RB. Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Res.* Jul 1 1997;25(13):2657-2660.
2. Aisenberg AC. Coherent view of non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol.* Oct 1995;13(10):2656-2675.
3. Anderson KC, Bates MP, Slaughenhaupt BL, Pinkus GS, Schlossman SF, Nadler LM. Expression of human B cell-associated antigens on leukemias and lymphomas: a model of human B cell differentiation. *Blood.* Jun 1984;63(6):1424-1433.
4. Anderson R. Manipulation of cell surface macromolecules by flaviviruses. *Adv Virus Res.* 2003;59:229-274.
5. Armitage P. Tests for Linear Trends in Proportions and Frequencies. *Biometrics.* Sep., 1955 1955;Vol. 11(No. 3):375-386.
6. Bagley CM, Jr., Devita VT, Jr., Berard CW, Canellos GP. Advanced lymphosarcoma: intensive cyclical combination chemotherapy with cyclophosphamide, vincristine, and prednisone. *Ann Intern Med.* Feb 1972;76(2):227-234.
7. Berinstein NL, Grillo-Lopez AJ, White CA, Bence-Bruckler I, Maloney D, Czuczman M, Green D, Rosenberg J, McLaughlin P, Shen D. Association of serum Rituximab (IDEC-C2B8) concentration and anti-tumor response in the treatment of recurrent low-grade or follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol.* Sep 1998;9(9):995-1001.
8. Bibeau F, Lopez-Crapez E, Di Fiore F, Thezenas S, Ychou M, Blanchard F, Lamy A, Penault-Llorca F, Frebourg T, Michel P, Sabourin JC, Boissiere-Michot F. Impact of Fc{gamma}RIIa-Fc{gamma}RIIIa polymorphisms and KRAS mutations on the clinical outcome of patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab plus irinotecan. *J Clin Oncol.* Mar 1 2009;27(7):1122-1129.
9. Binder M, Otto F, Mertelsmann R, Veelken H, Trepel M. The epitope recognized by rituximab. *Blood.* Sep 15 2006;108(6):1975-1978.
10. Boettcher S, Pott C, Ritgen M, Hiddemann W, Unterhalt M, Kneba M. Evidence for Fc{gamma} Receptor IIIA-Independent Rituximab Effector Mechanisms in Patients with Follicular Lymphoma Treated with Combined

-
- Immuno-Chemotherapy. ASH Annual Meeting Abstracts. November 16 2004;104(11):590.
11. Bonow RO, Bennett S, Casey DE, Jr., Ganiats TG, Hlatky MA, Konstam MA, Lambrew CT, Normand SL, Pina IL, Radford MJ, Smith AL, Stevenson LW, Burke G, Eagle KA, Krumholz HM, Linderbaum J, Masoudi FA, Ritchie JL, Rumsfeld JS, Spertus JA. ACC/AHA Clinical Performance Measures for Adults with Chronic Heart Failure: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Performance Measures (Writing Committee to Develop Heart Failure Clinical Performance Measures): endorsed by the Heart Failure Society of America. *Circulation*. Sep 20 2005;112(12):1853-1887.
 12. Bruhns P, Iannascoli B, England P, Mancardi DA, Fernandez N, Jorieux S, Daron M. Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood*. Apr 16 2009;113(16):3716-3725.
 13. Byrd JC, Kitada S, Flinn IW, Aron JL, Pearson M, Lucas D, Reed JC. The mechanism of tumor cell clearance by rituximab in vivo in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: evidence of caspase activation and apoptosis induction. *Blood*. Feb 1 2002;99(3):1038-1043.
 14. Camilleri-Broet S, Mounier N, Delmer A, Briere J, Casasnovas O, Cassard L, Gaulard P, Christian B, Coiffier B, Sautes-Fridman C. FcγRIIB expression in diffuse large B-cell lymphomas does not alter the response to CHOP+rituximab (R-CHOP). *Leukemia*. Dec 2004;18(12):2038-2040.
 15. Campeau L. Letter: Grading of angina pectoris. *Circulation*. Sep 1976;54(3):522-523.
 16. Carlotti E, Palumbo GA, Oldani E, Acerboni S, Di Raimondo F, Cortelazzo S, Pulsoni A, Barbui T, Foa R, Rambaldi A. Bone Marrow BCL2/IgH+ Cells at Diagnosis and Not FCGR3A Polymorphism Predict Response in Follicular Non-Hodgkin's Lymphoma Patients Treated with Sequential CHOP and Rituximab. ASH Annual Meeting Abstracts. November 16 2005;106(11):985.
 17. Carlotti E, Palumbo GA, Oldani E, Tibullo D, Salmoiraghi S, Rossi A, Golay J, Pulsoni A, Foa R, Rambaldi A. FcγRIIIA and FcγRIIA polymorphisms do not predict clinical outcome of follicular non-Hodgkin's

