

**Rolle des TNF-Familienmitgliedes BAFF und seiner  
Neutralisation durch Belimumab für die  
Suszeptibilität von CLL-Zellen gegenüber NK-  
Zellyse und Systemtherapie**

**Dissertation**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität Tübingen  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von  
Julia Wild  
aus Nürnberg

Tübingen  
2016

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:	21.09.2016
Dekan:	Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Helmut R. Salih

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
1 Zusammenfassung.....	5
2 Einleitung.....	6
2.1 Das Immunsystem.....	6
2.2 Die Immunreaktion gegen Tumoren.....	8
2.3 Natürliche Killerzellen (NK-Zellen).....	11
2.4 Die Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Familie.....	16
2.5 Chronisch Lymphatische Leukämie (CLL).....	23
2.6 NK-Zell-vermittelte Immunüberwachung maligner hämatopoetischer Neoplasien.....	28
3 Material und Methoden.....	30
3.1 Material.....	30
3.2 Methoden.....	36
4 Ergebnisse.....	49
4.1 Expression von BAFF und APRIL in NK-Zellen.....	49
4.2 Einfluss von BAFF auf die Immunevasion von CLL-Zellen vor der NK-Zell-vermittelten Immunüberwachung.....	59
4.3 Einfluss von BAFF auf die Suszeptibilität von CLL-Zellen für Systemtherapeutika.....	75
4.4 Einfluss einer BAFF-Neutralisation mit Belimumab auf die Suszeptibilität von CLL-Zellen für NK-Lyse und Systemtherapeutika.....	78
5 Diskussion.....	84
6 Literaturverzeichnis.....	91
7 Anhang.....	107
7.1 Abkürzungsverzeichnis.....	107
7.2 Tabellenverzeichnis.....	110

7.3	Abbildungsverzeichnis .....	111
7.4	Eigenanteil.....	113
7.6	Eigene Publikationen .....	114
7.7	Danksagung .....	115

## 1 Zusammenfassung

Natürliche Killer (NK)-Zellen sind zytotoxische Lymphozyten der angeborenen Immunität, die eine wichtige Rolle bei der Immunüberwachung von Tumoren, insbesondere von malignen hämatopoetischen Neoplasien, spielen. Aufgrund ihrer Fähigkeit nach Fc-Rezeptorstimulation *antibody dependent cellular cytotoxicity* (ADCC) zu vermitteln, tragen sie maßgeblich zum therapeutischen Erfolg von anti-Tumor Antikörpern, wie z.B. Rituximab, bei. Letzterer ist mittlerweile ein essentieller Bestandteil der meisten Behandlungsstrategien von B-Zell Malignomen. Während der letzten Jahre berichteten jedoch zahlreiche Studien darüber, dass in Patienten mit Chronisch Lymphatischer Leukämie (CLL) die Fähigkeit von NK-Zellen, maligne Zellen direkt zu lysieren oder Rituximab-induzierte ADCC zu vermitteln, beeinträchtigt ist. Die Mechanismen, die diesen Beobachtungen zu Grunde liegen, sind bis heute weitgehend unbekannt. In dieser Arbeit konnte nun das TNF-Familienmitglied *B cell activating factor* (BAFF) als Faktor identifiziert werden, welcher zur Resistenz der CLL-Zellen gegenüber einer NK-Zellattacke beiträgt. BAFF wird hauptsächlich von Zellen myeloischen Ursprungs exprimiert und spielt eine wichtige Rolle bei der Proliferation, Funktion und dem Überleben von B-Zellen. Neben seiner bedeutenden Rolle in Autoimmunerkrankungen, trägt BAFF durch seine anti-apoptotische und überlebensfördernde Wirkung auch zur Pathophysiologie von B-Zell Malignomen bei. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass NK-Zellen BAFF ohne detektierbare Oberflächenexpression löslich freisetzen. Die BAFF-Freisetzung wurde durch NK-Aktivierung noch gesteigert, und dies war neben aktivierenden Zytokinen auch nach Fc-Rezeptorstimulation mittels CD20-Antikörper zu beobachten. BAFF wiederum steigerte die metabolische Aktivität primärer CLL-Zellen und verringerte die direkte und Rituximab-induzierte Lyse der CLL-Zellen, ohne die NK-Reaktivität *per se* zu beeinflussen. Darüber hinaus vermittelte BAFF eine Resistenz von CLL-Zellen gegenüber einer Behandlung mit den Systemtherapeutika Fludarabin und Cyclophosphamid (FC). Der für die Behandlung des Systemischen Lupus Erythematoses (SLE) zugelassene neutralisierende BAFF-Antikörper Belimumab verhinderte die Effekte von BAFF auf die metabolische Aktivität der CLL-Zellen und stellte die Suszeptibilität für die direkte und Rituximab-induzierte NK-Lyse in allogenen und autologen experimentellen Ansätzen wieder her. Des Weiteren sensitivierte Belimumab die CLL-Zellen für eine systemtherapeutische Behandlung mit FC. Diese Ergebnisse identifizieren BAFF nicht nur als Faktor, der zur beobachteten Resistenz von CLL-Zellen gegenüber der direkten und Rituximab-induzierten NK-Antitumorimmunität beiträgt, sie decken darüber hinaus das Potential BAFF-neutralisierender Reagenzien zur Verstärkung der NK-Zell-Reaktivität für Immuntherapie und konventionelle Systemtherapeutika auf.

## 2 Einleitung

### 2.1 Das Immunsystem

Die Gesamtheit aller Organellen, Zellen und Proteine, die dem Organismus zur Abwehr von Mikroorganismen und Fremdstoffen, aber auch zur Eliminierung abnormaler Körperzellen dienen, bezeichnet man als Immunsystem (lat. immunis = frei, rein, unberührt). Damit sich die Immunreaktionen nicht gegen Bestandteile des eigenen, gesunden Organismus richten, ist die Fähigkeit erforderlich, körpereigene von körperfremden oder körpereigenen veränderten Strukturen zu unterscheiden. Das Immunsystem der Vertebraten hat sich im Zuge der Evolution zu einer komplexen Zusammenstellung von Abwehrmechanismen entwickelt, die sich in zelluläre und humorale Bestandteile untergliedern lassen (Abbildung 1).

	zelluläre Bestandteile	humorale Bestandteile
angeborene Immunität	Granulozyten Monozyten / Makrophagen Dendritische Zellen NK-Zellen	Komplement Zytokine Lysozym
adaptive Immunität	T-Zellen B-Zellen	Zytokine Antikörper

**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Komponenten des Immunsystems.**

Den zellulären Teil des Immunsystems bilden die Leukozyten. Diese sind entweder Komponenten der lymphatischen Reihe – B-Zellen, T-Zellen und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) – oder entstammen der myeloischen Reihe – Granulozyten, Monozyten/Makrophagen und Dendritische Zellen (DC). Das humorale Immunsystem umfasst dagegen eine Vielzahl löslicher Faktoren, die an einer Immunreaktion beteiligt sind. Hierzu zählen neben Komplementsystem, Zytokinen und Lysozym auch Antikörper, die von B-Zellen produziert werden. Das Immunsystem mit seinen zellulären und humoralen

Komponenten lässt sich weiterhin in einen angeborenen und einen adaptiven Teil untergliedern.<sup>1-3</sup>

### **2.1.1 Die angeborene Immunität**

Die angeborene Immunität bildet die erste Verteidigungslinie des Organismus und ist verantwortlich für die frühe Erkennung von Krankheitserregern, die die natürlichen Barrieren des Körpers überwinden konnten. Hierbei spielen sowohl verschiedene humorale als auch zelluläre Komponenten eine Rolle.

Zu den humoralen Faktoren gehören bakterizid wirkende Substanzen wie Lysozym oder die zahlreichen verschiedenen Proteine des Komplementsystems, die nach ihrer Aktivierung körperfremde Zellen direkt angreifen und lysieren oder durch Opsonierung für eine anschließende Eliminierung durch Immunzellen markieren. Ein weiterer Bestandteil der angeborenen, humoralen Immunantwort ist die Vielzahl von Zytokinen, die vor allem der Aktivierung der zellulären Bestandteile des Immunsystems dienen.

Granulozyten, Monozyten/Makrophagen, DC und NK-Zellen gehören zu den zellulären Strukturen der angeborenen Immunität. Außer NK-Zellen sind alle genannten Zelltypen phagozytierende Zellen, deren Aktivierung über PRR's (*pattern recognition receptors*) auf ihrer Zelloberfläche erfolgt. Diese erkennen konservierte Struktur motive pathogener Mikroorganismen, welche auf Eukaryonten nicht vorkommen.<sup>4-6</sup> Neben der Phagozytose der Mikroorganismen, alarmieren diese Zellen parallel das Immunsystem, indem sie inflammatorische Mediatoren freisetzen und so eine Entzündungsreaktion auslösen.<sup>7</sup> Letztere führt u.a. zur Aktivierung von Bestandteilen des adaptiven Immunsystems. Eine besondere Stellung zwischen angeborener und adaptiver Immunität nehmen DC ein, die nach der Phagozytose Antigene prozessieren, den Zellen des adaptiven Immunsystems präsentieren und so eine adaptive Immunreaktion auslösen. Die Funktion von NK-Zellen als weiterer wichtiger Komponente der angeborenen Immunität wird in späteren Abschnitten detailliert beschrieben.

### **2.1.2 Die adaptive Immunität**

Während Zellen der angeborenen Immunität ihre Zielzellen über eine begrenzte Anzahl keimbahnkodierter Rezeptoren erkennen, beruht die Erkennung von Pathogenen bei Zellen der adaptiven bzw. spezifischen Immunität auf einer praktisch unbegrenzten Zahl verschiedener Antigen-Rezeptoren mit jeweils einzigartiger Spezifität. Diese Antigen-Rezeptoren (B-Zell Rezeptoren bzw. deren Antikörper und T-Zell Rezeptoren) gehören zur Immunglobulin-Superfamilie und entstehen durch somatische Rekombination von keimbahnkodierten Genfragmenten.<sup>8-10</sup> Ein besonderes Merkmal der spezifischen Immunität

stellt die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses dar, wodurch der Organismus vor einer erneuten Erkrankung, ausgelöst durch das gleiche Pathogen, geschützt wird. Wie das angeborene Immunsystem verfügt auch die adaptive Immunität über humorale und zelluläre Abwehrmechanismen.

Für die zelluläre Immunantwort der adaptiven Immunität sind T-Zellen verantwortlich. Diese erkennen über ihren T-Zell Rezeptor Antigene, welche als Peptide an MHC-Moleküle (*major histocompatibility complex*) gebunden sind.<sup>11</sup> Der Kontakt mit einem spezifischen MHC-gebundenen Antigen (MHC-Restriktion) auf einer antigen-präsentierenden Zelle (APC) induziert in Kombination mit einem zweiten Stimulus (Kostimulation) die Entwicklung von naiven T-Zellen zu Effektor T-Zellen. Diese werden aufgrund ihrer Oberflächenmoleküle und ihrer Funktion im Wesentlichen in zwei Arten unterteilt: zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen erkennen Antigene im Komplex mit MHC-Klasse-I-Molekülen und können virusinfizierte oder maligne Zellen lysieren.<sup>12,13</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen erkennen dagegen Antigene auf MHC-Klasse-II-Molekülen und entwickeln sich z.B. zu T-Helferzellen.<sup>14</sup> Diese können wiederum B-Zellen, eine weitere Komponente des adaptiven Immunsystems, aktivieren. Dabei nehmen die B-Zellen Antigene über den B-Zell Rezeptor auf, internalisieren diese und präsentieren sie im Komplex mit MHC-Klasse-II-Moleküle den T-Helferzellen. Nach Aktivierung der B-Zellen kommt es zur Differenzierung zu Plasmazellen, welche Antigen-spezifische Antikörper für humorale Abwehrmechanismen produzieren.

## 2.2 Die Immunreaktion gegen Tumoren

In Deutschland und den westlichen Industrienationen ist Krebs die zweithäufigste Todesursache nach Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems. Die Inzidenz mancher Tumorentitäten steigt dabei rasant an, z.B. die des malignen Melanoms mit über 4% pro Jahr.<sup>15</sup> Krebserkrankungen werden standardmäßig durch chirurgisches Entfernen des Tumors, Strahlen- und Chemotherapie behandelt. Diese Therapieformen weisen jedoch trotz deutlicher Verbesserung in den letzten Jahren weiterhin starke Nebenwirkungen auf und sind je nach Tumorentität in ihrer Wirksamkeit begrenzt.

Ein viel versprechender Ansatz ist es, durch Induktion einer suffizienten Immunreaktion gegen den Tumor die Behandlungsoptionen für Krebspatienten zu verbessern. Die Idee einer Immunreaktion gegen Tumore wurde bereits Anfang des 20. Jahrhunderts von Paul Ehrlich formuliert und besagt, dass das Immunsystem den Körper kontinuierlich auf die Anwesenheit von „aberranten Keimen“ untersucht und diese eliminiert.<sup>16</sup> Da in Studien mit immundefizienten Mäusen jedoch keine Erhöhung der Tumorzinzidenz beobachtet werden

konnte,<sup>17</sup> wurde die Existenz natürlicher, tumorspezifischer Abwehrmechanismen lange angezweifelt. So wurde angenommen, dass sich das Immunsystem vor allem gegen virusinfizierte und weniger gegen maligne Zellen richtet. Im syngenen Mausmodell konnte die Immunogenität von Tumorzellen jedoch belegt werden: das Wachstum implantierter Tumore konnte nach vorheriger Immunisierung mit Krebszellen gleichen Ursprungs verhindert und zudem eine Anreicherung tumorspezifischer zytotoxischer T-Zellen nachgewiesen werden.<sup>18</sup> Dies wurde auch für humane, tumorinfiltrierende Lymphozyten gezeigt, für welche zudem eine tumorspezifische Lyseaktivität nachgewiesen werden konnte.<sup>19-21</sup> Die Fähigkeit des Immunsystems, Tumorzellen aufzuspüren und zu zerstören, wurde erstmals 1967 von Frank Burnet als Immunüberwachung (*immune surveillance*) bezeichnet. Heute geht man davon aus, dass Wachstum und Metastasierung von Tumoren stark von ihrer Fähigkeit abhängen, der Immunüberwachung und den Abwehrmechanismen des Organismus zu entkommen. Das Versagen der Kontrollmechanismen des Immunsystems scheint demnach eine notwendige Voraussetzung für die Entwicklung eines klinisch apparenten Tumors nach zellintrinsisch-onkogenen Ereignissen zu sein.<sup>22</sup> Folglich heißt das, dass das Immunsystem bei Auftreten eines Tumors die malignen Zellen nicht ausreichend erkennen und/oder bekämpfen konnte.

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Ursachen und Mechanismen als Basis für eine Tumortoleranz diskutiert. Eine Theorie zur Erklärung der „friedlichen“ Koexistenz von Tumor und Immunzellen liefert das *danger model* von Matzinger.<sup>15</sup> Dieses Modell geht davon aus, dass es nur zu einer Immunreaktion kommt, wenn, z.B. durch Ausschüttung inflammatorischer Mediatoren im Rahmen einer Infektion, Gewebestress (*danger*) vorliegt. Dieses *danger*-Signal fehlt jedoch in Tumorgewebe, wodurch nicht nur eine suffiziente Immunreaktion ausbleibt, sondern sogar Toleranz induziert wird. Dieser Theorie zufolge, entgehen die Tumorzellen der Immunüberwachung demnach nicht aktiv, sondern überleben in einem nicht-tumorfeindlichen Umfeld. Bislang ist jedoch unklar, welche *danger*-Signale im Umfeld des Tumors fehlen. Nach diesem Modell könnte es spontan oder durch therapeutische Intervention zu einer Aktivierung des Immunsystems kommen und somit eine Tumorregression bewirkt werden. Neben verschiedenen Ursachen für eine Tumor-Toleranz werden zahlreiche Faktoren und Mechanismen diskutiert, durch die sich die Tumorzellen mehr oder weniger aktiv der Kontrolle des Immunsystems entziehen (*immune escape*). Letztere sind Gegenstand intensiver Forschungsarbeiten und teilweise kontroverser Diskussionen.

Ein möglicher Mechanismus des *immune escape* könnte eine reduzierte Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf den Tumorzellen sein. Dies konnte sowohl im Tiermodell als auch bei verschiedenen humanen Tumoren beobachtet werden, bei welchen die

Expressionsstärke von MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Zelloberfläche deutlich variierte.<sup>23-27</sup> Es reichen zwar bereits einige wenige Antigene im Komplex mit MHC-Klasse-I-Molekülen auf einer Zelle aus, um sie zum Ziel für zytotoxische Lymphozyten zu machen, dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass unzählige verschiedene Peptide intrazellulär um wenige MHC-Klasse-I-Moleküle konkurrieren. Demzufolge ist es vorstellbar, dass bei einer reduzierten MHC-Expression nicht alle endogenen Epitope mit ausreichender Dichte präsentiert werden können, was den Tumorzellen zum *immune escape* verhelfen könnte. Besonders bei Tumoren, die nur schwach immunogen sind, könnte eine reduzierte Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen so den komplexen Mechanismus der T-Zellaktivierung beeinträchtigen.

Auch humorale Faktoren, wie z.B. Zytokine, spielen im Umfeld des Tumors eine Rolle und können die Interaktion zwischen Immunsystem und Tumorzellen beeinflussen. Dies geschieht zum einen durch direkte Effekte auf die Immunzellen, zum anderen aber auch durch die Regulation der Produktion und Funktion anderer Zytokine oder durch Modulation der Expression von Adhäsions- oder kostimulatorischen Molekülen.<sup>28-33</sup> Zytokine spielen z.B. eine wichtige Rolle bei der Reifung und Differenzierung von APC, können aber auch einen direkten suppressiven Effekt auf die Aktivität von T-Zellen haben. So konnte nachgewiesen werden, dass die Sekretion von IL-10 und TGF (*transforming growth factor*)- $\beta$  durch neoplastische Zellen eine Ursache für eine Immunsuppression bei Melanomen ist, und bei Melanom-Patienten Serumspiegel von TGF- $\beta$  und das Fortschreiten der Erkrankung korrelieren.<sup>31,33</sup> Bislang gibt es jedoch keinen endgültigen Beweis dafür, dass Zytokine auch *in vivo* für den *immune escape* der Tumorzellen verantwortlich sind.

Ein weiterer Mechanismus, durch den sich Tumorzellen der Kontrolle des Immunsystems entziehen können, ist eine veränderte Expression immunregulatorischer Oberflächmoleküle, die die Anti-Tumor-Immunreaktion beeinflussen können. So können Tumorzellen durch eine reduzierte Expression von Molekülen, die das Immunsystem stimulieren, der Immunüberwachung entkommen. Ein verbreiteter Mechanismus ist dabei die Freisetzung von Oberflächmolekülen in löslicher Form durch *shedding*.<sup>34-36</sup> Die Reduktion der Oberflächenexpression aktivierender Moleküle, eine Maskierung oder Herabregulation der entsprechenden Rezeptoren durch freigesetzte Moleküle sowie eine eventuell veränderte Funktion der löslichen Moleküle kann zu einer Inhibition der Immunantwort führen.<sup>37</sup> Ein intensiv erforschtes Beispiel hierfür ist die Freisetzung von Liganden des aktivierenden Immunrezeptors NKG2D (Natural killer group 2 member D). Eine weitere Möglichkeit eines *immune escape* ist die verstärkte Expression von Molekülen, die die Effektorzellen in ihrer Funktion hemmen, wie z.B. Liganden für inhibitorische Immuncheckpoints. Diese Signalwege steuern die Dauer und Stärke von Immunantworten und die Selbst-Toleranz.<sup>38</sup> Ein

prominentes Beispiel eines solchen Checkpoint-Moleküls ist der inhibitorische Rezeptor *Programmed cell death-1* (PD-1, CD279), welcher eine Schlüsselrolle in der Effektor-Phase der T-Zell Aktivierung spielt. Sein Ligand PD-L1 wird auf einer Vielzahl gesunder, aber auch maligner Zellen exprimiert, was so zu einer Unterdrückung der T-Zellantwort führt. Eine vielversprechende Herangehensweise, diese Art der Immunevasion zu verhindern, ist die Blockade dieser Checkpoint Moleküle durch Antikörper.<sup>39</sup> Besonders erfolgversprechend sind hier die 2014 zugelassenen, gegen PD-1 gerichteten monoklonalen Antikörper (mAb) Nivolumab und Pembrolizumab, welche ein bis dahin nie dagewesenes dauerhaftes Ansprechen von 30-35 % bei der Behandlung des fortgeschrittenen Melanoms zeigten.<sup>40</sup> Sie sind damit sowohl in ihrer Effektivität als auch bezüglich der Nebenwirkungen dem ersten jemals zur Checkpoint Blockade zugelassenen, gegen *Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4* (CTLA-4, CD152) gerichteten mAb Ipilimumab, überlegen.<sup>41</sup> Die Entwicklung und Testung weiterer Checkpoint Inhibitoren, wie z.B. gegen *T-cell immunoglobulin and mucin containing protein-3* (TIM-3) oder *Lymphocyte activation gene-3 or CD223* (LAG-3)<sup>42</sup> spiegeln die Bedeutung und das Potential dieser relativ neuen Entwicklung in der Krebsimmuntherapie wieder.

Neben T-Zellen spielen auch NK-Zellen eine wichtige Rolle bei der Immunreaktion gegen Tumoren. Inhalt dieser Dissertation ist u.a. die Beeinflussung der NK-Zell-vermittelten Immunüberwachung der Chronisch Lymphatischen Leukämie (CLL) durch das TNF-Familienmitglied *B cell activating factor* (BAFF).

### 2.3 Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)

NK-Zellen stellen ca. 5-10% der im peripheren Blut zirkulierenden mononukleären Zellen dar und sind im Menschen anhand der Expression des Oberflächenmarkers CD56 und der Abwesenheit des T-Zellantigens CD3 als CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> definiert. NK-Zellen wurden erstmals im Jahre 1975 als zytotoxische Lymphozyten beschrieben, welche die Fähigkeit besitzen, Tumorzellen ohne vorhergehende Sensibilisierung zu lysieren.<sup>43-45</sup> Die Zuordnung der NK-Zellen war zunächst unklar, da ihre Aktivierung im Gegensatz zu T- und B-Lymphozyten Antigen-unspezifisch erfolgt, sie jedoch aus einer gemeinsamen CD34<sup>+</sup> Vorläuferzelle hervorgehen. Inzwischen werden NK-Zellen der angeborenen Immunität zugerechnet,<sup>46</sup> deren Aktivierung von einer Vielzahl inhibierender und aktivierender Rezeptoren abhängt.<sup>47-49</sup> Beschrieben wird die NK-Zell-Aktivierung durch zwei Hypothesen, die sogenannte *missing-self*- und die *induced-self*-Hypothese: die *missing-self*-Hypothese besagt, dass NK-Zellen aktiviert werden und eine Zielzelle lysieren, wenn diese keine oder eine insuffiziente Menge

von MHC-Klasse-I-Molekülen auf ihrer Oberfläche exprimieren.<sup>47,50-52</sup> Über spezifische inhibierende Rezeptoren erkennen NK-Zellen MHC-Klasse-I Moleküle und definieren die betreffende Zelle als „Selbst“, so dass hemmende Signale in die NK-Zelle geleitet werden und keine Lyse erfolgt.<sup>53</sup> Die Oberflächenexpression von MHC-Klasse-I-Molekülen kann jedoch z.B. durch virale Infektion oder im Laufe einer malignen Entartung heruntergeregelt werden. Somit entfallen die hemmenden Signale und die Zielzelle kann von NK-Zellen lysiert werden. Da es jedoch Zellen gibt, wie z.B. Erythrozyten, die trotz fehlender Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen nicht von NK-Zellen lysiert werden, wurde schnell klar, dass die *missing-self*-Hypothese als alleinige Erklärung für die Regulation der NK-Zell-Reaktivität nicht ausreicht. Heute weiß man, dass eine NK-Zell-Aktivierung nicht nur das Fehlen inhibitorischer Signale, sondern auch eine Stimulation von aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren durch entsprechende Liganden auf den Zielzellen voraussetzt. Die Expression solcher Liganden kann durch Stress oder maligne Transformation induziert werden (*induced-self*). So entscheidet die Gesamtheit aus aktivierenden und inhibitorischen Signalen über die Induktion der Reaktivität von NK-Zellen.<sup>47</sup>

NK-Zellen besitzen zwei entscheidende Immuneffektorfunktionen: zum einen werden durch die Ausschüttung von Perforin und Granzym aus zytotoxischen Granula viral oder bakteriell infizierte, bzw. maligne transformierte Zielzellen lysiert. Zum anderen produzieren NK-Zellen sehr früh im Zuge einer Immunantwort große Mengen des Zytokins IFN- $\gamma$  (*early source of IFN- $\gamma$* ).<sup>47,54</sup> IFN- $\gamma$  trägt neben der direkten proliferationshemmenden Wirkung und Förderung von Apoptose bei den Zielzellen vor allem durch die Stimulation nachfolgender adaptiver Immunreaktionen zur Eliminierung von Zielzellen bei.<sup>55</sup>

Zahlreiche Studien belegen sowohl für das murine als auch das humane System die Fähigkeit von NK-Zellen, Tumorzellen spontan töten zu können.<sup>51</sup> Darüber hinaus wurde gezeigt, dass NK-Zellen an der Eradikation von sowohl induzierten, als auch spontan entstehenden Tumoren beteiligt sind.<sup>56</sup> Bei Tumorpatienten konnte nach Behandlung mit IL-2 eine Korrelation von NK-Zell-Reaktivität und Therapieansprechen festgestellt werden.<sup>57</sup> Klinische Daten belegen weiterhin die bedeutende Rolle von NK-Zellen insbesondere bei der Immunüberwachung maligner hämatopoetischer Erkrankungen. So wird beispielsweise nach haploidenter Stammzelltransplantation durch einen *mismatch* der MHC-Klasse-I-Moleküle auf den Leukämiezellen des Empfängers und den MHC-Klasse-I-spezifischen inhibitorischen Rezeptoren auf den NK-Zellen des Spenders eine NK-Reaktivität gegen die fremden Zielzellen induziert (Alloreaktivität). Die in diesem allogenen Kontext erfolgte Aktivierung der NK-Zellen bewirkt einen erhöhten Schutz vor Leukämie rezidiven (*graft-versus-leukemia* Effekt) und verbessert das *engraftment* des Transplantates, interessanterweise ohne dabei *Graft-versus-Host-Disease* (GvHD) zu verursachen.<sup>58</sup> Demnach ist es von hoher klinischer

Relevanz, Molekülsysteme, die an der Regulation der Reaktivität von NK-Zellen, insbesondere gegen Tumorzellen, beteiligt sind, zu charakterisieren.<sup>1-3</sup>

### 2.3.1 Inhibitorische NK-Zell-Rezeptoren

Hemmende NK-Zell-Rezeptoren verhindern durch das Erkennen von MHC-I-Molekülen die Lyse von gesunden, körpereigenen Zellen. Zu ihnen zählen im Menschen die Mitglieder der KIR-Familie (*killer immunoglobulin-like receptor*), sowie in der Maus die Mitglieder der Ly49-Familie. Die KIR-Gene sind im Menschen als Teil eines Gen-Klusters auf Chromosom 19q in der sogenannten LRC-Region (*leukocyte receptor complex*) kodiert.<sup>59</sup> KIR-Moleküle sind spezifisch für allelische Varianten von HLA-A, -B und -C-Molekülen. So bindet z.B. KIR2DL1 an Mitglieder der HLA-C-Gruppe-2 (z.B. HLA-Cw2, -Cw4, -Cw6) und KIR3DL1 interagiert mit HLA-B-Molekülen, die das Epitop HLA-Bw4 aufweisen.<sup>60-62</sup> Mittels Kristallographie von KIR2DL-Rezeptoren im Komplex mit ihren jeweiligen HLA-C-Liganden wurde die „D1-D2 elbow domain“ des KIR als Interaktionspartner der  $\alpha$ 1- und  $\alpha$ 2-Helices der *platform domain* des HLA-C identifiziert.<sup>63,64</sup> Im Gegensatz zur Interaktion des T-Zell-Rezeptors mit MHC-Klasse-I-Molekülen erfolgt die Bindung von KIR2DL an die helikale Region der *platform domain*, die den C-terminalen Teil des Peptidantigens umfasst.<sup>65</sup> Da NK-Zellen oft nur ein oder zwei selbst-restringierte KIR-Moleküle exprimieren und nur selten eine Koexpression von mehreren selbst-restringierten KIR-Molekülen aufweisen,<sup>52</sup> können sie entsprechend ihrer Fähigkeit zur Bindung an spezifische MHC-Klasse-I-Moleküle in entsprechende Subpopulationen eingeteilt werden. Ein weiterer hemmender Rezeptor, der auf einem Großteil der humanen und murinen NK-Zell-Populationen exprimiert wird, bildet das Heterodimer aus CD94 und NKG2A, welches die nicht-klassischen MHC-I-Moleküle HLA-E bzw. Qa-1b auf einer potentiellen Zielzelle erkennt.<sup>66</sup>

Alle „klassischen“ inhibitorischen NK-Zell-Rezeptoren weisen innerhalb der zytoplasmatischen Domäne sogenannte ITIMs (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*) auf, wobei die Anzahl enthaltener ITIMs bei den verschiedenen Rezeptoren variiert.<sup>60</sup> Nach Bindung der MHC-Moleküle an ihren inhibitorischen Rezeptor werden die ITIMs durch Src-Kinasen phosphoryliert, was den ITIMs die Rekrutierung und Aktivierung der Tyrosin-Phosphatasen SHP-1 und SHP-2 (*SH2 domain containing protein tyrosine phosphatase 1* und *2*) erlaubt. Diese inaktivieren schließlich Signalmoleküle aktivierender Signalwege und vermitteln so die hemmende Wirkung der inhibitorischen Rezeptoren.<sup>67,68</sup>

### 2.3.2 Aktivierende NK-Zell-Rezeptoren

Die wichtigsten Vertreter der bis heute bekannten aktivierenden Rezeptoren auf NK-Zellen sind NKp30, NKp44 und NKp46. Sie zählen zur Familie der NCR (*natural cytotoxicity receptors*), weisen untereinander jedoch keine Homologien auf. Während NKp30 und NKp46 sowohl auf ruhenden, als auch aktivierten NK-Zellen exprimiert werden, ist NKp44 nur nach Aktivierung auf der Oberfläche detektierbar.<sup>69-71</sup> Ihre Adaptormoleküle (CD3 $\zeta$ - und Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ -Kette für NKp46, CD3 $\zeta$ -Kette für NKp30 bzw. DAP12 für NKp44) vermitteln durch ITAM's (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) aktivierende Signale in die NK-Zelle.<sup>72</sup> Für alle NCR konnte eine wichtige Rolle bei NK-Zell-Reaktionen gegen Tumoren nachgewiesen werden, wobei die jeweiligen Liganden bis heute unzureichend charakterisiert sind.

Innerhalb der KIR-Familie finden sich nicht nur inhibitorische Moleküle, sondern auch MHC-Klasse-I-spezifische Rezeptoren, die keine IMITs tragen und somit aktivierende Signale vermitteln. So führt z.B. die Bindung von KIR2DS1 an seinen Liganden HLA-C zur Aktivierung von NK-Zellen.<sup>73,74</sup> Auch das inhibitorische Heterodimer CD94/NKG2A hat einen aktivierenden Gegenpart, CD94/NKG2C, welchem ebenfalls das inhibitorische ITIM fehlt. Stattdessen assoziiert CD94/NKG2C über einen bestimmten Sequenzabschnitt in der Transmembrandomäne mit dem Adaptorprotein DAP12, welches wiederum ein ITAM enthält und so NK-Zellen aktiviert. Die funktionelle Bedeutung der MHC-Klasse-I-spezifischen aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren ist bislang jedoch nur unzureichend verstanden.<sup>60</sup>

Ein aktivierender NK-Zell-Rezeptor von zentraler Bedeutung ist NKG2D, der neben NK-Zellen auch auf T-Zellen exprimiert wird.<sup>75</sup> Die Interaktion dieses Moleküls mit seinen MHC-Klasse-I-ähnlichen Liganden (NKG2DL) spielt eine wichtige Rolle bei der NK-Zell-Aktivierung und der Tumorummunüberwachung.<sup>76</sup> NKG2D tritt als Homodimer auf und formt mit seinen Adaptorproteinen DAP10 im humanen bzw. DAP10 und DAP12 im murinen System einen Immun-Rezeptor-Komplex, über welchen aktivierende Signale durch Rekrutierung der Phosphoinositol-3-Kinase transduziert werden.<sup>77</sup> Dies kann bei NK-Zellen selbst in Gegenwart durch MHC-Klasse-I-Moleküle vermittelter inhibitorischer Signale zur Aktivierung von Effektorfunktionen führen.<sup>75,78</sup> Die Expression von NKG2DL unterliegt einer strikten Regulation, was mit dem hohen Aktivierungspotential dieser Liganden für zytotoxische Lymphozyten in Einklang steht.<sup>77</sup> Gut charakterisiert sind die durch Zellstress induzierbaren, MHC-ähnlichen Moleküle MICA und MICB (*MHC class I related chain A/B*), die mit Ausnahme des Gastrointestinalepithels nicht auf Normalgewebe, dagegen aber auf vielen Tumorzelllinien, epithelialen und hämatopoetischen Tumoren und virusinfizierten Geweben exprimiert werden.<sup>79-82</sup> Im Gegensatz zu den klassischen MHC-Klasse-I-Molekülen präsentieren die MIC-Moleküle keine Peptide und assoziieren nicht mit  $\beta$ 2-Mikroglobulin.<sup>79</sup> Weitere Liganden von NKG2D sind die verschiedenen ULBP-Moleküle (*UL16-binding*

*proteins*),<sup>78,83</sup> welche, wie die MIC-Moleküle, eine MHC-Klasse-I-ähnliche  $\alpha 1/\alpha 2$ -Superdomäne, jedoch keine  $\alpha 3$ -Domäne besitzen und bis auf ULBP4 alle mittels eines Glykosyl-Phosphatidylinositol-Ankers (GPI-Anker) an der Zellmembran befestigt sind.

Interessanterweise konnte eine Verbindung zwischen dem *DNA damage pathway* und der Induktion von NKG2DL bei Mensch und Maus hergestellt werden. Es wurde gezeigt, dass Agenzien, die DNA-Schäden hervorrufen, in Abhängigkeit von den DNA-Sensoren ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) und ATR (*ATM- and Rad3 related*) auch die Expression von NKG2DL induzieren.<sup>84</sup> Dieser Mechanismus scheint für die tumorassoziierte Expression von NKG2DL relevant zu sein.

Zahlreiche Studien im Mausmodell haben die bedeutende Rolle des NKG2D/NKG2DL-Systems bei der Tumorummunüberwachung nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass NKG2DL-transduzierte Tumorzelllinien, jedoch nicht die entsprechenden parentalen Zelllinien, nach subkutaner Inokulation durch NK-Zellen angegriffen werden. Dabei wurde zudem eine durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen vermittelte, spezifische Immunität erzeugt, die sich auch auf die parentalen Zelllinien erstreckte.<sup>85,86</sup> Nachfolgende Untersuchungen zeigten, dass NKG2D – bei Karzinogen-induzierten Tumoren – auch bei der Tumoruminitiation eine protektive Wirkung hat und einen wichtigen Effektormechanismus bei der Zytokin-aktivierten Eliminierung von Tumorzellen durch zytotoxische Lymphozyten darstellt.<sup>87</sup> Zudem konnte mittels NKG2D-defizienter Mäuse belegt werden, dass NKG2D zwar nicht für die Entwicklung von NK-Zellen erforderlich ist, jedoch kritische Relevanz für die Immunüberwachung von Malignomen besitzt.<sup>88</sup>

Ein besonders wichtiger aktivierender Rezeptor auf NK-Zellen ist CD16 (Fc $\gamma$ RIII). CD16 ist Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie und bindet mit hoher Spezifität, aber niedriger Affinität an das Fc-Fragment (*fragment crystallizable*) der Immunglobuline IgG1 und IgG3. Neben den Fc $\gamma$ -Rezeptoren existieren noch 2 weitere Fc-Rezeptorklassen, die aufgrund ihrer jeweiligen Spezifität für die Antikörperklassen IgA und IgE als Fc $\alpha$ R und Fc $\epsilon$ R bezeichnet werden. CD16 wird hauptsächlich auf NK-Zellen und aktivierten Monozyten exprimiert. Er bildet einen multimeren Rezeptorkomplex aus der ligandenbindenden  $\alpha$ -Kette und einem Dimer zur Signaltransduktion (Homo- oder Heterodimere aus CD3 $\zeta$ - und Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ -Ketten).<sup>89</sup> Nach Stimulation des Rezeptors erfolgt die Aktivierung von ITAMs, was letztendlich zur Freisetzung von Zytokinen und Induktion von ADCC führt.<sup>89,90</sup> Die Signalübertragung durch Fc-Rezeptoren nach Ligandenbindung resultiert hauptsächlich aus der Kreuzvernetzung (*cross linking*) aktivierter Rezeptormoleküle. Dabei müssen sich mehrere Rezeptor-Liganden-Komplexe in räumlicher Nähe befinden, so dass sich auch die Signale der ITAM's ihrer zytoplasmatischen Domänen bzw. ihrer assoziierten Adaptormoleküle verschalten können.<sup>91</sup> Da freie, nicht an Antigene gebundene Antikörper nach einer Bindung an

vereinzelte Fc-Rezeptoren so keine aktivierenden Signale induzieren können, wird auf diese Weise die Spezifität der vermittelten Immunantwort gesichert. CD16 ist vor allem für den Einsatz monoklonaler Antikörper in der Anti-Tumor-Therapie von entscheidender Bedeutung. Ein prominentes Beispiel ist der erste jemals zur Krebsbehandlung zugelassene CD20-Antikörper Rituximab, der erfolgreich zur Behandlung maligner B-Zelllymphome eingesetzt wird.<sup>92,93</sup> Durch Modifikation der Fc-Fragmente von Antikörpern konnte gezeigt werden, dass eine gesteigerte Affinität des Fc-Teils zum Fc-Rezeptor mit der induzierten Zytotoxizität gegen Zielzellen korreliert.<sup>94,95</sup> Diese Daten legen nahe, dass Fc-optimierte Antikörper auch bei der Tumorthherapie zu besseren Ergebnissen führen.<sup>96</sup> Daher gibt es mittlerweile eine nächste Generation an anti-Tumorantikörpern, wie z.B. den ebenfalls gegen CD20 gerichteten Antikörper Obinutuzumab, bei welchen durch Modifikation des Fc-Teils die Affinität zum Fc-Rezeptor gesteigert und so die immunstimulatorische und auch klinische Wirksamkeit verbessert wurde.<sup>97-99</sup>

## 2.4 Die Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Familie

Die Mitglieder der TNF-Familie spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation von Proliferation, Aktivierung, Differenzierung und Apoptose von verschiedenen Komponenten des Immunsystems, aber auch von Tumorzellen.<sup>100</sup> Neben dem namensgebenden Mitglied TNF und seinen Rezeptoren TNFR1 und TNFR2, sind inzwischen zahlreiche weitere Rezeptor-Liganden-Paare bekannt (Tabelle 1).<sup>101</sup> Die Zugehörigkeit zur TNF/TNFR-Familie wird über Sequenz- und Strukturhomologien in den extrazellulären Domänen der Moleküle bestimmt: mehrere Cystein-reiche Domänen bilden das charakteristische Element der Rezeptoren, während die Liganden der TNF-Familie als Typ-II-Transmembranproteine mit einer extrazellulären (C-terminalen) Domäne (*TNF homology domain*) charakterisiert sind. Die Mitglieder der TNF-/TNF-Rezeptor-Familie vermitteln eine Vielzahl verschiedenster Effekte. So ist z.B. der Todesrezeptor CD95 (APO-1, Fas) ebenso ein Mitglied dieser Familie wie CD40 Ligand (CD40L), der nach Bindung durch seinen Rezeptor (CD40) eine starke Genexpression induziert, somit maßgeblich zur Aktivierung der ligandentragenden Zelle beiträgt und z.B. eine zentrale Rolle bei der Interaktion von T-Zellen und DC spielt.<sup>102</sup> Für viele Moleküle der TNF-Familie gilt interessanterweise, dass dasselbe Molekül je nach Zelltyp und dem jeweiligen Kontext sehr verschiedene, teils sogar gegensätzliche Effekte vermitteln kann.<sup>2,3</sup> So kann z.B. TNF zum einen als klassisches inflammatorisches Zytokin wirken, während es zum anderen auch die Fähigkeit besitzt, Apoptose zu induzieren.

