

Aus der Klinik für Innere Medizin II
mit den Schwerpunkten Hämatologie und Onkologie
Sektion für Stammzell- und Immuntherapie
(Leiter: Prof. Dr. med. Martin Gramatzki)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Funktionelle Charakterisierung eines rekombinanten IgA2
Antikörpers gegen CD20**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Sebastian Loew
aus
Bad Honnef

Kiel 2017

1. Berichtstatter:
2. Berichtstatter:
Tag der mündlichen Prüfung:
Zum Druck genehmigt, Kiel, den

Prof. Dr. Thomas Valerius
Prof. Dr. Dirk O. Bauerschlag
17.09.2018
23.07.2018

gez.: Prof. Dr. Johann Roider
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Vorbemerkung	V
1. Einleitung	1
1.1 Lymphatische Neoplasien	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Lymphome und Leukämien.....	1
1.2 CD20 in der Onkologie	3
1.2.1 Was ist CD20 und welche Zellen tragen es auf ihrer Oberfläche.....	3
1.2.2 Klinik CD20-positiver B-Zell Non-Hodgkin Lymphome.....	4
1.2.3 Rolle CD20-gerichteter Immuntherapie in der Behandlung CD20-positiver Neoplasien.....	6
1.2.3.1 Einteilung CD20-gerichteter Antikörper: Typ I und Typ II.....	8
1.3 Antikörper.....	8
1.3.1 Struktureller Aufbau.....	8
1.3.1.1 Antikörper Isotypen.....	8
1.3.1.2 Antikörper des IgA-Isotyps	9
1.3.3 Effektormechanismen von Antikörpern	10
1.3.3.1 F(ab)-vermittelte Effektormechanismen	10
1.3.3.2 Fc-vermittelte Effektormechanismen	11
1.3.3.2.1 Das Komplementsystem und komplementabhängige Zytotoxizität (CDC)	13
1.4 IgA als therapeutischer Antikörper.....	15
1.5 Fragestellung und Zielsetzung	16
2. Material und Methoden	17
2.1 Ethikvotum und Einverständnis der Spender	17
2.2 Material	17
2.3 Methoden.....	17
2.3.1 Molekularbiologische Methoden.....	17
2.3.1.1 Herstellung antikörperproduzierender Zellklone	17
2.3.1.2 Produktion der rekombinanten CD20-Antikörper im Bioreaktor	17
2.3.1.3 Aufreinigung der Antikörper	18
2.3.1.3.1 Affinitätschromatografie mittels ahu-κ Matrix.....	18
2.3.1.3.2 Größenausschlusschromatografie.....	18
2.3.1.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay.....	19
2.3.1.4.1 Nachweis von Komplementdeposition.....	20
2.3.2 Biochemische Methoden	20
2.3.2.1 Immunfluoreszenzen	20
2.3.2.2 Zellviabilität	21
2.3.2.3 Immunblots.....	22
2.3.2.3.1 Western Blots	22
2.3.2.3.2 Lectin Blots	22
2.3.2.4 Silberfärbung.....	23
2.3.3 Zellbiologische Methoden.....	23