-
- lymphoma patients treated with sequential CHOP and rituximab. *Haematologica*. Aug 2007;92(8):1127-1130.
18. Cartron G, Dacheux L, Salles G, Solal-Celigny P, Bardos P, Colombat P, Watier H. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood*. Feb 1 2002;99(3):754-758.
 19. Cartron G, Watier H, Golay J, Solal-Celigny P. From the bench to the bedside: ways to improve rituximab efficacy. *Blood*. Nov 1 2004;104(9):2635-2642.
 20. Cartron G, Trappe RU, Solal-Celigny P, Hallek M. Interindividual variability of response to rituximab: from biological origins to individualized therapies. *Clin Cancer Res*. Jan 1 2011;17(1):19-30.
 21. Cassard L, Cohen-Solal J, Camilleri-Broet S, Fournier E, Fridman WH, Sautes-Fridman C. Fc gamma receptors and cancer. *Springer Semin Immunopathol*. Dec 2006;28(4):321-328.
 22. Chow KU, Sommerlad WD, Boehrer S, Schneider B, Seipelt G, Rummel MJ, Hoelzer D, Mitrou PS, Weidmann E. Anti-CD20 antibody (IDEC-C2B8, rituximab) enhances efficacy of cytotoxic drugs on neoplastic lymphocytes in vitro: role of cytokines, complement, and caspases. *Haematologica*. Jan 2002;87(1):33-43.
 23. Clark EA, Shu G, Ledbetter JA. Role of the Bp35 cell surface polypeptide in human B-cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar 1985;82(6):1766-1770.
 24. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med*. Apr 2000;6(4):443-446.
 25. Cohen-Solal JF, Cassard L, Fridman WH, Sautes-Fridman C. Fc gamma receptors. *Immunol Lett*. Apr 15 2004;92(3):199-205.
 26. Coiffier B, Haioun C, Ketterer N, Engert A, Tilly H, Ma D, Johnson P, Lister A, Feuring-Buske M, Radford JA, Capdeville R, Diehl V, Reyes F. Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) for the treatment of patients with relapsing or refractory aggressive lymphoma: a multicenter phase II study. *Blood*. Sep 15 1998;92(6):1927-1932.
 27. Coiffier B, Lepage E, Briere J, Herbrecht R, Tilly H, Bouabdallah R, Morel P, Van Den Neste E, Salles G, Gaulard P, Reyes F, Lederlin P, Gisselbrecht C.

-
- CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med.* Jan 24 2002;346(4):235-242.
28. Czuczman MS, Grillo-Lopez AJ, White CA, Saleh M, Gordon L, LoBuglio AF, Jonas C, Klippenstein D, Dallaire B, Varns C. Treatment of patients with low-grade B-cell lymphoma with the combination of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody and CHOP chemotherapy. *J Clin Oncol.* Jan 1999;17(1):268-276.
 29. Dall'Ozzo S, Andres C, Bardos P, Watier H, Thibault G. Rapid single-step FCGR3A genotyping based on SYBR Green I fluorescence in real-time multiplex allele-specific PCR. *J Immunol Methods.* Jun 1 2003;277(1-2):185-192.
 30. Dall'Ozzo S, Tartas S, Paintaud G, Cartron G, Colombat P, Bardos P, Watier H, Thibault G. Rituximab-dependent cytotoxicity by natural killer cells: influence of FCGR3A polymorphism on the concentration-effect relationship. *Cancer Res.* Jul 1 2004;64(13):4664-4669.
 31. de Vries E, Koene HR, Vossen JM, Gratama JW, von dem Borne AE, Waaijer JL, Haraldsson A, de Haas M, van Tol MJ. Identification of an unusual Fc gamma receptor IIIa (CD16) on natural killer cells in a patient with recurrent infections. *Blood.* Oct 15 1996;88(8):3022-3027.
 32. Demidem A, Lam T, Alas S, Hariharan K, Hanna N, Bonavida B. Chimeric anti-CD20 (IDEC-C2B8) monoclonal antibody sensitizes a B cell lymphoma cell line to cell killing by cytotoxic drugs. *Cancer Biother Radiopharm.* Jun 1997;12(3):177-186.
 33. Devesa SS, Fears T. Non-Hodgkin's lymphoma time trends: United States and international data. *Cancer Res.* Oct 1 1992;52(19 Suppl):5432s-5440s.
 34. Dornan D, Spleiss O, Yeh RF, Duchateau-Nguyen G, Dufour A, Zhi J, Robak T, Moiseev SI, Dmoszynska A, Solal-Celigny P, Warzocha K, Loscertales J, Catalano J, Afanasiev BV, Larratt L, Rossiev VA, Bence-Bruckler I, Geisler CH, Montillo M, Wenger MK, Weissner M. Effect of FCGR2A and FCGR3A variants on CLL outcome. *Blood.* Nov 18 2010;116(20):4212-4222.
 35. Einfeld DA, Brown JP, Valentine MA, Clark EA, Ledbetter JA. Molecular cloning of the human B cell CD20 receptor predicts a hydrophobic protein with multiple transmembrane domains. *Embo J.* Mar 1988;7(3):711-717.