Rezeptor	Nomenklatur	Ligand
TNFR1	TNFRSF1A	TNF
TNFR2	TNFRSF1B	TNF
LT $\beta$ R	TNFRSF3	LT $\alpha$ , LT $\beta$ , LIGHT
OX40	TNFRSF4	OX40L
CD40	TNFRSF5	CD40L
Fas (CD95, APO-1)	TNFRSF6	FasL (CD95L)
DCR3	TNFRSF6B	FasL, VEGI
CD27	TNFRSF7	CD27L
CD30	TNFRSF8	CD30L
4-1BB	TNFRSF9	4-1BBL
DR4 (APO-2)	TNFRSF10A	TRAIL
DR5	TNFRSF10B	TRAIL
DCR1	TNFRSF10C	TRAIL
DCR2	TNFRSF10D	TRAIL
RANK	TNFRSF11A	RANKL
OPG	TNFRSF11B	RANKL, TRAIL
FN14 (TWEAKR)	TNFRSF12A	TWEAK
TACI	TNFRSF13B	APRIL, BAFF
BAFFR	TNFRSF13C	BAFF
HVEM	TNFRSF14	LIGHT, TNF
VEG	TNFRSF15	VEGI (TL1)
NGFR	TNFRSF16	NGF
BCMA	TNFRSF17	APRIL, BAFF
GITR	TNFRSF18	GITRL
TROY	TNFRSF19	?
RELT	TNFRSF19L	?
DR6	TNFRSF21	?
DR3 (APO-3)	TNFRSF25	VEGI, LIGHT
EDAR		EDA-A1
XEDAR		EDA-A2

**Tabelle 1: Übersicht über die TNF-Familienmitglieder nach Aggarwal, 2003 (modifiziert).**

### 2.4.1 Rezeptoren der TNF-Familie

Die Mitglieder der TNFR-Familie sind Typ-I-Transmembranproteine, welche durch 2-6 ca. 40 Aminosäuren umfassende Cystein-reiche Domänen (CRD) im extrazellulären Teil des Rezeptors charakterisiert sind.<sup>103</sup> Ein Teil der Rezeptoren weist zudem Sequenzhomologien im intrazellulären Bereich auf: die ca. 80 Aminosäuren umfassende sogenannte *death domain* (DD). Diese wurde erstmals bei der Analyse von Fas-Mutanten als eine intrazelluläre Region beschrieben, die zur Induktion von Apoptose notwendig ist.<sup>104</sup> Durch Struktur- bzw. Sequenzanalysen an den intrazellulären Domänen von TNFR1 und Fas konnte gezeigt werden, dass die DD ein gemeinsames essentielles Strukturmotiv der Todesrezeptoren innerhalb der TNF-Familie darstellt. CD40 besitzt ebenfalls in einem ca. 40 Aminosäuren umfassenden Bereich limitierte Sequenzhomologien zur DD,<sup>105</sup> wird aber aufgrund seiner

überwiegend proliferativen Funktionen nicht direkt zur Gruppe der Todesrezeptoren gerechnet.

Eine weitere Gemeinsamkeit vieler Mitglieder der TNFR-Familie ist die Fähigkeit, direkt an TRAF-Moleküle (*TNF-receptor associated factor*) zu binden und über diese Adaptorproteine intrazelluläre Signale weiterleiten zu können.<sup>106</sup> In Säugerzellen sind mittlerweile sechs TRAF-Moleküle (TRAF1-6) beschrieben worden, welche die für TRAFs charakteristischen Sequenzhomologien im C-terminalen Proteinbereich (TRAF-Domäne) aufweisen. Da TRAFs sowohl an Rezeptoren mit DD, als auch an Rezeptoren ohne diese Domäne binden können, fungieren sie als Schaltelement zwischen den apoptose-induzierenden und anti-apoptotischen Effekten der TNFR-Familienmitglieder.

Ein zentraler über TNFR-Familienmitglieder gesteuerter Signalweg ist die Translokation des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in den Zellkern durch Beteiligung der Adaptormoleküle TRAF2, TRAF5 und TRAF6. Durch TRAFs können zwei NF- $\kappa$ B-Signalwege aktiviert werden: zum einen der klassische Signalweg, welcher vor allem über inflammatorische Zytokine, TLR-Liganden und Pathogenkontakt aktiviert wird und zum anderen der alternative Signalweg. In unstimulierten Zellen liegt NF- $\kappa$ B im Zytoplasma vor und ist dort an das inhibitorische Protein I $\kappa$ B (*inhibitor of NF- $\kappa$ B*) gebunden. Nach Aktivierung werden N-terminale Serine des I $\kappa$ B durch den I $\kappa$ B-Kinase-Komplex phosphoryliert.<sup>107</sup> Dieser Komplex besteht aus drei Untereinheiten: IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  und der regulatorischen Einheit IKK $\gamma$ , die auch als NEMO bezeichnet wird.<sup>107,108</sup> Die Phosphorylierung des I $\kappa$ B-Komplex führt zu seiner Degradation und damit zur Freigabe von NF- $\kappa$ B. Im Zuge des klassischen Signalwegs werden nun die NF- $\kappa$ B-Komponenten RelA und p50 in den Nukleus transloziert, während der zweite, alternative, Signalweg die Translokation der NF- $\kappa$ B-Moleküle p52 und RelB in den Zellkern induziert.<sup>109</sup> Über die Bindung an spezifische Promotoren wird im Nukleus die Transkription verschiedener Gene aktiviert, was z.B. die Expression verschiedener entzündungsfördernder Zytokine, Chemokine und Adhäsionsmoleküle reguliert. NF- $\kappa$ B vermittelt des Weiteren anti-apoptotische Effekte, indem es z.B. den Zellzyklus beeinflusst und in viele Aspekte der Onkogenese eingreift. In Zellen von Patienten mit Chronisch Myeloischer Leukämie (CML) konnte NF- $\kappa$ B so z.B. als essentielle Komponente der onkogenen Aktivität von bcr-abl nachgewiesen werden.<sup>110</sup>

Ein Bindeglied zwischen den Rezeptor-assoziierten TRAF-Molekülen und der Aktivierung von NF- $\kappa$ B ist die Kinase NIK (*NF- $\kappa$ B inducing kinase*), die erstmals als TRAF2-gebundenes Signalprotein isoliert wurde<sup>111</sup> und die IKK $\alpha$ -Einheit des IKK-Komplexes effektiv phosphoryliert.<sup>112</sup> IKK $\alpha$  ist an der Aktivierung des alternativen Signalwegs von NF- $\kappa$ B beteiligt und führt zur nukleären Translokation von p52/RelB-Heterodimeren.<sup>113</sup> NIK interagiert über ein Konsensus-Motiv mit den TRAF-Molekülen 1, 2, 3, 5 und 6,<sup>114</sup> wobei die Bindung an

TRAF4 in diesem Zusammenhang nicht untersucht wurde. Neben NIK binden TRAFs an weitere zytoplasmatische Proteine, die inhibitorisch auf die Aktivierung von NF- $\kappa$ B wirken: cIAP (*inhibitor of apoptosis protein*), TTRAP (*TRAF and TNF-receptor associated protein*) und A20.<sup>115,116</sup> So konnte gezeigt werden, dass cIAP in der Lage ist, Kaspasen direkt zu hemmen und so Apoptose zu regulieren. TTRAP gehört zur Gruppe der Mg<sup>2+</sup>/Mn<sup>2+</sup>-abhängigen Phosphodiesterasen und nimmt so über seine Endonukleaseaktivität Einfluss auf den Signalweg.<sup>117</sup> A20 ist hingegen ein effektiver Inhibitor der TRAF- bzw. MAP-Kinasen-vermittelten Aktivierung von NF- $\kappa$ B.<sup>118,119</sup> Neben der Aktivierung von NF- $\kappa$ B und der Induktion von Apoptose regulieren TRAFs zudem die Aktivität weiterer Kinasen und Transkriptionsfaktoren. So vermitteln TRAF2 und TRAF6 z.B. die Aktivierung von JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) und beeinflussen so die transkriptionale Aktivität von AP-1,<sup>120</sup> während TRAF6 zudem ERK aktivieren kann.<sup>121</sup> Die Funktion von TRAF1, TRAF3 und TRAF4 hingegen ist in diesem Zusammenhang noch nicht ausführlich untersucht.<sup>1-3</sup>

#### 2.4.2 Liganden der TNF-Familie

Bei den Liganden der TNF-Superfamilie handelt es sich typischerweise um Typ-II-Transmembranproteine, die ihre Homologien zu TNF im extrazellulären, C-terminalen Bereich besitzen. Wie u.a. bei TNF und CD40L nachgewiesen, liegen die Liganden in biologisch aktiver Form typischerweise als Homotrimer vor.<sup>122-124</sup> Jedes Monomer ist dabei aus anti-parallelen  $\beta$ -Faltblättern aufgebaut, die eine Sandwichstruktur mit *jelly roll topology* bilden. Die zwischen den verschiedenen TNF-Liganden konservierten Sequenzbereiche des  $\beta$ -Faltblatt-Sandwich sorgen für die nicht-kovalente Bindung an die beiden anderen Monomere und dienen so zur Stabilisierung der trimeren Gesamtstruktur. Die Proteinanteile in den *loop regions*, die zur Verbindung der einzelnen Stränge der  $\beta$ -Faltblätter dienen, sind dagegen sehr spezifisch für den jeweiligen Liganden und ermöglichen die Erkennung des jeweils spezifischen Rezeptormoleküls.

Zahlreiche Liganden der TNF-Familie liegen nicht nur als membranständige Moleküle vor, sondern konnten zudem in löslicher Form nachgewiesen werden. Diese können durch *alternative splicing* oder durch proteolytische Abspaltung der extrazellulären Domäne des membranständigen Liganden (*shedding*) generiert werden.<sup>37</sup> TNF wird z.B. durch TACE (*TNF- $\alpha$  converting enzyme*, ADAM17) von der Zelloberfläche abgespalten,<sup>125</sup> wobei in vielen anderen Fällen die verantwortlichen Proteasen noch nicht identifiziert werden konnten. Die biologische Aktivität der löslichen Liganden ist, im Vergleich zur membranständigen Form, teilweise unterschiedlich. So weist z.B. die lösliche Form des Fas-Liganden eine stark verringerte funktionelle Aktivität auf, kompetitiert dabei mit dem membranständigen Liganden

um die Bindung an den Rezeptor und kann so die apoptose-induzierende Wirkung des membranständigen Moleküls antagonisieren.<sup>36</sup>

Nach Interaktion eines Rezeptormoleküls der TNF-Superfamilie mit seinem membranständigen Liganden können bidirektionale Signale vermittelt werden, d.h. Signale werden sowohl in die rezeptortragende Zelle (*forward signaling*) als auch in die ligandentragende Zelle (*reverse signaling*) übertragen. Dies ermöglicht eine beiderseitige Kommunikation nach Zell-Zell-Kontakt.<sup>103,126</sup> Mittlerweile sind für einige TNF-Liganden die durch *reverse signaling* induzierten Zellantworten bekannt. So kann die Bindung von CD40 an seinen Liganden auf T-Zellen spezifische T-Zell-Antworten und die Differenzierung zu T-Helferzellen initiieren und die Produktion von IL-4 stimulieren.<sup>127-130</sup> In ruhenden T-Zellen wurde dagegen eine CD40L-abhängige Induktion von Apoptose beschrieben.<sup>131</sup> Signale über den OX40-Liganden induzieren die Differenzierung von Monozyten und DC und führen damit zu einer gesteigerten Produktion von TNF, IL-1, IL-6 und IL-12, sowie zu einer Steigerung der Expression von CD40, CD54, CD80 und CD86.<sup>132</sup> Zudem konnte gezeigt werden, dass Signale über CD95L die Proliferation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen kostimulieren, in CD4<sup>+</sup> T-Zellen dagegen Apoptose einleiten.<sup>133</sup> Signale über den CD30-Liganden können sowohl kostimulierende als auch negativ-regulatorische Effekte in T-Zellen vermitteln.<sup>134,135</sup>

Trotz konservierter Sequenzen innerhalb der zytoplasmatischen Domänen nutzen die Liganden der TNF-Familie wohl unterschiedliche Signalwege, die nur wenig bekannt sind. Nach der Stimulation von CD40L konnte bei T-Zellen die Phosphorylierung der Phospholipase C (PLC), resultierend in verstärkter Ausschüttung von Ca<sup>2+</sup> und Aktivierung der Proteinkinase C (PKC), nachgewiesen werden.<sup>136</sup> Die induzierten Signale der TNF-Liganden lösen verschiedenste Zellreaktionen aus, scheinen daher sehr divers und zudem vom zellulären Kontext und Aktivierungsgrad abhängig zu sein.<sup>1-3</sup>

### 2.4.3 Das BAFF/APRIL-System

In dieser Arbeit liegt der Fokus auf dem TNF-Familienmitglied BAFF (auch bekannt als BLyS, TALL-1, zTNF4, TNFSF13B und THANK). BAFF ist wie die meisten TNF-Familienmitglieder ein Typ II Transmembranprotein und agiert entweder als membrangebundener oder löslicher Faktor, welcher mittels proteolytischer Prozessierung durch eine Furin-Konvertase generiert wird.<sup>137</sup> Lösliches BAFF oligomerisiert wie die meisten TNF-Familienmitglieder zu Trimeren, kann sich aber auch zu einer höher geordneten Kapsid-ähnlichen Struktur aus 20 Trimeren (60-mer) zusammenschließen.<sup>138</sup> Eine Expression von BAFF ist hauptsächlich für Zellen myeloischen Ursprungs wie Monozyten, Makrophagen, neutrophile Granulozyten und DC beschrieben. Daneben wurde auch für T-Zellen, aktivierte murine B-Zellen und nicht-hämatopoetische Zellen wie Epithelzellen, Adipozyten oder Keratinozyten eine BAFF-

Expression berichtet.<sup>139,140</sup>

Funktionell spielt BAFF eine wichtige Rolle bei der Entwicklung, Reifung und dem Überleben von B-Zellen und beeinflusst deren Immunglobulinproduktion und die *Class-switch recombination* (CSR).<sup>137,141</sup> Seine Effekte werden über die Interaktion mit drei verschiedenen Rezeptoren, dem *BAFF receptor* (BAFFR), dem *transmembrane activator-calcium modulator and cyclophilin ligand interactor* (TACI) und/oder dem *B-cell maturation antigen* (BCMA), welche auf B-Zellen, aber auch auf aktivierten oder regulatorischen T-Zellen exprimiert werden, vermittelt.<sup>142</sup> Die unterschiedlichen Effektormechanismen von BAFF hängen von seinem Oligomerisierungszustand, dem jeweils involvierten Rezeptor und der damit verbundenen Rekrutierung verschiedener TRAF-Moleküle ab. So kann BAFF sowohl als Trimer als auch 60-mer Signale über BAFFR vermitteln. An TACI dagegen können BAFF-Trimere zwar binden, eine Signalweiterleitung findet jedoch nur nach Bindung von BAFF-Multimeren statt.<sup>143</sup>

Eine Bindung von BAFF führt zur Trimerisierung von BAFFR, wodurch es zur Rekrutierung von TRAF3 und dessen TRAF2-vermittelter Degradierung kommt. Dies hat die Stabilisierung von NIK zur Folge, was zur Aktivierung des alternativen NF- $\kappa$ B-Signalwegs führt. Stimulation von BAFFR reguliert so das B-Zellüberleben und die Reifung unreifer B-Zellen. Eine Bindung von BAFF an TACI hat hingegen die Aktivierung des klassischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs zur Folge, wobei es hier zur Rekrutierung von TRAF2 oder TRAF6 an den ausschließlich über BAFF 60-mer trimerisierten Rezeptor kommt. TACI agiert eher als negativer Regulator des B-Zellüberlebens und reguliert hauptsächlich die CSR und die IgA Produktion.<sup>139,144</sup> BCMA, welcher über die Interaktion mit TRAF1, 2 und 3 oder TRAF5 und 6 ebenfalls den klassischen NF- $\kappa$ B-Signalweg aktiviert,<sup>145</sup> wird hauptsächlich eine Rolle bei der Regulation des Überlebens von Plasmazellen zugeschrieben.<sup>146</sup>

TACI und BCMA, nicht jedoch BAFFR, können neben BAFF auch *A Proliferation-Inducing Ligand* (APRIL) binden, welches eine hohe Sequenzhomologie zu BAFF aufweist.<sup>147</sup> APRIL wird neben Zellen des Immunsystems, die auch BAFF exprimieren, vornehmlich in Tumorgewebe, aber auch in nicht-Immunzellen wie Epithelzellen und Osteoklasten exprimiert.<sup>148</sup> April wird ebenfalls von einer Furin-Konvertase prozessiert, anders als bei BAFF geschieht dies jedoch ausschließlich intrazellulär am Golgi-Apparat, so dass APRIL direkt löslich freigesetzt und nicht als membranständiges Molekül exprimiert wird.<sup>149</sup> Auch APRIL verbessert das B-Zellüberleben, agiert als Co-Stimulus für die B-Zellproliferation und beeinflusst die CSR. Weiterhin verstärkt es die Antigenpräsentation und verbessert so die APC-Funktion von B-Zellen. Es existiert eine alternative Form von APRIL, TWE-PRIL, welche durch *trans-splicing* der nebeneinander liegenden Gene für APRIL und TWEAK, einem weiteren TNF-Familienmitglied, entsteht. TWE-PRIL besteht aus der Zytoplasma- und

Transmembrandomäne von TWEAK, fusioniert an die carboxy-terminale TNF-Domäne von APRIL und repräsentiert die einzige membrangebundene Form von APRIL.

Über die physiologische Rolle von TWE-PRIL ist bis heute allerdings wenig bekannt.<sup>139,147</sup>

Aus klinischer Sicht ist BAFF vor allem hinsichtlich seiner Rolle bei Autoimmunerkrankungen bekannt. Während die Rolle von APRIL umstritten ist, tragen erhöhte BAFF-Level vor allem zur Pathophysiologie des SLE, des Sjögren's Syndrom und der Rheumatoiden Arthritis bei.<sup>147,150-152</sup> Aufgrund dessen ist seit 2011 der neutralisierende BAFF-Antikörper Belimumab (Benlysta®), welcher das BAFF-induzierte B-Zell-Überleben und die Antikörperproduktion hemmt, zur Behandlung von SLE zugelassen.<sup>153,154</sup>

Laut zahlreicher Studien ist BAFF durch seine überlebensfördernde und anti-apoptotische Wirkung auch in die Pathophysiologie von B-Zell Malignomen involviert. So exprimieren maligne Zellen der Akuten (ALL) und Chronisch Lymphatischen Leukämie (CLL), des Non Hodgkin Lymphoms (NHL) und des Multiplen Myeloms (MM) nicht nur einen oder mehrere BAFF-Rezeptoren, sondern auch BAFF und/oder APRIL selbst.<sup>155-160</sup> Darüber hinaus begünstigt die BAFF-Produktion durch Zellen des Tumormikromillieus, wie z.B. microvasculäre Endothelzellen oder *nurse like cells* (NCL), welche unter Anwesenheit von CLL-Zellen aus CD14<sup>+</sup> Zellen differenzieren und große Mengen von BAFF produzieren,<sup>161,162</sup> das Überleben der malignen Zellen.<sup>155,158,163,164</sup> Es konnte gezeigt werden, dass die Blockade von endogenem BAFF das Überleben von NHL B-Zellen reduziert, die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B hemmt und zur Herunterregulation von anti-apoptotischen und Hochregulation von pro-apoptotischen Proteinen führt.<sup>155</sup> Auch bezüglich ALL und MM existieren einige wenige Daten, die BAFF aufgrund seiner anti-apoptotischen Wirkung eine überlebensfördernde Rolle zusprechen.<sup>156,159,160,165</sup> Die meisten Daten liegen zur Rolle von BAFF in der CLL vor: die Expression von BAFF und seinen Rezeptoren auf CLL-Zellen wurde bereits 2002 von Novak et al. beschrieben und 2004 von Kern et al. bestätigt.<sup>157,163</sup> Dabei wurde die Expression der einzelnen Moleküle sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene auf der Zelloberfläche nachgewiesen. Die Zugabe von exogenem BAFF schütze laut beiden Arbeitsgruppen vor Apoptose, während Blockade des endogenen BAFF durch BCMA-Fusionsproteine Apoptose induzierte. Später konnte weiterhin gezeigt werden, dass, wie in gesunden B-Zellen, BAFF über BAFFR den alternativen und über TACI und BCMA den klassischen NF- $\kappa$ B-Signalweg aktiviert. Im Gegensatz zu gesunden B-Zellen, hatte eine Blockade des durch BAFFR aktivierten alternativen NF- $\kappa$ B-Signalwegs jedoch keinen Einfluss auf den Pro-Überlebenseffekt von BAFF für die CLL-Zellen, eine Blockade des kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs hingegen schon.<sup>166</sup> Auch im CLL-Mausmodell mit E $\mu$ -TCL1-Mäusen konnte eine Rolle von BAFF bei der Pathophysiologie der CLL nachgewiesen werden: Tiere, welche eine BAFF-Überexpression aufwiesen, zeigten einen aggressiveren

Krankheitsverlauf und kürzeres Überleben als die Kontrollmäuse.<sup>167</sup>

## 2.5 Chronisch Lymphatische Leukämie (CLL)

Die Chronisch Lymphatische Leukämie (CLL) ist ein niedrig-malignes Non-Hodgkin-Lymphom und beruht auf einer klonalen Akkumulation reifer, funktionell inkompetenter Lymphozyten in peripherem Blut, Knochenmark und sekundären lymphatischen Organen. Bei etwa 95% der CLL-Patienten sind dabei Zellen der B-Zell-Linie (B-CLL) und nur selten T-Zellen betroffen, weshalb hier zur Vereinfachung die Bezeichnung CLL zur Beschreibung der B-CLL verwendet wird. Die jährliche Inzidenz liegt bei 5 Neuerkrankungen je 100.000 Menschen, damit ist die CLL die häufigste Leukämie im Erwachsenenalter (30%). Das mediane Alter bei Diagnosestellung liegt bei etwa 70 Jahren, wobei etwa 15% der Patienten im Alter unter 50 Jahre liegen und Männer häufiger betroffen sind als Frauen (2:1).<sup>168</sup> Da bei über 80% der Patienten chromosomale Aberrationen detektiert werden können, die z.T. auch von prognostischer Bedeutung sind, wird angenommen, dass genetische Veränderungen in der Pathogenese der CLL eine Rolle spielen.

Von der Transformation sind zumeist reife B-Zellen betroffen. Ihre Akkumulation beruht jedoch nicht auf verstärkter Zellteilung – die meisten Zellen befinden sich in der G1/G0-Phase des Zellzyklus – sondern auf der Inhibition von Apoptose, wodurch es zu einer deutlich verlängerten Lebenszeit kommt. So konnte bei CLL-Zellen eine im Vergleich zu normalen B-Zellen deutlich erhöhte Expression anti-apoptotischer Proteine, wie Bcl-2, Bcl-xL und Bax nachgewiesen werden. Die zugrunde liegenden Ursachen sind jedoch nicht vollständig verstanden.<sup>169</sup> Die Infiltration des Knochenmarks oder sekundärer lymphatischer Organe scheint bei der CLL eine wichtige Rolle zu spielen. Es wird angenommen, dass die Infiltration und ein adaptiertes Mikromilieu zum verlängerten Überleben der CLL-Zellen beitragen. Die Anwesenheit verschiedener akzessorischer Zellen – Stromazellen, folliculäre Dendritische Zellen und *nurse-like cells* – moduliert dabei die Akkumulation und vermindert die Apoptose der Leukämie-Zellen. Dies erfolgt entweder durch direkte Interaktion über Zell-Zell-Kontakt oder durch Ausschüttung von Zytokinen, wie unter anderem auch BAFF oder APRIL.<sup>164,170</sup>

In frühen Stadien ist die CLL meist asymptomatisch, daher erfolgt die Erstdiagnose der Erkrankung oftmals zufällig im Rahmen einer Blutbilduntersuchung durch den Nachweis einer Leukozytose. Nur in 20% der Fälle treten bereits bei Diagnosestellung Symptome wie Müdigkeit, Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsverlust auf. Mit fortschreitender Erkrankung kommt es zur Schwellung von Lymphknoten, Hepato- und Splenomegalie und aufgrund

zunehmender Infiltration des Knochenmarks und Verdrängung der gesunden Blutbildung zu Anämie, Thrombozytopenie und erhöhter Infektanfälligkeit. Die Immundefizienz geht einerseits auf die unzureichende Produktion von Immunglobulinen zurück, andererseits auch auf die zunehmende, CLL-vermittelte Immunsuppression, die zu Funktionsstörungen von T-Zellen und NK-Zellen führt. Der Krankheitsverlauf ist dabei sehr variabel ausgeprägt: neben prolongierten Verläufen mit nahezu normaler Lebenserwartung kann es auch zu aggressiven Verläufen kommen. In seltenen Fällen kann die CLL in ein hochmalignes Non-Hodgkin-Lymphom übergehen, einhergehend mit starker Proliferation der CLL-Zellen (Richter-Transformation). CLL-Patienten versterben im Verlauf der Erkrankung häufig an systemischen Infektionen, Pneumonie oder Sepsis.

Neben der Untersuchung im Blutaussstrich, in welchem CLL-Zellen als kleine, reife Lymphozyten erkennbar sind, die wegen ihrer Instabilität leicht platzen und dann als „Gumprecht'sche Kernschatten“ vorliegen, dient zur Diagnosestellung die Immunphänotypisierung der Zellen mittels Durchflusszytometrie, mit der sich auch bei kleiner Tumorlast transformierte B-Zellen zuverlässig erkennen lassen. Dabei wird die Diagnose einer CLL aufgrund einer anhaltenden Lymphozytose im peripheren Blut (Lymphozytenzahl größer als 5.000 /  $\mu\text{l}$  mit typischem Immunphänotyp) gestellt. Neben den klassischen B-Zell-Antigenen CD19, CD20 und CD23, ist vor allem das T-Zell-Antigen CD5 ein charakteristischer Oberflächenmarker von CLL-Zellen. Im Vergleich zu normalen B-Zellen fehlt zudem die Expression von FMC7, die Expression von CD79b ist nur schwach oder gar nicht nachweisbar und auch monoklonale Immunglobuline (meist IgM) mit Leichtkettenrestriktion ( $\kappa$  oder  $\lambda$ ) als Marker monoklonaler Zellen, sind nur schwach exprimiert. Da CLL-Patienten mit einem normalen Karyotyp die beste Prognose haben, werden auch die häufig auftretenden chromosomalen Aberrationen analysiert, von welchen oftmals die Chromosomen 13, 12, 11 und/oder 17 betroffen sind.

Die klinische Klassifizierung erfolgt anhand der Einteilung nach Rai (Tabelle 2) oder Binet (Tabelle 3). Während sich die Einteilung nach Rai zentral an der Lymphozytenzahl im peripheren Blut orientiert, basiert die Einteilung nach Binet wesentlich auf der Erfassung infiltrierter Lymphknotenregionen. Zusätzlich sind für beide Einteilungen der Hämoglobinwert und die Thrombozytenzahl von Bedeutung.

Stadium	Definition	Medianes Überleben
<b>Niedriges Risiko</b> 0	Lymphozytose (> 15.000 / $\mu$ l) und Knochenmarkinfiltration (> 40%)	> 10 Jahre
<b>Intermediäres Risiko</b> I	Lymphozytose und Lymphknotenvergrößerung	7 Jahre
II	Lymphozytose und Hepatomegalie und/oder Splenomegalie (mit/ohne Lymphknotenvergrößerung)	
<b>Hochrisiko</b> III	Lymphozytose und Anämie (Hb < 11 g/dl) (mit/ohne Lymphknotenvergrößerung und/oder Organomegalie)	2 - 3,5 Jahre
IV	Lymphozytose und Thrombozytopenie (< 100.000 / $\mu$ l) (mit/ohne Anämie, Lymphknotenvergrößerung, Organomegalie)	

**Tabelle 2: Stadieneinteilung der CLL nach Rai, 1975.**

Stadium	Definition	Medianes Überleben
A	höchstens 2 Lymphknotenregionen befallen Hb $\geq$ 10 g/dl und Thrombozyten $\geq$ 100.000 / $\mu$ l	> 10 Jahre
B	mindestens 3 Lymphknotenregionen befallen Hb $\geq$ 10 g/dl und Thrombozyten > 100.000 / $\mu$ l	5 Jahre
C	Befall der Lymphknotenregionen irrelevant Hb < 10 g/dl oder Thrombozyten < 100.000 / $\mu$ l	2 - 3 Jahre

**Tabelle 3: Stadieneinteilung der CLL nach Binet, 1981.**

Beide Einteilungen sind in der Klinik verbreitet, weisen jedoch Schwächen bei der Beurteilung früher Stadien auf. Aufgrund der Heterogenität der CLL mit sehr unterschiedlichen klinischen Verläufen sind Prognose und Abschätzung der optimalen Therapie schwierig.

Die einzige kurative Therapieform der CLL stellt derzeit die allogene Stammzelltransplantation dar. Diese kommt jedoch aufgrund des meist hohen Alters der Patienten oftmals nicht in Frage. Da die Erkrankung meist bei älteren Menschen auftritt und oftmals lange Zeit asymptomatisch verläuft, erfolgt eine therapeutische Intervention erst beim Auftreten von Symptomen (bei Binet A oder B) oder fortgeschrittener Erkrankung (bei Binet C). Bei Patienten mit niedrigem Progressionsrisiko wird zumeist die sogenannte *watch and wait*-Strategie verfolgt. Die standardmäßige Erstlinientherapie bei Patienten mit hohem Progressionsrisiko umfasst in den meisten Fällen eine Therapie mit Fludarabin und/oder Cyclophosphamid in Kombination mit dem CD20-Antikörper Rituximab (FCR).<sup>171</sup> Dabei werden gute Ansprech- und Remissionsraten erzielt, allerdings sind die progressionsfreien

Intervalle bis zum Rezidiv oft nur kurz. In Abhängigkeit von Alter und Komorbidität der Patienten kann FC auch durch die weniger effektiven aber besser verträglichen Zytostatika Bendamustin oder Chlorambucil ersetzt werden. Wesentlicher Bestandteil von CLL-Behandlungsstrategien ist die Immuntherapie, im Zuge derer die malignen Zellen durch die Verwendung von Antikörpern gegen spezifische Oberflächenmoleküle zielgerichtet ausgelöscht werden sollen. Bisher sind die Antikörper Alemtuzumab (anti-CD52) und Rituximab für die Klinik zugelassen und werden vor allem in Kombination mit verschiedenen Chemotherapeutika eingesetzt, wobei einzig für Rituximab bislang eine signifikante Verlängerung des Gesamtüberlebens von CLL-Patienten nachgewiesen werden konnte.<sup>172</sup> Damit scheint ein Zusammenhang zwischen Rituximab-induzierten Signalen und der Wirksamkeit parallel verabreichter Zytostatika zu bestehen.<sup>96,173</sup>

Die Wirkmechanismen solcher therapeutischer monoklonaler Antikörper sind bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Neben der direkten Induktion von Apoptose können sie das Komplementsystem aktivieren (*complement dependent cytotoxicity*, CDC) und die sogenannte Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (*antibody dependent cellular cytotoxicity*, ADCC) von z.B. NK-Zellen induzieren.<sup>173</sup> Wird durch Bindung von Rituximab an CD20 auf der Zelloberfläche von z.B. CLL-Zellen Apoptose induziert, kommt es zur Aktivierung von proteolytischen Kaspasen und damit zum Abbau von zellulären Proteinen und zur Fragmentierung der DNA. CLL-Zellen weisen jedoch eine verstärkte Expression von anti-apoptotischen Molekülen der Bcl-2-Familie auf, welche in der Lage sind die Aktivierungskaskade der Kaspasen zu unterbrechen. Ein weiterer Wirkmechanismus von Rituximab ist die Aktivierung des Komplementsystems, welches aus zahlreichen verschiedenen Plasmaproteinen besteht. Eine proteolytische Kaskade generiert dabei u.a. das Protein C3b, welches die Zielzelle für phagozytierende Zellen opsoniert und die Bildung des *membrane attack complex* (MAC) zur Zerstörung der Zellmembran der Zielzelle ermöglicht.<sup>96</sup> Der wahrscheinlich entscheidendste Wirkmechanismus von Rituximab ist die Induktion von ADCC. Dabei werden Antigen-gebundene Antikörper über ihren Fc-Teil von Fc-Rezeptoren auf verschiedenen Immuneffektorzellen erkannt. Von zentraler Rolle ist dabei die Bindung des Fc-Teils an den Fc-Rezeptor auf NK-Zellen (FcγRIIIa, CD16), dessen Aktivierung sowohl die Lyse der Antikörper-markierten Zielzelle als auch die Freisetzung des immunmodulatorischen Zytokins IFN-γ bewirkt. Neben NK-Zellen exprimieren auch Granulozyten und Monozyten bzw. Makrophagen Fc-Rezeptoren und können so zur Rituximab-abhängigen Zytotoxizität gegen Tumorzellen beitragen.<sup>96</sup>

Mittlerweile stehen neben Rituximab zwei weitere CD20-Antikörper zur Behandlung der CLL zur Verfügung: Ofatumumab unterscheidet sich durch die Bindung an ein anderes CD20-Epitop von Rituximab und weist eine höhere Affinität zum Zielantigen auf. Während dies zu

einer verstärkten CDC führt, ist die Frage nach einer im Vergleich zu Rituximab verbesserten ADCC umstritten.<sup>174-176</sup> Obinutuzumab weist aufgrund von *glycoengineering* des Fc-Teils eine im Vergleich zu Rituximab höhere Affinität zum Fc-Rezeptor und dadurch eine deutlich verbesserte Fähigkeit zur Induktion von ADCC auf. Darüber hinaus ist Obinutuzumab in der Lage, Lysosom-vermittelten direkten, nicht-apoptotischen Zelltod zu induzieren.<sup>97,177</sup> So zeigte sich in neueren Studien, dass bessere Ergebnisse bei der Behandlung komorbider Patienten mit CLL erzielt werden, wenn z.B. bei der Standardtherapie mit Chlorambucil und Rituximab letzteres durch Obinutuzumab ersetzt wird.<sup>178,179</sup>

Die Behandlung eines CLL-Patienten mit CD20-Antikörpern führt aufgrund der oben genannten Mechanismen nicht nur zur Eliminierung von malignen, sondern auch gesunden CD20-positiven B-Zellen, wobei sich die B-Zell-Population in der Regel nach 9-12 Monaten wieder erholt.<sup>96</sup> Ein verbreitetes Phänomen bei der Behandlung mit CD20-Antikörpern ist jedoch die Herunterregulation der CD20-Expression bei CLL-Zellen.<sup>180</sup> Dies führt zur Resistenz der Tumorzellen gegenüber der Antikörper-Therapie und macht die Suche nach anderen Zielantigenen oder alternativen Behandlungsstrategien notwendig. Solch alternative Behandlungsstrategie stellen die neuen *small molecules* Ibrutinib, Idelalisib und Abt-199 dar.<sup>181</sup> Die Kinase-Inhibitoren Ibrutinib und Idelalisib greifen in den für B-Zellen essentiellen B-Zell-Rezeptor (BCR) Signalweg ein und induzieren so Apoptose in den CLL-Zellen. Ibrutinib bindet dabei an die Bruton-Tyrosinkinase (BTK), was zu einer verminderten Migration und Proliferation der malignen Zellen führt und Apoptose induziert.<sup>182</sup> Idelalisib ist ein Inhibitor der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), welcher überlebensfördernde Signale blockiert, die Chemotaxis zu Zellen aus dem Tumormikromillieu verhindert und die CLL-Zellen so susceptibler für Chemotherapeutika macht.<sup>183</sup> Abt-199 ist ein Antagonist des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 und führt so zur Induktion von Apoptose in sowohl gesunden als auch malignen B-Zellen.<sup>184,185</sup>

Die Wirksamkeit all dieser Substanzen wurde in klinischen Studien gezeigt. So führte Ibrutinib in Phase Ib/II Studien mit rezidivierten/refraktären CLL-Patienten zu beeindruckenden Überlebensraten und ist seit 2014 für die Behandlung bereits behandelter CLL-Patienten zugelassen.<sup>182</sup> Idelalisib ist bisher nur als Kombinationstherapie mit Rituximab zugelassen, wobei diese in einer Phase III Studie mit rezidivierten Patienten sowohl die Gesamtansprechrates als auch nach 12 Monaten das Gesamtüberleben im Vergleich zur Rituximab-Monotherapie deutlich verbesserte.<sup>186</sup> Auch Abt-199, welches sich derzeit noch in der klinischen Entwicklung als Monotherapie oder in Kombination mit Immun- oder Chemotherapie befindet, führte ebenfalls zu klinischen Erfolgen bei der Behandlung von Hoch-Risiko CLL-Patienten.<sup>187</sup>

So gibt es mittlerweile zahlreiche neue Reagenzien mit unterschiedlichen Wirkmechanismen, die in kombinatorischen oder sequentiellen Behandlungsstrategien das zukünftige Therapieparadigma der CLL verändern könnten.