-
36. Ernst JA, Li H, Kim HS, Nakamura GR, Yansura DG, Vandlen RL. Isolation and characterization of the B-cell marker CD20. *Biochemistry*. Nov 22 2005;44(46):15150-15158.
 37. Fabisiewicz A, Paszkiewicz-Kozik E, Osowiecki M, Walewski J, Siedlecki JA. FcγRIIA and FcγRIIIA polymorphisms do not influence survival and response to rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone immunochemotherapy in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*. Aug 2011;52(8):1604-1606.
 38. Farag SS, Flinn IW, Modali R, Lehman TA, Young D, Byrd JC. FcγRIIIa and FcγRIIa polymorphisms do not predict response to rituximab in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. Feb 15 2004;103(4):1472-1474.
 39. Feuring-Buske M, Kneba M, Unterhalt M, Engert A, Gramatzki M, Hiller E, Trumper L, Brugger W, Ostermann H, Atzpodien J, Hallek M, Aulitzky E, Hiddemann W. IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 antibody treatment in relapsed advanced-stage follicular lymphomas: results of a phase-II study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Annals of hematology*. Sep 2000;79(9):493-500.
 40. Fisher RI, Gaynor ER, Dahlborg S, Oken MM, Grogan TM, Mize EM, Glick JH, Coltman CA, Jr., Miller TP. Comparison of a standard regimen (CHOP) with three intensive chemotherapy regimens for advanced non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. Apr 8 1993;328(14):1002-1006.
 41. Förster T. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik*. 1948;437(1-2):55-75.
 42. Ghesquieres H, Cartron G, Seymour JF, Delfau-Larue MH, Offner F, Soubeyran P, Perrot A, Brice P, Bouabdallah R, Sonet A, Dupuis J, Casasnovas O, Catalano JV, Delmer A, Jardin F, Verney A, Dartigues P, Salles G. Clinical outcome of patients with follicular lymphoma receiving chemoimmunotherapy in the PRIMA study is not affected by FCGR3A and FCGR2A polymorphisms. *Blood*. Sep 27 2012;120(13):2650-2657.
 43. Golay J, Zaffaroni L, Vaccari T, Lazzari M, Borleri GM, Bernasconi S, Tedesco F, Rambaldi A, Introna M. Biologic response of B lymphoma cells to anti-CD20 monoclonal antibody rituximab in vitro: CD55 and CD59 regulate complement-mediated cell lysis. *Blood*. Jun 15 2000;95(12):3900-3908.

-
44. Golay JT, Clark EA, Beverley PC. The CD20 (Bp35) antigen is involved in activation of B cells from the G0 to the G1 phase of the cell cycle. *J Immunol.* Dec 1985;135(6):3795-3801.
 45. Gordon LI, Harrington D, Andersen J, Colgan J, Glick J, Neiman R, Mann R, Resnick GD, Barcos M, Gottlieb A, et al. Comparison of a second-generation combination chemotherapeutic regimen (m-BACOD) with a standard regimen (CHOP) for advanced diffuse non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med.* Nov 5 1992;327(19):1342-1349.
 46. Habermann TM, Weller EA, Morrison VA, Gascoyne RD, Cassileth PA, Cohn JB, Dakhil SR, Woda B, Fisher RI, Peterson BA, Horning SJ. Rituximab-CHOP versus CHOP alone or with maintenance rituximab in older patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol.* Jul 1 2006;24(19):3121-3127.
 47. Harjunpaa A, Junnikkala S, Meri S. Rituximab (anti-CD20) therapy of B-cell lymphomas: direct complement killing is superior to cellular effector mechanisms. *Scand J Immunol.* Jun 2000;51(6):634-641.
 48. Hartge P, Devesa SS. Quantification of the impact of known risk factors on time trends in non-Hodgkin's lymphoma incidence. *Cancer Res.* Oct 1 1992;52(19 Suppl):5566s-5569s.
 49. Hartmann F, Schmits R, Pfreundschuh M. Neue Chancen für ältere Patienten mit aggressiven Lymphomen: In Deutschland zu selten genutzt? *Deutsches Ärzteblatt.* 2002 2002;99:(48):3254–3264.
 50. Hogarth PM. Fc receptors are major mediators of antibody based inflammation in autoimmunity. *Curr Opin Immunol.* Dec 2002;14(6):798-802.
 51. Idusogie EE, Presta LG, Gazzano-Santoro H, Totpal K, Wong PY, Ultsch M, Meng YG, Mulkerrin MG. Mapping of the C1q binding site on rituxan, a chimeric antibody with a human IgG1 Fc. *J Immunol.* Apr 15 2000;164(8):4178-4184.
 52. Ihaka R, Gentleman R. R: A Language for Data Analysis and Graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics.* 1996/09/01 1996;5(3):299-314.
 53. Indik ZK, Hunter S, Huang MM, Pan XQ, Chien P, Kelly C, Levinson AI, Kimberly RP, Schreiber AD. The high affinity Fc gamma receptor (CD64) induces phagocytosis in the absence of its cytoplasmic domain: the gamma

-
- subunit of Fc gamma RIIIA imparts phagocytic function to Fc gamma RI. *Exp Hematol.* Jul 1994;22(7):599-606.
54. Jazirehi AR, Bonavida B. Cellular and molecular signal transduction pathways modulated by rituximab (rituxan, anti-CD20 mAb) in non-Hodgkin's lymphoma: implications in chemosensitization and therapeutic intervention. *Oncogene.* Mar 24 2005;24(13):2121-2143.
55. Jiang XM, Arepally G, Poncz M, McKenzie SE. Rapid detection of the Fc gamma RIIA-H/R 131 ligand-binding polymorphism using an allele-specific restriction enzyme digestion (ASRED). *J Immunol Methods.* Nov 29 1996;199(1):55-59.
56. Jones SE, Rosenberg SA, Kaplan HS, Kadin ME, Dorfman RF. Non-Hodgkin's lymphomas. II. Single agent chemotherapy. *Cancer.* Jul 1972;30(1):31-38.
57. Karnofsky DA, Burchenal JH. The clinical evaluation of chemotherapeutic agents in cancer. New York, NY: Columbia University Press; 1949:196.
58. Kim DH, Jung HD, Kim JG, Lee JJ, Yang DH, Park YH, Do YR, Shin HJ, Kim MK, Hyun MS, Sohn SK. FCGR3A gene polymorphisms may correlate with response to frontline R-CHOP therapy for diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* Oct 15 2006;108(8):2720-2725.
59. Koene HR, Kleijer M, Algra J, Roos D, von dem Borne AE, de Haas M. Fc gammaRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc gammaRIIIa, independently of the Fc gammaRIIIa-48L/R/H phenotype. *Blood.* Aug 1 1997;90(3):1109-1114.
60. Kutuyavin IV, Lukhtanov EA, Gamper HB, Meyer RB. Oligonucleotides with conjugated dihydropyrroloindole tripeptides: base composition and backbone effects on hybridization. *Nucleic Acids Res.* Sep 15 1997;25(18):3718-3723.
61. Lakowicz JR. Energy transfer. In *Principles of fluorescent spectroscopy.* New York: Springer US; 1983.
62. Levy D, Bellesso M, Oliveira-Souza P, Maciel FV, Pereira J, Bydlowski SP. The H/R Fc gamma RIIA-131 polymorphism and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) treated with R-CHOP: a study in a genetically mixed population. *Clinics (Sao Paulo).* 2011;66(5):919-922.
63. Li X, Ptacek TS, Brown EE, Edberg JC. Fc gamma receptors: structure, function and role as genetic risk factors in SLE. *Genes Immun.* Jul 2009;10(5):380-389.

-
64. Lister TA, Crowther D, Sutcliffe SB, Glatstein E, Canellos GP, Young RC, Rosenberg SA, Coltman CA, Tubiana M. Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease: Cotswolds meeting. *J Clin Oncol*. Nov 1989;7(11):1630-1636.
 65. Livak KJ. Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. *Genet Anal*. Feb 1999;14(5-6):143-149.
 66. Luce JK, Gamble JF, Wilson HE, Monto RW, Isaacs BL, Palmer RL, Coltman CA, Jr., Hewlett JS, Gehan EA, Frei E, 3rd. Combined cyclophosphamide vincristine, and prednisone therapy of malignant lymphoma. *Cancer*. Aug 1971;28(2):306-317.
 67. Maloney DG, Liles TM, Czerwinski DK, Waldichuk C, Rosenberg J, Grillo-Lopez A, Levy R. Phase I clinical trial using escalating single-dose infusion of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8) in patients with recurrent B-cell lymphoma. *Blood*. Oct 15 1994;84(8):2457-2466.
 68. Maloney DG, Grillo-Lopez AJ, White CA, Bodkin D, Schilder RJ, Neidhart JA, Janakiraman N, Foon KA, Liles TM, Dallaire BK, Wey K, Royston I, Davis T, Levy R. IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. Sep 15 1997;90(6):2188-2195.
 69. Martelli M, Ferreri AJ, Agostinelli C, Di Rocco A, Pfreundschuh M, Pileri SA. Diffuse large B-cell lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol*. Aug 2013;87(2):146-171.
 70. Masuda K, Kubota T, Kaneko E, Iida S, Wakitani M, Kobayashi-Natsume Y, Kubota A, Shitara K, Nakamura K. Enhanced binding affinity for FcγRIIIa of fucose-negative antibody is sufficient to induce maximal antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Mol Immunol*. May 2007;44(12):3122-3131.
 71. Masuda M, Roos D. Association of all three types of Fc gamma R (CD64, CD32, and CD16) with a gamma-chain homodimer in cultured human monocytes. *J Immunol*. Dec 15 1993;151(12):7188-7195.
 72. McKelvey EM, Gottlieb JA, Wilson HE, Haut A, Talley RW, Stephens R, Lane M, Gamble JF, Jones SE, Grozea PN, Gutterman J, Coltman C, Moon TE. Hydroxyldaunomycin (Adriamycin) combination chemotherapy in malignant lymphoma. *Cancer*. Oct 1976;38(4):1484-1493.

-
73. McLaughlin P, Grillo-Lopez AJ, Link BK, Levy R, Czuczman MS, Williams ME, Heyman MR, Bence-Bruckler I, White CA, Cabanillas F, Jain V, Ho AD, Lister J, Wey K, Shen D, Dallaire BK. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol.* Aug 1998;16(8):2825-2833.
 74. Minard-Colin V, Xiu Y, Poe JC, Horikawa M, Magro CM, Hamaguchi Y, Haas KM, Tedder TF. Lymphoma depletion during CD20 immunotherapy in mice is mediated by macrophage FcγRI, FcγRIII, and FcγRIV. *Blood.* Aug 15 2008;112(4):1205-1213.
 75. Mitrovic Z, Aurer I, Radman I, Ajdukovic R, Sertic J, Labar B. FCγRIIIA and FCγRIIA polymorphisms are not associated with response to rituximab and CHOP in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica.* Jul 2007;92(7):998-999.
 76. Morgan AW, Barrett JH, Griffiths B, Subramanian D, Robinson JI, Keyte VH, Ali M, Jones EA, Old RW, Ponchel F, Boylston AW, Situnayake RD, Markham AF, Emery P, Isaacs JD. Analysis of Fcγ receptor haplotypes in rheumatoid arthritis: FCGR3A remains a major susceptibility gene at this locus, with an additional contribution from FCGR3B. *Arthritis Res Ther.* 2006;8(1):R5.
 77. Morgan G, Vornanen M, Puitinen J, Naukkarinen A, Brincker H, Olsen J, Coeburgh JW, Vrints LW, Clayden D, McNally R, Jack A, Carli PM, Petrella T, Tomino R, D'Lollo S, Barchielli A, Cartwright R. Changing trends in the incidence of non-Hodgkin's lymphoma in Europe. Biomed Study Group. *Ann Oncol.* 1997;8 Suppl 2:49-54.
 78. Morton LM, Wang SS, Devesa SS, Hartge P, Weisenburger DD, Linet MS. Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. *Blood.* Jan 1 2006;107(1):265-276.
 79. Mossner E, Brunker P, Moser S, Puntener U, Schmidt C, Herter S, Grau R, Gerdes C, Nopora A, van Puijenbroek E, Ferrara C, Sondermann P, Jager C, Strein P, Fertig G, Friess T, Schull C, Bauer S, Dal Porto J, Del Nagro C, Dabbagh K, Dyer MJ, Poppema S, Klein C, Umana P. Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. *Blood.* Jun 3 2010;115(22):4393-4402.