## 2.6 NK-Zell-vermittelte Immunüberwachung maligner hämatopoetischer Neoplasien

NK-Zellen spielen als zytotoxische Lymphozyten eine zentrale Rolle bei der Immunabwehr von Tumoren.<sup>188</sup> Insbesondere ihre Bedeutung bei der Immunüberwachung maligner hämatopoetischer Erkrankungen kann durch klinische Daten belegt werden. So geht z.B. die durch haploidente Stammzelltransplantation hervorgerufene Alloreaktivität von NK-Zellen mit klinischen Vorteilen einher.<sup>58</sup> Aber auch autologe NK-Zellen scheinen eine Rolle bei der Immunüberwachung leukämischer Erkrankungen zu spielen. So ist nicht nur die Anzahl und Aktivität von NK-Zellen bei Leukämiepatienten im Vergleich zu gesunden Personen reduziert, es scheint zudem, dass die Aktivität autologer NK-Zellen mit dem Überleben von Leukämiepatienten assoziiert ist.<sup>189-191</sup>

NK-Zellen spielen darüber hinaus eine wichtige Rolle bei der Immuntherapie von malignen hämatopoetischen Erkrankungen. Von zentraler Bedeutung ist dabei der Fc-Rezeptor von NK-Zellen (FcγRIIIa, CD16), dessen Aktivierung ADCC und die Produktion von Zytokinen auslöst.<sup>89,90</sup> Der erste jemals zur Krebstherapie zugelassene Antikörper Rituximab ist derzeit zentraler Bestandteil der Behandlungsstrategie bei der CLL.<sup>93</sup> Da therapeutische Antikörper großes Potential zur Behandlung von Tumoren zeigen, zielt die Entwicklung neuer Generationen therapeutischer Antikörper u.a. auf die Optimierung ihrer FcγRIIIa-Affinität ab, um die Effektorfunktionen von NK-Zellen gegen Tumorzellen zu verstärken.<sup>192</sup> Ein Beispiel für solch einen durch *glykoengineering* optimierten Antikörper ist der ebenfalls gegen CD20 gerichtete Antikörper Obinutuzumab (GA101).<sup>98</sup> Neben der Verbesserung der immunstimulatorischen Kapazität eines Antikörpers erscheint es jedoch auch sinnvoll, die Effizienz seiner therapeutischen Wirkung durch das Verhindern von *immune escape*-Mechanismen zu verbessern.

In den letzten 30 Jahren wurde durch zahlreiche Arbeiten gezeigt, dass die Fähigkeit von NK-Zellen maligne Zellen zu lysieren in lymphatischen Leukämien, und dabei insbesondere in der CLL, im Vergleich zu myeloischen Leukämien deutlich eingeschränkt ist. So wurde neben einer geringeren Suszeptibilität der CLL-Zellen gegenüber der NK-Zell-vermittelten Lyse, auch eine reduzierte Reaktivität der patienteneigenen NK-Zellen beschrieben, wobei dies sowohl für die direkte Lyse als auch die durch therapeutische Antikörper vermittelte

ADCC gilt. Die zu Grunde liegenden Mechanismen sind bis heute nicht hinreichend bekannt.<sup>193-203</sup>

In diesem Zusammenhang erschien es uns interessant, dass von anderen Untersuchern eine aktivierungsabhängige Expression von BAFF in NK-Zellen beschrieben wurde. Zu dessen funktioneller Rolle, insbesondere auch bei der Interaktion von NK-Zellen mit malignen Zellen, war bislang jedoch nichts bekannt.<sup>204</sup> In der vorliegenden Arbeit wurde daher zum einen die Expression von BAFF durch NK-Zellen und dessen Rolle bei der NK-Zell-vermittelten Immunüberwachung der CLL näher untersucht. Darüber hinaus wurde eine BAFF-Neutralisation als therapeutisches Konzept zur Steigerung der Suszeptibilität von CLL-Zellen für eine durch therapeutische Antikörper induzierte NK-Immunantwort, aber auch zur Verbesserung der Effizienz „konventioneller“ Systemtherapeutika evaluiert.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Geräte

Combi cell Harvester	Skatron, Lier, Norwegen
Brutschrank Heracell	Heraeus, Hanau, Deutschland
Bolt® Mini Gel-Laufkammer	Life technologies, Darmstadt
Durchlichtmikroskop, Axiovert 25	Zeiss, Jena, Deutschland
ELISA-Reader, E-max	Molecular Devices, Ismaning, Deutschland
FACS BD FACS Canto™ II	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
FACS Cytomics FC500	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Feinwaage, Mettler AT 261 Delta	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Geldokumentation BioDocAnalyse	Biometra, Göttingen, Deutschland
Gelkammern & Powersupply	BioRad, München, Deutschland
iBlot® Gel Transfer Device	Invitrogen™ Life technologies, Darmstadt
MACS Separator Magnet	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Massenspektrometer LTQ orbitrap XL	Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
Multilabel Counter Victor 1420	Perkin Elmer Wallac, Turku, Finnland
Multistepper	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim, Deutschland
pH-Meter	Mettler-Toledo, Greifensee, Schweiz
Pipetteboy comfort	Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Pipetten & Multikanalpipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sterilbank Herasafe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Tischwaage BL 150S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Tisch-Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	Heraeus, Hanau, Deutschland
UltiMate 3000 RSLCnano UHPLC system	Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
Vortexer	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Wasserbad	Köttermann, München, Deutschland
Wallac 1205 Betaplate	LKB Instruments, Mount Waverley, Australien
Zentrifuge	Heraeus, Hanau, Deutschland

### 3.1.2 Verbrauchsmaterial

Bolt® Bis-Tris Plus Gele	Life technologies, Darmstadt
Combi-Tips	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Cryoröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland Nunc, Roskilde, Dänemark
Einmalpipetten	Corning Inc., Corning, NY, USA
Einmalspritzen	Braun, Wertheim, Deutschland
FACS-Röhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
MACS Säulen (LS)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäße	Biozym Scientific, Hess. Oldendorf, Deutschland
Platten für ELISA (96 well)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA Nunc, Roskilde, Dänemark
Platten für FACS (96 well)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen	VWR, Darmstadt, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5; 1,5; 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vakuum-Filtrationssystem (steril)	Millipore, Billerica, MA, USA
Zellkulturflaschen	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA Nunc, Roskilde, Dänemark
Zellkulturplatten (6, 12, 24, 48, 96 well)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA Corning Inc., Corning, NY, USA
Zentrifugenröhrchen (15 ml; 50 ml)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zentrifugen-Filtereinheiten	
Amicon Ultra 15	Merck, Millipore, Billerica, MA, USA

### 3.1.3 Chemikalien & Reagenzien

Alle nicht aufgelisteten Reagenzien wurden von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) oder Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

aTaq DNA-Polymerase	Promega, Madison, WI, USA
Agarose	Lonza, Rockland, ME, USA
Ampuwa	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Amersham ECL Prime	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
BATDA reagent	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
BD OptEIA™ Assay Diluent	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

Bolt® MOPS-SDS-Laufpuffer	Life technologies, Darmstadt
Bovines Serum Albumin (BSA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Carbonat-Bicarbonat-Puffer	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
CNBr-activated Sepharose 4B	GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK
CountBright absolute counting beads	Life technologies, Carlsbad, CA, USA
4-OOH-Cyclophosphamid	Niomech, Bielefeld, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
EDTA Solution	Cambrex, Rockland, ME, USA
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Europium Solution	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Ficoll-Lösung	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Fludarabin (Fludara®)	Medac, Hamburg, Deutschland
LDS-Puffer	Life technologies, Darmstadt
L-Glutamin	Lonza, Verviers, Belgien
<sup>3</sup> H-Thymidin	Hartmann Analytic, Braunschweig
Medium DMEM	Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Medium RPMI 1640	Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natrium Pyruvate Solution	Lonza, Verviers, Belgien
NEAA Solution	Lonza, Verviers, Belgien
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Lonza, Verviers, Belgien
PBS	PAA, Pasching, Österreich
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase (rek.)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Phosphate Substrate (P4744)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Phosphorsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Polystyrene Latex beads	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Szintillationsflüssigkeit Ultima gold	PerkinElmer, Waltham, MA, USA
Reducing Agent	Life technologies, Darmstadt
RIPA-Puffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
TMB MicroWell Peroxidase Substrate	KPL, Gaithersburg, MD, USA
Triton X-100	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-114	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypan Blue Stain 0,4%	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin	Sigma Aldrich, St. Louis, MO

Trypsin-EDTA Solution	Lonza, Verviers, Belgien
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
ZipTipC18	Millipore, Schwalbach, Germany
Zellproliferationsreagenz WST-1	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

### 3.1.4 Antikörper, Fusionsproteine und Zytokine

APRIL (clone Aprily 1; mlgG1)	Enzo Life Sciences, Lausen, Schweiz
BAFF (rekombinant)	Immunotools, Friesoythe, Deutschland
BAFF (clone 1D6; mlgG1)	eBioscience, San Diego, CA, USA
BAFF (clone 137314; mlgG1)	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
BAFF (clone 148725; mlgG2b)	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
BAFFR (clone 11c1; mlgG1)	Biolegend, San Diego, CA, USA
BAFFR-Ig	Adipogen, Liestal, Switzerland
BCMA (clone Vicky-1; ratlgG1)	Enzo Life Sciences, Lausen, Schweiz
CD40L (rekombinant)	Immunotools, Friesoythe, Deutschland
Belimumab (Benlysta®)	GlaxoSmithKline, Brentford, UK
Bevacizumab (Avastin®)	Roche, Basel, Switzerland
Goat-anti-mouse-PE	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
Humanes IgG (hlgG)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
IL-2, IL-15, IFN-g (rekombinant)	Immunotools, Friesoythe, Deutschland
Mouse anti-human-IgG1-PE	SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA
Mouse IgG1	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
Mouse IgG2b	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
Obinutuzumab (Gazyvaro®)	Roche, Basel, Switzerland
Ofatumumab (Arzerra®)	GlaxoSmithKline, Brentford, UK
PARP p85 Fragment	Promega, Madison, WI, USA
Rat IgG1	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
Rituximab (Mabthera®)	Roche, Basel, Switzerland
TACI (clone 165604; mlgG1)	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA

Direkt-markierte FACS-Antikörper und die zugehörigen Isotyp-Kontrollen wurden von BD Pharmingen (San Diego, CA, USA) bezogen.

### 3.1.5 Kits

AnnexinV-PE/7-AAD	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
Cytofix/Cytoperm™	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
April ELISA Platinum	eBioscience, San Diego, CA, USA
BAFF ELISA, matched pair detection set	Adipogen, Liestal, Switzerland
High Pure RNA Isolation Kit	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
LIVE/DEAD fixable aqua staining Kit	Life technologies, Carlsbad, CA, USA
Monocyte Isolation Kit II	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
NK Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
SuperScript® Synthesis System	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

### 3.1.6 Zelllinien

293	Universität Lausanne, Schweiz
293-BAFF	Universität Lausanne, Schweiz
Raji	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
K562	Universität Tübingen, Deutschland
K562-IL15-41BBL	St. Jude's Children's Research Hospital, USA

### 3.1.7 Medien, Puffer und Lösungen

Agarosegele	1x TAE-Puffer + 2% (w/v) Agarose + 0,01% EtBr
ELISA-Waschpuffer	PBS + 0,5% Tween 20
FACS-Puffer	PBS + 1% FCS + 0,01% NaN <sub>3</sub>
MACS-Puffer	PBS + 0,5% FCS + 2 mM EDTA
TAE-Puffer (50 x)	2 M Tris-HCl pH 8,0 + 5,75% (v/v) Essigsäure + 50 mM EDTA
Western Blot-Transferpuffer	195mM Glycin + 0,01% SDS + 12,5mM Tris-Base + 10% Methanol
Western Blot-Waschpuffer	PBS + 0,1% Tween 20
Medium (Einfrieren)	RPMI 1640 + 20% FCS + 10% DMSO
Medium (Zellkultur)	RPMI 1640 + 10% FCS + 1% P/S
Medium (Zellkultur)	DMEM/F-12 + 10% FCS + 1% P/S

### 3.1.8 Verwendete Primer

Alle Primer wurden von Biomers (Ulm, Deutschland) bezogen. Nachfolgend sind die Sequenzen angegeben.

BAFF            5'- CCTCACGGTGGTGTCTTTCT -3'  
                  5'- AAAGCTGAGAAGCCATGGAA -3'

APRIL           5'-CCAGAATGGGGAAGGGTATC-3'  
                  5'-CGCCCCTCATCTACACACAC-3

GAPDH           5'- GAGTCAACGGATTTGGTCGT -3'  
                  5'- TTGATTTTGGAGGGATCTCG -3'

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.2.1.1 RNA-Extraktion

Zur Gewinnung von RNA wurden  $5 \times 10^6$  Zellen mit PBS gewaschen, der Überstand komplett abgesaugt und das Pellet anschließend bis zur Aufarbeitung bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert. Die Isolation zellulärer Gesamt-RNA erfolgte mit dem *High Pure RNA Isolation Kit* von Roche Diagnostics und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Anschließend wurde die Konzentration photometrisch bestimmt und die RNA direkt zur cDNA-Synthese verwendet oder bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

#### 3.2.1.2 Herstellung von cDNA durch Reverse Transkription (RT)

Bei der Reversen Transkription kann mit einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase RNA in komplementäre, einzelsträngige DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Zur Herstellung von cDNA aus der zuvor präparierten Gesamt-RNA wurde das Kit *SuperScript® Synthesis System* von Invitrogen verwendet. Dazu wurde  $1 \mu\text{g}$  RNA in  $25 \mu\text{l}$  DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen,  $2,5 \mu\text{l}$  dNTP-Mix ( $10 \text{ mM}$ ) und  $1,5 \mu\text{l}$  Random Hexamer Primern ( $50 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ) zugesetzt und diese Mischung für  $5 \text{ min}$  bei  $65^\circ\text{C}$  erhitzt. Anschließend wurde ein Mix aus  $5 \mu\text{l}$  RT-Puffer ( $10 \times$ ),  $10 \mu\text{l}$   $\text{MgCl}_2$  ( $25 \text{ mM}$ ),  $5 \mu\text{l}$  DTT ( $0,1 \text{ M}$ ) und  $1 \mu\text{l}$  RNaseOUT ( $40 \text{ U}/\mu\text{l}$ ) zugegeben, für  $2 \text{ min}$  bei  $42^\circ\text{C}$  inkubiert und  $1 \mu\text{l}$  SuperScript II RT ( $50 \text{ U}/\mu\text{l}$ ) zugesetzt. Der Ansatz wurde für  $50 \text{ min}$  bei  $42^\circ\text{C}$  inkubiert, die Reaktion durch Erhitzung für  $15 \text{ min}$  bei  $70^\circ\text{C}$  beendet, zum Verdau der RNA  $1 \mu\text{l}$  RNaseH zugegeben und  $20 \text{ min}$  bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Die fertige cDNA wurde anschließend direkt verwendet oder bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

#### 3.2.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur qualitativen Bestimmung der Genexpression wurde cDNA der zu analysierenden Proben in einer RT-PCR eingesetzt. Dazu wurde ein Mix aus  $2,5 \mu\text{l}$  Puffer ( $10 \times$ ),  $1,5 \mu\text{l}$   $\text{MgCl}_2$  ( $25 \text{ mM}$ ),  $0,5 \mu\text{l}$  dNTP-Mix ( $10 \text{ mM}$ ), je  $0,25 \mu\text{l}$  der beiden Primer (je  $25 \mu\text{M}$ ) und  $0,125 \mu\text{l}$  *aTaq* DNA-Polymerase ( $5 \text{ U}/\mu\text{l}$ ) angesetzt und mit Wasser auf  $24 \mu\text{l}$  aufgefüllt. Abschließend wurde  $1 \mu\text{l}$  cDNA zugegeben und die Reaktion im Thermocycler gestartet. Zur Amplifikation wurde die Probe zunächst für  $3 \text{ min}$  bei  $95^\circ\text{C}$  denaturiert, anschließend erfolgten 25-35

Zyklen aus 30 s bei 95°C (Denaturierung), 30 s bei 57°C (Annealing) und 30 s bei 72°C (Elongation). Zur Elongation aller Fragmente wurde die Probe abschließend für 10 min bei 72°C inkubiert und bis zur Weiterbearbeitung auf 4°C gekühlt oder bei -20°C eingefroren. Die Analyse erfolgte durch Agarosegel-Elektrophorese

#### 3.2.1.4 Agarosegel-Elektrophorese

Zum Nachweis von PCR-Produkten bei optimaler Auftrennung der DNA-Fragmente wurden Gele mit einer Agarosekonzentration von 2% verwendet und 0,01% Ethidiumbromid zugesetzt. Nach Auftragung von Größenmarker bzw. 10 µl des PCR-Produktes, jeweils vermischt mit DNA-Probenpuffer, wurden die DNA-Fragmente bei 100 Volt aufgetrennt. Zur Detektion wurde das Gel unter UV-Licht analysiert.

### 3.2.2 Zellbiologie

Sämtliche Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 5,0% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Zellzahl wurde unter Ausschluss toter Zellen durch Trypanblau-Anfärbung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Wenn nicht anders angegeben, erfolgte eine Zentrifugation der Zellen bei 1.500 rpm für 5 min.

#### 3.2.2.1 Kultivierung von Zelllinien

Ein Mediumwechsel bei den verwendeten Zelllinien wurde alle 2-3 Tage durchgeführt. Bei Suspensionszelllinien wurden die Zellen zentrifugiert und in frischem Medium auf die gewünschte Zelldichte eingestellt. Zum Umsetzen (semi-) adhärenter Zellen wurde der Kulturüberstand abgenommen, vorsichtig mit PBS gewaschen, Trypsin-EDTA Solution zugegeben und für etwa 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig vom Flaschenboden abgeklopft und frisches Medium zugesetzt. Alternativ wurden die Zellen mit einem Zellschaber direkt vom Boden der Zellkulturflasche abgeschabt. Die Zellsuspension (ggf. vermischt mit aufbewahrtem Kulturüberstand semi-adhärenter Zellen) wurde anschließend zentrifugiert und das Zellpellet in frischem Medium aufgenommen. Für geplante Versuche mit den Zellen wurden diese am Vortag frisch versorgt, um zu gewährleisten, dass sich diese zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung in der Wachstumsphase befinden.

Die Versorgung der Zelllinien sowie die entsprechend verwendeten Medien können nachfolgender Übersicht entnommen werden:

Zelllinie	Zelldichte (Split)	Kulturmedium
293	4x10 <sup>6</sup> / 10 ml (1:3)	DMEM/F-12 + 10% FCS + 1% P/S
293-BAFF	4x10 <sup>6</sup> / 10 ml (1:3)	DMEM/F-12 + 10% FCS + 1% P/S
Raji	1x10 <sup>7</sup> / 20 ml (1:3)	RPMI 1640 + 10% FCS + 1% P/S
K562	1x10 <sup>7</sup> / 20 ml (1:3)	RPMI 1640 + 10% FCS + 1% P/S
K562-IL15-41BBL	1x10 <sup>7</sup> / 20 ml (1:3)	RPMI 1640 + 10% FCS + 1% P/S

### 3.2.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur Konservierung von Zellen wurden diese einen Tag nach dem Umsetzen aus der Kulturflasche entnommen, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Zellen in Einfriermedium resuspendiert und mit einer Zelldichte von 5 x 10<sup>6</sup> je ml in sterile Cryoröhrchen (je 1 ml) eingefroren (-80°C). Nach wenigen Tagen wurden die Röhrchen zur Langzeitlagerung in Stickstoff-Tanks überführt.

Um eingefrorene Zellen in Kultur zu nehmen, wurde das Cryoröhrchen bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, die Zellen sofort in Medium resuspendiert und zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in Medium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche gegeben.

### 3.2.2.3 Spender primären Materials

Gemäß den Richtlinien der Ethikkommission und mit dem freiwilligen Einverständnis der Spender wurde Material zur Isolation mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) oder aus dem Knochenmark (KM) sowohl von Leukämie-Patienten als auch von gesunden Spendern gewonnen. Material von Patienten wurde zum Zeitpunkt der Diagnosestellung vor Beginn der Therapie entnommen.

### 3.2.2.4 Isolation von PBMC

Zur Isolation von PBMC von gesunden Spendern wurden frisch abgenommenes Vollblut, zur Gerinnungshemmung mit Heparin versetzt, Buffy-Coat- oder Leukaphereseprodukte der Blutbank des Universitätsklinikums Tübingen verwendet. Patientenmaterial wurde, ebenfalls mit Heparin versetzt, direkt nach der Abnahme aufgearbeitet.

Die mononukleären Zellen wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation aus dem gespendeten Material isoliert. Die isotonische Ficoll-Lösung (Ficoll-Hypaque) enthält ein synthetisches, stark verzweigtes und vernetztes Polymer aus Saccharose und Epichlorhydrin

(Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer) und besitzt daher eine Dichte von etwa 1,077 g/ml. Während sich mononukleäre Zellen (Lymphozyten und Monozyten) bei der Fraktionierung aufgrund ihrer niedrigeren Dichte in der Interphase zwischen Plasma (enthält die Thrombozyten) und Ficoll-Lösung anreichern, durchdringen Zellen mit einer höheren Dichte (Erythrozyten und Granulozyten) die Ficoll-Lösung und bilden ein Sediment.

Zum Auftragen der Blut-Probe wurden diese zumeist 1:3 mit PBS verdünnt. 15 ml vorgelegter Ficoll-Lösung wurden anschließend mit 35 ml des Blut-PBS-Gemisches überschichtet. Nach der Zentrifugation (2.000 rpm für 18 min; ohne Bremse) wurden die Zellen der Interphase abgenommen und anschließend dreimal mit PBS gewaschen (1.500 rpm für 5 min). Zur Entfernung der Thrombozyten erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (800 rpm für 10 min). Anschließend wurden die Zellen je nach Verwendungszweck in Kulturmedium oder PBS resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Gesunde PBMC für nachfolgende Experimente wurden mit  $5 \times 10^6$  Zellen je ml in Kultur genommen.

### 3.2.2.5 Isolation ruhender/naiver NK-Zellen und Monozyten

Zur Gewinnung von hochreinen Zellpopulationen wurde das Prinzip der MACS-Separation (*Magnetic Activated Cell Sorting*) angewendet. Dieses basiert auf der negativen Selektion der gewünschten Zellen (diese bleiben unbeeinflusst) durch magnetische Markierung aller unerwünschten Zellen mittels derer spezifischen Oberflächenmoleküle (z.B. CD3 für T-Zellen und CD19 für B-Zellen). Die genaue Zusammensetzung des primären Antikörper-Cocktails (Biotin-markiert) ist unbekannt, richtet sich jedoch gegen alle Zellen innerhalb der PBMC außer NK-Zellen bzw. Monozyten. Der sekundäre Antikörper (anti-Biotin) ist mit Magnet-Beads gekoppelt und bindet spezifisch an den primären Antikörper. So werden die Antikörper-markierten Zellen in einem starken Magnetfeld in der MACS-Säule zurückgehalten, während die nicht-markierten NK-Zellen bzw. Monozyten diese durchlaufen und so angereichert werden. Die Reinheit der Populationen wurde anschließend mittels FACS-Analyse bestimmt ( $CD56^+CD3^-$  für NK-Zellen bzw.  $CD14^+$  für Monozyten) und lag in der Regel bei über 95%. Zur Gewinnung von reinen NK-Zellen oder Monozyten aus frisch isolierten PBMC wurden das *NK Cell Isolation Kit* bzw. *Monocyte Isolation Kit II* gemäß den Herstellerprotokollen verwendet.

### 3.2.2.6 Generierung polyklonaler NK-Zellen (pNKC)

Zur Herstellung polyklonaler NK-Zellen wurden zunächst PBMC aus Vollblut oder Leukaphereseprodukten mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Die Zellen wurden in Kulturmedium aufgenommen, auf  $1 \times 10^7$  Zellen je ml eingestellt, in eine Zellkulturflasche überführt und anschließend für 1 h im Brutschrank inkubiert. Durch vorsichtige Entnahme des Überstandes konnten die an die Kunststoffoberfläche adhärenen Monozyten aus dem Zellgemisch entfernt werden. Der Überstand wurde zentrifugiert und die Zellen anschließend in Kulturmedium (mit dem Zusatz von 2 mM L-Glu und 50 U IL-2 pro ml) aufgenommen und auf  $8 \times 10^5$  Zellen pro ml eingestellt. Zellen der Linie K562-41BBL-IL15 dienten als Feeder-Zellen. Diese wurden mit 30 Gray bestrahlt, einmal mit PBS gewaschen (1.500 rpm für 5 min) und in Kulturmedium (versetzt mit 2 mM L-Glu) auf  $2 \times 10^5$  Zellen je ml eingestellt. Von beiden Zellsuspensionen wurden nun jeweils 500  $\mu$ l in die inneren 8 wells einer 24 well-Platte pipettiert; in die äußeren wells wurde jeweils 600  $\mu$ l PBS als Verdunstungsschutz gegeben. Die Platten wurden für 10 Tage im Brutschrank inkubiert. Alle zwei Tage wurde jedem well 200  $\mu$ l Überstand entnommen und 200  $\mu$ l frisches Medium (mit 25 U IL-2 je ml) zugesetzt. Am Tag 10 wurde die Reinheit der polyklonaler NK-Zellen ( $CD56^+CD3^-$ ) mittels FACS-Analyse ermittelt.

### 3.2.3 Durchflusszytometrie

Die Expression verschiedener Proteine auf der Zelloberfläche wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die zu untersuchenden Zellen wurden dazu mit Zielmolekül-spezifischen Antikörpern, direkt oder indirekt mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert, angefärbt. Die Analyse erfolgte mit dem Cytomics FC 500 oder dem FACS BD FACS Canto™ II, zur Auswertung wurde die integrierte Software bzw. das Analyse-Programm FlowJo vX.0.7 verwendet.

Bei der Messung werden die Zellen durch hydrodynamische Fokussierung vereinzelt und durch einen gebündelten Laserstrahl geführt. So kommt es zur Anregung der gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe, die daraufhin Licht bestimmter Wellenlänge emittieren. Dieses Licht kann durch ein komplexes System von Spiegeln und Filtern im Durchflusszytometer gebündelt und zerlegt werden. Für jeden unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff bekommt man somit ein spezifisches Signal. Unabhängig von den gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen lässt sich eine Aussage über die Größe und Granularität der Zellen treffen.

### 3.2.3.1 Allgemeines Protokoll

Zur Färbung wurden unmarkierte (primäre) Antikörper mit einer Konzentration von 10 µg/ml (ebenso die Isotyp-Kontrollen) eingesetzt. Sekundäre Antikörper wurden 1:100 bis 1:200 verdünnt und direkt markierte Antikörper wurden 1:25 verdünnt eingesetzt. Alle Antikörperverdünnungen wurden in FACS-Puffer mit humanem IgG (10 µg/ml) hergestellt und jeweils mit 50 µl zur Färbung eingesetzt.

Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurden die zu untersuchenden Zellen in FACS-Puffer mit 10 µg/ml humanem IgG aufgenommen und 1 h bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen in einer 96 well-Platte verteilt und in der Platte zentrifugiert (2.000 rpm für 2 min). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in der primären Antikörperlösung resuspendiert. Nach der Inkubation (30 min bei 4°C) wurden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Um gebundenen primären Antikörper zu detektieren, wurde das Zellpellet anschließend in sekundärer Antikörperlösung resuspendiert und die Zellen für 20 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurde erneut zweimal gewaschen und ggf. erfolgte ein weiterer Inkubationsschritt mit direkt-markierten Antikörpern (20 min bei 4°C im Dunkeln). Danach wurden die Zellen noch einmal gewaschen und das Zellpellet wurde in 300 µl FACS-Puffer resuspendiert und bis zur Messung bei 4°C im Dunkeln gelagert.

### 3.2.3.2 Messung der Bindung von Fusionsproteinen

Zum Nachweis der Bindung des BAFFR-Ig Fusionsproteins an BAFF auf der Oberfläche von Zielzellen wurden die Zellen in FACS-Puffer (ohne humanes IgG oder alternativ mit 10 µg/ml mouse IgG) aufgenommen, in eine 96 well-Platte gegeben und anschließend zentrifugiert. Das BAFFR-Ig wurde auf 5 µg/ml in FACS-Puffer (ohne humanes IgG) verdünnt und mit 50 µl zur Färbung eingesetzt. Nach einer Inkubation von 30 min bei RT wurde zweimal gewaschen und das Zellpellet in sekundärer Antikörperlösung (mouse-anti-human-IgG1-PE; 1:200 in FACS-Puffer) resuspendiert. Nach einer Inkubation von 15 min bei RT wurde erneut gewaschen. Optional wurden die Zellen anschließend mit direkt-markierten Antikörpern gefärbt (10 min bei RT), anschließend in FACS-Puffer resuspendiert und bis zur Messung bei 4°C gelagert.

### 3.2.3.3 Messung intrazellulären BAFF-Proteins

Zur Analyse der intrazellulären BAFF-Expression wurde das Cytofix/Cytoperm™ Kit von BD Biosciences verwendet. Hierbei erfolgte zunächst eine Selektion der CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> NK-Zellen mittels extrazellulärer Färbung mit direkt gelabelten Antikörpern gemäß dem in Punkt 3.2.3.1

beschriebenen Protokoll. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und zur Färbung toter Zellen für 20 min mit 200 µl *fixable aqua* auf Eis im Dunkeln inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS erfolgten Fixierung, Permeabilisierung und intrazelluläre Färbung gemäß Herstellerangaben.

#### 3.2.3.4 Messung apoptotischer und toter Zellen mittels AnnexinV/7-AAD

Zum Nachweis apoptotischer und toter Zellen wurde das AnnexinV-PE/7-AAD Kit von BD Pharmingen verwendet und nach Herstellerangaben durchgeführt. AnnexinV bindet an das im Zuge der Apoptose von der Membranninnenseite auf die –außenseite translozierte Phospholipid Phosphatidylserin, während 7-AAD in die DNA toter Zellen interkaliert. Lebende Zellen sind damit als AnnexinV<sup>-</sup>/7-AAD<sup>-</sup>, früh-apoptotische Zellen als AnnexinV<sup>+</sup>/7-AAD<sup>-</sup> und spät-apoptotische oder tote Zellen als AnnexinV<sup>+</sup>/7-AAD<sup>+</sup> definiert.

### 3.2.4 Analyse der NK-Zell-Reaktivität

#### 3.2.4.1 NK-Zell-Zytotoxizität (BATDA-Europium-Assay)

Die Zytotoxizität von NK-Zellen gegen eine spezifische Zellpopulation wurde mit Hilfe des BATDA-Europium-Assay analysiert. Dazu wurden die Zielzellen mit BATDA (*2,2':6',2''-terpyridine-6,6''-dicarboxylacid acetoxymethylester*) vorinkubiert, dessen Esterbindung nach Aufnahme in die Zelle hydrolysiert wird, wodurch der aktivierte Ligand (TDA) in der Zelle verbleibt und nur durch Lyse der Zielzellen in den Kulturüberstand abgegeben wird. Durch Bindung des freigesetzten Liganden an das zugegebene Europiumsalz bildet sich ein stabiler Chelat-Komplex (EuTDA), dessen Fluoreszenzsignal direkt mit der Anzahl lysierter Zellen korreliert. Die spezifische Lyse wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{Lyse [\%]} = (\text{Wert}_{\text{Probe}} - \text{Wert}_{\text{spontan}}) / (\text{Wert}_{\text{maximal}} - \text{Wert}_{\text{spontan}}) \times 100$$

Die Zielzellen wurden mit  $2 \times 10^6$  in 2 ml Kulturmedium aufgenommen, mit 4 µl BATDA-Lösung versetzt und für 1 h unter regelmäßigem Schütteln bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen fünfmal mit warmen Medium gewaschen (Zentrifugation bei 300 g für 7 min) und auf  $5 \times 10^4$  Zellen je ml eingestellt. Anschließend wurden die Zellen mit 100 µl je well in eine 96 well-Platte ( $5 \times 10^3$  Zielzellen je well) gegeben. Optional wurde nun 10 µg/ml Rituximab zugesetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Effektorzellen wurden entsprechend des gewünschten Verhältnisses von Effektor- zu Zielzelle (E:T Ratio) eingestellt und mit 100 µl je well zu den vorgelegten Zielzellen pipettiert. Anstatt

Effektorzellen wurden 100 µl Medium für den Spontanrelease bzw. 100 µl 1%-ige Triton X-100-Lösung zur Bestimmung des Maximalrelease zu den Zielzellen gegeben. Anschließend wurden die Platten kurz zentrifugiert (100 g für 2 min) und 2 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde erneut zentrifugiert (200 g für 5 min), 20 µl des Überstandes entnommen, mit 200 µl Europium-Lösung in einer 96 well-Platte vermischt und anschließend die Fluoreszenz bestimmt.

Zur Analyse des Einflusses von BAFF auf die NK-Lyse von CLL-Zellen wurden die Zielzellen vor dem Zytotoxizitätsassay für 24 h mit BAFF bzw. BAFF und Belimumab oder einer Isotypkontrolle mit  $2,5 \times 10^6$  Zellen in 500 µl Zellkulturmedium vorbehandelt, gewaschen und anschließend auf die für den Assay benötigte Zellzahl von  $2 \times 10^6$  in 2 ml eingestellt.

#### 3.2.4.2 NK-Zell-Degranulation und –Aktivierung (CD107a- und CD69-Assay)

Die Oberflächenexpression von CD107a bei NK-Zellen dient als Nachweis für die Ausschüttung lytischer Granula (Degranulation), da dieses Protein bei der Verschmelzung von Vesikel- mit Zellmembran an die Zelloberfläche gelangt. Die CD107a-Expression korreliert mit der NK-Zell-vermittelten Lyse der Zielzellen und kann als Surrogatmarker für die NK-Zell-Reaktivität verwendet werden. Ein weiterer klassischer Aktivierungsmarker ist das C-Typ Lektin CD69, welches als das früheste durch Aktivierung induzierbare Oberflächenprotein auf Lymphozyten gilt.

Zur Messung der NK-Reaktivität im allogenen System wurden primäre CLL Zellen aufgetaut, auf  $5 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und in An- oder Abwesenheit von BAFF (500 ng/ml) in einer 24-well Platte für 24 h bei 37°C kultiviert. Anschließend wurden die Zellen neu gezählt, in frisches Zellkulturmedium aufgenommen und zusammen mit pNKC mit einer Zellzahl von jeweils  $1 \times 10^6$  (E:T Ratio 1:1) in einem Endvolumen von 400 µl in einer 24-well Platte in An- oder Abwesenheit von Rituximab (10 µg/ml) inkubiert. Nach 4 h bzw. 24 h erfolgte nach Selektion der NK-Zellen (CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>) die Analyse der CD107a- bzw. CD69-Expression auf der Oberfläche der NK-Zellen mittels FACS. Zur Erhöhung der Sensitivität wurde im Falle des CD107a-Assays der CD107a- bzw. Isotypkontrollantikörper direkt zum Ansatz hinzugegeben, war also während der vierstündigen Inkubationszeit anwesend, während im Falle der CD69-Analyse erst nach Ablauf der 24 h wie gewohnt gefärbt wurde.

Zur Analyse der Reaktivität autologer NK-Zellen innerhalb der Patienten-PBMC wurde Primärmaterial mit moderater Leukämiezellzahl (40-80%) aufgetaut, auf  $5 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und alleine oder mit BAFF (500 ng/ml) in einer 24-well Platte für 24 h bei 37°C inkubiert. Für den CD107a-Assay wurden die Zellen anschließend neu gezählt und mit  $1,5 \times 10^6$  Zellen in 100 µl in eine 96-well Platte transferiert. Die Zellen wurden nun entweder

alleine oder mit Rituximab (10 µg/ml) in Anwesenheit des CD107a- bzw. Isotyp-Antikörpers für weitere 4 h inkubiert. Zur Bestimmung der CD69-Expression wurden die Zellen nach der 24-stündigen Vorbehandlung auf  $3 \times 10^6$  Zellen in 300 µl in einer 48-well Platte eingestellt, ebenfalls mit Rituximab behandelt und für weitere 24 h inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeiten wurden die NK-Zellen innerhalb der Patienten-PBMC mit CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> selektiert bzw. zusätzlich mit CD69 gefärbt und anschließend im FACS analysiert.

#### 3.2.4.3 Autologe Lyse

Zur Bestimmung der NK-Zell-vermittelten Lyse von primären CLL-Zellen im autologen System wurden PBMC von Leukämiepatienten mit moderater Leukämiezellzahl (40-80%) im sogenannte *FACS based lysis assay* verwendet. Hierfür wurden die Patienten-PBMC mit  $1 \times 10^6$  Zellen in 500 µl in einer 24-well Platten ausplattiert und mit oder ohne BAFF bzw. BAFF zusammen mit Belimumab oder einem Isotypkontrollantikörper inkubiert. Nach 48 h wurde Rituximab (10 µg/ml) zugegeben und für weitere 24 h inkubiert. Anschließend wurden die CLL-Zellen mittels CD19- und CD5-Antikörpern selektiert und zur Bestimmung toter Zellen mit 7-AAD gefärbt. Um die Analyse gleicher Assay-Volumina und somit eine quantitative Bestimmung der in jeder Probe verbleibenden Anzahl lebender Zellen zu ermöglichen, wurde jeder Probe die gleiche Menge an ungefärbten Kalibrierungsbeads zugegeben. Im FACS erfolgte dann die Messung der lebenden Zellen pro 200000 aufgenommenen beads. Der prozentuale Anteil lebender Zellen bezogen auf die unbehandelte Kontrolle berechnete sich anschließend wie folgt:  $\frac{7\text{-AAD negative Zellen in der zu analysierenden Probe}}{7\text{-AAD negative Zellen in der Kontrollprobe}} \times 100$ .

### 3.2.5 Generierung von Kulturüberständen zur Analyse der BAFF- Freisetzung

Zur Untersuchung, ob NK-Zellen BAFF löslich freisetzen, wurden die Zellen (ruhende NK-Zellen oder pNKC) mit einer Zellzahl von  $2,5 \times 10^6$  in 24-well Platten in einem Endvolumen von 500 µl für 72 h kultiviert. Zur Analyse der Induktion der BAFF-Freisetzung nach Aktivierung der Fc-Rezeptoren (CD16) durch die Fc-Anteile von Antikörpern, wurden NK-Zellen mit Rituximab, Obinutuzumab oder Ofatumumab inkubiert. Die Antikörper wurden zuvor auf 24-well Platten über Nacht bei 4°C immobilisiert und ungebundener Antikörper mit PBS gewaschen. Zur Aktivierung der NK-Zellen durch Zytokine wurden IL-2 (200 U/ml) oder IL-15 (10 ng/ml) direkt zum well dazu gegeben. Nach 72 h wurden die Kulturüberstände zentrifugiert (3.000 rpm für 5 min) und direkt im ELISA analysiert.