-
80. Muller C, Murawski N, Wiesen MH, Held G, Poeschel V, Zeynalova S, Wenger M, Nickenig C, Peter N, Lengfelder E, Metzner B, Rixecker T, Zwick C, Pfreundschuh M, Reiser M. The role of sex and weight on rituximab clearance and serum elimination half-life in elderly patients with DLBCL. *Blood*. Apr 5 2012;119(14):3276-3284.
 81. Nadler LM, Ritz J, Hardy R, Pesando JM, Schlossman SF, Stashenko P. A unique cell surface antigen identifying lymphoid malignancies of B cell origin. *J Clin Invest*. Jan 1981;67(1):134-140.
 82. Norris CF, Pricop L, Millard SS, Taylor SM, Surrey S, Schwartz E, Salmon JE, McKenzie SE. A naturally occurring mutation in Fc gamma RIIA: a Q to K127 change confers unique IgG binding properties to the R131 allelic form of the receptor. *Blood*. Jan 15 1998;91(2):656-662.
 83. Oettgen HC, Bayard PJ, Van Ewijk W, Nadler LM, Terhorst CP. Further biochemical studies of the human B-cell differentiation antigens B1 and B2. *Hybridoma*. 1983;2(1):17-28.
 84. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, Carbone PP. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol*. Dec 1982;5(6):649-655.
 85. Okroj M, Osterborg A, Blom AM. Effector mechanisms of anti-CD20 monoclonal antibodies in B cell malignancies. *Cancer Treat Rev*. Dec 5 2012.
 86. Pan L, Pei P. Signaling transduction by IgG receptors. *Chin Med J (Engl)*. Apr 2003;116(4):487-494.
 87. Park JG, Murray RK, Chien P, Darby C, Schreiber AD. Conserved cytoplasmic tyrosine residues of the gamma subunit are required for a phagocytic signal mediated by Fc gamma RIIIA. *J Clin Invest*. Oct 1993;92(4):2073-2079.
 88. Park SI, Lucas AS, Kingberg M, Moore D, Chiu M, Misher AMD, Hoskins J, Dunphy CH, McLeod HL, Richards KL. The Predictive Value of FCGR3A Polymorphism on Clinical Outcomes of Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated with R-CHOP Chemotherapy. *ASH Annual Meeting Abstracts*. November 18 2011;118(21):89.
 89. Pfreundschuh M, Trumper L, Osterborg A, Pettengell R, Trneny M, Imrie K, Ma D, Gill D, Walewski J, Zinzani PL, Stahel R, Kvaloy S, Shpilberg O, Jaeger U, Hansen M, Lehtinen T, Lopez-Guillermo A, Corrado C, Scheliga A, Milpied N, Mendila M, Rashford M, Kuhnt E, Loeffler M. 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.* May 2006;7(5):379-391.
90. Pfreundschuh M, Ho AD, Cavallin-Stahl E, Wolf M, Pettengell R, Vasova I, Belch A, Walewski J, Zinzani PL, Mingrone W, Kvaloy S, Shpilberg O, Jaeger U, Hansen M, Corrado C, Scheliga A, Loeffler M, Kuhnt E. Prognostic significance of maximum tumour (bulk) diameter in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma treated with CHOP-like chemotherapy with or without rituximab: an exploratory analysis of the MabThera International Trial Group (MInT) study. *Lancet Oncol.* May 2008;9(5):435-444.
91. Pfreundschuh M, Schubert J, Ziepert M, Schmits R, Mohren M, Lengfelder E, Reiser M, Nickenig C, Clemens M, Peter N, Bokemeyer C, Eimermacher H, Ho A, Hoffmann M, Mertelsmann R, Trumper L, Balleisen L, Liersch R, Metzner B, Hartmann F, Glass B, Poeschel V, Schmitz N, Ruebe C, Feller AC, Loeffler M. Six versus eight cycles of bi-weekly CHOP-14 with or without rituximab in elderly patients with aggressive CD20+ B-cell lymphomas: a randomised controlled trial (RICOVER-60). *Lancet Oncol.* Feb 2008;9(2):105-116.
92. Pfreundschuh M, Zeynalova S, Poeschel V, Haenel M, Schmitz N, Ho AD, Reiser M, Loeffler M, Schubert J. Improved outcome of elderly patients with poor-prognosis diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) after dose-dense rituximab: Results of the DENSE-R-CHOP-14 trial of the German High-Grade Non-Hodgkin Lymphoma Study Group (DSHNHL). *J Clin Oncol.* 2008 2008;26(2008 (May 20 suppl)):abstr 8508.
93. Pfreundschuh M, Muller C, Zeynalova S, Kuhnt E, Wiesen M, Held G, Rixecker T, Poeschel V, Zwick C, Reiser M, Schmitz N, Murawski N. Suboptimal dosing of rituximab in male and female patients with DLBCL. *Blood.* Dec 2 2013.
94. Plosker GL, Figgitt DP. Rituximab: a review of its use in non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia. *Drugs.* 2003;63(8):803-843.