### 3.2.6 ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*)

Ein ELISA ist ein immunologisches Verfahren, basierend auf einer enzymatischen Farbreaktion, zum Nachweis verschiedenster Moleküle mittels spezifischer Antigen-bindender Antikörper (Sandwich-ELISA). Der erste Antikörper (*capture*) wird immobilisiert und nach dem Blocken (zur Minimierung unspezifischer Bindungen) mit Antigen-haltiger Probe inkubiert. Nach dem Waschen verbleibt Antikörper-gebundenes Antigen auf der Platte und die Bindung des zugegebenen sekundären Antikörpers (*detection*) führt zur Bildung eines Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexes. Zum quantitativen Nachweis des Antigens wird anschließend Streptavidin-HRP (bei Biotin-Markierung des sekundären Antikörpers) oder ein HRP-gekoppelter tertiärer Antikörper zugegeben. Nach Zugabe eines chromogenen Substrats führt die enzymatische Aktivität der HRP zu einem Farbumschlag, der die Berechnung der Antigen-Konzentration ermöglicht.

Für den BAFF-ELISA wurde ein *matched pair detection set* von Adipogen, für den April-ELISA der April ELISA Platinum von eBioscience eingesetzt und jeweils nach Herstellerangaben durchgeführt.

### 3.2.7 Aufreinigung und Analyse von BAFF aus Zellkulturüberständen von pNKC

#### 3.2.7.1 BAFF-Aufreinigung

pNKC wurden wie unter Punkt 3.2.2.6 aufgeführt generiert. Am Tag 10 ihrer Herstellung wurden die Zellkulturüberstände durch zweimaliges zentrifugieren (bei 1500 rpm für 5 min) geerntet und bei 4°C gelagert. Zur Generierung ausreichender Mengen Überstandes, wurden die Zellkulturüberstände verschiedener pNKC-Chargen gepoolt und über mehrere Wochen gesammelt, bis ein Ausgangsvolumen von ca. 2 Litern erreicht war. Der gepoolte Überstand wurde mittels Größenausschlussfiltration auf ein Volumen von ca. 20 ml konzentriert. Anschließend erfolgte die BAFF-Aufreinigung. Hierfür wurden Belimumab bzw. Rituximab als Kontrolle auf einer CNBr-aktivierten Sepharose 4B Säule nach Herstelleranleitung immobilisiert. Der konzentrierte pNKC-Zellkulturüberstand zirkulierte dann über Nacht bei 4°C über ein seriell geschaltetes zwei-Säulen-System. Das Eluat wurde anschließend mit Natriumzitat pH 2,5 eluiert und mittels Größenausschlussfiltration mit PBS neutralisiert, konzentriert und gewaschen. Um die Reinheit des aufgereinigten BAFF zu erhöhen, wurde das Eluat der Belimumab-Säule einer zweiten Aufreinigungsrunde unter identischen Bedingungen unterzogen.

### 3.2.7.2 Peptidmassenfingerprint-Analyse von aufgereinigtem BAFF

Das Eluat der Belimumab-Säule wurde mit Dithiothreitol und Iodacetamid vorbehandelt und anschließend mit Trypsin verdaut. Nach Aufreinigung und Entsalzung mit einer C<sub>18</sub>-Matrix (ZipTipC<sub>18</sub>), wurden die Peptide mittels eines an Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie (*ultra high performance liquid chromatography*, UHPLC) gekoppeltes Massenspektrometers (*liquid chromatography - mass spectrometry*, LC-MS/MS) analysiert. Die verwendete Software Proteome Discoverer 1.4 übermittelte die Rohdaten des Massenspektrometers an einen lokalen MASCOT-Server (Mascot software ver 2.2.04), um mit der Datenbank Uniprot/Swiss-Prot ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org), Taxonomie homo sapiens) die Fragmentspektren zu annotieren. Eine mögliche Oxidation von Methioninen, sowie Carbamidomethyl-Modifikationen von Cysteinen wurden als dynamische Modifikation zugelassen. Um die Qualität der generierten Daten zu sichern, wurde eine Falschpositiv-Rate (*false discovery rate*, FDR) von  $q < 0.01$  angelegt. In der Auswertung wurden nur Peptide mit einem tryptischen Schnittmuster berücksichtigt.

### 3.2.8 Bestimmung der Metabolischen Aktivität

Zur Bestimmung der metabolischen Aktivität von CLL-Zellen wurde der WST-1 Assay von Roche verwendet. Das Prinzip dieses Assays basiert auf der Spaltung des Tetrazolium Salzes WST-1 (4-[3-(4 Jodophenyl)-2-(4-Nitrophenyl) -2H-5-Tetrazolio]-1,3-Benzendisulfonat) durch mitochondriale Dehydrogenasen in den Farbstoff Formazan. Da diese Enzyme nur in vitalen Zellen aktiv sind, dient die WST-1 Reduktion als Maß für die Zellviabilität. Ein Anstieg der Zahl an lebenden Zellen führt zu einer Erhöhung der enzymatischen Aktivität in einer Probe, was wiederum zu einer verstärkten Bildung des Farbstoffes Formazan führt, was damit direkt mit der Zahl metabolisch aktiver Zellen in der Probe korreliert. Die Menge an gebildetem Formazan kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm - 650 nm gemessen werden. Zur Bestimmung der metabolischen Aktivität von CLL-Zellen wurden je  $2 \times 10^6$  in 100  $\mu$ l Endvolumen in einer 96-well Flachbodenplatte für 72 h in An- oder Abwesenheit von BAFF und ggf. Belimumab oder Isotypkontrollantikörper kultiviert. Die Messung erfolgte anschließend nach Herstellerangaben.

### 3.2.9 Bestimmung der Proliferation

Zur Messung der Zell-Proliferation diente der [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Uptake. Grundlage dieser Methode ist der Einbau von [<sup>3</sup>H]-markiertem Thymidin in die im Zuge der mitotischen

Zellteilung neu gebildete DNA der betreffenden Zellen. Hierfür wurden die zu untersuchenden Zellen (primäre CLL-Zellen oder Raji) zunächst in einer 96-well Platte in 100 µl ausgesät und mit 14,8 kBq (20 µl)  $^3\text{H}$ -Thymidin beladen. Nach Inkubation von 16-18 h bei 37°C wurden die Zellen mit Hilfe eines Erntegerätes geerntet und zum Trocknen auf Fließpapier aufgebracht. Schließlich wurde das Fließ zusammen mit Szintillationsflüssigkeit verschweißt und die Radioaktivität in cpm (*counts per minute*) im  $\beta$ -Counter bestimmt.

### 3.2.10 Western-Blot

Im Western-Blot können Proteine innerhalb von Proteingemischen mittels Antikörper identifiziert und quantifiziert werden. Hierfür müssen die zuvor aus Zellen isolierten Proteingemische mittels SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) aufgetrennt und anschließend auf eine Membran übertragen werden. Die auf der Membran fixierten Proteine können dann mit Hilfe spezifischer Antikörper identifiziert werden.

#### 3.2.10.1 Proteinisolation

Protein wurde aus pelletierten Zellen isoliert, welche entweder frisch verwendet oder bis zum Zeitpunkt der Isolation bei -80°C gelagert wurden. Zunächst wurden  $5 \times 10^6$  Zellen in 100 µl RIPA-Puffer, welcher zuvor mit 17,5 µg PMSF pro ml versetzt wurde, lysiert. Die Zellen wurden mit Hilfe einer Spritze und Kanüle (25G) aufgeschlossen und für 5 min auf Eis lysiert. Die verbliebenen zellulären Bestandteile wurden bei 13000 rpm für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Das im Überstand enthaltene Proteinlysate wurde anschließend quantifiziert.

#### 3.2.10.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe der Roti®-Nanoquant-Lösung nach Bradford bestimmt. Hierfür wurden in einer 96-well Platte jeweils 49 µl ddH<sub>2</sub>O vorgelegt und je 1 µl der zuvor 1:10 in RIPA-Puffer vorverdünnten Proteinlösung bzw. des Standards (0 mg/ml – 4 mg/ml) zugegeben. Anschließend wurden je 200 µl der 1:5 in ddH<sub>2</sub>O vorverdünnten Roti®-Nanoquant-Arbeitslösung zugegeben und 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe der Standardgeraden anhand des Quotienten der im ELISA-Gerät gemessenen Optischen Dichte (590 nm/450 nm) bestimmt.

#### 3.2.10.3 SDS-Page

Unter SDS-PAGE versteht man die elektrophoretische Auftrennung eines Proteingemischs auf einem Polyacrylamidgel aufgrund der molekularen Masse der Proteine. Voraussetzung dafür ist die vorrausgegangene Denaturierung der Proteine und Überlagerung ihrer Eigenladung mittels des anionischen Detergens SDS (Natrium-Dodecylsulfat). Zur

Durchführung der SDS-PAGE wurden zunächst je 20 µg Protein mit 5 µl LDS-Puffer und 2 µl *reducing agent* versetzt, mit ddH<sub>2</sub>O auf ein finales Volumen von 20 µl aufgefüllt und für 10 min bei 70°C erhitzt. Die Bolt® Bis-Tris Plus Gele wurden gemäß Herstellerangaben in eine mit 400 ml 1x MOPS-Laufpuffer gefüllte Gelkammer installiert und mit den Proben bzw. 2-3 µl des Proteinstandards beladen. Die Proteinauftrennung erfolgte anschließend bei 165 V für ca. 45 min.

#### 3.2.10.4 Semi-Dry Blotting und Western Blot

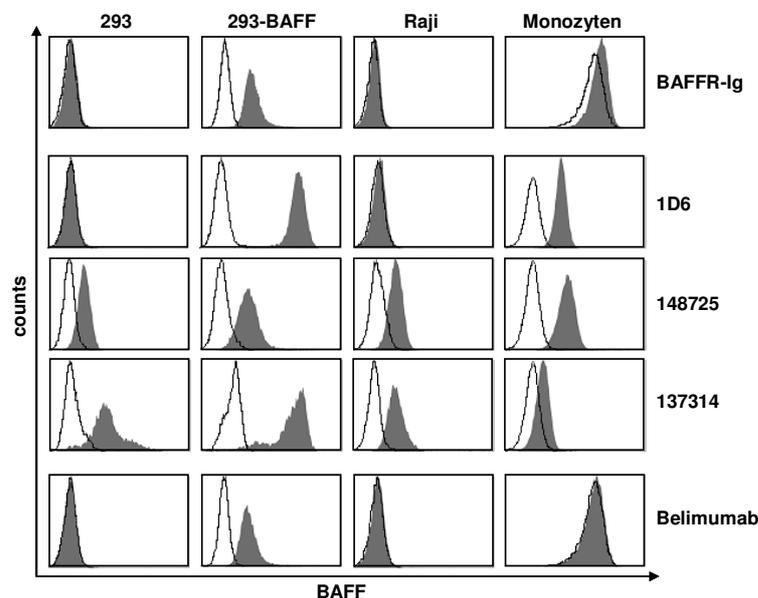
Die mit Hilfe der SDS-page aufgetrennten Proteine wurden mittels *Semi-Dry Blotting* auf eine PVDF-Membran transferiert. Hierfür wurden das Filterpapier und die Membran zunächst in Transferpuffer gelegt. Die Membran wurde zuvor kurz in MeOH geschwenkt und anschließend mit Wasser gewaschen. Zum blotten wurden Filterpapier, Gel und Membran wie folgt auf dem Semi-Dry Blotter angeordnet (von unten nach oben, unten befindet sich die Anode): Filterpapier, Gel, Membran, Filterpapier. Anschließend wurde für 75 min mit 75 mA geblottet. Nach der Proteinübertragung wurde die Membran für 15 min in Waschpuffer gewaschen und freie Bindestellen anschließend für 1 h mit Roti-Block blockiert. Die anschließende Inkubation mit dem in Roti-Block gelösten Primärantikörper erfolgte entweder für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C. Nach fünfmaligem Waschen für je 10 min mit Waschpuffer wurde die Membran für 1 h bei RT mit dem Sekundärantikörper inkubiert, gefolgt von abermaligem Waschen. Substrat- und Röntgenfilmexposition erfolgten nach Herstellerangaben.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Expression von BAFF und APRIL in NK-Zellen

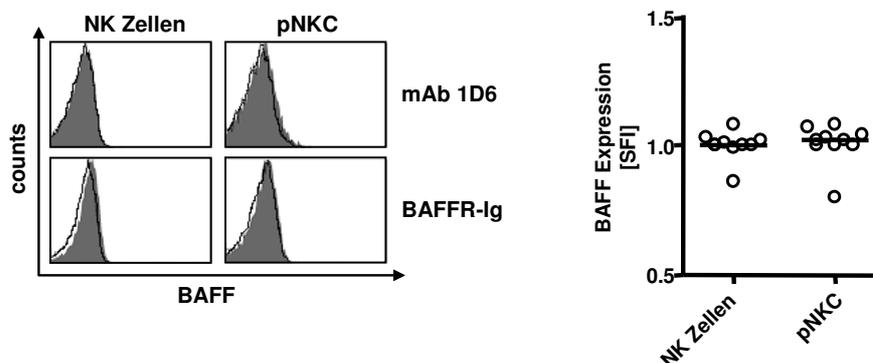
#### 4.1.1 Oberflächenexpression von BAFF und APRIL

Von anderen Untersuchern wurde mittels Western Blot eine Expression von BAFF-Protein in NK-Zellen gezeigt.<sup>204</sup> Ob BAFF jedoch auf der Zelloberfläche exprimiert oder löslich freigesetzt wird, wurde dabei nicht untersucht. Zur Analyse der BAFF-Expression auf der Zelloberfläche wurde die Methode der Durchflusszytometrie verwendet. Hierfür wurden zunächst verschiedene Reagenzien hinsichtlich ihrer Eignung zur BAFF-Oberflächendetektion, vor allem unter Berücksichtigung ihrer Spezifität und Sensitivität, charakterisiert. Dabei dienten 293-BAFF Transfektanten und IFN- $\gamma$ -stimulierte Monozyten als Positiv- bzw. untransfizierte parentale 293-Zellen und die Lymphomzelllinie Raji als Negativkontrollen. Untersucht wurden neben drei verschiedenen monoklonalen Antikörpern (mAb; Klone 1D6, 148725 und 137314) ein BAFFR-Ig Fusionsprotein, sowie der therapeutische mAb Belimumab (**Abbildung 2**).



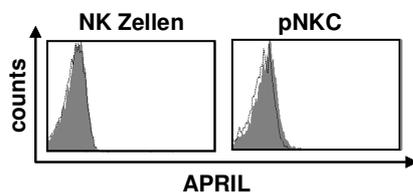
**Abbildung 2: Charakterisierung von Reagenzien zur Detektion von BAFF auf der Zelloberfläche.** Parentale und BAFF-transfizierte 293-Zellen, IFN- $\gamma$ -stimulierte Monozyten und Raji-Zellen wurden mittels FACS auf die Expression von BAFF untersucht. Verwendet wurden hierfür ein BAFFR-Ig Fusionsprotein, verschiedene anti-BAFF mAb (1D6, 148725 und 137314) und Belimumab (ausgefüllte Histogramme) mit den jeweiligen Isotypkontrollen (offene Histogramme).

Sowohl mit dem BAFFR-Ig als auch dem anti-BAFF mAb 1D6 wurde ein positives Signal auf den BAFF-Transfektanten und den Monozyten, aber nicht auf den parentalen 293-Zellen oder der Raji-Zelllinie detektiert. Obwohl auch die beiden anti-BAFF mAb 148725 und 137314 BAFF auf der Oberfläche der Positivkontrollzellen ein Signal ergaben, zeigten diese auch eine unspezifische Bindung an die 293-Parental- und die Raji-Zellen, was diese mAb Klone für weitere Untersuchungen ausschloss. Der therapeutische Antikörper Belimumab ergab ebenfalls ein positives Signal auf BAFF-Transfektanten, welche unphysiologisch hohe BAFF-Level exprimieren, aber nicht auf den anderen Zelltypen. Dies schließt auch Belimumab als Reagenz zur BAFF-Oberflächendetektion aus. Insgesamt wurde mit den Reagenzien, die humane Fc-Teile enthalten, einschließlich der Kontrollreagenzien, ein starkes Signal auf Monozyten detektiert, was eine unspezifische Bindung an Fc-Rezeptoren andeutet. Dies wurde nicht mit mIgG1 beobachtet, was darauf hindeutet, dass der BAFF mAb 1D6 tatsächlich zur Detektion von BAFF geeignet ist. Da auch mit dem BAFFR-Ig auf den Monozyten eine im Vergleich zur Isotypkontrolle etwas stärkere Bindung zu detektieren war, wurden zunächst sowohl das BAFFR-Ig Fusionsprotein als auch der mAb 1D6 zur Analyse von BAFF auf der Zelloberfläche von NK-Zellen verwendet. Aufgrund der höheren Sensitivität des mAb 1D6, wurde im weiteren Verlauf der Untersuchungen jedoch nur noch dieser eingesetzt.



**Abbildung 3: Analyse der BAFF-Expression auf NK-Zellen.** Ruhende NK-Zellen innerhalb von PBMC gesunder Spender oder pNKC wurden mittels  $CD56^+CD3^-$  selektiert und mit dem mAb 1D6 oder BAFFR-Ig Fusionsprotein mittels FACS auf die Expression von BAFF untersucht. Ausgefülltes Histogramm, BAFF mAb/BAFFR-Ig; offenes Histogramm, Isotyp-Kontrolle (links). Die spezifischen Fluoreszenz-Indices (SFI) von jeweils 10 Spendern mit dem mAb 1D6 sind in der Abbildung rechts kombiniert dargestellt. SFI-Werte  $>1,5$  gelten als positive Expression; der Median ist angezeigt als (-).

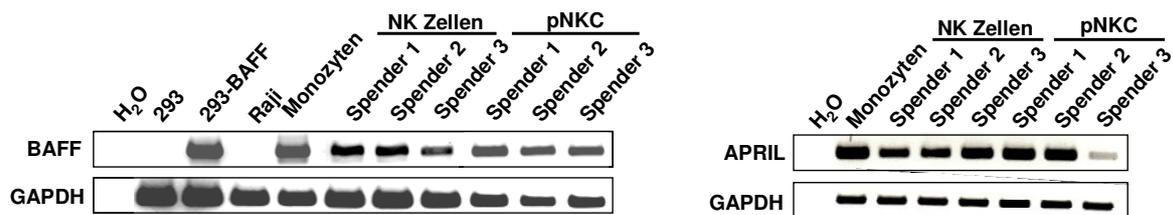
Mit beiden Reagenzien konnte weder auf ruhenden, CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> selektierten NK-Zellen innerhalb von PBMC gesunder Spender, noch auf gemäß eines Protokolls für adoptiven Transfer generierten polyklonalen NK-Zellen (pNKC) BAFF detektiert werden (**Abbildung 3**). Dies deutet darauf hin, dass NK-Zellen entweder kein oder nur sehr geringe und unterhalb des Detektionslimits liegende BAFF-Level auf der Zelloberfläche exprimieren. Auch APRIL, welches Untersuchungen Anderer zufolge direkt löslich freigesetzt und nicht auf der Oberfläche exprimiert wird<sup>149</sup> konnte weder auf ruhenden noch polyklonalen NK-Zellen detektiert werden (**Abbildung 4**).



**Abbildung 4: Analyse der APRIL-Expression auf NK-Zellen.** CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> NK-Zellen innerhalb von PBMC gesunder Spender sowie pNKC wurden mittels FACS auf die Oberflächen-Expression von APRIL untersucht. Ausgefülltes Histogramm, APRIL mAb; offenes Histogramm, Isotyp-Kontrolle.

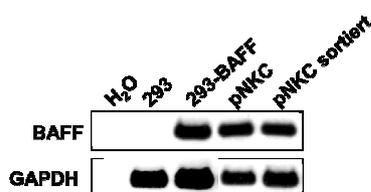
#### 4.1.2 Expression von BAFF und APRIL mRNA in NK-Zellen

Zur Analyse der BAFF- und APRIL-Expression auf mRNA-Ebene wurde eine RT-PCR durchgeführt. Hierfür wurden zunächst ruhende NK-Zellen aus frisch isolierten PBMC gesunder Donoren mittels MACS isoliert und dabei eine Reinheit von ca. 95% erreicht. Sowohl aus den ruhenden als auch polyklonalen NK-Zellen, welche ebenfalls eine Reinheit von ca. 90% aufwiesen, wurde RNA gewonnen und die nach Reverser Transkription erhaltene cDNA für die Analyse der BAFF- und APRIL-mRNA-Expression eingesetzt. Als Positiv- bzw. Negativkontrollen für eine BAFF-Expression diente RNA von 293-BAFF Transfektanten und untransfizierten Parentalzellen, sowie von IFN- $\gamma$ -stimulierten Monozyten und Raji-Zellen. Als Positivkontrolle für eine Expression von APRIL mRNA dienten ebenfalls IFN- $\gamma$ -stimulierte Monozyten. In nahezu allen von uns getesteten Spendern von sowohl ruhenden als auch polyklonalen NK-Zellen konnte mRNA für BAFF und APRIL nachgewiesen werden (**Abbildung 5**).



**Abbildung 5: Analyse der mRNA-Expression von BAFF und APRIL in NK-Zellen.** MACS isolierte ruhende NK-Zellen und pNKC von jeweils drei repräsentativen Donoren, sowie parentale und BAFF-transfizierte 293-Zellen, IFN- $\gamma$ -stimulierte Monozyten und Raji-Zellen wurden mittels RT-PCR auf die Expression von BAFF (links) und APRIL (rechts) mRNA untersucht. Die Expression von GAPDH mRNA diente dabei als Kontrolle.

Um auszuschließen, dass die detektierte BAFF mRNA auf eine geringfügige Kontamination der NK-Zellpopulation durch BAFF-exprimierende andere Zelltypen, wie z.B. Monozyten oder aktivierte B- oder T-Zellen, zurückzuführen ist, wurden diese mittels FACS-Sorting unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen CD14, CD19 und CD3 durchflusszytometrisch aus der pNKC-Zellsuspension aussortiert. Es zeigte sich, dass sowohl die sortierten pNKC, welche eine Reinheit von nahezu 100% aufwiesen, ebenso wie die unsortierten pNKC BAFF mRNA exprimieren (**Abbildung 6**).

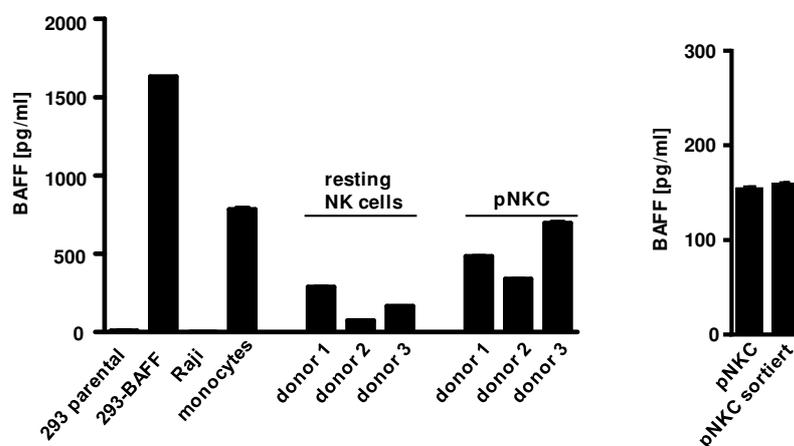


**Abbildung 6: Analyse der Expression von BAFF mRNA in hochreinen pNKC.** Mittels FACS-Sorting wurden CD19<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup> Zellen aus der pNKC-Zellsuspension aussortiert und die Expression von BAFF mRNA mittels RT-PCR untersucht. Abermals dienten parentale bzw. BAFF-transfizierte 293-Zellen und die Expression von GAPDH mRNA als Kontrolle.

#### 4.1.3 Freisetzung von BAFF und APRIL in löslicher Form

Wie bereits erläutert, wird BAFF in der Regel membranständig exprimiert und durch proteolytische Spaltung durch eine Furin-Konvertase als löslicher Faktor abgespalten. APRIL wird ebenfalls von einer Furin-Konvertase prozessiert. Anders als bei BAFF geschieht dies

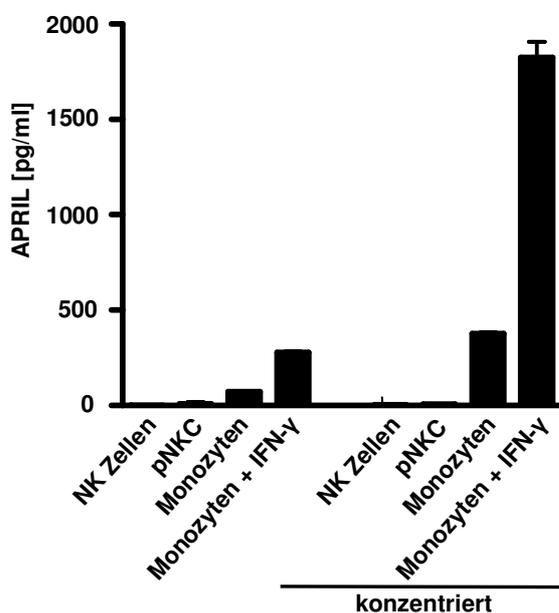
jedoch intrazellulär, so dass APRIL direkt löslich freigesetzt wird, ohne dass es zu einer membranständigen Expression kommt. Zur näheren Analyse einer möglichen Freisetzung von BAFF und APRIL durch NK-Zellen wurden Zellkulturüberstände mittels ELISA untersucht. Hierfür wurden abermals ruhende NK-Zellen aus PBMC gesunder Spender mittels MACS isoliert und für 72 h kultiviert. pNKC wurden an Tag 10 ihrer Generierung in frisches Kulturmedium überführt und nach anschließender ebenfalls 72-stündiger Kultur analysiert. Die Spezifität des ELISA wurde anhand hoher BAFF Spiegel in Kulturüberständen von 293-BAFF Transfektanten und IFN- $\gamma$ -stimulierten Monozyten, sowie anhand nicht detektierbaren Proteins in Überständen der Negativkontrollzellen (293- Parentalzellen, Raji) belegt. BAFF wurde sowohl von ruhenden als auch polyklonalen NK-Zellen löslich freigesetzt, wobei in den Kulturüberständen der pNKC immer höhere BAFF-Level als in denen der ruhenden NK-Zellen detektiert wurden (**Abbildung 7, links**). Um auszuschließen, dass das lösliche BAFF von kontaminierenden anderen Zelltypen stammt, wurden Zellkulturüberstände von unsortierten und, wie oben beschrieben durch FACS-Sorting gewonnenen, reinen pNKC nach 72-stündiger Kultur miteinander verglichen. Es zeigte sich, dass sowohl unsortierte als auch reine pNKC lösliches BAFF freisetzen (**Abbildung 7, rechts**).



**Abbildung 7: Analyse der BAFF-Freisetzung durch NK-Zellen.** MACS isolierte ruhende NK-Zellen und pNKC wurden für 72 h kultiviert und die Kulturüberstände anschließend mittels ELISA auf lösliches BAFF untersucht. Zur Kontrolle wurden außerdem Kulturüberstände von 293-BAFF Transfektanten und untransfizierten Parentalzellen, sowie von IFN- $\gamma$ -stimulierten Monozyten und Raji-Zellen analysiert (links). Mittels FACS-Sorting wurden CD19<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup> Zellen aus der pNKC-Zellsuspension aussortiert. Die Freisetzung von löslichem BAFF wurde im Vergleich zu unsortierten pNKC desselben Spenders mittels ELISA der Zellkulturüberstände nach 72 h untersucht (rechts).

Die lösliche Freisetzung, trotz nicht nachweisbarer Expression auf der Zelloberfläche von NK-Zellen, könnte durch eine intrazelluläre Prozessierung und direkte Freisetzung von BAFF, wie es für APRIL grundsätzlich gilt und auch für BAFF schon bei Neutrophilen

beobachtet wurde, erklärt werden.<sup>149,205</sup> APRIL hingegen konnte in Zellkulturüberständen von ruhenden und polyklonalen NK-Zellen auch nach Aufkonzentrierung der Überstände nicht detektiert werden. Als Positivkontrolle dienten unbehandelte und IFN- $\gamma$ -stimulierte Monozyten, in deren Überständen die APRIL-Level nach Aufkonzentrierung deutlich anstiegen (**Abbildung 8**). Da aus dem Vorliegen von APRIL mRNA nicht notwendigerweise eine Freisetzung von Protein in löslicher Form zu resultieren scheint, ist dies ein Indiz für eine mögliche post-transkriptionelle oder post-translationale Regulation der APRIL-Expression bei NK-Zellen.

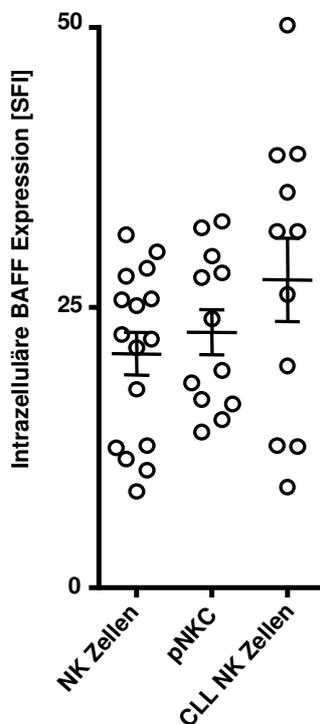


**Abbildung 8: Analyse der APRIL-Freisetzung durch NK-Zellen.** MACS isolierte ruhende NK-Zellen und pNKC wurden für 72 h kultiviert und die Kulturüberstände anschließend direkt oder nach Aufkonzentrierung mittels Ultrafiltration auf lösliches APRIL mittels ELISA untersucht. Kulturüberstände von unbehandelten und IFN- $\gamma$ -stimulierten Monozyten dienten als Positivkontrolle.

#### 4.1.4 Intrazelluläre Expression von BAFF

Nachfolgend wurde die BAFF-Expression in NK-Zellen von CLL-Patienten mittels intrazellulärem FACS untersucht. Dies erlaubt eine Analyse der NK-Zellen von CLL-Patienten mittels Selektion für CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> auch bei einem sehr geringen NK-Zellanteil innerhalb der PBMC. Zusätzlich wurde auch die intrazelluläre BAFF-Expression von NK-Zellen gesunder Spender und pNKC analysiert. Die im FACS detektierten BAFF-Level der patienteneigenen NK-Zellen waren dabei höher als die der gesunden NK-Zellen, wobei, in

Übereinstimmung mit den ELISA-Daten, die BAFF-Expression der pNKC wiederum höher war als die der ruhenden NK-Zellen (**Abbildung 9**).



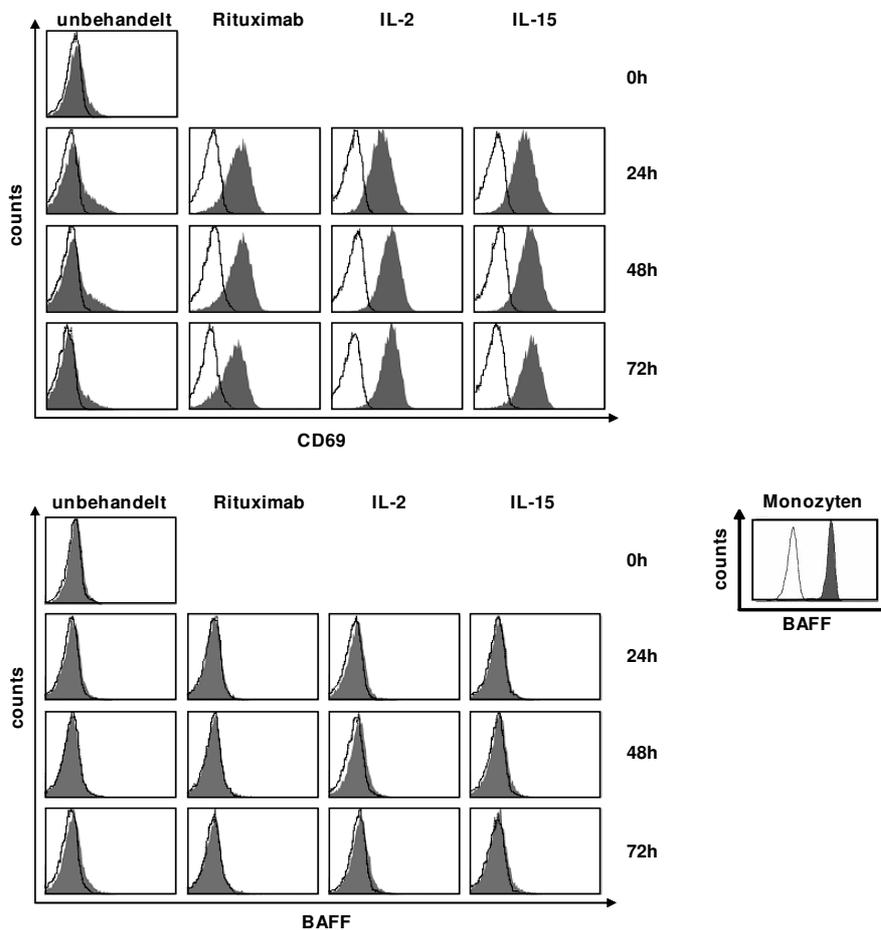
**Abbildung 9: FACS-Analyse der intrazellulären BAFF-Expression in NK-Zellen.** Ruhende und polyklonale NK-Zellen gesunder Spender, sowie NK-Zellen von CLL-Patienten wurden mittels CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> selektiert und im FACS auf die intrazelluläre Expression von BAFF untersucht. Die SFI-Werte von jeweils mindestens 10 Spendern mit mAb 1D6 sind kombiniert dargestellt. SFI-Werte >1,5 gelten als positive Expression; der Median mit SEM ist angezeigt als ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ).

#### 4.1.5 Einfluss der NK-Zell Aktivierung auf die BAFF-Expression

##### 4.1.5.1 Regulation der Oberflächenexpression von BAFF

Um zu untersuchen, ob und wie die BAFF-Expression in NK-Zellen reguliert wird, wurden PBMC gesunder Spender alleine oder in Gegenwart von IL-2, IL-15 oder auf Plastik immobilisiertem Rituximab kultiviert. Die Zytokine führen dabei eine eher generelle Aktivierung herbei, während Rituximab eine Stimulation des Fc-Rezeptors, welche für die Wirkung dieses therapeutischen Antikörpers in der CLL-Therapie entscheidend und damit hier von besonderem Interesse ist, induziert. FACS-Analysen zeigten die erwartete Hochregulation des Aktivierungsmarkers CD69 auf den NK-Zellen im Laufe der Zeit mit allen drei Stimuli. BAFF konnte jedoch zu keinem Zeitpunkt und unter keinem Stimulus auf der

Oberfläche detektiert werden. Monozyten innerhalb derselben PBMC-Präparation als Positivkontrolle zeigten hingegen ein deutliches Signal für BAFF (**Abbildung 10**).

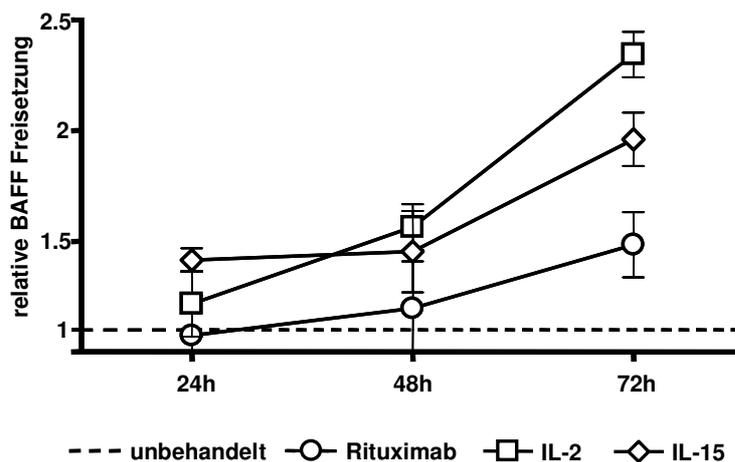


**Abbildung 10: Analyse der BAFF-Expression auf aktivierten NK-Zellen.** PBMC gesunder Spender wurden alleine oder in Gegenwart von IL-2 (200 U/ml), IL-15 (10 ng/ml) oder immobilisiertem Rituximab (10  $\mu$ g/ml) kultiviert. Die Expression von CD69 (oben) und BAFF (unten links) auf der Zelloberfläche der CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> NK-Zellen wurde zum jeweils angegebenen Zeitpunkt mittels FACS untersucht. Zum Zeitpunkt 0 h wurden außerdem Monozyten mittels CD14 selektiert und auf die Expression von BAFF analysiert (unten rechts). Ausgefülltes Histogramm, spezifischer mAb; offenes Histogramm, Isotyp-Kontrolle.

#### 4.1.5.2 Regulation der Freisetzung von BAFF in löslicher Form

Zur Analyse einer möglichen aktivierungsabhängigen Regulation der BAFF-Freisetzung wurden ruhende NK-Zellen aus PBMC gesunder Spender mittels MACS isoliert. Anschließend wurden diese alleine oder in Anwesenheit von IL-2, IL-15 oder immobilisiertem

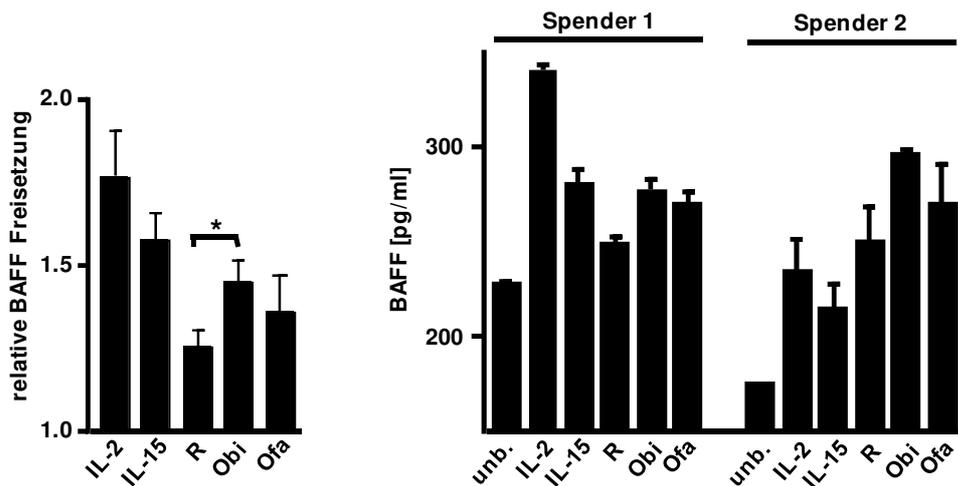
Rituximab kultiviert und die BAFF-Level im Zellkulturüberstand zu verschiedenen Zeitpunkten mittels ELISA gemessen. Alle drei Stimuli führten zu einer im Vergleich zu unbehandelten Zellen verstärkten BAFF-Freisetzung, wobei durch die Stimulation mit den Zytokinen im Vergleich zu Rituximab höhere BAFF-Spiegel detektiert wurden (**Abbildung 11**).



**Abbildung 11: Analyse der BAFF Freisetzung durch NK-Zellen nach Aktivierung.** MACS isolierte NK-Zellen wurden für die angegebenen Zeiten alleine, mit IL-2 (200 U/ml), IL-15 (10 ng/ml) oder immobilisiertem Rituximab (10 µg/ml) kultiviert und die Kulturüberstände anschließend mittels ELISA auf lösliches BAFF untersucht. Die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten sind dargestellt als relative Freisetzung bezogen auf unbehandelte NK-Zellen (zu jedem Zeitpunkt auf 1 gesetzt, gestrichelte Linie) mit SEM.

Mittlerweile kommen neben Rituximab auch die beiden neuen, im Vergleich zu Rituximab immunstimulatorisch potenteren CD20-Antikörper Obinutuzumab und Ofatumumab in der CLL-Therapie zum Einsatz. Während letzterer sich durch die Bindung eines anderen CD20-Epitops von Rituximab unterscheidet, wurde durch *glycoengineering* des Fc-Teils die Affinität von Obinutuzumab zum Fc-Rezeptor verbessert, was zu einer verstärkten ADCC führt. In einem weiteren Versuchsansatz wurden nun pNKC in Gegenwart von IL-2, IL-15 oder jeweils einem der an Plastik immobilisierten CD20-Antikörpern für 72 h kultiviert. Anschließend wurde die BAFF-Freisetzung mittels ELISA der Zellkulturüberstände analysiert. Die beiden neuen CD20-Antikörper führten zu einer im Vergleich zu Rituximab verstärkten BAFF-Freisetzung der NK-Zellen, wobei der Unterschied mit Obinutuzumab statistische Signifikanz erreichte. Insgesamt führte die CD16-Stimulation der pNKC zu einer im Vergleich zur Zytokin-Stimulation geringeren Induktion der BAFF-Freisetzung (**Abbildung**

12, links). In einzelnen Fällen und in Abhängigkeit vom jeweiligen Spender konnte jedoch nach NK-Stimulation mit den CD20-Antikörper auch eine im Vergleich zur Zytokin-Stimulation stärkere BAFF-Freisetzung beobachtet werden (**Abbildung 12**, rechts, Spender 2) (alle  $p < 0.05$ , Student's t-test).

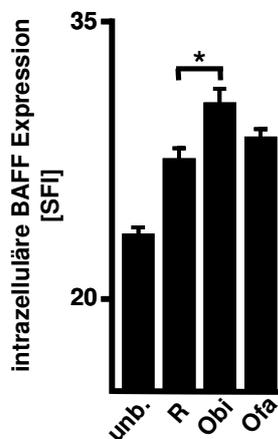


**Abbildung 12: Analyse der BAFF-Freisetzung durch NK-Zellen nach unterschiedlicher CD16-Stimulation.** pNKC wurden für 72 h unbehandelt belassen, mit IL-2 (200 U/ml), IL-15 (15 ng/ml) oder mit jeweils 10  $\mu\text{g/ml}$  immobilisiertem Rituximab (R), Obinutuzumab (Obi) oder Ofatumumab (Ofa) kultiviert. Die Zellkulturüberstände wurden anschließend mittels ELISA auf lösliches BAFF untersucht. Mittelwerte aus Daten sechs verschiedener Spender sind in der Abbildung links als relative Freisetzung, bezogen auf unbehandelte pNKC, welche in jedem individuellen Datensatz auf 1 gesetzt wurden, mit SEM dargestellt. In der Abbildung rechts sind exemplarische Ergebnisse zweier verschiedener Donoren dargestellt, um die Spenderabhängigkeit der Ergebnisse zu verdeutlichen. Statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0.05$ , Student's t-test) sind mit \* gekennzeichnet.

#### 4.1.5.3 Regulation der Expression von intrazellulärem BAFF-Protein durch CD16

Neben der Freisetzung als lösliches Protein wurde auch die intrazelluläre BAFF-Expression in CD16-stimulierten pNKC untersucht. Hierfür wurden abermals pNKC in Anwesenheit der an Plastik immobilisierten CD20-Antikörper Rituximab, Obinutuzumab oder Ofatumumab für 72 h inkubiert und anschließend mittels FACS hinsichtlich ihrer intrazellulären BAFF-Expression analysiert. In Übereinstimmung mit den ELISA-Daten, konnte auch hier ein Anstieg der intrazellulären BAFF-Level nach FcR-Stimulation beobachtet werden. Obinutuzumab führte dabei abermals zu einer im Vergleich zu Rituximab statistisch

signifikanten Steigerung der BAFF-Expression, während Ofatumumab eine mit Rituximab vergleichbare BAFF-Expression induzierte (**Abbildung 13**) (alle  $p < 0.05$ , Student's t-test).

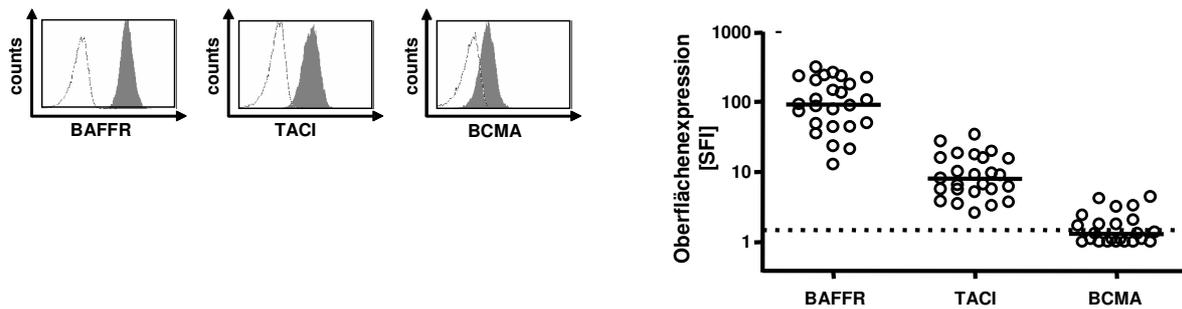


**Abbildung 13: Analyse der intrazellulären BAFF-Expression in NK-Zellen nach CD16-Stimulation.** pNKC wurden für 72 h unbehandelt belassen oder mit jeweils 10  $\mu\text{g/ml}$  immobilisiertem Rituximab (R), Obinutuzumab (Obi) oder Ofatumumab (Ofa) kultiviert. Intrazelluläre BAFF-Proteinlevel wurden mittels FACS mit mAb 1D6 bestimmt. Die SFI dreier verschiedener Spender sind kombiniert dargestellt als Mittelwert mit SEM. Statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0.05$ , Student's t-test) sind mit \* gekennzeichnet.

## 4.2 Einfluss von BAFF auf die Immunevasion von CLL-Zellen vor der NK-Zell-vermittelten Immunüberwachung

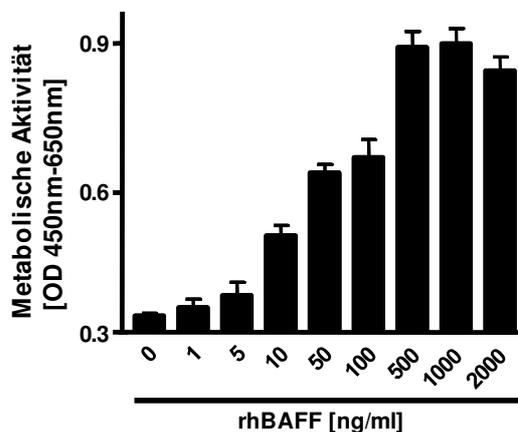
### 4.2.1 Einfluss von BAFF auf die Stoffwechselaktivität von CLL-Zellen

Um Signale in eine Zelle vermitteln zu können, muss BAFF an einen oder mehrere seiner drei Rezeptoren - BAFFR, TACI und BCMA - binden. Mittels FACS wurden daher zunächst primäre CLL-Zellen hinsichtlich ihrer Oberflächenexpression der drei BAFF-Rezeptoren charakterisiert. In Übereinstimmung mit Daten anderer Untersucher,<sup>166</sup> wurden in allen analysierten Patientenproben hohe Level von BAFFR und TACI auf der Oberfläche der CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> CLL-Zellen detektiert, während in nur 9 von 25 (36%) Fällen auch BCMA exprimiert wurde (**Abbildung 14**).



**Abbildung 14: Expression der BAFF-Rezeptoren auf primären CLL-Zellen.** Primäre CLL-Zellen wurden mittels CD19+CD5+ selektiert und auf die Oberflächenexpression von BAFFR, TACI und BCMA im FACS untersucht. Links ist die FACS-Analyse eines CLL-Patienten exemplarisch gezeigt. Ausgefülltes Histogramm, spezifischer mAb; offenes Histogramm, Isotyp-Kontrolle. Die SFI-Werte von jeweils 25 Spendern sind in der Abbildung rechts kombiniert dargestellt. SFI-Werte >1,5 gelten als positive Expression; der Median ist angezeigt als (–).

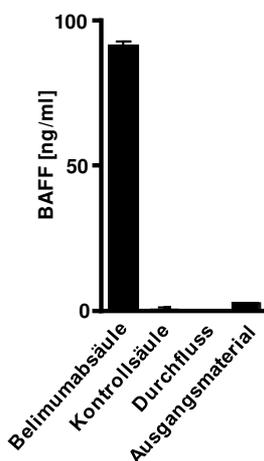
Von anderen Untersuchern wurde BAFF bereits eine für CLL-Zellen überlebensfördernde und anti-apoptische Wirkung zugeschrieben.<sup>157,163,166</sup> Damit übereinstimmend konnte nach Inkubation primärer CLL-Zellen mit rekombinantem humanem BAFF (rhBAFF) in WST-1 Assays eine dosisabhängige Steigerung der metabolischen Aktivität festgestellt werden (**Abbildung 15**).



**Abbildung 15: Einfluss von BAFF auf die Stoffwechselaktivität primärer CLL-Zellen.** PBMC von CLL-Patienten (> 80% Lymphozytenanteil) wurden mit ansteigenden Konzentrationen (0-2000 ng/ml) von rhBAFF inkubiert. Nach 72 h wurde mittels WST-1 Assay die Stoffwechselaktivität bestimmt.

#### 4.2.2 Isolation und Charakterisierung des von NK-Zellen freigesetzten BAFF (nkBAFF)

Als nächstes sollte untersucht werden, welchen Effekt das von NK-Zellen freigesetzte BAFF auf primäre CLL-Zellen hat. Hierfür wurden zunächst Zellkulturüberstände von pNKC verschiedener Spender gesammelt und mittels Ultrafiltration aufkonzentriert. Aus diesem aufkonzentrierten Überstand (Ausgangsmaterial) wurde BAFF mit Hilfe einer Sepharose-Säule, auf welcher zuvor der therapeutische anti-BAFF mAb Belimumab immobilisiert wurde, isoliert. Als Negativkontrolle diente die Durchführung des selben Aufreinigungsprozesses über eine Rituximab-gecoatete Kontroll-Säule. Mittels ELISA konnte im Eluat der Belimumabsäule BAFF in hoher Konzentration detektiert werden (nkBAFF), während im Eluat der Kontrollsäule keine relevanten BAFF-Level gemessen werden konnten (**Abbildung 16**).



**Abbildung 16: Nachweis von löslichem BAFF nach der Aufreinigung aus pNKC-Überstand.** BAFF wurde mit Hilfe einer Belimumab-gecoateten Sepharose-Säule aus aufkonzentriertem pNKC-Überstand isoliert. Zur Kontrolle diente eine Rituximab-gecoatete Säule. Mittels ELISA wurden die Eluate der beiden Säulen (Belimumab- bzw. Kontrollsäule), der Durchfluss der Belimumabsäule, sowie der aufkonzentrierte pNKC-Überstand (Ausgangsmaterial) auf BAFF untersucht.

Anschließend sollten die ELISA-Ergebnisse mittels LC-MS/MS bestätigt und gesichert werden, dass es sich bei dem mit der Belimumabsäule erhaltenem Präparat tatsächlich um BAFF handelt. Als Positivkontrolle wurde hierfür BAFF aus Zellkulturüberständen von 293-BAFF Transfektanten auf dieselbe Weise isoliert und ebenfalls mittels LC-MS/MS analysiert. Einige der in der Positivkontrolle gefundenen tryptischen Peptide (**Tabelle 4**), die einen

Großteil der BAFF-Peptidsequenz abdecken, konnten auch im nkBAFF identifiziert werden, was bestätigt, dass es sich bei dem aus den pNKC Überständen aufgereinigtem Produkt tatsächlich um BAFF handelt (**Tabelle 5**).

Peptid	Sequenz	Position*	q-value
#1	TYAMGHLIQR	205-214	0
#2	LEEGDELQLAIPR	253-265	0
#3	AVQGPEETVTQDcLQLIADSETPTIQK	134-160	0
#4	cIQNMPETLPNNScYSAGIAK	232-252	0
#5	TYAmGHLIQR	205-214	0.001
#6	VHVFGDELSLVTLFR	217-231	0
#7	GSYTFVPWLLSFK	161-173	0.002
#8	cIQNmPETLPNNScYSAGIAK	232-252	0

\*amino acid residue position within the BAFF sequence according to Uniprot.org (accession Q9Y275 or TN13B\_HUMAN)  
 m = methionine sulfoxide  
 c = carbamidomethyl-cysteine

**Tabelle 4: Mittels MS/MS identifizierte tryptische Peptide von BAFF in Zellkulturüberständen der 293-BAFF Positivkontrollzellen (FDR of >1%).**

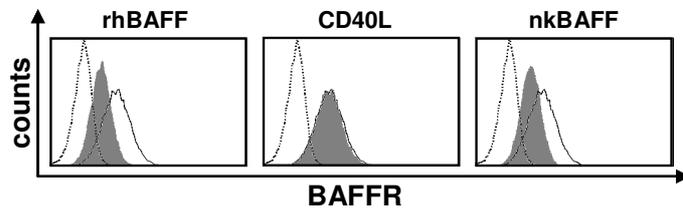
Replik	Peptid	q-value
#1	LEEGDELQLAIPR	0
	AVQGPEETVTQDcLQLIADSETPTIQK	0
#2	LEEGDELQLAIPR	0
#3	LEEGDELQLAIPR	0

c = carbamidomethyl-cysteine

**Tabelle 5: Mittels MS/MS identifizierte tryptische Peptide von BAFF in Zellkulturüberständen von pNKC (FDR of >1%).**

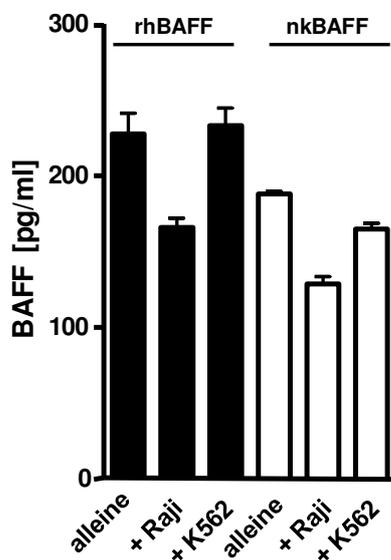
Im nächsten Schritt wurde das aufgereinigte BAFF hinsichtlich seiner Bindungseigenschaften und Funktionalität untersucht. In einem FACS-basierten Blockade-Experiment wurde zunächst die Expression von BAFFR auf Raji-Zellen mittels eines blockierenden BAFFR mAb analysiert. Eine vorherige Inkubation der Raji-Zellen mit nkBAFF führte durch die Bindung von nkBAFF an BAFFR - und damit einer Blockade der Antikörper-Bindestelle - zu einem deutlich verringerten BAFFR-Signal auf den Raji-Zellen. Als Kontrolle diente hierfür die Inkubation der Raji-Zellen mit rhBAFF, sowie CD40 Ligand (CD40L), einem weiteren TNF

Familienmitglied, das die Bindung des BAFFR mAb an die Raji-Zellen nicht beeinflusste (**Abbildung 17**).



**Abbildung 17: Nachweis der Bindungseigenschaften von nkBAFF mittels FACS.** Raji-Zellen wurden unbehandelt belassen (offenes Histogramm, durchgezogene Linie, BAFFR mAb) oder für 1 h mit rhBAFF, CD40L oder nkBAFF (jeweils 1 ng/ml; ausgefülltes Histogramm, BAFFR mAb) inkubiert. Anschließend wurde die Expression von BAFFR auf der Zelloberfläche mittels eines blockierenden BAFFR mAb im FACS analysiert. Offenes Histogramm, gestrichelte Linie, Isotypkontrolle.

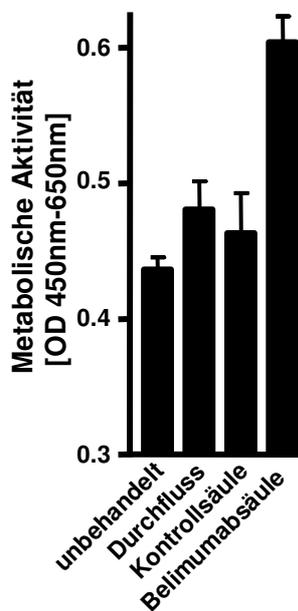
In einem zweiten Ansatz wurde nkBAFF entweder direkt oder nach einstündiger Inkubation mit BAFFR-positiven (Raji) oder -negativen (K562) Zellen im ELISA detektiert. Als Positivkontrolle diente abermals rhBAFF.



**Abbildung 18: Nachweis der Bindungseigenschaften von nkBAFF mittels ELISA.** rhBAFF oder nkBAFF wurden alleine oder in Gegenwart von Raji- (BAFFR<sup>+</sup>) oder K562- (BAFFR<sup>-</sup>) Zellen für 1 h inkubiert. Anschließend wurde die BAFF-Konzentration im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt.

Eine Inkubation sowohl von nkBAFF als auch rhBAFF mit Raji-Zellen führte durch die Bindung an seinen Rezeptor zu einer deutlichen Reduktion der zu detektierenden BAFF-Spiegel im ELISA, während eine Inkubation mit den BAFFR-negativen K562-Zellen keinen relevanten Einfluss auf die gemessenen BAFF-Level hatte (**Abbildung 18**).

Um die Funktionalität des aus pNKC Überständen isolierten nkBAFF weiter zu testen, wurde ein WST-1 Assay mit primären CLL-Zellen durchgeführt. Genau wie zuvor mit rhBAFF beobachtet, führte auch das mit Hilfe der Belimumabsäule aufgereinigte nkBAFF zu einer deutlichen Steigerung der metabolischen Aktivität der primären CLL-Zellen. Dahingegen hatten weder das Eluat der Kontrollsäule, noch der Durchfluss der Belimumabsäule einen relevanten Effekt auf die Stoffwechselaktivität (**Abbildung 19**).

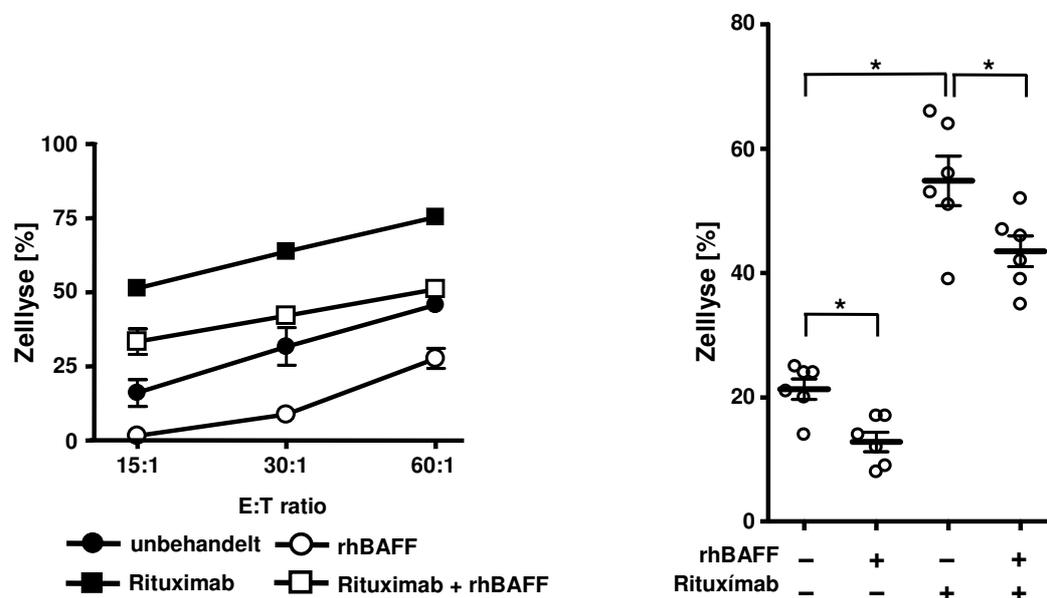


**Abbildung 19: Einfluss von nkBAFF auf die Stoffwechselaktivität primärer CLL-Zellen.** PBMC von CLL Patienten (> 80% Lymphozytenanteil) wurden alleine, mit dem Durchfluss der Belimumabsäule, dem Eluat der Kontrollsäule oder mit dem Eluat der Belimumabsäule (nkBAFF) inkubiert. Nach 72 h wurde mittels WST-1 Assay die Stoffwechselaktivität bestimmt.

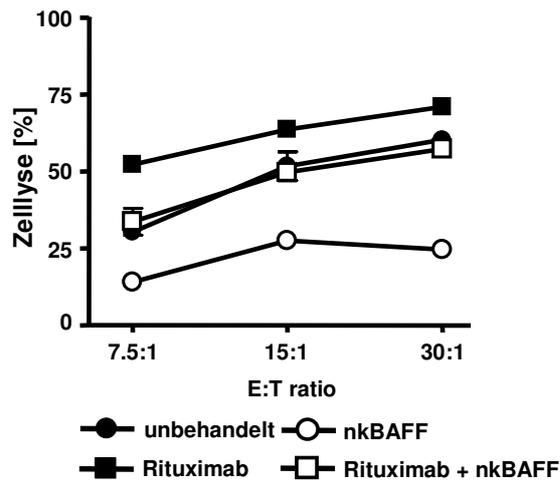
#### 4.2.3 Einfluss von BAFF auf die NK-Zell-vermittelte Lyse von CLL-Zellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass NK-Zellen BAFF löslich freisetzen, und dass sich das von NK-Zellen freigesetzte BAFF positiv auf das CLL-Überleben auswirkt, wurde nun untersucht, ob BAFF auch einen Einfluss auf die NK-Zell-vermittelte Lyse von Leukämiezellen hat. Hierfür wurden primäre CLL-Zellen unbehandelt belassen oder zunächst

für 24 h mit rhBAFF inkubiert und anschließend gewaschen. In Europium-Zytotoxizitätsassays mit pNKC als Effektorzellen wurden die Leukämiezellen im Anschluss hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber einer NK-Lyse untersucht. Eine Behandlung der CLL-Zellen mit rhBAFF führte zu einer signifikant reduzierten Lyse der malignen Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen. Diese BAFF-vermittelte Reduktion der Sensitivität gegenüber der NK-Lyse wurde außerdem nach zusätzlicher Behandlung der CLL-Zellen mit Rituximab auch hinsichtlich der Rituximab-induzierten ADCC beobachtet (**Abbildung 20**) (alle  $p < 0.05$ , Student's *t*-test). Analog führte auch eine Inkubation der CLL-Zellen mit nkBAFF - sowohl in An- als auch Abwesenheit von Rituximab - zu einer deutlichen Reduktion der NK-Zell-vermittelten Lyse der CLL-Zellen (**Abbildung 21**).



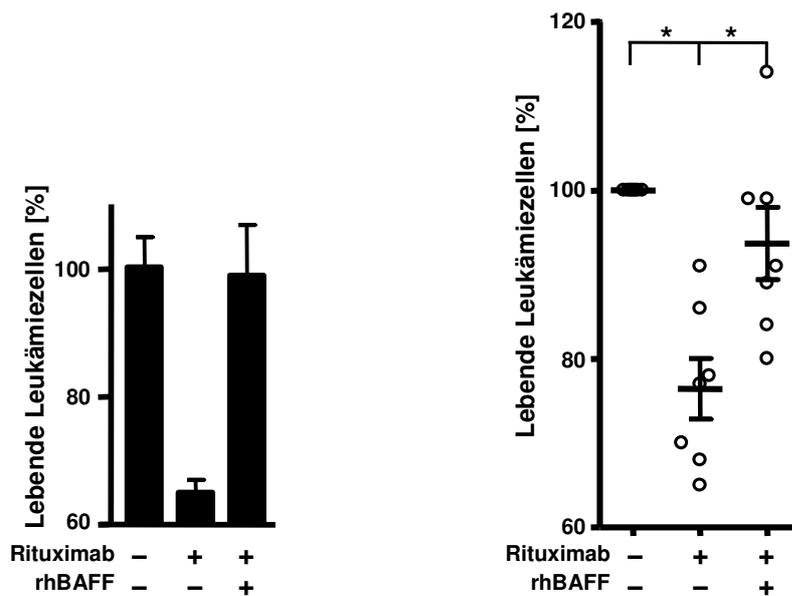
**Abbildung 20: Einfluss von BAFF auf die NK-Zell-vermittelte Lyse primärer CLL-Zellen.** Primäre CLL-Zellen wurden für 24 h alleine oder mit rhBAFF (500 ng/ml) kultiviert. Nach anschließendem Waschen wurde in 2 h BATDA-Europium-Zytotoxizitätsassays mit pNKC die Lyse der CLL-Zellen in An- oder Abwesenheit von Rituximab (10 µg/ml) analysiert. In der Abbildung links ist ein exemplarisches Ergebnis eines Patienten dargestellt. Kombinierte Daten sechs verschiedener Patienten (E:T 20:1) sind in der Abbildung rechts mit Median und SEM dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0.05$ , Student's *t*-test) sind mit \* gekennzeichnet.



**Abbildung 21: Einfluss von nkBAFF auf die NK-Zell-vermittelte Lyse primärer CLL-Zellen.**

Primäre CLL-Zellen wurden für 24 h alleine oder mit nkBAFF (1 ng/ml) kultiviert und anschließend gewaschen. Mittels Europium-Zytotoxizitätsassays mit pNKC als Effektorzellen wurde die Lyse der CLL-Zellen in An- oder Abwesenheit von Rituximab (10 µg/ml) analysiert. Dargestellt ist ein exemplarisches Ergebnis von mindestens drei verschiedenen Patienten mit vergleichbaren Ergebnissen.

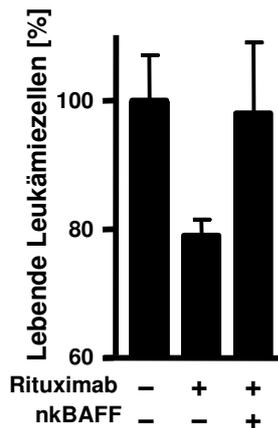
Um der Situation im Menschen noch näher zu kommen, wurden schließlich die Effekte von BAFF im autologen System mit PBMC von CLL-Patienten mit moderater Leukämiebelastung untersucht. Dieser experimentelle Ansatz entspricht am ehesten der Situation im Menschen, da er Aufschluss über den Einfluss von BAFF auf die Lyse der Leukämiezellen durch die patienteneigenen NK-Zellen gibt. In einem FACS-basierten Ansatz wurden PBMC von CLL-Patienten für 72 h in An- oder Abwesenheit von rhBAFF inkubiert. 24 h vor Versuchsende wurden die Zellen unbehandelt belassen oder mit Rituximab stimuliert. Schließlich wurde die Zahl der in der jeweiligen Probe verbliebenen lebenden CLL-Zellen durchflusszytometrisch mit Hilfe von beads quantifiziert.



**Abbildung 22: Einfluss von rhBAFF auf die Lyse von CLL-Zellen durch autologe NK-Zellen.**

PBMC von CLL Patienten mit moderater Leukämiezellzahl (40-80%) wurden unbehandelt belassen oder für 48 h mit rhBAFF (500 ng/ml) inkubiert. Rituximab (10 µg/ml) wurde, wie angezeigt, zugegeben und die Zellen für weitere 24 h inkubiert. Anschließend wurde die Zahl der in jeder Probe verbliebenen lebenden CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> CLL-Zellen mittels FACS mit Hilfe von beads quantitativ bestimmt. Die Anzahl der lebenden CLL-Zellen in der unbehandelten Probe wurde auf 100% gesetzt. In der Abbildung links ist das exemplarische Ergebnis eines Patienten als Mittelwert von Dreifachbestimmungen mit SEM dargestellt. Kombinierte Daten sechs verschiedener Patienten sind rechts mit Mittelwert und SEM abgebildet. Statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0.05$ , Student's *t*-test) sind mit \* gekennzeichnet.

Es zeigte sich, dass eine Behandlung der PBMC von Patienten mit Rituximab - und damit eine Stimulation der patienteneigenen NK-Zellen - zu einer deutlichen und statistisch signifikanten Reduktion der Zahl an lebenden CLL-Zellen, und, daraus abgeleitet, verminderten Lyse der CLL-Zellen durch die NK-Zellen führt. Die Rituximab-induzierte Lyse wurde durch rhBAFF jedoch nahezu aufgehoben (alle  $p < 0.05$ , Student's *t*-test) (**Abbildung 22**). Auch mit nkBAFF wurde eine Protektion der CLL-Zellen vor der Rituximab-induzierten NK-Zell Lyse in diesem autologen System beobachtet (**Abbildung 23**).

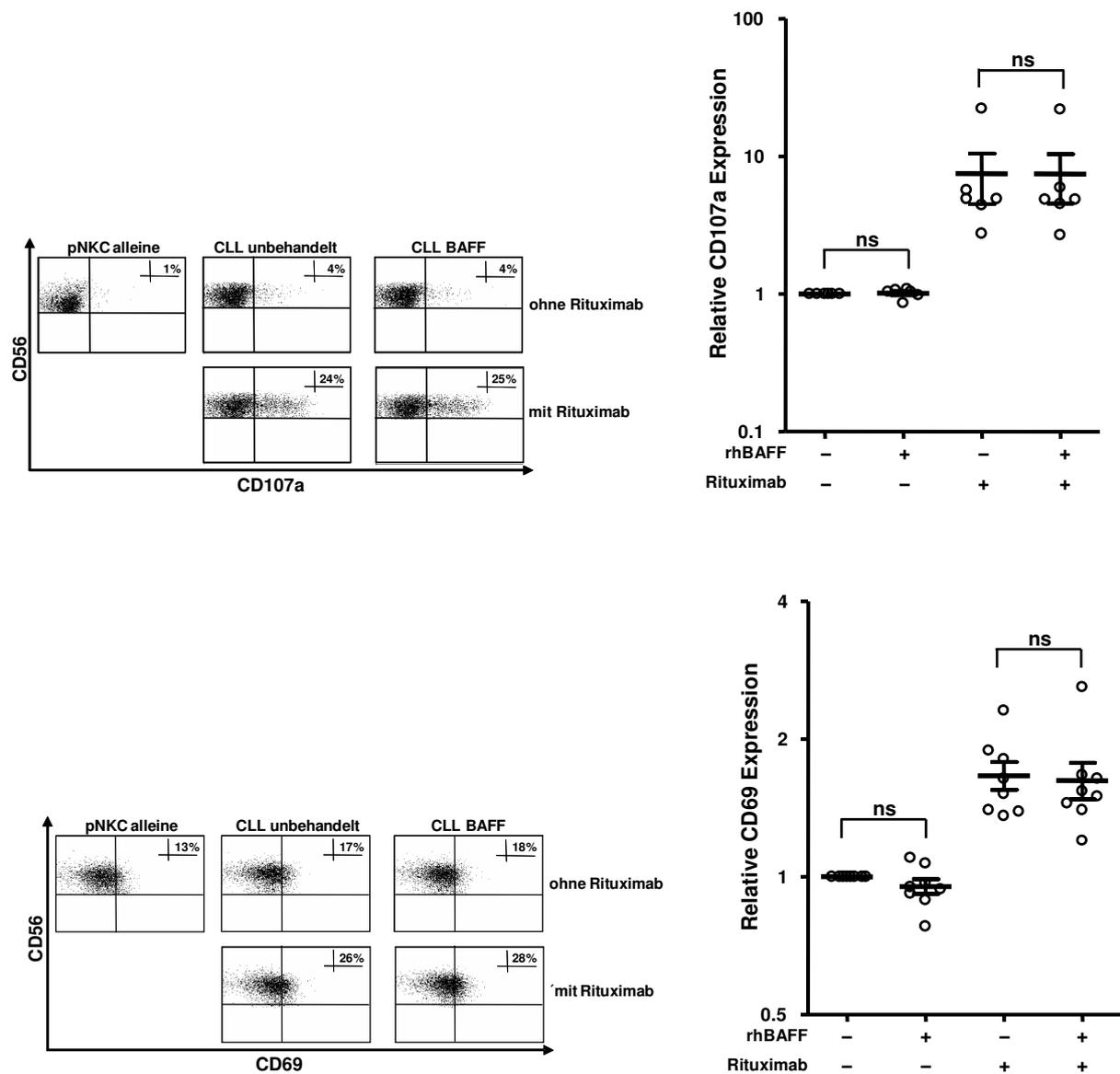


**Abbildung 23: Einfluss von nkBAFF auf die Lyse von CLL-Zellen durch autologe NK-Zellen.**

PBMC von CLL-Patienten mit moderater Leukämielast wurden unbehandelt belassen oder für 72 h mit nkBAFF (1 ng/ml) inkubiert. 24 h vor Versuchsende wurden die Zellen wo angegeben zusätzlich mit Rituximab (10 µg/ml) behandelt. Im Anschluss wurde die Lyse der CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> CLL-Zellen im FACS mit Hilfe von beads quantitativ bestimmt und die Anzahl unbehandelter CLL-Zellen auf 100% gesetzt. Dargestellt ist das exemplarische Ergebnis eines Patienten von mindestens drei mit ähnlichen Ergebnissen als Mittelwert von Dreifachbestimmungen mit SEM.

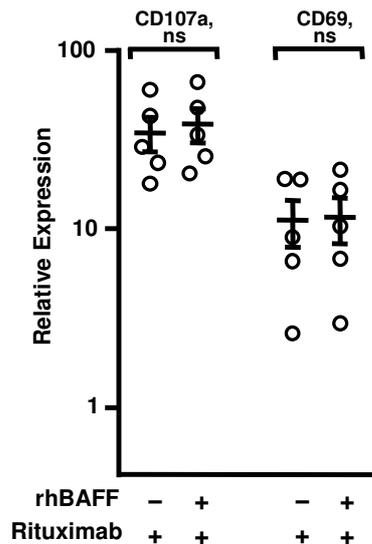
#### 4.2.4 Einfluss von BAFF auf NK-Zell Degranulation und Aktivierung

Um herauszufinden, ob die beobachtete verminderte Lyse der CLL-Zellen auf eine durch BAFF ausgelöste abgeschwächte NK-Reaktivität zurückzuführen ist, wurde die NK-Zell Degranulation und Aktivierung untersucht. Hierfür wurden CLL-Zellen mit oder ohne rhBAFF für 24 h inkubiert, gewaschen und anschließend ohne rhBAFF mit pNKC in An- oder Abwesenheit von Rituximab kultiviert. Das Waschen der Targetzellen vor Ansetzen der Cokultur schließt zum einen direkte Effekte von BAFF auf die NK-Zellen aus. Zum anderen werden dadurch lösliche Faktoren, deren Freisetzung potentiell durch BAFF in den CLL-Zellen induziert worden sein könnte, und die sich inhibitorisch auf die NK-Reaktivität auswirken könnten, entfernt. NK-Zell Degranulation und Aktivierung wurden mittels FACS der Oberflächenmoleküle CD107a bzw. CD69 bestimmt. Allein die Anwesenheit der CLL-Zellen führte zu einer leicht verstärkten Expression beider Moleküle auf den pNKC. Während die Stimulation mit Rituximab sowohl die CD107a- als auch CD69-Expression der pNKC deutlich steigerte, hatte die BAFF-Vorbehandlung der CLL-Zellen keinen Effekt auf die NK-Reaktivität, weder in An- noch in Abwesenheit von Rituximab (**Abbildung 24**).



**Abbildung 24: Einfluss von BAFF auf die NK-Zell Degranulation.** Primäre CLL-Zellen wurden mit oder ohne rhBAFF (500 ng/ml) für 24 h inkubiert, gewaschen und anschließend mit allogenen pNKC in An- oder Abwesenheit von Rituximab (10 µg/ml) kultiviert. Nach 4 h bzw. 24 h wurde die Oberflächenexpression des Degranulationsmarkers CD107a (oben) bzw. des Aktivierungsmarkers CD69 (unten) auf den CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> NK-Zellen im FACS analysiert. In der Abbildung links ist jeweils der prozentuale Anteil von CD107a-/CD69-positiven NK-Zellen eines exemplarischen Versuchs angeben. Rechts sind kombinierte Daten sechs verschiedener Spender als relative CD107a-/CD69-Expression, bezogen auf pNKC, welche mit unbehandelte CLL-Zellen kultiviert und deren Expression in jedem individuellen Datensatz auf 1 gesetzt wurden, mit Mittelwert und SEM dargestellt. ns, nicht signifikant (Student's t-test).

Um abermals die Situation im Menschen besser widerzuspiegeln, wurde der Einfluss von BAFF auf die NK-Reaktivität auch im autologen System untersucht. Die Stimulation mit Rituximab führte zu einer im Vergleich zu unbehandelten Zellen deutlichen Steigerung der Expression von CD107a und CD69 auf der Oberfläche der patienteneigenen NK-Zellen. Jedoch hatte auch hier eine BAFF-Vorbehandlung keinen Einfluss auf die Rituximab-induzierte Aktivierung und Degranulation der autologen NK-Zellen (**Abbildung 25**).

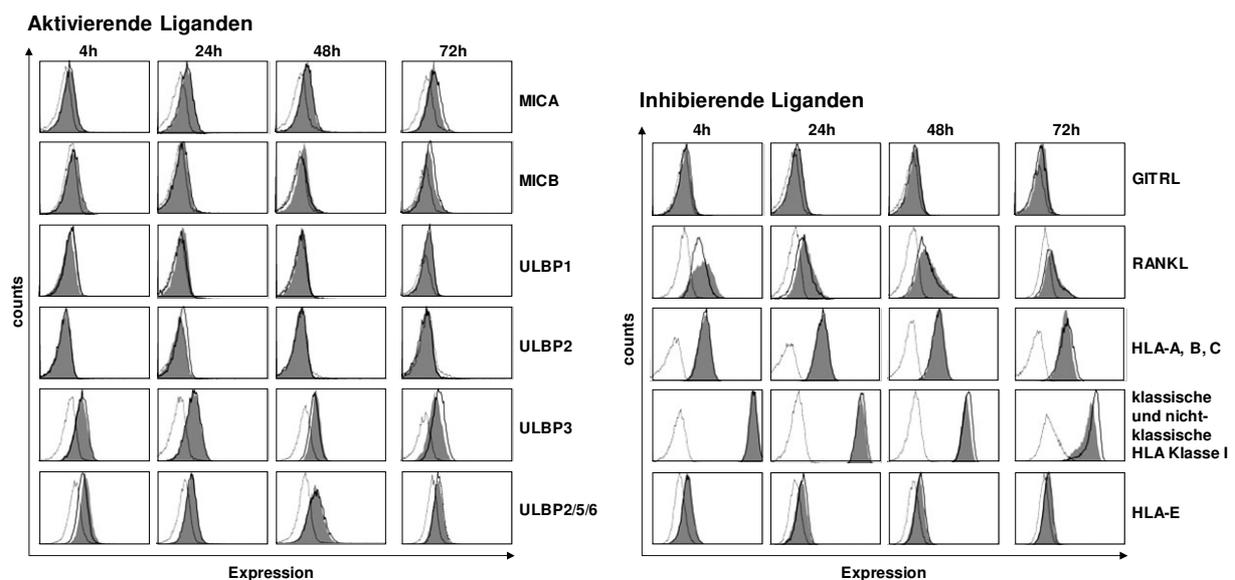


**Abbildung 25: Einfluss von BAFF auf die NK-Reaktivität autologer NK-Zellen.** PBMC von CLL Patienten mit moderater Leukämiezellzahl (40-80%) wurden unbehandelt belassen oder für 24 h mit rhBAFF (500 ng/ml) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mit Rituximab (10 µg/ml) behandelt. Nach 4 h bzw. 24 h wurde die Expression von CD107a bzw. CD69 auf den autologen CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> NK-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind kombinierte Daten sechs verschiedener Patienten mit Mittelwert und SEM als relative CD107a- bzw. CD69-Expression, bezogen auf pNKC, welche mit unbehandelte CLL-Zellen kultiviert und in jedem individuellen Datensatz auf 1 gesetzt wurden. ns, nicht signifikant (Student's t-test).