-
95. Press OW, Appelbaum F, Ledbetter JA, Martin PJ, Zarling J, Kidd P, Thomas ED. Monoclonal antibody 1F5 (anti-CD20) serotherapy of human B cell lymphomas. *Blood*. Feb 1987;69(2):584-591.
 96. Reff ME, Carner K, Chambers KS, Chinn PC, Leonard JE, Raab R, Newman RA, Hanna N, Anderson DR. Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood*. Jan 15 1994;83(2):435-445.
 97. Rehm H, Hammar F. *Biochemie light: Harri Deutsch*; 2008.
 98. Reiser M, Wenger MK, Nickenig C, Peter N, Kuhn C, Metzner B, Theisohn M, Pfreundschuh M. Serum Levels and Pharmacokinetic of Rituximab in Bi-Weekly R-CHOP in Elderly Patients with DLBCL Treated in the RICOVER-60 Trial. *ASH Annual Meeting Abstracts*. November 16 2006;108(11):2748.
 99. Rossi D, Rasi S, Franceschetti S, Capello D, Castelli A, De Paoli L, Ramponi A, Chiappella A, Pogliani EM, Vitolo U, Kwee I, Bertoni F, Conconi A, Gaidano G. Analysis of the host pharmacogenetic background for prediction of outcome and toxicity in diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP21. *Leukemia*. Jun 2009;23(6):1118-1126.
 100. Sacchi S, Federico M, Dastoli G, Fiorani C, Vinci G, Clo V, Casolari B. Treatment of B-cell non-Hodgkin's lymphoma with anti CD 20 monoclonal antibody Rituximab. *Crit Rev Oncol Hematol*. Jan 2001;37(1):13-25.
 101. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. Dec 20 1985;230(4732):1350-1354.
 102. Salmon JE, Brogle NL, Edberg JC, Kimberly RP. Fc gamma receptor III induces actin polymerization in human neutrophils and primes phagocytosis mediated by Fc gamma receptor II. *J Immunol*. Feb 1 1991;146(3):997-1004.
 103. Salmon JE, Edberg JC, Brogle NL, Kimberly RP. Allelic polymorphisms of human Fc gamma receptor IIA and Fc gamma receptor IIIB. Independent mechanisms for differences in human phagocyte function. *J Clin Invest*. Apr 1992;89(4):1274-1281.
 104. Schmitz N, Nickelsen M, Ziepert M, Haenel M, Borchmann P, Viardot A, Nickenig C, Bentz M, Peschel C, Trumper L, Loeffler M, Pfreundschuh M, Glass B. Aggressive Chemotherapy (CHOEP-14) and Rituximab or High-Dose Therapy (MegaCHOEP) and Rituximab for Young, High-Risk Patients with

-
- Aggressive B-Cell Lymphoma: Results of the MegaCHOEP Trial of the German High -- Grade Non-Hodgkin Lymphoma Study Group (DSHNHL). ASH Annual Meeting Abstracts. November 20 2009;114(22):404-.
105. Schmoll HJ. Kompendium Internistische Onkologie: Standards in Diagnostik und Therapie: Springer-Verlag GmbH; 2006.
 106. Shan D, Ledbetter JA, Press OW. Apoptosis of malignant human B cells by ligation of CD20 with monoclonal antibodies. *Blood*. Mar 1 1998;91(5):1644-1652.
 107. Shan D, Ledbetter JA, Press OW. Signaling events involved in anti-CD20-induced apoptosis of malignant human B cells. *Cancer Immunol Immunother*. Mar 2000;48(12):673-683.
 108. Shibata-Koyama M, Iida S, Misaka H, Mori K, Yano K, Shitara K, Satoh M. Nonfucosylated rituximab potentiates human neutrophil phagocytosis through its high binding for FcγRIIIb and MHC class II expression on the phagocytotic neutrophils. *Exp Hematol*. Mar 2009;37(3):309-321.
 109. Shields RL, Namenuk AK, Hong K, Meng YG, Rae J, Briggs J, Xie D, Lai J, Stadlen A, Li B, Fox JA, Presta LG. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for FcγRI, FcγRII, FcγRIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the FcγR. *J Biol Chem*. Mar 2 2001;276(9):6591-6604.
 110. Shipp MA. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *N Engl J Med*. Sep 30 1993;329(14):987-994.
 111. Stashenko P, Nadler LM, Hardy R, Schlossman SF. Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen. *J Immunol*. Oct 1980;125(4):1678-1685.
 112. Stern C. The Hardy-Weinberg Law. *Science*. Feb 5 1943;97(2510):137-138.
 113. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth Edition. WHO/ IARC (International Agency for Research on Cancer) - Classification of Tumours. 2008 2008;Volume 2:441.
 114. Tedder TF, Boyd AW, Freedman AS, Nadler LM, Schlossman SF. The B cell surface molecule B1 is functionally linked with B cell activation and differentiation. *J Immunol*. Aug 1985;135(2):973-979.