#### 4.2.5 Einfluss von BAFF auf die Expression immunregulatorischer Moleküle auf der Oberfläche primärer CLL-Zellen

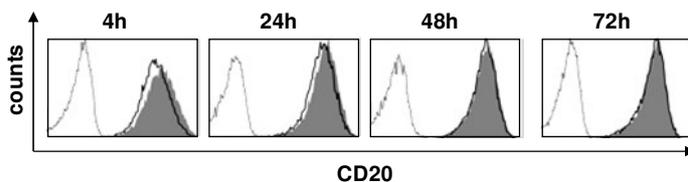
Wie bereits erörtert, wird die Reaktivität von NK-Zellen durch eine Balance aus aktivierenden und inhibierenden Signalen reguliert. Eine naheliegende Erklärung für die beobachtete verminderte NK-Lyse wäre demnach z.B. eine durch BAFF ausgelöste Hochregulation von Liganden für inhibitorische NK-Rezeptoren auf den CLL-Zellen. Die durch BAFF unveränderte Reaktivität der NK-Zellen gegen die Leukämiezellen deutet jedoch darauf hin,

dass BAFF keinen Einfluss auf die Immunogenität der CLL-Zellen und damit auch keinen Einfluss auf die Expression von Liganden für NK-Rezeptoren hat. Um diese These weiter zu untermauern, wurde der Effekt von BAFF auf die Oberflächenexpression verschiedener immunregulatorischer Moleküle auf den CLL-Zellen untersucht. Hierfür wurden primäre CLL-Zellen unbehandelt belassen oder mit rhBAFF inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde dann die Expression von Molekülen, welche bekanntermaßen die NK-Reaktivität gegen Leukämiezellen beeinflussen, auf der Oberfläche der CLL-Zellen untersucht: die Liganden des aktivierenden NKG2D-Rezeptors MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3 und ULBP2/5/6, sowie Liganden für inhibierende NK-Rezeptoren, wie die TNF-Familienmitglieder GITRL, RANKL und HLA Klasse I Moleküle. In Übereinstimmung mit der beobachteten unveränderten NK-Reaktivität, führte BAFF weder zu einer Herunterregulation von aktivierenden immunregulatorischen Molekülen, noch zu einer Hochregulation von inhibitorischen NK-Zell Liganden auf den CLL-Zellen (**Abbildung 26**).



**Abbildung 26: Einfluss von BAFF auf die Expression immunregulatorischer Moleküle auf der Oberfläche von CLL-Zellen.** Primäre CLL-Zellen wurden unbehandelt belassen (offenes Histogramm, durchgezogene Linie, spezifischer mAb) oder für bis zu 72 h mit rhBAFF (500 ng/ml; ausgefülltes Histogramm, spezifischer mAb) inkubiert. Zum jeweils angegebenen Zeitpunkt wurde die Expression der angezeigten Moleküle auf der Oberfläche der CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> CLL-Zellen im FACS analysiert. Offenes Histogramm, gestrichelte Linie, Isotypkontrolle.

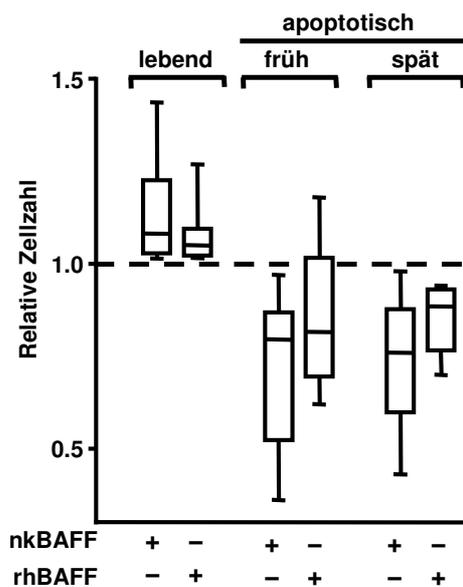
BAFF hatte weiterhin auch keinen Effekt auf die Expression des Rituximab-Zielantigens CD20 auf den CLL-Zellen. Eine differentielle Expression von CD20 kann damit als mögliche Ursache für eine veränderte Rituximab-induzierte NK-Reaktivität ausgeschlossen werden (**Abbildung 27**).



**Abbildung 27: Einfluss von BAFF auf die CD20-Expression von CLL-Zellen.** Primäre CLL-Zellen wurden unbehandelt belassen (offenes Histogramm, durchgezogene Linie, CD20 mAb) oder für bis zu 72 h mit rhBAFF (500 ng/ml; ausgefülltes Histogramm, CD20 mAb) inkubiert. Zum jeweils angegebenen Zeitpunkt wurde die Expression von CD20 auf der Oberfläche der CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> CLL-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Offenes Histogramm, gestrichelte Linie, Isotypkontrolle.

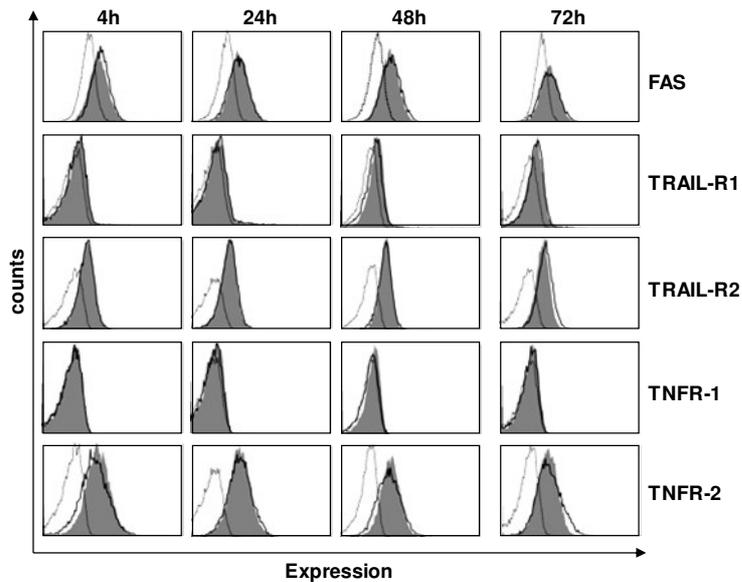
#### 4.2.6 Einfluss von BAFF auf CLL-Zell Überleben, Apoptose und Proliferation

Eine durch BAFF veränderte Immunogenität der CLL-Zellen und eine damit verbundene veränderte NK-Reaktivität kommt somit als mögliche Ursache für die beobachtete verminderte NK-Lyse nicht in Frage. Vielmehr zeigte sich, dass sowohl BAFF - und das gilt auch für das von NK-Zellen freigesetzte nkBAFF - primäre CLL-Zellen vor spontaner Apoptose schützt und sich positiv auf ihr Überleben auswirkt (alle  $p < 0.05$ , Student's t-test). So konnte mittels FACS für AnnexinV/7-AAD nach 24-stündiger Inkubation primärer CLL-Zellen mit rhBAFF oder nkBAFF ein vermehrter prozentualer Anteil lebender bzw. ein verringerter Anteil früh-apoptotischer und spät-apoptotischer/toter CLL-Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen gemessen werden (**Abbildung 28**).

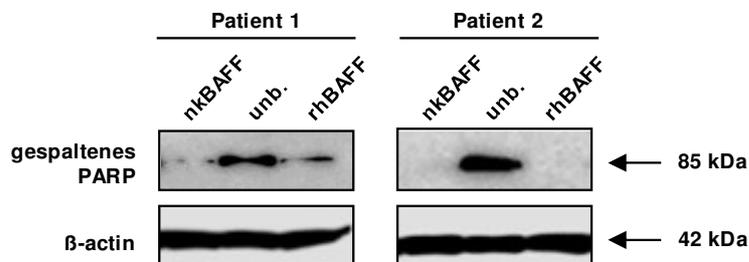


**Abbildung 28: Einfluss von BAFF auf das Überleben von CLL-Zellen.** Primäre CLL-Zellen wurden unbehandelt belassen oder für 24 h mit rhBAFF (500 ng/ml) oder nkBAFF (1 ng/ml) inkubiert. Nach 24 h wurde im FACS mittels AnnexinV/7-AAD die Zahl lebender (AnnexinV<sup>-</sup>/7-AAD<sup>-</sup>), früh-apoptotischer (AnnexinV<sup>+</sup>/7-AAD<sup>-</sup>) und spät-apoptotischer bzw. toter (AnnexinV<sup>+</sup>/7-AAD<sup>+</sup>) Zellen bestimmt. Abgebildet sind kombinierte Daten von 10 Spendern mit Mittelwert und SEM als relativer Anteil bezogen auf unbehandelten CLL-Zellen, deren Ergebnisse in jedem individuellen Datensatz auf 1 gesetzt wurden (gestrichelte Linie).

Während zwar kein Effekt von BAFF auf die Oberflächenexpression von Todesrezeptoren (TRAILR, TNFR und CD95/Fas) auf CLL-Zellen beobachtet wurde (**Abbildung 29**), konnte der CLL-protective Effekt mittels der Beobachtung, dass BAFF eine Herunterregulation von gespaltenem PARP, einer Komponente des Apoptose-Signalweges, welche im Zuge der Apoptose vermehrt exprimiert wird, bestätigt werden: CLL-Zellen lassen sich nur über einen begrenzten Zeitraum *in vitro* kultivieren, da sie, wenn keine unterstützenden Stimuli vorhanden sind, apoptotisch werden. So ließ sich nach 24-stündiger Kultur unbehandelter CLL-Zellen die Expression von gespaltenem PARP in Form einer 85 kDa Bande im Western Blot nachweisen. Nach Kultivierung der CLL-Zellen mit rhBAFF oder nkBAFF wurde diese Bande in ihrer Intensität deutlich reduziert (Patient 1) oder verschwand ganz (Patient 2) (**Abbildung 30**).



**Abbildung 29: Einfluss von BAFF auf die Expression von Todesrezeptoren auf der Oberfläche von CLL-Zellen.** Primäre CLL-Zellen wurden unbehandelt belassen (offenes Histogramm, durchgezogene Linie, spezifischer mAb) oder für bis zu 72 h mit rhBAFF (500 ng/ml; ausgefülltes Histogramm, spezifischer mAb) inkubiert. Zum jeweils angegebenen Zeitpunkt wurde die Expression der angezeigten Moleküle auf der Oberfläche der CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> CLL-Zellen im FACS analysiert. Offenes Histogramm, gestrichelte Linie, Isotypkontrolle.

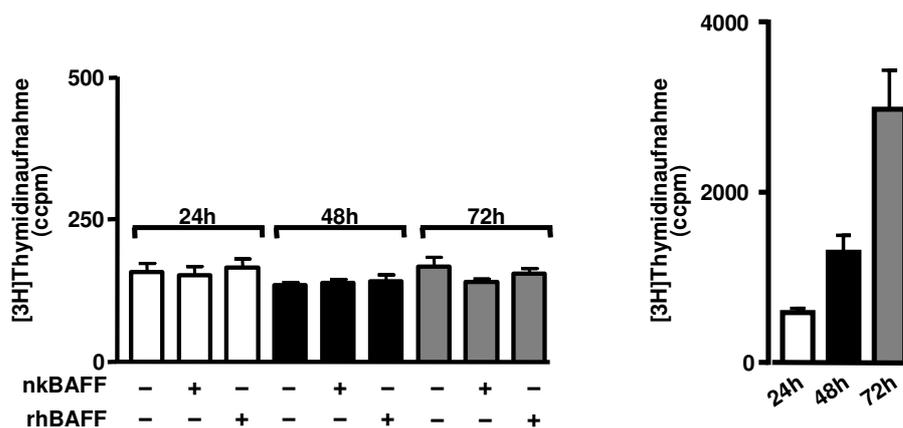


**Abbildung 30: Einfluss von BAFF auf die Apoptose von CLL-Zellen.** Primäre CLL-Zellen wurden unbehandelt belassen oder für 24 h mit nkBAFF (1 ng/ml) oder rhBAFF (500 ng/ml) inkubiert. Nach 24 h wurden Zelllysate hergestellt und im Western Blot auf die Expression von gespaltenem PARP untersucht. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Gelbeladung diente  $\beta$ -actin. Gezeigt sind beispielhafte Ergebnisse von zwei repräsentativen Patienten.

Abschließend wurde untersucht, ob BAFF die Proliferation von CLL-Zellen beeinflusst. Hierfür wurden primäre CLL-Zellen alleine oder mit rhBAFF bzw. nkBAFF kultiviert und die Proliferation mittels Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-Thymidin nach 24 h, 48 h und 72 h analysiert. Während sich Raji-Zellen als Positivkontrolle in Kultur über die Zeit kontinuierlich teilten,

vollzogen die CLL-Zellen keine Zellteilung, unabhängig von der An- oder Abwesenheit von BAFF.

Auf die Proliferation der CLL-Zellen hatte BAFF, zumindest in diesem *in vitro* Setting, somit zwar keinen Einfluss (**Abbildung 31**), die verminderte Induktion von Apoptose und Zelltod nach einer BAFF-Behandlung könnte jedoch ursächlich zur reduzierten Sensitivität gegenüber der NK-Zell-vermittelten Lyse beitragen.

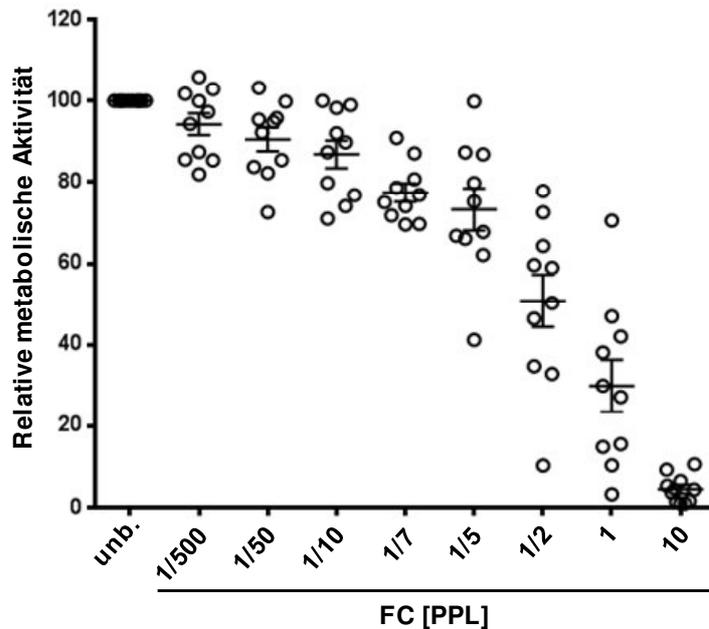


**Abbildung 31: Einfluss von BAFF auf die Proliferation von CLL-Zellen.** Primäre CLL-Zellen wurden alleine, mit nkBAFF (1 ng/ml) oder rhBAFF (500 ng/ml) kultiviert. Zum jeweils angegebenen Zeitpunkt wurde die Proliferation mittels Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-Thymidin analysiert. Die Ergebnisse dreier Patienten sind kombiniert dargestellt. Raji Zellen dienten als Positivkontrolle.

#### 4.3 Einfluss von BAFF auf die Suszeptibilität von CLL-Zellen für Systemtherapeutika

Der Standard der CLL-Therapie in der Erstlinie ist eine Kombination aus klassischer Chemotherapie mit den Zytostatika Fludarabin und Cyclophosphamid (FC), Bendamustin oder Chlorambucil, zusammen mit monoklonalen Antikörpern wie Rituximab. Im Folgenden wurde daher untersucht, ob sich BAFF– neben seinem bereits herausgearbeiteten negativen Einfluss auf die Rituximab-vermittelte Immunantwort von NK-Zellen – auch auf die Suszeptibilität von CLL-Zellen für eine Behandlung mit Chemotherapeutika auswirkt. Als repräsentatives Beispiel wurde hierfür eine Behandlung mit Fludarabin und Cyclophosphamid (FC) ausgewählt. Um geeignete FC-Konzentrationen für die *in vitro* Untersuchungen zu identifizieren, wurden zunächst Dosistitrationen mit PBMC zehn verschiedener CLL-Patienten durchgeführt und die zytotoxische Wirkung der Chemotherapeutika anhand des Einflusses auf die metabolische Aktivität im WST-1 Assay

bestimmt. Die eingesetzten FC-Konzentrationen orientierten sich dabei an in Patienten gemessenen *plasma peak* Levels (PPL).<sup>206,207</sup> Die den PPL entsprechenden Konzentrationen von Fludarabin und Cyclophosphamid sind in Tabelle 6 genauer aufgeschlüsselt.

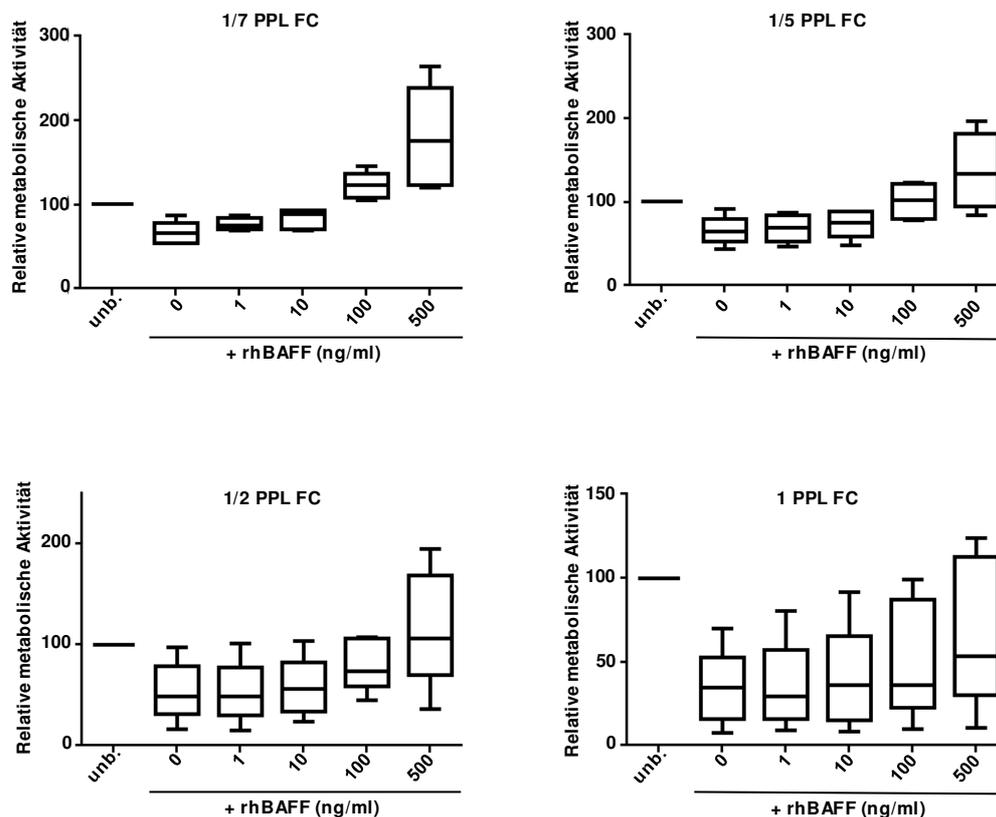


**Abbildung 32: Dosistitration von Fludarabin/Cyclophosphamid (FC) mit primären CLL-Zellen im WST-1.** PBMC von CLL-Patienten (> 80% Lymphozytenanteil) wurden unbehandelt belassen oder mit ansteigenden Konzentrationen von FC inkubiert. Nach 72 h wurde mittels WST-1 Assays die Stoffwechselaktivität bestimmt. Zur Vereinfachung sind die Dosierungen bezogen auf die *in vivo* gemessenen *plasma peak* Level (PPL) dargestellt. Die tatsächlichen Konzentrationen der beiden Komponenten können der Tabelle 6 entnommen werden. Dargestellt sind kombinierte Daten zehn verschiedener Patienten mit Mittelwert und SEM als relative metabolische Aktivität bezogen auf unbehandelte CLL-Zellen, welche in jedem individuellen Datensatz auf 100% gesetzt wurden.

<i>plasma peak</i> Level (PPL)	1/500	1/50	1/10	1/7	1/5	1/2	1	10
Fludarabin (µg/ml)	0,001	0,01	0,05	0,075	0,1	0,2	0,5	5
Cyclophosphamid (µg/ml)	0,001	0,004	0,02	0,03	0,04	0,08	0,2	2,5

**Tabelle 6: Konzentrationen von Fludarabin und Cyclophosphamid, bezogen auf die jeweiligen in CLL-Patienten gemessenen *plasma peak* Level (PPL).**

Während die Konzentration von 1/500 PPL nur einen geringen Einfluss auf die metabolische Aktivität der CLL-Zellen hatte, konnten mit einer zehnfachen PPL kaum noch stoffwechselaktive Zellen detektiert werden. Die in diesem experimentellen Setting identifizierte  $LC_{50}$  (halbmaximal-letale) Konzentration entsprach ca. der Hälfte der im Patienten gemessenen PPL. Um den Einfluss von BAFF auf die Chemosensitivität der CLL-Zellen zu untersuchen, wurden neben der  $LC_{50}$ -Dosis auch die sich in der S-Kurve der Titration befindlichen Konzentrationen von 1/5, 1/7 und 1 PPL verwendet. Die Zellen wurden hierfür zusätzlich zur Chemotherapie mit aufsteigenden Konzentrationen von rhBAFF inkubiert und ihre metabolische Aktivität bestimmt. BAFF schützte die CLL-Zellen dosisabhängig vor der Chemo-induzierten Reduktion ihrer metabolischen Aktivität. Diese BAFF-vermittelte Protektion der CLL-Zellen wurde für alle vier untersuchten FC-Dosierungen beobachtet, war dabei in ihrer Intensität jedoch abhängig von der jeweils eingesetzten Chemotherapie-Konzentration (**Abbildung 33**).

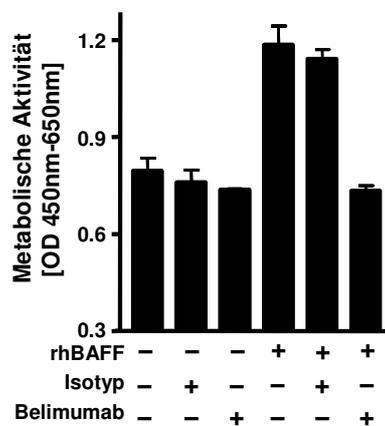


**Abbildung 33: Einfluss von BAFF auf die Suszeptibilität von CLL-Zellen für eine chemotherapeutische Behandlung.** Primäre CLL-Zellen wurden unbehandelt belassen oder mit vier verschiedenen FC-Dosierungen (1/7, 1/5, 1/2, und 1 PPL) inkubiert. BAFF wurde in aufsteigenden Konzentrationen (0, 1, 10, 100, 500 ng/ml) hinzugegeben und nach 72 h wurde die Stoffwechselaktivität im WST-1 Assay bestimmt. Dargestellt sind kombinierte Daten sechs verschiedener Patienten als relative metabolische Aktivität bezogen auf unbehandelte CLL-Zellen, welche in jedem individuellen Datensatz auf 100% gesetzt wurde.

#### 4.4 Einfluss einer BAFF-Neutralisation mit Belimumab auf die Suszeptibilität von CLL-Zellen für NK-Lyse und Systemtherapeutika

##### 4.4.1 Einfluss von Belimumab auf die BAFF-vermittelte Reduktion der NK-Lyse primärer CLL-Zellen

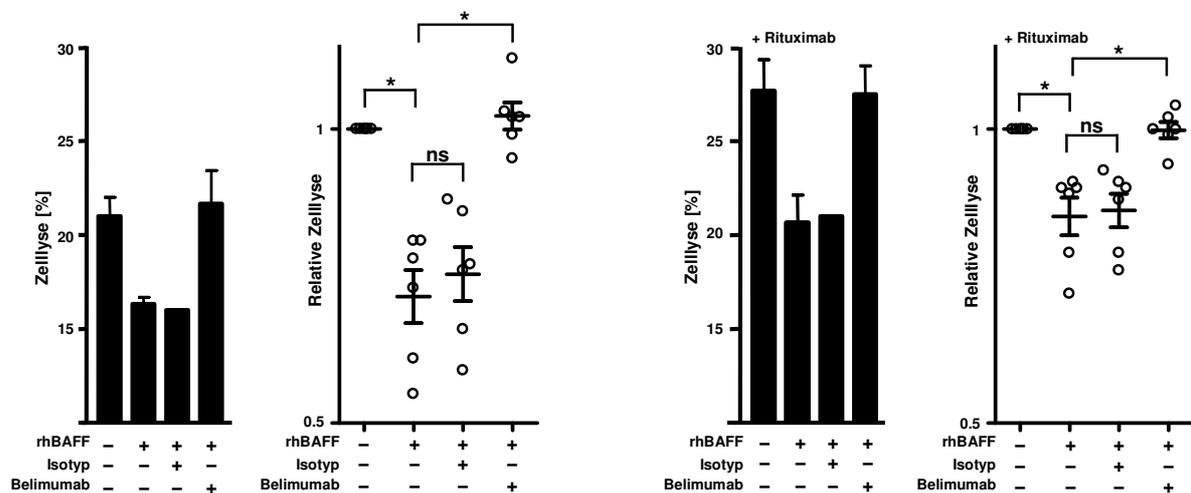
Nachdem gezeigt werden konnte, dass BAFF CLL-Zellen vor der direkten und Antikörper-induzierten NK-Lyse, aber auch vor Standardchemotherapiebehandlung schützt, wurde schließlich untersucht, ob der therapeutische BAFF-blockierende mAb Belimumab den protektiven Effekt von BAFF für die CLL-Zellen neutralisieren und sich somit im Rahmen eines therapeutischen Konzepts positiv auf eine CLL-Therapie auswirken könnte. Zu diesem Zweck wurden zunächst primäre CLL-Zellen für 72 h mit BAFF in An- oder Abwesenheit von Belimumab oder einer Isotypkontrolle inkubiert und der Effekt der BAFF-Neutralisation auf die metabolische Aktivität der CLL-Zellen untersucht. Es zeigte sich, dass die Gegenwart von Belimumab den BAFF-vermittelten Anstieg der metabolischen Aktivität der CLL-Zellen verhinderte, während die Isotypkontrolle keinen Einfluss hatte (**Abbildung 34**).



**Abbildung 34: Einfluss einer BAFF-Neutralisation mittels Belimumab auf die Stoffwechselaktivität primärer CLL-Zellen.** PBMC von CLL Patienten (> 80% Lymphozytenanteil) wurden wie angegeben mit oder ohne rhBAFF (500 ng/ml), Belimumab oder einer Isotypkontrolle inkubiert. Nach 72 h wurde mittels WST-1 Assay die Stoffwechselaktivität bestimmt. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis eines CLL-Patienten mit Mittelwert und SEM aus Dreifachbestimmungen aus sechs mit ähnlichen Ergebnissen.

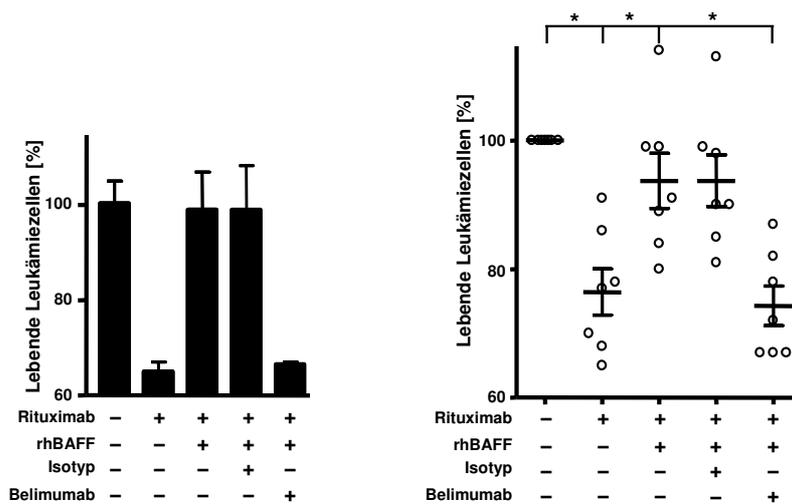
Als nächstes wurde analysiert, ob Belimumab auch die BAFF-vermittelte Resistenz von CLL-Zellen gegenüber der NK-Lyse blockieren kann. In Zytotoxizitätsassays, für welche die CLL-Zellen zuvor wieder für 24 h mit BAFF bzw. BAFF zusammen mit Belimumab oder einer Isotypkontrolle vorbehandelt und anschließend gewaschen wurden, verhinderte die Zugabe

von Belimumab den protektiven Effekt von BAFF auf die CLL-Zellen, so dass sowohl die direkte als auch Rituximab-induzierte Lyse der CLL-Zellen durch allogene NK-Zellen wieder hergestellt wurde (**Abbildung 35**).



**Abbildung 35: Einfluss einer BAFF-Neutralisation auf die NK-Zell-vermittelte Lyse primärer CLL-Zellen.** Primäre CLL-Zellen wurden für 24 h unbehandelt belassen oder mit rhBAFF (500 ng/ml) alleine oder in Kombination mit Belimumab bzw. einer Isotypkontrolle (je 10 µg/ml) kultiviert. Nach anschließendem Waschen wurde in 2 h BATDA-Europium-Zytotoxizitätsassays mit pNKC die Lyse der CLL-Zellen in An- (rechts) oder Abwesenheit (links) von Rituximab (10 µg/ml) analysiert. Links ist jeweils ein exemplarisches Ergebnis eines Patienten dargestellt. Kombinierte Daten sechs verschiedener Patienten (E:T 20:1) sind rechts als relative Lyse bezogen auf die Lyse unbehandelter CLL-Zellen, welche in jedem individuellen Datensatz auf 1 gesetzt wurde, mit Median und SEM dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0.05$ , Student's t-test) sind mit \* gekennzeichnet. ns, nicht signifikant.

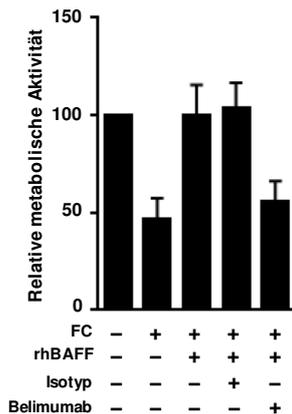
Die Blockadekapazität von Belimumab wurde auch im autologen Assay-System untersucht. Hier führte die Rituximab-induzierte NK-Reaktivität abermals zu einer deutlichen Reduktion der CLL-Zellen und auch hier verhinderte Belimumab die BAFF-vermittelte Resistenz der CLL-Zellen gegenüber der Rituximab-induzierten NK-Zell-vermittelten ADCC (alle  $p < 0.05$ , Student's t-test) (**Abbildung 36**).



**Abbildung 36: Einfluss einer BAFF Neutralisation auf die Lyse von CLL-Zellen durch autologe NK-Zellen.** PBMC von CLL Patienten mit moderater Leukämiezellzahl (40-80%) wurden unbehandelt belassen oder für 48 h mit rhBAFF (500 ng/ml) alleine oder in Kombination mit Belimumab oder einer Isotypkontrolle (je 10 µg/ml) inkubiert. Rituximab (10 µg/ml) wurde, wo angezeigt, zugegeben und die Zellen für weitere 24 h inkubiert. Anschließend wurde die Zahl der in jeder Probe verbliebenen lebenden CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> CLL-Zellen mittels FACS mit Hilfe von beads quantitativ bestimmt. Die Anzahl der lebenden CLL-Zellen in der unbehandelten Probe wurde auf 100% gesetzt. In der Abbildung links ist das exemplarische Ergebnis eines Patienten als Mittelwert von Dreifachbestimmungen mit SEM dargestellt. Kombinierte Daten sechs verschiedener Patienten sind rechts mit Mittelwert und SEM abgebildet. Statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0.05$ , Student's t-test) sind mit \* gekennzeichnet.

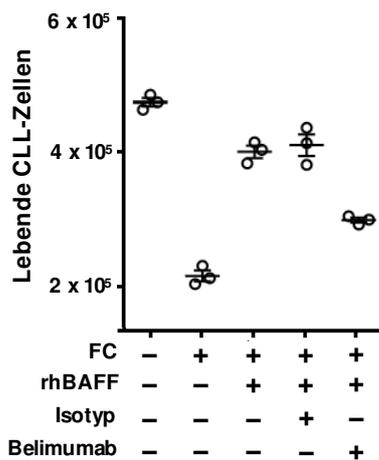
#### 4.4.2 Einfluss von Belimumab auf die BAFF-vermittelte Resistenz gegenüber chemotherapeutischer Behandlung

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob Belimumab auch die BAFF-vermittelte Protektion vor dem Chemotherapeutisch-induzierten Zelltod neutralisieren und die Suszeptibilität der CLL-Zellen für eine FC-Behandlung wiederherstellen kann (**Abbildung 37**). Es zeigte sich in WST-1 Assays, dass bei einer FC-Konzentration, die 1 PPL entspricht, die durch BAFF verminderte Sensitivität der CLL-Zellen gegenüber der chemotherapeutischen Behandlung durch Belimumab wieder hergestellt werden konnte.



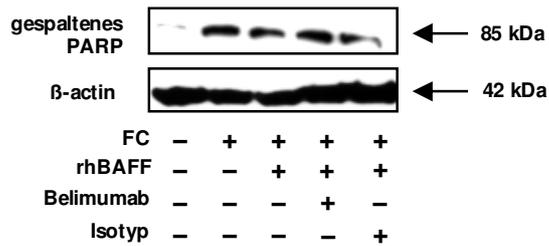
**Abbildung 37: Einfluss einer BAFF-Neutralisation auf die Chemotherapiesensitivität primärer CLL-Zellen.** Primäre CLL-Zellen (> 80% Lymphozytenanteil) wurden unbehandelt belassen oder mit 1 PPL FC inkubiert. Zusätzlich wurde, wo angegeben, rhBAFF (500 ng/ml), Belimumab oder eine Isotypkontrolle zugegeben. Nach 72 h wurde im WST-1 Assay die Stoffwechselaktivität bestimmt. Gezeigt sind kombinierte Daten vier verschiedener Patienten mit Mittelwert und SEM als relative metabolische Aktivität bezogen auf unbehandelte CLL-Zellen, welche in jedem individuellen Datensatz auf 100% gesetzt wurden.

Neben der metabolischen Aktivität als Surrogatmarker für die Zellviabilität, wurde der Einfluss von BAFF und seiner Neutralisation auch auf das tatsächliche Zellüberleben analysiert. Hierfür wurden primäre CLL-Zellen zunächst für 24 h mit oder ohne BAFF bzw. mit BAFF in Kombination mit Belimumab oder Isotypkontrolle vorbehandelt. Anschließend wurde 1 PPL FC zugegeben und die Zellen für weitere 48 h inkubiert. Die absolute Zellzahl lebender CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> CLL-Zellen wurde dann durchflusszytometrisch anhand ihrer 7-AAD-Negativität mit Hilfe von Quantifizierungsbeads bestimmt. Auch in diesem Assay zeigte sich der protektive Effekt von BAFF im Hinblick auf die durch die FC-Behandlung reduzierte Zahl lebender CLL-Zellen. Belimumab neutralisierte diesen Effekt und stellte die Suszeptibilität der CLL-Zellen für die FC-Behandlung zumindest teilweise wieder her (**Abbildung 38**).



**Abbildung 38: Einfluss einer BAFF-Neutralisation mittels Belimumab auf das Überleben primärer CLL-Zellen.** CLL-Zellen eines Patienten wurden wie angegeben mit oder ohne rhBAFF (500 ng/ml), Belimumab oder einer Isotypkontrolle inkubiert. Nach 24 h wurden die Zellen mit 1 PPL FC behandelt und für weitere 48 h kultiviert. Im FACS wurden die CLL-Zellen anschließend als CD19+CD5+ selektiert und die absolute Zahl lebender CLL-Zellen mittels 7-AAD und Quantifizierungsbeads bestimmt. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis eines CLL-Patienten mit Mittelwert und SEM aus Dreifachbestimmungen aus drei Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen.

Mittels Western Blot für gespaltenes PARP konnte durch einen Anstieg der Expression nach FC-Behandlung zum einen gezeigt werden, dass es sich bei dem durch FC induzierten Zelltod um Apoptose zu handelt. Zum anderen wird auch hier durch eine Reduktion der Bandenintensität nach BAFF-Behandlung deutlich, dass BAFF vor FC-induzierter Apoptose schützt. Eine Neutralisation mit Belimumab blockierte diesen BAFF-vermittelten Effekt jedoch, so dass die ursprüngliche Bandenintensität wiederhergestellt wurde (**Abbildung 39**).



**Abbildung 39: Einfluss einer BAFF-Neutralisation mittels Belimumab auf die chemotherapeutisch induzierte Apoptose.** Primäre CLL-Zellen wurden wie angegeben mit oder ohne rhBAFF (500 ng/ml), Belimumab oder Isotypkontrolle (je 10µg/ml) für 24 h inkubiert. Die Zellen wurden danach mit 1 PPL FC behandelt und für weitere 48 h kultiviert. Anschließend wurden Zelllysate generiert und im Western Blot auf gespaltenes PARP hin analysiert. Die Expression von  $\beta$ -actin diente als Ladekontrolle. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis eines CLL-Patienten von mindestens drei mit ähnlichen Ergebnissen.

Zusammenfassend demonstrieren diese Ergebnisse, dass eine Belimumab-Behandlung die BAFF-vermittelte Resistenz der CLL-Zellen neutralisieren und somit zum einen die direkte und Rituximab-induzierte NK-Lyse, und zum anderen die Suszeptibilität der CLL-Zellen für eine chemotherapeutische Intervention wieder herstellen kann.

## 5 Diskussion

Die Interaktion transformierter Zellen mit dem Immunsystem entscheidet wesentlich darüber, ob die entarteten Zellen nach initialen onkogenen Ereignissen eliminiert werden oder ob es zur Entwicklung einer klinisch apparenten und lebensbedrohlichen malignen Erkrankung kommt. Dabei scheinen die Induktion von Toleranz der Immunzellen gegen die Tumorzellen und die Resistenz der malignen Zellen für die Immunantwort von besonderer Relevanz und ermöglichen letztlich einen *immune escape* der Tumorzellen. Entsprechend wird heute neben den klassischen sechs *hallmarks of cancer* der *immune escape* als siebtes betrachtet.<sup>22,55,208</sup> Die Mechanismen, die initial den *immune escape* der Tumorzellen ermöglicht haben, bestehen wohl in den meisten Fällen auch bei therapeutischer Intervention fort. Dadurch kann insbesondere der Erfolg immunbasierter Behandlungsstrategien, wie z.B. allogene Stammzelltransplantation oder Applikation therapeutischer Antikörper, beeinträchtigt werden. Die Aufklärung von Molekülsystemen, die an der Immunevasion der Tumorzellen beteiligt sind, ist daher nicht nur von wissenschaftlicher, sondern auch von direkter klinischer Relevanz.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit standen die NK-Zellen, eine Komponente des angeborenen Immunsystems, die insbesondere bei der Immunüberwachung von malignen hämatopoetischen Erkrankungen eine bedeutende Rolle einnimmt. Darüber hinaus spielen NK-Zellen eine wichtige Rolle für den Erfolg der allogenen Stammzelltransplantation.<sup>51,209</sup> Auch bei der Applikation von therapeutischen Antikörpern, wie Rituximab, tragen sie durch ihre Fähigkeit, nach Bindung des Antikörpers an die malignen Zellen ADCC zu vermitteln, zu dessen therapeutischer Wirkung bei.<sup>96</sup> Insgesamt wird die Reaktivität von NK-Zellen durch eine Balance aus aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren reguliert, wozu neben klassischen Molekülen, wie den inhibitorischen Rezeptoren für MHC-Klasse-I oder dem aktivierenden FcγRIIIa (CD16) auch zahlreiche Mitglieder der TNF-Familie beitragen.<sup>100</sup>

Trotz der bedeutenden Rolle von NK-Zellen bei der Immunüberwachung gerade von Leukämien, gab es in den letzten 30 Jahren zahlreiche Berichte darüber, dass die Fähigkeit von NK-Zellen, maligne Zellen anzugreifen und zu töten, in lymphatischen Leukämien im Vergleich zu Leukämien myeloischen Ursprungs eingeschränkt ist. Dazu trägt zum einen die geringere Suszeptibilität der malignen Zellen gegenüber einer NK-Zell-Attacke, zum anderen jedoch auch eine verminderte Reaktivität der NK-Zellen selbst bei. Interessanterweise wurde dies sowohl für die direkte NK-Reaktivität, als auch die Antikörper-induzierte ADCC beschrieben.<sup>193-203</sup> Die diesen Beobachtungen zugrunde liegenden Mechanismen sind bis heute weitgehend unbekannt. Dazu beitragen könnte die allgemein in lymphatischen im Vergleich zu myeloischen Leukämien verstärkte Expression von inhibitorischen HLA-Klasse

I-Molekülen, sowie die geringere Expression von Liganden für aktivierende NK-Rezeptoren, wie z.B. CD155 und CD112.<sup>198</sup> Speziell in der CLL scheint die Herunterregulation von NKG2D und Nkp30 auf den patienteneigenen NK-Zellen, aber auch die Freisetzung des löslichen Nkp30-Liganden BAG6 und die deutliche Expression von NK-inhibitorischen Liganden, wie nicht-klassische HLA-Moleküle, eine Rolle zu spielen. Darüber hinaus konnten zahlreiche TNF-Familienmitglieder identifiziert werden, die von CLL-Zellen exprimiert werden und zur Immunevasion vor der NK-Zell-vermittelten Immunüberwachung beitragen. So wurde gezeigt, dass 4-1BB/CD137 Ligand (CD137L) und G1TR Ligand (GITRL) eine Hemmung der NK-Antitumorreaktivität, sowohl hinsichtlich der direkten als auch Antikörper induzierten NK-Reaktivität, vermitteln.<sup>197,201,210-213</sup> Auch das TNF-Familienmitglied RANK Ligand (RANKL), welches vornehmlich hinsichtlich seiner zentralen Rolle im Knochenstoffwechsel bekannt ist, wird auf Leukämiezellen und Myelomzellen exprimiert und vermittelt Signale, die das Überleben der malignen Zellen begünstigen.<sup>214,215</sup>

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand das TNF-Familienmitglied BAFF, das hauptsächlich aufgrund seiner pathophysiologischen Rolle in Autoimmunerkrankungen bekannt ist und zu dessen Neutralisation der Antikörper Belimumab für die Behandlung von SLE zugelassen ist.

In dieser Arbeit wurde BAFF hinsichtlich seiner Rolle bei der Interaktion von CLL-Zellen mit NK-Zellen und einer damit verbundenen Immunevasion der CLL-Zellen vor der NK-Zell-vermittelten Immunüberwachung charakterisiert. Zudem wurde die Eignung einer BAFF-Neutralisation mittels des therapeutischen Antikörpers Belimumab als therapeutisches Konzept zur Steigerung der Suszeptibilität von CLL-Zellen für eine durch therapeutische Antikörper induzierte NK-Immunantwort und zur Verbesserung der Effizienz „konventioneller“ Systemtherapeutika untersucht.

BAFF wird in der Regel von Zellen myeloischen Ursprungs, wie Monozyten/Makrophagen, DC oder Neutrophilen exprimiert und löslich freigesetzt. Darüber hinaus wurde eine durch Aktivierung induzierte BAFF-Expression in B- und T-Zellen, und damit für Zellen der lymphoiden Linie des Immunsystems, beschrieben.<sup>139</sup> Von anderen Untersuchern wurde auch in den ebenfalls der lymphoiden Linie entstammenden NK-Zellen eine Expression von BAFF-Protein mittels Western Blot nachgewiesen.<sup>204</sup> Da zur membranständigen Expression oder Freisetzung als löslicher Faktor durch NK-Zellen bisher nichts bekannt war, wurde dies im ersten Teil dieser Arbeit untersucht. Vor Analyse der BAFF-Oberflächenexpression wurden verschiedene Reagenzien hinsichtlich ihrer Eignung zur BAFF-Detektion evaluiert. Lediglich der mAb 1D6 und ein BAFF-Ig wiesen die nötige Spezifität, und nur im Falle von mAb 1D6, auch die nötige Sensitivität zur Detektion von endogenem, membranständigem BAFF auf. Mit beiden Reagenzien konnte jedoch weder auf ruhenden noch auf gemäß einem

Protokoll für den adoptiven Transfer generierten polyklonalen NK-Zellen eine relevante BAFF-Expression auf der Zelloberfläche detektiert werden. Eine Analyse der BAFF-Expression auf mRNA-Ebene ergab allerdings in beiden NK-Zelltypen ein positives Signal. Mittels ELISA ließ sich in Übereinstimmung mit dem positiven PCR-Ergebnis lösliches BAFF in Zellkulturüberständen ruhender und polyklonaler NK-Zellen nachweisen. Die lösliche Freisetzung trotz nicht nachweisbarer Expression auf der Zelloberfläche von NK-Zellen unterscheidet sich von Beobachtungen mit anderen Zelltypen, bei welchen BAFF in der Regel auf der Zelloberfläche exprimiert, und durch eine Furinkonvertase abgespalten und so löslich freigesetzt wird.<sup>137</sup> Der aufgrund hoher Sequenzhomologien nahe Verwandte von BAFF, APRIL, wird hingegen intrazellulär durch eine Furinkonvertase prozessiert und direkt löslich freigesetzt, ohne je membranständig exprimiert zu werden. Diese Art der Freisetzung wurde auch für BAFF in Neutrophilen beschrieben und könnte eine mögliche Erklärung für eine lösliche Freisetzung trotz nicht detektierbarer Oberflächenexpression in NK-Zellen bieten.<sup>205</sup> Damit übereinstimmend wurde BAFF-Protein intrazellulär in NK-Zellen von gesunden Spendern, aber auch CLL-Patienten gefunden. Die Bestimmung der intrazellulären BAFF-Expression mittels FACS erlaubt durch spezifische Selektion der NK-Zellen anhand von Oberflächenmarkern eine eindeutige Zuordnung der BAFF-Expression zu den NK-Zellen. Im Gegensatz dazu bestand bei den vorangegangenen Analysen der löslichen Freisetzung und der Expression von BAFF-mRNA in pNKC die Gefahr der Kontamination durch andere, in der Zellsuspension enthaltene BAFF-exprimierende Zelltypen (z.B. Monozyten, aktivierte B- oder T-Zellen). Durch FACS-Sorting wurden nachfolgend diese potentiell kontaminierenden Zelltypen aussortiert und so eine nahezu reine NK-Population generiert. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der intrazellulären FACS-Färbung, wurde diese reine NK-Population ebenfalls positiv auf BAFF-mRNA und lösliches BAFF getestet.

Zur Expression von APRIL ist in NK-Zellen bislang nichts bekannt. Trotz der Detektion von APRIL-mRNA, konnte weder membranständiges, noch lösliches APRIL in Zellkulturüberständen von ruhenden oder polyklonalen NK-Zellen nachgewiesen werden. Die Spezifität des APRIL-ELISA wurde anhand von nachweisbarem APRIL-Protein in Überständen von INF- $\gamma$ -stimulierten Monozyten belegt. Da APRIL intrazellulär prozessiert und direkt löslich freigesetzt wird,<sup>149</sup> entsprach eine fehlende Oberflächenexpression den Erwartungen. Die Abwesenheit von löslichem APRIL trotz positiven PCR-Ergebnisses deutet jedoch auf eine post-transkriptionelle oder post-translationale Regulation der APRIL-Expression bei NK-Zellen hin.

Sowohl die intrazelluläre BAFF-Expression, als auch die Freisetzung von löslichem BAFF wurde nach Stimulation mit den Zytokinen IL-2 und IL-15, welche eine eher generelle NK-

Aktivierung induzieren, gesteigert. Dies ist in Übereinstimmung mit Daten Anderer, die eine Steigerung der BAFF-Expression in NK-Zellen nach IL-2-Stimulation auf Proteinebene zeigten.<sup>204</sup> Auch die mittels ELISA und intrazellulärem FACS detektierten höheren BAFF-Level in unter IL-2-Stimulation generierten pNKC im Vergleich zu ruhenden NK-Zellen bestätigen diese Beobachtung. Interessanterweise wurde auch nach CD16-Stimulation mit Rituximab eine gesteigerte BAFF-Expression detektiert. Mit den neuen CD20-Antikörpern Ofatumumab und Obinutuzumab wurde dieser Effekt sogar noch verstärkt. Vor allem Obinutuzumab, bei welchem die Affinität zu CD16 durch *glykoengineering* verbessert wurde,<sup>97,174</sup> vermittelte eine deutlich stärkere BAFF-Induktion als Rituximab. Membranständiges BAFF konnte jedoch auch nach Aktivierung nicht auf den NK-Zellen detektiert werden, wohingegen die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 nach Zytokin- oder CD16-Stimulation auf der Oberfläche der NK-Zellen erwartungsgemäß anstieg. Dies deutet weiterhin auf eine intrazelluläre Prozessierung und direkte lösliche Freisetzung von BAFF bei NK-Zellen hin.

Um das von NK-Zellen freigesetzte BAFF näher zu charakterisieren und dessen Rolle bei der Interaktion von NK- und CLL-Zellen untersuchen zu können, wurde BAFF mit Hilfe einer Belimumab-gecoateten Säule aus Zellkulturüberständen von pNKC isoliert (nkBAFF). Mittels ELISA konnten im Eluat der Belimumabsäule hohe BAFF-Level detektiert werden, während im Eluat einer mit einem Kontrollprotein gecoateten Säule nahezu kein BAFF zu finden war. Mittels LC-MS/MS konnte anschließend bestätigt werden, dass es sich bei dem aus pNKC-Überständen isolierten Protein tatsächlich um BAFF handelt: im pNKC-Eluat konnten Peptide gefunden werden, welche identisch waren mit tryptischen Peptiden im Eluat von ebenfalls über eine Belimumabsäule aufgereinigten Zellkulturüberständen von 293-BAFF Transfektanten, welche als Positivkontrolle dienten. Zu erwähnen ist, dass sich einige dieser Peptide in ihrer Sequenz von der von bovinem BAFF unterscheiden. Dies schließt aus, dass das im Eluat der pNKC-Überstände gefundene nkBAFF von dem fetalen Kalbsserum stammt, welches im Zellkulturmedium vorhanden ist. Mit Hilfe von Blockade-Assays im FACS und ELISA konnte anschließend zum einen weiter bestätigt werden, dass es sich bei dem aufgereinigten Protein um BAFF handelt. Zum andere wurde gezeigt, dass nkBAFF noch immer die Fähigkeit besitzt, an seine Rezeptoren zu binden und es nicht im Zuge des Aufreinigungsprozesses zerstört oder derart in seiner Struktur verändert wurde, dass es zum Verlust seiner Bindungsfähigkeit kam.

Nachfolgend wurde untersucht, welchen Effekt BAFF auf CLL-Zellen hat und ob es Einfluss auf die NK-Zell-vermittelte Immunüberwachung der CLL-Zellen nimmt. In Übereinstimmung mit Daten anderer Untersucher, konnte auf CLL-Zellen aller untersuchten Patienten eine starke Expression der BAFF-Rezeptoren BAFFR und TACI und in 36% der Fälle auch BCMA

detektiert werden.<sup>166</sup> Der überlebensfördernde Einfluss von BAFF auf CLL-Zellen konnte durch WST-1 Assays, in welchen die Aktivität mitochondrialer Enzyme bestimmt wird, bestätigt werden: rhBAFF führte zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der metabolischen Aktivität der CLL-Zellen.

Im Fokus dieser Arbeit stand die Frage, ob BAFF sich neben seiner bereits bekannten überlebensfördernden Wirkung auch auf das NK-Zell-Killing von CLL-Zellen auswirkt. Tatsächlich reduzierte eine Exposition von CLL-Zellen mit rhBAFF die NK-Zell-vermittelte Lyse der CLL Zellen in Europium-Zytotoxizitätsassays deutlich. Beachtenswerterweise wurde dies sowohl für die direkte Lyse als auch für die Rituximab-induzierte ADCC beobachtet. Dies wurde mit allogenen "gesunden", aber auch autologen patienteneigenen NK-Zellen nachgewiesen. Im Hinblick auf diesen CLL-protektiven Effekt von BAFF ist die Beobachtung, dass auch NK-Zellen BAFF freisetzen - und diese Freisetzung nach CD16-Stimulation durch therapeutische Antikörper noch gesteigert wird - von besonderem Interesse. Genau wie rekombinantes BAFF vermittelte auch das von NK-Zellen freigesetzte BAFF - neben seines ebenfalls beobachteten positiven Einflusses auf die metabolische Aktivität - eine deutliche Resistenz der CLL-Zellen gegenüber der direkten und Rituximab-induzierten NK-Lyse im allogenen und autologen Assay-System. Interessanterweise wurden NK-Aktivierung und Degranulation, gemessen anhand der Oberflächenexpression von CD69 bzw. CD107a, der sowohl allogenen als auch autologen NK-Zellen nicht durch eine Vorbehandlung der CLL-Zellen durch BAFF beeinflusst – weder in An- noch in Abwesenheit von Rituximab. Es ist daher unwahrscheinlich, dass die verminderte NK-Lyse auf eine durch BAFF verringerte Immunogenität der Leukämiezellen zurückzuführen ist. Damit übereinstimmend konnte auch kein Effekt von BAFF auf die Expression zahlreicher Oberflächenmoleküle, welche bekanntermaßen die NK-Reaktivität gegen Leukämiezellen beeinflussen, festgestellt werden. So führte BAFF weder zu einer Herunterregulation von aktivierenden immunregulatorischen Molekülen, noch zu einer Hochregulation von inhibitorischen NK-Zell Liganden auf den CLL-Zellen. BAFF hatte darüber hinaus auch keinen Einfluss auf die Oberflächenexpression von CD20, dem Zielantigen verschiedener in der CLL eingesetzter therapeutischer Antikörper, was eine differentielle Expression von CD20 als mögliche Ursache für eine veränderte Rituximab-induzierte NK-Reaktivität ausschließt. Die Tatsache, dass BAFF die metabolische Aktivität der CLL-Zellen steigert, sowie die Apoptose der CLL-Zellen reduziert und das Überleben verbessert, deutet vielmehr darauf hin, dass BAFF die Leukämiezellen vor dem durch NK-Zellen induzierten Zelltod schützt. Dies stimmt mit Beobachtungen Anderer überein, die zeigten, dass die Zugabe von exogenem BAFF CLL-Zellen vor Apoptose schützt, während eine Blockade des endogenen BAFF durch BCMA-Fusionsproteine Apoptose induziert. Weiterhin konnte von anderen Untersuchern bereits gezeigt werden,

dass BAFF CLL-Zellen vor Flavopiridol-induziertem Zelltod schützt.<sup>157,163</sup> In dieser Arbeit konnten diese Daten durch Versuche mit den heute gängigen Systemtherapeutika Fludarabin und Cyclophosphamid ergänzt werden: es wurde gezeigt, dass BAFF die Suszeptibilität von CLL-Zellen für eine Behandlung mit diesen Therapeutika reduziert; und dies lässt sich anhand der Expressionsanalyse von gespaltenem PARP auf eine verminderte Apoptose-Induktion der CLL-Zellen nach einer BAFF-Exposition zurückführen.

NK-Zellen im Patienten sind sicherlich nicht die einzige BAFF-Quelle für die CLL-Zellen. Neben Zellen aus dem CLL-Mikromillieu, wie z.B. die in Anwesenheit von CLL-Zellen aus Monozyten differenzierenden *nurse like cells* (NCL), können auch die malignen Zellen selbst BAFF exprimieren.<sup>157,163,166</sup> Dennoch ist es möglich, dass auch das von NK-Zellen freigesetzte BAFF zu der verminderten Fähigkeit von NK-Zellen, CLL-Zellen zu töten, beiträgt, indem eine durch die maligne Zielzelle selbst ausgelöste NK-Aktivierung zu lokal erhöhten BAFF-Spiegeln führt. Vor allem nach Antikörperbehandlung könnte die Induktion der BAFF-Freisetzung durch die NK-Zellen und die daraus resultierende Resistenz der CLL-Zellen gegenüber der NK-Lyse kontraproduktiv für die Auslöschung der Leukämiezellen sein und damit Therapieerfolge in der CLL limitieren.

Basierend auf unseren Beobachtungen wurde weiterhin untersucht, ob der bereits für die SLE-Behandlung zugelassene BAFF-Antikörper Belimumab den protektiven Effekt von BAFF auf die CLL-Zellen verringert oder gar aufhebt und dadurch die Wirkung von z.B. CD20-Antikörpern verbessern könnte. Denn neben der Möglichkeit die immunstimulatorische Kapazität eines Antikörpers zu verbessern – wie z.B. durch Erhöhung der Affinität zum Zielantigen durch *glykoengineering* des Fc-Teils, wie im Falle von Obinutuzumab – kann man die therapeutische Effizienz möglicherweise auch dadurch erhöhen, dass man Mechanismen, die zur Tumorevasion beitragen, verhindert. Im Falle der CLL erscheint die Herangehensweise, die Anti-Tumoreimmunität durch eine BAFF-Neutralisation mit Belimumab - oder anderen BAFF-blockierenden Reagenzien, wie z.B. dem sich bisher noch in der klinischen Erprobung befindlichen TACI-Ig Atacicept<sup>216</sup>- zu erhöhen, sehr vielversprechend. Dies zeigen – wie auch schon die Rolle von BAFF beim Immunescape der CLL-Zellen vor der NK-Immunüberwachung - unsere Untersuchungen mit primären CLL-Zellen und allogenen bzw. autologen NK-Zellen: eine Neutralisation von BAFF mit Belimumab stellte in beiden Assays-Systemen die Suszeptibilität der CLL-Zellen für die direkte und Rituximab-induzierte NK-Lyse wieder her. Darüber hinaus sensitivierte die Belimumab-vermittelte BAFF-Neutralisation die CLL-Zellen für eine chemotherapeutische Behandlung. Diese Ergebnisse werden von Daten einer Phase 1b klinischen Studie mit dem TACI-Ig Atacicept gestützt: eine Monotherapie von refraktären und/oder rezidivierten CLL-Patienten führte zu einer Stabilisierung der progressiven Erkrankung.<sup>217</sup> Auch

Untersuchungen Anderer im E $\mu$ -TCL1 CLL-Mausmodell konnten einen Einfluss von BAFF bei der CLL belegen: Tiere, die zusätzlich transgen für BAFF waren, zeigten einen aggressiveren Krankheitsverlauf und kürzeres Überleben. Eine Neutralisation von BAFF führte bei den doppelt transgenen Tieren zu einer deutlichen Reduktion der Leukämiebelastung.<sup>167</sup> Eine BAFF-Neutralisation könnte des Weiteren einem kürzlich beschriebenen Mechanismus der Immunevasion von CLL-Zellen entgegenwirken: BAFF begünstigt über TACI-Signalling die Produktion des Immunsuppressors IL-10 in humanen und murinen CLL-Zellen.<sup>218</sup>

Das hier eingesetzte Versuchsmodell mit autologen NK-Zellen spiegelt am besten die Situation im Patienten wieder. Es bietet im Vergleich zum Mausmodell den Vorteil, dass es potentielle Artefakte, die aufgrund der Unterschiede in der Expression und/oder Funktion von BAFF oder anderen TNF-Familienmitgliedern, aber auch in der Expression/Funktion von Fc-Rezeptoren und den Mechanismen und Zelltypen, welche ADCC vermitteln, in Maus und Mensch ausschließt.<sup>219-223</sup>

Zusammengefasst liefern die Ergebnisse dieser Arbeit nicht nur erste Hinweise darauf, dass BAFF – auch das von NK-Zellen freigesetzte - eine Rolle bei der verminderten Suszeptibilität der CLL-Zellen gegenüber der direkten und Rituximab-induzierten NK-Reaktivität spielt. Sie legen des Weiteren nahe, dass die Kombination von Belimumab mit Rituximab - oder möglicherweise auch Obinutuzumab oder Ofatumumab - und/oder anderen systemischen Behandlungsmodalitäten wie konventionellen Chemotherapeutika oder den neuen Inhibitoren der Signaltransduktion Ibrutinib, Idelalisib oder Abt-199, sich positiv auf die CLL-Therapie auswirken könnte. Diese Annahme wird auch durch einen klinischen Fall unterstützt, bei welchem ein Patient mit Autoimmunerkrankung mit Belimumab für die anschließende Rituximab-Behandlung sensitiviert werden konnte.<sup>224</sup> Zukünftige, auf dieser Arbeit basierende klinische Studien, in welchen Belimumab und Rituximab oder andere konventionelle Systemtherapeutika miteinander kombiniert werden, sind nötig und befinden sich bereits in der Planung, um *in vivo* die Schlussfolgerung, dass Belimumab sowohl die NK-Zell-Reaktivität und Antikörper-induzierte ADCC, als auch die Suszeptibilität für Systemtherapeutika in der CLL verbessert, zu validieren.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Schmiedel BJ. Expression, Funktion und therapeutische Modulation von RANKL in der Immunüberwachung von malignen hämatopoetischen Neoplasien durch Natürliche Killerzellen. *Dissertation Universität Tübingen* 2011.
2. Baltz-Ghahremanpour KM. Rolle von Glucocorticoid-Induced TNFR Related (GITR) Protein bei der Interaktion von NK Zellen und Tumorzellen im Menschen. *Dissertation Universität Tübingen* 2008.
3. Baessler T. Rolle von Glucocorticoid-Induced TNFR Related Protein (GITR) Ligand und 4-1BB Ligand bei der Immunüberwachung von Tumoren durch NK-Zellen. *Dissertation Universität Tübingen* 2010.
4. Janeway CA, Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1989; 54 Pt 1:1-13.
5. Ezekowitz RA, Sastry K, Bailly P, Warner A. Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells. *J Exp Med* 1990; 172:1785-1794.
6. Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 1999; 17:593-623.
7. Underhill DM, Bassetti M, Rudensky A, Aderem A. Dynamic interactions of macrophages with T cells during antigen presentation. *J Exp Med* 1999; 190:1909-1914.
8. Davis MM, Bjorkman PJ. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 1988; 334:395-402.
9. Tonegawa S. Somatic generation of immune diversity. *Biosci Rep* 1988; 8:3-26.
10. Tonegawa S. Antibody and T-cell receptors. *JAMA* 1988; 259:1845-1847.
11. Zinkernagel RM, Doherty PC. Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. *Nature* 1974; 251:547-548.
12. Orourke AM, Mescher MF. Cytotoxic Lymphocyte-T Activation Involves A Cascade of Signaling and Adhesion Events. *Nature* 1992; 358:253-255.
13. Squier MKT, Cohen JJ. Cell-Mediated Cytotoxic Mechanisms. *Current Opinion in Immunology* 1994; 6:447-452.
14. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996; 383:787-793.
15. Matzinger P. An innate sense of danger. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 961:341-342.

16. Ehrlich P. Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneeskd* 1909; 5:273-290.
17. Stutman O. Tumor development after polyoma infection in athymic nude mice. *J Immunol* 1975; 114:1213-1217.
18. PREHN RT, MAIN JM. Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas. *J Natl Cancer Inst* 1957; 18:769-778.
19. Itoh K, Platsoucas CD, Tilden AB, Pollock RE, Balch CM. Lysis of fresh solid tumor targets in the presence of Con A is mediated primarily by Leu 7+ peripheral blood T lymphocytes: blocking by the anti-CD3 monoclonal antibody and comparison with recombinant interleukin 2-induced lysis by natural killer cells. *Cell Immunol* 1987; 108:283-296.
20. Nishimura MI, Avichezer D, Custer MC, Lee CS, Chen C, Parkhurst MR et al. MHC class I-restricted recognition of a melanoma antigen by a human CD4+ tumor infiltrating lymphocyte. *Cancer Res* 1999; 59:6230-6238.
21. Topalian SL, Solomon D, Rosenberg SA. Tumor-specific cytolysis by lymphocytes infiltrating human melanomas. *J Immunol* 1989; 142:3714-3725.
22. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:715-727.
23. Algarra I, Gaforio JJ, Cabrera T, Collado A, Garrido F. The biological consequences of altered MHC class I expression in tumours. *J Biol Regul Homeost Agents* 1999; 13:90-96.
24. de Baetselier P, Katzav S, Gorelik E, Feldman M, Segal S. Differential expression of H-2 gene products in tumour cells is associated with their metastatogenic properties. *Nature* 1980; 288:179-181.
25. Garrido F, Festenstein H, Schirmacher V. Further evidence for depression of H-2 and Ia-like specificities of foreign haplotypes in mouse tumour cell lines. *Nature* 1976; 261:705-707.
26. Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, Perez-Villar JJ, Lopez-Botet M, Duggan-Keen M et al. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today* 1997; 18:89-95.
27. Hui K, Grosveld F, Festenstein H. Rejection of transplantable AKR leukaemia cells following MHC DNA-mediated cell transformation. *Nature* 1984; 311:750-752.
28. Appleman LJ, Boussiotis VA. T cell anergy and costimulation. *Immunol Rev* 2003; 192:161-180.
29. Becker JC, Dummer R, Hartmann AA, Burg G, Schmidt RE. Shedding of ICAM-1 from human melanoma cell lines induced by IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha. Functional consequences on cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 1991; 147:4398-4401.

30. Chen JL, Hunt P, McElvain M, Black T, Kaufman S, Choi ES. Osteoblast precursor cells are found in CD34+ cells from human bone marrow. *Stem Cells* 1997; 15:368-377.
31. Dummer W, Bastian BC, Ernst N, Schanzle C, Schwaaf A, Brocker EB. Interleukin-10 production in malignant melanoma: preferential detection of IL-10-secreting tumor cells in metastatic lesions. *Int J Cancer* 1996; 66:607-610.
32. Evans DE, Weinberg AD. Boosting T cell costimulation in cancer: the possibilities seem endless. *Int Rev Immunol* 2003; 22:173-194.
33. Wojtowicz-Praga S. Reversal of tumor-induced immunosuppression: a new approach to cancer therapy. *J Immunother* 1997; 20:165-177.
34. Jeannin P, Magistrelli G, Aubry JP, Caron G, Gauchat JF, Renno T et al. Soluble CD86 is a costimulatory molecule for human T lymphocytes. *Immunity* 2000; 13:303-312.
35. Salih HR, Nussler V. Commentary: Immune escape versus tumor tolerance: how do tumors evade immune surveillance? *Eur J Med Res* 2001; 6:323-332.
36. Schneider P, Holler N, Bodmer JL, Hahne M, Frei K, Fontana A et al. Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J Exp Med* 1998; 187:1205-1213.
37. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:745-756.
38. Shin DS, Ribas A. The evolution of checkpoint blockade as a cancer therapy: what's here, what's next? *Current Opinion in Immunology* 2015; 33:23-35.
39. Callahan MK, Postow MA, Wolchok JD. Immunomodulatory therapy for melanoma: Ipilimumab and beyond. *Clinics in Dermatology* 2013; 31:191-199.
40. Hamid O, Robert C, Daud A, Hodi FS, Hwu WJ, Kefford R et al. Safety and Tumor Responses with LAMBROLIZUMAB (Anti-PD-1) in Melanoma. *New England Journal of Medicine* 2013; 369:134-144.
41. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB et al. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *New England Journal of Medicine* 2010; 363:711-723.
42. Woo SR, Turnis ME, Goldberg MV, Bankoti J, Selby M, Nirschl CJ et al. Immune Inhibitory Molecules LAG-3 and PD-1 Synergistically Regulate T-cell Function to Promote Tumoral Immune Escape. *Cancer Research* 2012; 72:917-927.
43. Herberman RB, Djeu JY, Ortaldo JR, Holden HT, West WH, Bonnard GD. Role of interferon in augmentation of natural and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Cancer Treat Rep* 1978; 62:1893-1896.
44. Kiessling R, Klein E, Pross H, Wigzell H. "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol* 1975; 5:117-121.

45. Kiessling R, Klein E, Wigzell H. "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol* 1975; 5:112-117.
46. Yoon SR, Chung JW, Choi I. Development of natural killer cells from hematopoietic stem cells. *Mol Cells* 2007; 24:1-8.
47. Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 2005; 23:225-274.
48. Moretta L, Bottino C, Pende D, Mingari MC, Biassoni R, Moretta A. Human natural killer cells: their origin, receptors and function. *Eur J Immunol* 2002; 32:1205-1211.
49. Moretta L, Biassoni R, Bottino C, Cantoni C, Pende D, Mingari MC et al. Human NK cells and their receptors. *Microbes Infect* 2002; 4:1539-1544.
50. Farag SS, Caligiuri MA. Human natural killer cell development and biology. *Blood Rev* 2006; 20:123-137.
51. Ljunggren HG, Malmberg KJ. Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nat Rev Immunol* 2007; 7:329-339.
52. Moretta L, Moretta A. Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors. *EMBO J* 2004; 23:255-259.
53. Yokoyama WM, Seaman WE. The Ly-49 and NKR-P1 gene families encoding lectin-like receptors on natural killer cells: the NK gene complex. *Annu Rev Immunol* 1993; 11:613-635.
54. Moretta L, Bottino C, Cantoni C, Mingari MC, Moretta A. Human natural killer cell function and receptors. *Curr Opin Pharmacol* 2001; 1:387-391.
55. Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:836-848.
56. Hayakawa Y, Smyth MJ. Innate immune recognition and suppression of tumors. *Adv Cancer Res* 2006; 95:293-322.
57. Fehniger TA, Cooper MA, Caligiuri MA. Interleukin-2 and interleukin-15: immunotherapy for cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13:169-183.
58. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002; 295:2097-2100.
59. Trowsdale J, Barten R, Haude A, Stewart CA, Beck S, Wilson MJ. The genomic context of natural killer receptor extended gene families. *Immunol Rev* 2001; 181:20-38.
60. Lanier LL. NK cell receptors. *Annu Rev Immunol* 1998; 16:359-393.
61. Long EO, Burshtyn DN, Clark WP, Peruzzi M, Rajagopalan S, Rojo S et al. Killer cell inhibitory receptors: diversity, specificity, and function. *Immunol Rev* 1997; 155:135-144.

62. Moretta L, Mingari MC, Pende D, Bottino C, Biassoni R, Moretta A. The molecular basis of natural killer (NK) cell recognition and function. *J Clin Immunol* 1996; 16:243-253.
63. Boyington JC, Motyka SA, Schuck P, Brooks AG, Sun PD. Crystal structure of an NK cell immunoglobulin-like receptor in complex with its class I MHC ligand. *Nature* 2000; 405:537-543.
64. Fan QR, Long EO, Wiley DC. Crystal structure of the human natural killer cell inhibitory receptor KIR2DL1-HLA-Cw4 complex. *Nat Immunol* 2001; 2:452-460.
65. Natarajan K, Dimasi N, Wang J, Mariuzza RA, Margulies DH. Structure and function of natural killer cell receptors: multiple molecular solutions to self, nonself discrimination. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:853-885.
66. Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, Soderstrom K, D'Andrea A, Ogg GS et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 1998; 391:795-799.
67. Lanier LL. Natural killer cell receptor signaling. *Curr Opin Immunol* 2003; 15:308-314.
68. Long EO. Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annu Rev Immunol* 1999; 17:875-904.
69. Pende D, Parolini S, Pessino A, Sivori S, Augugliaro R, Morelli L et al. Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J Exp Med* 1999; 190:1505-1516.
70. Pessino A, Sivori S, Bottino C, Malaspina A, Morelli L, Moretta L et al. Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. *J Exp Med* 1998; 188:953-960.
71. Vitale M, Bottino C, Sivori S, Sanseverino L, Castriconi R, Marcenaro E et al. NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *J Exp Med* 1998; 187:2065-2072.
72. Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari MC et al. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 2001; 19:197-223.
73. Biassoni R, Cantoni C, Pende D, Sivori S, Parolini S, Vitale M et al. Human natural killer cell receptors and co-receptors. *Immunol Rev* 2001; 181:203-214.
74. Mason LH, Anderson SK, Yokoyama WM, Smith HR, Winkler-Pickett R, Ortaldo JR. The Ly-49D receptor activates murine natural killer cells. *J Exp Med* 1996; 184:2119-2128.
75. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 1999; 285:727-729.

76. Lanier LL. A renaissance for the tumor immunosurveillance hypothesis. *Nature Medicine* 2001; 7:1178-1180.
77. Raulet DH. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:781-790.
78. Cosman D, Mullberg J, Sutherland CL, Chin W, Armitage R, Fanslow W et al. ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* 2001; 14:123-133.
79. Groh V, Bahram S, Bauer S, Herman A, Beauchamp M, Spies T. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:12445-12450.
80. Groh V, Steinle A, Bauer S, Spies T. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science* 1998; 279:1737-1740.
81. Groh V, Rhinehart R, Randolph-Habecker J, Topp MS, Riddell SR, Spies T. Costimulation of CD8alpha beta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol* 2001; 2:255-260.
82. Salih HR, Antropius H, Gieseke F, Lutz SZ, Kanz L, Rammensee HG et al. Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. *Blood* 2003; 102:1389-1396.
83. Steinle A, Li P, Morris DL, Groh V, Lanier LL, Strong RK et al. Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. *Immunogenetics* 2001; 53:279-287.
84. Gasser T, Sandalcioglu IE, El Hamalawi B, van de Nes JA, Stolke D, Wiedemayer H. Surgical treatment of intramedullary spinal cord metastases of systemic cancer: functional outcome and prognosis. *J Neurooncol* 2005; 73:163-168.
85. Cerwenka A, Lanier LL. Ligands for natural killer cell receptors: redundancy or specificity. *Immunol Rev* 2001; 181:158-169.
86. Diefenbach A, Jensen ER, Jamieson AM, Raulet DH. Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature* 2001; 413:165-171.
87. Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, Westwood JA, Street SE, Yagita H et al. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol* 2005; 42:501-510.
88. Guerra N, Tan YX, Joncker NT, Choy A, Gallardo F, Xiong N et al. NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy. *Immunity* 2008; 28:571-580.
89. Lanier LL. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol* 2008; 9:495-502.
90. Bryceson YT, March ME, Ljunggren HG, Long EO. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood* 2006; 107:159-166.