-
115. Tedder TF, Engel P. CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes. *Immunol Today*. Sep 1994;15(9):450-454.
 116. Theodossiou C, Schwarzenberger P. Non-Hodgkin's lymphomas. *Clin Obstet Gynecol*. Sep 2002;45(3):820-829.
 117. Tilly H, Mounier N, Lederlin P, Briere J, Dupriez B, Sebban C, Bosly A, Biron P, Nouvel C, Herbrecht R, Bordessoule D, Coiffier B. Randomized comparison of ACVBP and m-BACOD in the treatment of patients with low-risk aggressive lymphoma: the LNH87-1 study. Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol*. Mar 2000;18(6):1309-1315.
 118. Tilly H, Lepage E, Coiffier B, Blanc M, Herbrecht R, Bosly A, Attal M, Fillet G, Guettier C, Molina TJ, Gisselbrecht C, Reyes F. Intensive conventional chemotherapy (ACVBP regimen) compared with standard CHOP for poor-prognosis aggressive non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. Dec 15 2003;102(13):4284-4289.
 119. Tirelli U, Errante D, Van Glabbeke M, Teodorovic I, Kluin-Nelemans JC, Thomas J, Bron D, Rosti G, Somers R, Zagonel V, Noordijk EM. CHOP is the standard regimen in patients \geq 70 years of age with intermediate-grade and high-grade non-Hodgkin's lymphoma: results of a randomized study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Lymphoma Cooperative Study Group. *J Clin Oncol*. Jan 1998;16(1):27-34.
 120. Treon SP, Hansen M, Branagan AR, Verselis S, Emmanouilides C, Kimby E, Frankel SR, Touroutoglou N, Turnbull B, Anderson KC, Maloney DG, Fox EA. Polymorphisms in Fc γ R3A (CD16) receptor expression are associated with clinical response to rituximab in Waldenstrom's macroglobulinemia. *J Clin Oncol*. Jan 20 2005;23(3):474-481.
 121. van Sorge NM, van der Pol WL, van de Winkel JG. Fc γ R polymorphisms: Implications for function, disease susceptibility and immunotherapy. *Tissue Antigens*. Mar 2003;61(3):189-202.
 122. Varoczy L, Zilahi E, Gyetvai A, Kajtar B, Gergely L, Sipka S, Illes A. Fc γ -receptor IIIa polymorphism and gene expression profile do not predict the prognosis in diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP protocol. *Pathol Oncol Res*. Jan 2012;18(1):43-48.
 123. Vose JM, Link BK, Grossbard ML, Czuczman M, Grillo-Lopez A, Gilman P, Lowe A, Kunkel LA, Fisher RI. Phase II study of rituximab in combination with

-
- chop chemotherapy in patients with previously untreated, aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. Jan 15 2001;19(2):389-397.
124. Warmerdam PA, van de Winkel JG, Vlug A, Westerdaal NA, Capel PJ. A single amino acid in the second Ig-like domain of the human Fc gamma receptor II is critical for human IgG2 binding. *J Immunol*. Aug 15 1991;147(4):1338-1343.
125. Weng WK, Levy R. Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol*. Nov 1 2003;21(21):3940-3947.
126. Weng WK, Levy R. Immunoglobulin G Fc receptor polymorphisms do not correlate with response to chemotherapy or clinical course in patients with follicular lymphoma. *Leuk Lymphoma*. Sep 2009;50(9):1494-1500.
127. Weng WK, Levy R. Genetic polymorphism of the inhibitory IgG Fc receptor FcgammaRIIb is not associated with clinical outcome in patients with follicular lymphoma treated with rituximab. *Leuk Lymphoma*. May 2009;50(5):723-727.
128. Wilmanns W, Wilms K, Rajewsky MF, Klein HO, Lennartz KJ, Hirschmann WD, Oerkermann H, Gross R, Freireich E, Bodey G, McCredie K, Hart J, Whitecar J, Jr., Hersh E, Martin H, Fischer M, Schubert JCF, Fülle HH, Pribilla W, Lang HD, Riehm H, Gadner H, Jessenberger K, Odenwald E, Tariverdian G, Vortisch M, Stück B, Simon A, Obrecht P, Hennekeuser HH, Westerhausen M, Sodomann CP, Malchow H, Schmidt M, Havemann K, Brüster H, Aust C, Boll I, Mathé G, Schoen HD, Mayer G, Mayer S, Kalogjera V, Krepler P, Biskamp K, Stille W, Brücher H, Kirstaedter HJ, Rühl H, Dietrich M, Fliedner TM, Kubanek B, Heimpel H, Scholz N, Brittinger G, Linzenmeier G, König E, Wendt F, Mueller-Eckhardt C, Kretschmer V, Heinrich D, Kwapisz A, Adam W, Marcard E, Flad HD. Therapie. In: Gross R, Loo J, eds. *Leukämie*: Springer Berlin Heidelberg; 1972:459-693.
129. Wu J, Edberg JC, Redecha PB, Bansal V, Guyre PM, Coleman K, Salmon JE, Kimberly RP. A novel polymorphism of FcgammaRIIIa (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease. *J Clin Invest*. Sep 1 1997;100(5):1059-1070.
130. Yi PI, Coleman M, Saltz L, Norton L, Topilow AA, Adler K, Bernhardt B. Chemotherapy for large cell lymphoma: a status update. *Semin Oncol*. Feb 1990;17(1):60-73.