91. Mimura Y, Ghirlando R, Sondermann P, Lund J, Jefferis R. The molecular specificity of IgG-Fc interactions with Fc gamma receptors. *Adv Exp Med Biol* 2001; 495:49-53.
92. Adams GP, Weiner LM. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol* 2005; 23:1147-1157.
93. Keating GM. Rituximab: a review of its use in chronic lymphocytic leukaemia, low-grade or follicular lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma. *Drugs* 2010; 70:1445-1476.
94. Shields RL, Namenuk AK, Hong K, Meng YG, Rae J, Briggs J et al. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *J Biol Chem* 2001; 276:6591-6604.
95. Shields RL, Lai J, Keck R, O'Connell LY, Hong K, Meng YG et al. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fc gamma RIII and antibody-dependent cellular toxicity. *J Biol Chem* 2002; 277:26733-26740.
96. Cartron G, Watier H, Golay J, Solal-Celigny P. From the bench to the bedside: ways to improve rituximab efficacy. *Blood* 2004; 104:2635-2642.
97. Herter S, Herting F, Mundigl O, Waldhauer I, Weinzierl T, Fauti T et al. Preclinical Activity of the Type II CD20 Antibody GA101 (Obinutuzumab) Compared with Rituximab and Ofatumumab In Vitro and in Xenograft Models. *Molecular Cancer Therapeutics* 2013; 12:2031-2042.
98. Mossner E, Brunker P, Moser S, Puntener U, Schmidt C, Herter S et al. 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* 2010; 115:4393-4402.
99. Patz M, Isaeva P, Forcob N, Muller B, Frenzel LP, Wendtner CM et al. Comparison of the in vitro effects of the anti-CD20 antibodies rituximab and GA101 on chronic lymphocytic leukaemia cells. *British Journal of Haematology* 2011; 152:295-306.
100. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001; 104:487-501.
101. Ware CF. The TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003; 14:181-184.
102. Hernandez MG, Shen L, Rock KL. CD40-CD40 ligand interaction between dendritic cells and CD8+ T cells is needed to stimulate maximal T cell responses in the absence of CD4+ T cell help. *J Immunol* 2007; 178:2844-2852.
103. Smith CA, Farrah T, Goodwin RG. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 1994; 76:959-962.
104. Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, Matsuzawa A, Kasugai T, Kitamura Y et al. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* 1993; 364:806-809.
105. Itoh Y, Kohgo Y, Watanabe N, Kanisawa Y, Sakamaki S, Takahashi M et al. Human tumor-infiltrating lymphocytes transfected with tumor necrosis factor gene could

- augment cytotoxicity to autologous tumor cells. *Jpn J Cancer Res* 1991; 82:1203-1206.
106. Wajant H, Grell M, Scheurich P. TNF receptor associated factors in cytokine signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 1999; 10:15-26.
  107. Israel A. The IKK complex: an integrator of all signals that activate NF-kappaB? *Trends Cell Biol* 2000; 10:129-133.
  108. Viatour P, Merville MP, Bours V, Chariot A. Phosphorylation of NF-kappaB and IkappaB proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends Biochem Sci* 2005; 30:43-52.
  109. Karin M, Ben Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* 2000; 18:621-663.
  110. Reuther JY, Reuther GW, Cortez D, Pendergast AM, Baldwin AS, Jr. A requirement for NF-kappaB activation in Bcr-Abl-mediated transformation. *Genes Dev* 1998; 12:968-981.
  111. Malinin NL, Boldin MP, Kovalenko AV, Wallach D. MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature* 1997; 385:540-544.
  112. Senftleben U, Cao Y, Xiao G, Greten FR, Krahn G, Bonizzi G et al. Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* 2001; 293:1495-1499.
  113. Ling W, Rayman P, Uzzo R, Clark P, Kim HJ, Tubbs R et al. Impaired activation of NFkappaB in T cells from a subset of renal cell carcinoma patients is mediated by inhibition of phosphorylation and degradation of the inhibitor, IkappaBalpha. *Blood* 1998; 92:1334-1341.
  114. Song HY, Regnier CH, Kirschning CJ, Goeddel DV, Rothe M. Tumor necrosis factor (TNF)-mediated kinase cascades: bifurcation of nuclear factor-kappaB and c-jun N-terminal kinase (JNK/SAPK) pathways at TNF receptor-associated factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:9792-9796.
  115. Pipari AW, Jr., Boguski MS, Dixit VM. The A20 cDNA induced by tumor necrosis factor alpha encodes a novel type of zinc finger protein. *J Biol Chem* 1990; 265:14705-14708.
  116. Pype S, Declercq W, Ibrahim A, Michiels C, Van Rietschoten JG, Dewulf N et al. TTRAP, a novel protein that associates with CD40, tumor necrosis factor (TNF) receptor-75 and TNF receptor-associated factors (TRAFs), and that inhibits nuclear factor-kappa B activation. *J Biol Chem* 2000; 275:18586-18593.
  117. Rodrigues-Lima F, Josephs M, Katan M, Cassinat B. Sequence analysis identifies TTRAP, a protein that associates with CD40 and TNF receptor-associated factors, as a member of a superfamily of divalent cation-dependent phosphodiesterases. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 285:1274-1279.
  118. Zetoune FS, Murthy AR, Shao Z, Hlaing T, Zeidler MG, Li Y et al. A20 inhibits NF-kappa B activation downstream of multiple Map3 kinases and interacts with the I kappa B signalosome. *Cytokine* 2001; 15:282-298.

119. Hess S, Gottfried E, Smola H, Grunwald U, Schuchmann M, Engelmann H. CD40 induces resistance to TNF-mediated apoptosis in a fibroblast cell line. *Eur J Immunol* 1998; 28:3594-3604.
120. Chung JY, Park YC, Ye H, Wu H. All TRAFs are not created equal: common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction. *J Cell Sci* 2002; 115:679-688.
121. Kashiwada M, Shirakata Y, Inoue JI, Nakano H, Okazaki K, Okumura K et al. Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) stimulates extracellular signal-regulated kinase (ERK) activity in CD40 signaling along a ras-independent pathway. *J Exp Med* 1998; 187:237-244.
122. Eck MJ, Sprang SR. The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 A resolution. Implications for receptor binding. *J Biol Chem* 1989; 264:17595-17605.
123. Karpusas M, Hsu YM, Wang JH, Thompson J, Lederman S, Chess L et al. 2 A crystal structure of an extracellular fragment of human CD40 ligand. *Structure* 1995; 3:1426.
124. Cha SS, Kim MS, Choi YH, Sung BJ, Shin NK, Shin HC et al. 2.8 A resolution crystal structure of human TRAIL, a cytokine with selective antitumor activity. *Immunity* 1999; 11:253-261.
125. Zheng Y, Saftig P, Hartmann D, Blobel C. Evaluation of the contribution of different ADAMs to tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) shedding and of the function of the TNFalpha ectodomain in ensuring selective stimulated shedding by the TNFalpha convertase (TACE/ADAM17). *J Biol Chem* 2004; 279:42898-42906.
126. Eissner G, Kolch W, Scheurich P. Ligands working as receptors: reverse signaling by members of the TNF superfamily enhance the plasticity of the immune system. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004; 15:353-366.
127. Grewal IS, Xu J, Flavell RA. Impairment of antigen-specific T-cell priming in mice lacking CD40 ligand. *Nature* 1995; 378:617-620.
128. van Essen D, Kikutani H, Gray D. CD40 ligand-transduced co-stimulation of T cells in the development of helper function. *Nature* 1995; 378:620-623.
129. Blotta MH, Marshall JD, DeKruyff RH, Umetsu DT. Cross-linking of the CD40 ligand on human CD4+ T lymphocytes generates a costimulatory signal that up-regulates IL-4 synthesis. *J Immunol* 1996; 156:3133-3140.
130. Macaulay AE, DeKruyff RH, Goodnow CC, Umetsu DT. Antigen-specific B cells preferentially induce CD4+ T cells to produce IL-4. *J Immunol* 1997; 158:4171-4179.
131. Blair PJ, Riley JL, Harlan DM, Abe R, Tadaki DK, Hoffmann SC et al. CD40 ligand (CD154) triggers a short-term CD4(+) T cell activation response that results in secretion of immunomodulatory cytokines and apoptosis. *J Exp Med* 2000; 191:651-660.
132. Ohshima Y, Tanaka Y, Tozawa H, Takahashi Y, Maliszewski C, Delespesse G. Expression and function of OX40 ligand on human dendritic cells. *J Immunol* 1997; 159:3838-3848.

133. Suzuki I, Fink PJ. The dual functions of fas ligand in the regulation of peripheral CD8+ and CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:1707-1712.
134. Wiley SR, Goodwin RG, Smith CA. Reverse signaling via CD30 ligand. *J Immunol* 1996; 157:3635-3639.
135. Saraiva M, Smith P, Fallon PG, Alcami A. Inhibition of type 1 cytokine-mediated inflammation by a soluble CD30 homologue encoded by ectromelia (mousepox) virus. *J Exp Med* 2002; 196:829-839.
136. Brenner B, Koppenhoefer U, Lepple-Wienhues A, Grassme H, Muller C, Speer CP et al. The CD40 ligand directly activates T-lymphocytes via tyrosine phosphorylation dependent PKC activation. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 239:11-17.
137. Schneider P, Mackay F, Steiner V, Hofmann K, Bodmer JL, Holler N et al. BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. *Journal of Experimental Medicine* 1999; 189:1747-1756.
138. Liu YF, Hong X, Kappler J, Jiang L, Zhang RG, Xu LG et al. Ligand-receptor binding revealed by the TNF family member TALL-1. *Nature* 2003; 423:49-56.
139. Mackay F, Schneider P. Cracking the BAFF code. *Nature Reviews Immunology* 2009; 9:491-502.
140. Vincent FB, Saulep-Easton D, Figgitt WA, Fairfax KA, Mackay F. The BAFF/APRIL system: Emerging functions beyond B cell biology and autoimmunity. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2013; 24:203-215.
141. He B, Santamaria R, Xu WF, Cols M, Chen K, Puga I et al. The transmembrane activator TACI triggers immunoglobulin class switching by activating B cells through the adaptor MyD88. *Nature Immunology* 2010; 11:836-U94.
142. Mackay F, Leung H. The role of the BAFF/APRIL system on T cell function. *Semin Immunol* 2006; 18:284-289.
143. Bossen C, Ingold K, Tardivel A, Bodmer JL, Gaide O, Hertig S et al. Interactions of tumor necrosis factor (TNF) and TNF receptor family members in the mouse and human. *J Biol Chem* 2006; 281:13964-13971.
144. Lied GA, Berstad A. Functional and clinical aspects of the B-cell-activating factor (BAFF): a narrative review. *Scand J Immunol* 2011; 73:1-7.
145. Bossen C, Schneider P. BAFF, APRIL and their receptors: Structure, function and signaling. *Seminars in Immunology* 2006; 18:263-275.
146. Avery DT, Kalled SL, Ellyard JI, Ambrose C, Bixler SA, Thien M et al. BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells. *Journal of Clinical Investigation* 2003; 112:286-297.
147. Dillon SR, Gross JA, Ansell SM, Novak AJ. An APRIL to remember: novel TNF ligands as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5:235-246.
148. Kimberley FC, Hahne M, Medema JP. "APRIL hath put a spring of youth in everything": Relevance of APRIL for survival. *J Cell Physiol* 2009; 218:1-8.

149. Lopez-Fraga M, Fernandez R, Albar JP, Hahne M. Biologically active APRIL is secreted following intracellular processing in the Golgi apparatus by furin convertase. *Embo Reports* 2001; 2:945-951.
150. Zhang J, Roschke V, Baker KP, Wang Z, Alarcon GS, Fessler BJ et al. Cutting edge: A role for B lymphocyte stimulator in systemic lupus erythematosus. *Journal of Immunology* 2001; 166:6-10.
151. Groom J, Kalled SL, Cutler AH, Olson C, Woodcock SA, Schneider P et al. Association of BAFF/BLyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjogren's syndrome. *Journal of Clinical Investigation* 2002; 109:59-68.
152. Cheema GS, Roschke V, Hilbert DA, Stohl W. Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. *Arthritis and Rheumatism* 2001; 44:1313-1319.
153. Baker KP, Edwards BM, Main SH, Choi GH, Wager RE, Halpern WG et al. Generation and characterization of LymphoStat-B, a human monoclonal antibody that antagonizes the bioactivities of B lymphocyte stimulator. *Arthritis Rheum* 2003; 48:3253-3265.
154. Espinosa C, Cervera R. Belimumab, A Blys-Specific Inhibitor for the Treatment of Systemic Lupus Erythematosus. *Drugs of Today* 2010; 46:891-899.
155. He B, Chadburn A, Jou E, Schattner EJ, Knowles DM, Cerutti A. Lymphoma B cells evade apoptosis through the TNF family members BAFF/BLyS and APRIL (vol 172, pg 3298, 2004). *Journal of Immunology* 2004; 172:5128.
156. Maia S, Pelletier M, Ding JX, Hsu YM, Sallan SE, Rao SP et al. Aberrant Expression of Functional BAFF-System Receptors by Malignant B-Cell Precursors Impacts Leukemia Cell Survival. *Plos One* 2011; 6.
157. Novak AJ, Bram RJ, Kay NE, Jelinek DF. Aberrant expression of B-lymphocyte stimulator by B chronic lymphocytic leukemia cells: a mechanism for survival. *Blood* 2002; 100:2973-2979.
158. Novak AJ, Grote DM, Stenson M, Ziesmer SC, Witzig TE, Habermann TM et al. Expression of BLyS and its receptors in B-cell non-Hodgkin lymphoma: correlation with disease activity and patient outcome. *Blood* 2004; 104:2247-2253.
159. Novak AJ, Darce JR, Arendt BK, Harder B, Henderson K, Kindsvogel W et al. Expression of BCMA, TACI, and BAFF-R in multiple myeloma: a mechanism for growth and survival. *Blood* 2004; 103:689-694.
160. Parameswaran R, Muschen M, Kim YM, Groffen J, Heisterkamp N. A Functional Receptor for B-Cell-Activating Factor Is Expressed on Human Acute Lymphoblastic Leukemias. *Cancer Research* 2010; 70:4346-4356.
161. Cols M, Barra CM, He B, Puga I, Xu WF, Chiu A et al. Stromal Endothelial Cells Establish a Bidirectional Crosstalk with Chronic Lymphocytic Leukemia Cells through the TNF-Related Factors BAFF, APRIL, and CD40L. *Journal of Immunology* 2012; 188:6071-6083.

162. Nishio M, Endo T, Tsukada N, Ohata J, Kitada S, Reed JC et al. Nurselike cells express BAFF and APRIL, which can promote survival of chronic lymphocytic leukemia cells via a paracrine pathway distinct from that of SDF-1alpha. *Blood* 2005; 106:1012-1020.
163. Kern C, Cornuel JF, Billard C, Tang R, Rouillard D, Stenou V et al. Involvement of BAFF and APRIL in the resistance to apoptosis of B-CLL through an autocrine pathway. *Blood* 2004; 103:679-688.
164. Burger JA, Gribben JG. The microenvironment in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and other B cell malignancies: Insight into disease biology and new targeted therapies. *Seminars in Cancer Biology* 2014; 24:71-81.
165. Moreaux J, Legouffe E, Jourdan E, Quittet P, Reme T, Lugagne C et al. BAFF and APRIL protect myeloma cells from apoptosis induced by interleukin 6 deprivation and dexamethasone. *Blood* 2004; 103:3148-3157.
166. Endo T, Nishio M,ENZLER T, Cottam HB, Fukuda T, James DF et al. BAFF and APRIL support chronic lymphocytic leukemia B-cell survival through activation of the canonical NF-kappaB pathway. *Blood* 2007; 109:703-710.
- 167.ENZLER T, Kater AP, Zhang W, Widhopf GF, Chuang HY, Lee J et al. Chronic lymphocytic leukemia of E mu-TCL1 transgenic mice undergoes rapid cell turnover that can be offset by extrinsic CD257 to accelerate disease progression. *Blood* 2009; 114:4469-4476.
168. Rozman C, Montserrat E. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 1995; 333:1052-1057.
169. Bannerji R, Byrd JC. Update on the biology of chronic lymphocytic leukemia. *Curr Opin Oncol* 2000; 12:22-29.
170. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005; 352:804-815.
171. Schmoll HJ, Höffken K, Possinger K. Kompendium Internistische Onkologie. *Springer Medizin Verlag, Heidelberg* 2006.
172. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, Fink AM, Busch R, Mayer J et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 2010; 376:1164-1174.
173. Weiner GJ. Rituximab: mechanism of action. *Semin Hematol* 2010; 47:115-123.
174. Bologna L, Gotti E, Da Roit F, Intermesoli T, Rambaldi A, Intronà M et al. Ofatumumab Is More Efficient than Rituximab in Lysing B Chronic Lymphocytic Leukemia Cells in Whole Blood and in Combination with Chemotherapy. *Journal of Immunology* 2013; 190:231-239.
175. Castillo J, Milani C, Mendez-Allwood D. Ofatumumab, a second-generation anti-CD20 monoclonal antibody, for the treatment of lymphoproliferative and autoimmune disorders. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 2009; 18:491-500.

176. Cheson BD. Ofatumumab, a Novel Anti-CD20 Monoclonal Antibody for the Treatment of B-Cell Malignancies. *Journal of Clinical Oncology* 2010; 28:3525-3530.
177. Alduaij W, Ivanov A, Honeychurch J, Cheadle E, Potluri S, Lim SH et al. Novel type II anti-CD20 monoclonal antibody (GA101) evokes homotypic adhesion and actin-dependent, lysosome-mediated cell death in B-cell malignancies. *Blood* 2011.
178. Goede V, Fischer K, Busch R, Engelke A, Eichhorst B, Wendtner CM et al. Obinutuzumab plus Chlorambucil in Patients with CLL and Coexisting Conditions. *New England Journal of Medicine* 2014; 370:1101-1110.
179. Goede V, Fischer K, Engelke A, Schlag R, Lepretre S, Montero LFC et al. Obinutuzumab as frontline treatment of chronic lymphocytic leukemia: updated results of the CLL11 study. *Leukemia* 2015; 29:1602-1604.
180. Czuczman MS, Olejniczak S, Gowda A, Kotowski A, Binder A, Kaur H et al. Acquisition of rituximab resistance in lymphoma cell lines is associated with both global CD20 gene and protein down-regulation regulated at the pretranscriptional and posttranscriptional levels. *Clin Cancer Res* 2008; 14:1561-1570.
181. Tausch E, Mertens D, Stilgenbauer S. Advances in treating chronic lymphocytic leukemia. *F1000Prime Rep* 2014; 6:65.
182. Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, Flinn IW, Burger JA, Blum KA et al. Targeting BTK with Ibrutinib in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine* 2013; 369:32-42.
183. Hoellenriegel J, Meadows SA, Sivina M, Wierda WG, Kantarjian H, Keating MJ et al. The phosphoinositide 3'-kinase delta inhibitor, CAL-101, inhibits B-cell receptor signaling and chemokine networks in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011; 118:3603-3612.
184. Khaw SL, Merino D, Anderson MA, Glaser SP, Bouillet P, Roberts AW et al. Both leukaemic and normal peripheral B lymphoid cells are highly sensitive to the selective pharmacological inhibition of prosurvival Bcl-2 with ABT-199. *Leukemia* 2014; 28:1207-1215.
185. Souers AJ, Levenson JD, Boghaert ER, Ackler SL, Catron ND, Chen J et al. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nature Medicine* 2013; 19:202-208.
186. Furman RR, Sharman JP, Coutre SE, Cheson BD, Pagel JM, Hillmen P et al. Idelalisib and Rituximab in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine* 2014; 370:997-1007.
187. Seymour JF, Davids MS, Pagel JM, Kahl BS, Wierda WG, Miller TP et al. Bcl-2 Inhibitor ABT-199 (GDC-0199) Monotherapy Shows Anti-Tumor Activity Including Complete Remissions In High-Risk Relapsed/Refractory (R/R) Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) and Small Lymphocytic Lymphoma (SLL). *Blood* 2013; 122.
188. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 2008; 9:503-510.

189. Lowdell MW, Craston R, Samuel D, Wood ME, O'Neill E, Saha V et al. Evidence that continued remission in patients treated for acute leukaemia is dependent upon autologous natural killer cells. *Br J Haematol* 2002; 117:821-827.
190. Tajima F, Kawatani T, Endo A, Kawasaki H. Natural killer cell activity and cytokine production as prognostic factors in adult acute leukemia. *Leukemia* 1996; 10:478-482.
191. Pierson BA, Miller JS. CD56+bright and CD56+dim natural killer cells in patients with chronic myelogenous leukemia progressively decrease in number, respond less to stimuli that recruit clonogenic natural killer cells, and exhibit decreased proliferation on a per cell basis. *Blood* 1996; 88:2279-2287.
192. Beck A, Wurch T, Bailly C, Corvaia N. Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. *Nat Rev Immunol* 2010; 10:345-352.
193. Jewell AP, Worman CP, Giles FJ, Goldstone AH, Lydyard PM. Resistance of Chronic Lymphocytic-Leukemia Cells to Interferon-Alpha Generated Lymphokine Activated Killer-Cells. *Leukemia & Lymphoma* 1992; 7:473-480.
194. Katrinakis G, Kyriakou D, Papadaki H, Kalokyri I, Markidou F, Eliopoulos GD. Defective natural killer cell activity in B-cell chronic lymphocytic leukaemia is associated with impaired release of natural killer cytotoxic factor(s) but not of tumour necrosis factor-alpha. *Acta Haematologica* 1996; 96:16-23.
195. Kay NE, Zarling JM. Impaired natural killer activity in patients with chronic lymphocytic leukemia is associated with a deficiency of azurophilic cytoplasmic granules in putative NK cells. *Blood* 1984; 63:305-309.
196. Kay NE, Zarling J. Restoration of Impaired Natural-Killer Cell-Activity of B-Chronic Lymphocytic-Leukemia Patients by Recombinant Interleukin-2. *American Journal of Hematology* 1987; 24:161-167.
197. Maki G, Hayes GM, Naji A, Tyler T, Carosella ED, Rouas-Freiss N et al. NK resistance of tumor cells from multiple myeloma and chronic lymphocytic leukemia patients: implication of HLA-G. *Leukemia* 2008; 22:998-1006.
198. Pende D, Spaggiari GM, Marcenaro S, Martini S, Rivera P, Capobianco A et al. Analysis of the receptor-ligand interactions in the natural killer-mediated lysis of freshly isolated myeloid or lymphoblastic leukemias: Evidence for the involvement of the Poliovirus receptor (CD155) and Nectin-2 (CD112). *Blood* 2005; 105:2066-2073.
199. Platsoucas CD, Fernandes G, Gupta SL, Kempin S, Clarkson B, Good RA et al. Defective spontaneous and antibody-dependent cytotoxicity mediated by E-rosette-positive and E-rosette-negative cells in untreated patients with chronic lymphocytic leukemia: augmentation by in vitro treatment with interferon. *J Immunol* 1980; 125:1216-1223.
200. Spitz DL, Zuckerfranklin D, Nabi ZF. Unmasking of Cryptic Natural-Killer (Nk) Cell Recognition Sites on Chronic Lymphocytic-Leukemia Lymphocytes. *American Journal of Hematology* 1988; 28:155-161.
201. Veuillen C, Aurrant-Schleinitz T, Castellano R, Rey J, Mallet F, Orlanducci F et al. Primary B-CLL Resistance to NK Cell Cytotoxicity can be Overcome In Vitro and In

- Vivo by Priming NK Cells and Monoclonal Antibody Therapy. *Journal of Clinical Immunology* 2012; 32:632-646.
202. Ziegler HW, Kay NE, Zarling JM. Deficiency of natural killer cell activity in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Int J Cancer* 1981; 27:321-327.
203. Jaglowski SM, Alinari L, Lapalombella R, Muthusamy N, Byrd JC. The clinical application of monoclonal antibodies in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2010; 116:3705-3714.
204. Suzuki K, Setoyama Y, Yoshimoto K, Tsuzaka K, Abe T, Takeuchi T. Effect of interleukin-2 on synthesis of B cell activating factor belonging to the tumor necrosis factor family (BAFF) in human peripheral blood mononuclear cells. *Cytokine* 2008; 44:44-48.
205. Scapini P, Nardelli B, Nadali G, Calzetti F, Pizzolo G, Montecucco C et al. G-CSF-stimulated neutrophils are a prominent source of functional BlyS. *Journal of Experimental Medicine* 2003; 197:297-302.
206. Hersh MR, Kuhn JG, Phillips JL, Clark G, Ludden TM, Vonhoff DD. Pharmacokinetic Study of Fludarabine Phosphate (Nsc-312887). *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 1986; 17:277-280.
207. Xie HJ, Griskevicius L, Stahle L, Hassan Z, Yasar U, Rane A et al. Pharmacogenetics of cyclophosphamide in patients with hematological malignancies. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2006; 27:54-61.
208. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 2004; 21:137-148.
209. Terme M, Ullrich E, Delahaye NF, Chaput N, Zitvogel L. Natural killer cell-directed therapies: moving from unexpected results to successful strategies. *Nat Immunol* 2008; 9:486-494.
210. Hilpert J, Grosse-Hovest L, Grunebach F, Buechele C, Nuebling T, Raum T et al. Comprehensive analysis of NKG2D ligand expression and release in leukemia: implications for NKG2D-mediated NK cell responses. *J Immunol* 2012; 189:1360-1371.
211. Reiners KS, Topolar D, Henke A, Simhadri VR, Kessler J, Sauer M et al. Soluble ligands for NK cell receptors promote evasion of chronic lymphocytic leukemia cells from NK cell anti-tumor activity. *Blood* 2013; 121:3658-3665.
212. Buechele C, Baessler T, Wirths S, Schmohl JU, Schmiedel BJ, Salih HR. Glucocorticoid-induced TNFR-related protein (GITR) ligand modulates cytokine release and NK cell reactivity in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Leukemia* 2011.
213. Buechele C, Baessler T, Schmiedel BJ, Schumacher CE, Grosse-Hovest L, Rittig K et al. 4-1BB ligand modulates direct and Rituximab-induced NK-cell reactivity in chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Immunol* 2012; 42:737-748.
214. Schmiedel BJ, Nuebling T, Steinbacher J, Malinowska A, Wende CM, Azuma M et al. Receptor Activator for NF-kappaB Ligand in Acute Myeloid Leukemia: Expression,

- Function, and Modulation of NK Cell Immunosurveillance. *J Immunol* 2013; 190:821-831.
215. Schmiedel BJ, Scheible CA, Nuebling T, Kopp HG, Wirths S, Azuma M et al. RANKL Expression, Function, and Therapeutic Targeting in Multiple Myeloma and Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Res* 2013; 73:683-694.
216. Kamal A. The efficacy of novel B cell biologics as the future of SLE treatment: A review. *Autoimmun Rev* 2014.
217. Kofler DM, Gawlik BB, Elter T, Gianella-Borradori A, Wendtner CM, Hallek M. Phase 1b trial of atacept, a recombinant protein binding BLyS and APRIL, in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2012; 26:841-844.
218. Saulep-Easton D, Vincent FB, Quah PS, Wei A, Ting SB, Croce CM et al. The BAFF receptor TACI controls IL-10 production by regulatory B cells and CLL B cells. *Leukemia* 2015.
219. Levings MK, Sangregorio R, Sartirana C, Moschin AL, Battaglia M, Orban PC et al. Human CD25+CD4+ T suppressor cell clones produce transforming growth factor beta, but not interleukin 10, and are distinct from type 1 T regulatory cells. *J Exp Med* 2002; 196:1335-1346.
220. Tuyraerts S, Van Meirvenne S, Bonehill A, Heirman C, Corthals J, Waldmann H et al. Expression of human GITRL on myeloid dendritic cells enhances their immunostimulatory function but does not abrogate the suppressive effect of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Leukoc Biol* 2007; 82:93-105.
221. Liu B, Li Z, Mahesh SP, Pantanelli S, Hwang FS, Siu WO et al. GITR negatively regulates activation of primary human NK cells by blocking proliferative signals and increasing NK cell apoptosis. *J Biol Chem* 2008.
222. Baessler T, Krusch M, Schmiedel BJ, Kloss M, Baltz KM, Wacker A et al. Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-related protein ligand subverts immunosurveillance of acute myeloid leukemia in humans. *Cancer Res* 2009; 69:1037-1045.
223. Baessler T, Charton JE, Schmiedel BJ, Grunebach F, Krusch M, Wacker A et al. CD137 ligand mediates opposite effects in human and mouse NK cells and impairs NK-cell reactivity against human acute myeloid leukemia cells. *Blood* 2010; 115:3058-3069.
224. De Vita S, Quartuccio L, Salvin S, Picco L, Scott CA, Rupolo M et al. Sequential therapy with belimumab followed by rituximab in Sjogren's syndrome associated with B-cell lymphoproliferation and overexpression of BAFF: evidence for long-term efficacy. *Clin Exp Rheumatol* 2014; 32:490-494.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

ADCC	<i>antibody dependent cellular cytotoxicity</i>
APC	Antigen-präsentierende Zelle ( <i>antigen presenting cell</i> )
APRIL	<i>a proliferation inducing ligand</i>
BAFF	<i>B cell activating factor</i>
BAFFR	<i>BAFF receptor</i>
BCMA	<i>B cell maturation antigen</i>
BSA	Bovines Serumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CD95L	CD95 Ligand
CDC	<i>complement dependent cytotoxicity</i>
CLL	Chronisch Lymphatische Leukämie
cpm	counts per minute
CRD	Cystein-reiche Domäne ( <i>cysteine-rich domain</i> )
CTLA-4	<i>Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4</i>
DC	Dendritische Zelle ( <i>dendritic cell</i> )
DD	Todesdomäne ( <i>death domain</i> )
ddH <sub>2</sub> O	Aqua bidest.
DMSO	Dimethylsulfoxid
DR	Todesrezeptor ( <i>death receptor</i> )
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
Fas	<i>factor of apoptosis</i>
FC	Fludarabin/Cyclophosphamid
FCR	Fludarabin/Cyclophosphamid-Rituximab
FcR	Fc-Rezeptor
FCS	Fetales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
GvHD	<i>Graft-versus-Host-Disease</i>
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>

---

HSC	Hämatopoetische Stammzelle ( <i>hematopoetic stem cell</i> )
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
ITIM	<i>immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif</i>
KIR	<i>killer immunoglobulin-like receptor</i>
KM	Knochenmark
LC-MS/MS	liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry
LAG-3	<i>lymphocyte activation gene-3</i>
mAb	Monoklonaler Antikörper ( <i>monoclonal antibody</i> )
MACS	<i>Magnetic Activated Cell Sorting</i>
MICA/B	<i>MHC class I related chain A/B</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MM	Multiplres Myelom
MMP14	Matrix-Metalloprotease 14
NCR	<i>natural cytotoxicity receptor</i>
NEAA	Nicht-essentielle Aminosäure ( <i>non-essential amino acid</i> )
NF-κB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NKG2D	<i>natural killer group 2 member D</i>
NKG2DL	NKG2D Ligand
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PD-1	<i>Programmed cell death-1</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
RANK	<i>receptor activator of NF-κB</i>
RANKL	<i>receptor activator of NF-κB ligand</i>
RT	Raumtemperatur
rh	rekombinant human
SCT	Stammzelltransplantation ( <i>stem cell transplantation</i> )
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
SDS-Page	SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese

---

SFI	Spezifischer Fluorezenz-Index ( <i>specific fluorescence index</i> )
TACE	TNF- $\alpha$ converting enzyme
TACI	<i>transmembrane activator and CAML interactor</i>
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor <math>\beta</math></i>
TIM-3	<i>T-cell immunoglobulin and mucin containing protein-3</i>
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRAF	<i>TNF-receptor associated factor</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TRAP	<i>tartrate resistant acid phosphatase</i>
TTRAP	<i>TRAF and TNF-receptor associated protein</i>
WT	<i>wild type</i>
7-AAD	<i>7-Amino-Actinomycin</i>

## 7.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht über die TNF-Familienmitglieder nach Aggarwal, 2003 (modifiziert). .....	17
Tab. 2: Stadieneinteilung der CLL nach Rai, 1975.....	25
Tab. 3: Stadieneinteilung der CLL nach Binet, 1981.....	25
Tab. 4: Tryptische BAFF-Peptide in Kulturüberständen von 293-BAFF Transfektanten.....	62
Tab. 5: Tryptische BAFF-Peptide in Zellkulturüberständen von pNKC.....	62
Tab. 6: Fludarabin-/Cyclophosphamidkonzentrationen bezogen auf <i>plasma peak</i> Level. ....	76

### 7.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der Komponenten des Immunsystems. ....	6
Abb. 2: Charakterisierung von Reagenzien zur Detektion von BAFF auf der Zelloberfläche. ....	49
Abbi. 3: FACS-Analyse der BAFF-Expression auf NK-Zellen. ....	50
Abb. 4: FACS-Analyse der APRIL-Expression auf NK-Zellen. ....	51
Abb. 5: Analyse der mRNA-Expression von BAFF und APRIL in NK-Zellen. ....	52
Abb. 6: Analyse der Expression von BAFF mRNA in reinen pNKC. ....	52
Abb. 7: Analyse der Freisetzung von BAFF durch NK-Zellen. ....	53
Abb. 8: Analyse der Freisetzung von APRIL durch NK-Zellen. ....	54
Abb. 9: FACS-Analyse der intrazellulären BAFF-Expression in NK-Zellen. ....	55
Abb. 10: Analyse der BAFF-Expression auf aktivierten NK-Zellen. ....	56
Abb. 11: Analyse der BAFF Freisetzung durch NK-Zellen nach Aktivierung. ....	57
Abb. 12: Analyse der BAFF-Freisetzung durch NK-Zellen nach CD16-Stimulation. ....	58
Abb. 13: Intrazelluläre BAFF-Expression in NK-Zellen nach CD16-Stimulation. ....	59
Abb. 14: Expression der BAFF-Rezeptoren auf primären CLL-Zellen. ....	60
Abb. 15: Einfluss von BAFF auf die Stoffwechselaktivität primärer CLL-Zellen. ....	60
Abb. 16: Nachweis von löslichem BAFF nach der Aufreinigung aus pNKC-Überstand mittels ELISA. ....	61
Abb. 17: Nachweis der Bindungseigenschaften von nkBAFF mittels FACS. ....	63
Abb. 18: Nachweis der Bindungseigenschaften von nkBAFF mittels ELISA. ....	63
Abb. 19: Einfluss von nkBAFF auf die Stoffwechselaktivität primärer CLL-Zellen. ....	64
Abb. 20: Einfluss von BAFF auf die NK-Zell-vermittelte Lyse primärer CLL-Zellen. ....	65
Abb. 21: Einfluss von nkBAFF auf die NK-Zell-vermittelte Lyse primärer CLL-Zellen. ....	66
Abb. 22: Einfluss von rhBAFF auf die Lyse von CLL-Zellen durch autologe NK-Zellen. ....	67
Abb. 23: Einfluss von nkBAFF auf die Lyse von CLL-Zellen durch autologe NK-Zellen. ....	68
Abb. 24: Einfluss von BAFF auf die NK-Zell Degranulation. ....	69
Abb. 25: Einfluss von BAFF auf die NK-Reaktivität autologer NK-Zellen. ....	70
Abb. 26: Einfluss von BAFF auf die Expression immunregulatorischer Moleküle auf der Oberfläche von CLL-Zellen. ....	71
Abb. 27: Einfluss von BAFF auf die CD20-Expression von CLL-Zellen. ....	72
Abb. 28: Einfluss von BAFF auf das Überleben von CLL-Zellen. ....	73
Abb. 29: Einfluss von BAFF auf die Expression von Todesrezeptoren auf der Oberfläche von CLL-Zellen. ....	74
Abb. 30: Einfluss von BAFF auf die Apoptose von CLL-Zellen. ....	74

---

Abb. 31: Einfluss von BAFF auf die Proliferation von CLL-Zellen. ....	75
Abb. 32: Dosistitration von Fludarabin/Cyclophosphamid (FC) mit primären CLL-Zellen im WST-1 .....	76
Abb. 33: Einfluss von BAFF auf die Suszeptibilität von CLL-Zellen für eine chemotherapeutische Behandlung. ....	77
Abb. 34: Einfluss einer BAFF-Neutralisation mittels Belimumab auf die Stoffwechselaktivität primärer CLL-Zellen. ....	78
Abb. 35: Einfluss einer BAFF-Neutralisation auf die NK-Zell-vermittelte Lyse primärer CLL-Zellen. ....	79
Abb. 36: Einfluss einer BAFF Neutralisation auf die Lyse von CLL-Zellen durch autologe NK-Zellen. ....	80
Abb. 37: Einfluss einer BAFF-Neutralisation auf die Chemosensitivität primärer CLL-Zellen	81
Abb. 38: Einfluss einer BAFF-Neutralisation mittels Belimumab auf das Überleben primärer CLL-Zellen.....	82
Abb. 39: Einfluss einer BAFF-Neutralisation mittels Belimumab auf die chemotherapeutisch induzierte Apoptose.....	83

## 7.4 Eigenanteil

Experimente, die zu den hier aufgezählten Abbildungen geführt haben, wurden nicht bzw. nicht ausschließlich von mir selbst durchgeführt:

Abb. 5: Analyse der mRNA-Expression von BAFF und APRIL in NK-Zellen.

Abb. 6: Analyse der Expression von BAFF mRNA in reinen pNKC.

Abb. 16: Nachweis von löslichem BAFF nach der Aufreinigung aus pNKC-Überstand mittels ELISA.

Abb. 30: Einfluss von BAFF auf die Apoptose von CLL-Zellen.

Abb. 31: Einfluss von BAFF auf die Proliferation von CLL-Zellen.

Abb. 32: Dosistitration von Fludarabin/Cyclophosphamid (FC) mit primären CLL-Zellen im WST-1.

Abb. 33: Einfluss von BAFF auf die Suszeptibilität von CLL-Zellen für eine chemotherapeutische Behandlung.

Abb. 34: Einfluss einer BAFF-Neutralisation mittels Belimumab auf die Stoffwechselaktivität primärer CLL-Zellen.

Abb. 37: Einfluss einer BAFF-Neutralisation auf die Chemosensitivität primärer CLL-Zellen.

Abb. 29: Einfluss von BAFF auf die Expression von Todesrezeptoren auf der Oberfläche von CLL-Zellen.

## 7.5 Eigene Publikationen

Schmohl JU, Nuebling T, **Wild J**, Kroell T, Salih HR, Schmetzer H. "RANK-L expression on blasts in patients with acute myeloid leukemia is associated with survival, PD-1/PD-1L expression has no impact" *Eur J Haematol.* 2016 Apr 20. doi: 10.1111/ejh.12762. [Epub ahead of print]

Schmohl JU, Nuebling T, **Wild J**, Jung J, Kroell T, Kanz L, Salih HR, Schmetzer H. "Death Receptor Expression on Blasts in AML Is Associated with Unfavorable Prognosis" *Anticancer Res.* 2015 Jul;35(7):4043-52.114

**Wild J**, Schmiedel BJ, Maurer A, Raab S, Prokop L, Stevanović S, Dörfel D, Schneider P, Salih HR "Neutralization of (NK-cell-derived) B-cell activating factor by Belimumab restores sensitivity of chronic lymphoid leukemia cells to direct and Rituximab-induced NK lysis" *Leukemia.* 2015 Aug;29(8):1676-83. doi: 10.1038/leu.2015.50. Epub 2015 Feb 24.

Hahn S, Setz C, **Wild J**, Eißman A and Schubert U, "The PTAP Late domain regulates ubiquitination and MHC-I antigen presentation of human immunodeficiency virus type 1 Gag" *J Immunol.* 2011 May 15;186(10):5706-18. doi: 10.4049/jimmunol.1003764. Epub 2011 Apr 11.

## 7.6 Danksagung

Beginnen möchte ich mit einem „Danke“ an meine Familie an, die meine Entscheidungen nie in Frage gestellt, mich meinen eigenen Weg haben gehen lassen und mich immer in allem unterstützt haben.

Außerdem danke ich meinem Freund Martin, der die Wochenenden auf der Autobahn und die, an welchen ich „nur mal kurz“ ins Labor musste, sowie meine eher seltenen Höhen und doch zahlreicheren Tiefs mit stoischer Ruhe ertragen und immer an mich geglaubt hat.

Ich danke jedem einzelnen Mitglied der AG Salih, da jeder einzelne auf seine Art die letzten Jahre zu etwas Besonderem gemacht hat. Im Einzelnen möchte ich mich bei Benjamin für die intensive Betreuung am Anfang bedanken. Danke an Tina dafür, dass Sie als Labor-Mami immer mit Rat und Tat zur Seite stand und Danke an Samuel für die langjährige Freundschaft und seine liebenswerte Verpeiltheit, durch die ich mich immer wahnsinnig organisiert gefühlt habe. Meinen Dank an meine liebe Melli, die all die Jahre Seite and Seite mit mir geschuftet hat, vermag ich kaum in Worte zu fassen.

Ein herzliches Dankeschön geht an Prof. Rammensee für die Betreuung meiner Dissertation, seine Gutachtertätigkeit und seine Vorbildfunktion. Außerdem danke ich Prof. Jürgen Frank und dem IRTG für die finanzielle Unterstützung und die vielen schönen Jahre im Kreise der anderen IRTG-Mitglieder.

Zu guter Letzt danke ich meinem Doktorvater Helmut Salih, der wie kein anderer diesen Titel verdient hat. Er hat auf seine unvergleichliche Art das Beste aus mir rausgeholt.