-
131. Zhang W, Gordon M, Schultheis AM, Yang DY, Nagashima F, Azuma M, Chang HM, Borucka E, Lurje G, Sherrod AE, Iqbal S, Groshen S, Lenz HJ. FCGR2A and FCGR3A polymorphisms associated with clinical outcome of epidermal growth factor receptor expressing metastatic colorectal cancer patients treated with single-agent cetuximab. *J Clin Oncol.* Aug 20 2007;25(24):3712-3718.

6.5. Publikationen

- I. Preuss KD, Pfreunds Schuh M, Fadle N, Regitz E, Raudies S, Murwaski N, Ahlgrimm M, Bittenbring J, Klotz M, Schafer KH, Held G, Neumann F, Grass S. Hyperphosphorylation of autoantigenic targets of paraproteins is due to inactivation of PP2A. *Blood*. September 2011;118(12):3340-3346.
- II. Grass S, Preuss K-D, Wikowicz A, Terpos E, Ziepert M, Ahlgrimm M, Fadle N, Regitz E, Murawski N, Dimopoulos MA, Treon SP, Hunter Z, Pfreunds Schuh M. Hyperphosphorylated Paratarg-7 Is a Frequent Antigenic Target of IgM Paraproteins, Is Dominantly Inherited and Represents a Highly Significant Risk Factor for Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance of the IgM Type (IgM-MGUS) and Waldenstrom's Macroglobulinemia (WM), Allowing for the Identification of Family Members at Risk in Cases of Familial IgM-MGUS and WM. *ASH Annual Meeting Abstracts*. November 2009;114(22):3935.
- III. Grass S, Preuss KD, Ahlgrimm M, Fadle N, Regitz E, Pfoehler C, Murawski N, Pfreunds Schuh M. Association of a dominantly inherited hyperphosphorylated paraprotein target with sporadic and familial multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance: a case-control study. *Lancet Oncol*. October 2009;10(10):950-956.
- IV. Zwick C, Preuss KD, Kubuschok B, Held G, Ahlgrimm M, Bittenbring J, Schubert J, Neumann F, Pfreunds Schuh M. Analysis of the antibody repertoire of patients with mantle cell lymphoma directed against mantle cell lymphoma-associated antigens. *Ann Hematol*. October 2009;88(10):999-1003.
- V. Zwick C, Held G, Hammermeister V, Alahmad A, Kubuschok B, Bittenbring J, Ahlgrimm M, Neumann F, Preuss KD, Pfreunds Schuh M. Spontaneous high-titered IgG antibody responses against BCL-2 in patients with aggressive lymphomas. *J Cancer Res Clin Oncol*. September 2009;135(9):1207-1213.
- VI. Preuss KD, Pfreunds Schuh M, Ahlgrimm M, Fadle N, Regitz E, Murawski N, Grass S. A frequent target of paraproteins in the sera of patients with multiple myeloma and MGUS. *Int J Cancer*. August 2009;125(3):656-661.
- VII. Bittenbring JT, Ahlgrimm M, Ditschkowski M, Neumann F, Schubert J, Preuss K-D, Beelen DW, Pfreunds Schuh M. Identification of New Minor Histocompatibility Antigens (mHags) in Patients with Chronic Graft Versus Host Disease (GvH) after Allogeneic Stem Cell Transplantation by SEREX. *ASH Annual Meeting Abstracts*. November 2008;112(11):2198.

-
- VIII. Kilian M, Gregor JI, Heukamp I, Hanel M, Ahlgrimm M, Schimke I, Kristiansen G, Ommer A, Walz MK, Jacobi CA, Wenger FA. Matrix metalloproteinase inhibitor RO 28-2653 decreases liver metastasis by reduction of MMP-2 and MMP-9 concentration in BOP-induced ductal pancreatic cancer in Syrian Hamsters: inhibition of matrix metalloproteinases in pancreatic cancer. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. December 2006;75(6):429-434.

6.6. Danksagung

Wie jede wissenschaftliche Arbeit ist auch diese Dissertation nicht das Werk einer einzelnen Person, ich möchte mich daher bei allen Menschen bedanken, die mir bei der Erstellung dieser Promotion geholfen und möglich gemacht haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater und Chef Herrn Professor Dr. med. M. Pfreundschuh, der mich zu jeder Zeit der Dissertation mit seinem unerschöpflichen Ideenreichtum motiviert, unterstützt, herausgefordert und gefördert hat.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. Klaus-Dieter Preuss und Frau Evi Regitz im José-Carreras-Zentrum, die mir von den Anfängen bis zu dem Abschluss dieser Promotion mit Hilfestellungen zur Verfügung standen.

Vielen Dank an Herrn Markus Kreuz für seine statistischen Analysen und Ausarbeitungen.

Ebenso möchte ich Herrn Dr. Carsten Zwick für seinen Rückhalt und die moralische Unterstützung danken.

Nicht minder aufreibend waren die vergangenen Jahre für Veronique Mootz, die dieses Werk in allen Phasen mit jeder möglichen Unterstützung bedacht hat. Ihr gilt mein liebevoller Dank.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern für die Ermöglichung meiner Ausbildung danken. Ohne sie wäre das alles gar nicht erst möglich gewesen. Ihre Unterstützung und Aufbau in den Jahren haben den Grundstein hierfür gelegt.