Inhaltsverzeichnis

2.3.3.1 Zellkultur	23
2.3.3.2 Präparation von humanem Vollblut	24
2.3.3.2.1 Gewinnung von PMN und MNC	24
2.3.3.2.2 Gezielte Gewinnung von Monozyten und Makrophagen	26
2.3.3.2.3 Präparation von Serum	27
2.3.3.3 Homotypische Aggregation	28
2.3.3.4 B-Zell-Depletion <i>in vitro</i>	28
2.3.3.5 ⁵¹ Chrom-Freisetzungs Tests	28
2.3.3.6 Tierexperimente	29
2.3.3.6.1 <i>In vivo</i> B-Zell Depletion,	30
2.3.3.6.2 Phagozytose Untersuchungen	30
3. Ergebnisse	32
3.1 Biochemische Charakterisierung und Bindungseigenschaften CD20-gerichteter Antikörper	32
3.2 Direkte Effekte CD20 gerichteter IgG1- und IgA2- Antikörper	35
3.3 B-Zell Depletion im Vollblut	37
3.4 Komplementabhängige Zytotoxizität CD20-gerichteter IgA2 und IgG1 Antikörper	41
3.5 Aktivierung von Effektorzellen durch CD20-gerichtete IgG1 und IgA2 Antikörper	46
3.6 1F5-IgA2 und –IgG1 Antikörper vermitteln Tumorzelllyse gegen primäre CLL Zellen	50
3.7 <i>In vivo</i> Effektivität CD20-gerichteter IgA2 Antikörper	51
3.8 Evaluation von Fcα/μR als mögliches Ziel weitergehender Forschung	53
4. Diskussion	55
4.1 Direkte Wirkmechanismen CD20-gerichteter IgA-Antikörper	56
4.2 Indirekte Wirkmechanismen CD20-gerichteter IgA-Antikörper	56
4.2.1 Komplementvermittelte Zytotoxizität durch CD20-gerichtete IgA2 Antikörper....	56
4.2.2 Effektorzellaktivierung durch CD20-gerichtete IgA2-Antikörper	59
4.3 Phagozytose durch CD20-gerichtete IgA2-Antikörper	61
4.4 Ausblick	61
5. Zusammenfassung	63
6. Literaturverzeichnis	64
7. Anhang	75
7.1 Verwendete Chemikalien	75
7.2 Verwendete Geräte	76
7.3 Verwendete Software	77
7.4 Verwendete Lösungen	77
7.5 Verwendete Antikörper	79
7.6 Verwendete Einmalmaterialien	80
7.7 Verwendete Kits & Reagenzien	81
7.8. Durchgeführte Immunfluoreszenzen	81
Abkürzungsverzeichnis	84
Eidesstattliche Erklärung	85
Danksagung	86

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Relative Häufigkeit von lymphatischen Neoplasien und NHL..... 3

Abbildung 2: Darstellung des strukturellen Aufbaus von CD20..... 4

Abbildung 3: Schematische Darstellung der IgA Isotypen. 10

Abbildung 4: Schematische Darstellung des Komplementsystems. 14

Abbildung 5: Produktion und Aufreinigung des 1F5-IgA2 Antikörpers..... 32

Abbildung 6 Biochemische Charakterisierung CD20-gerichteter 1F5 Antikörper. 33

Abbildung 7: Untersuchung der Glykolysierung CD20-gerichteter Antikörper. 34

Abbildung 8: Bindungseigenschaften CD20 gerichteter Antikörper..... 35

Abbildung 9: Fab-vermittelte Effektormechanismen CD20-gerichteter Antikörper..... 36

Abbildung 10: Homotypische Aggregation durch CD20-gerichtete Antikörper..... 37

Abbildung 11: Antikörper-vermittelte Tumorlyse mit Vollblut als Effektorquelle. 38

Abbildung 12: B-Zell Depletion durch 1F5-Antikörper des IgA2 und IgG1 Isoytyps..... 39

Abbildung 13: Einfluss der Effektorzellaktivierung in der B-Zell-Depletion im Vollblut. 40

Abbildung 14: Einfluss der CDC an der B-Zell-Depletion im Vollblut..... 41

Abbildung 15: Nachweis der C1q Deposition an die Antikörperisotypen IgG1 und IgA2..... 42

Abbildung 16: Komplementrekrutierung durch CD20-gerichtete Antikörper. 43

Abbildung 17: Analyse der Komplementaktivierung durch CD20-gerichtete Antikörper..... 44

Abbildung 18: Vermittlung von CDC durch CD20-gerichtete Antikörper auf verschiedenen Tumor-Zelllinien. 45

Abbildung 19: Vermittlung von CDC durch CD20- gerichtete Antikörper gegen primäre CLL-Proben..... 45

Abbildung 20: Effektorzellaktivierung durch CD20-gerichtete Antikörper..... 46

Abbildung 21: Aktivierung von Monozyten und Makrophagen durch CD20-gerichtete Antikörper..... 48

Abbildung 23: CD20 Oberflächenexpression verschiedener Lymphom-Zelllinien..... 49

Abbildung 24: Vermittlung von ADCC durch CD20-gerichtete Antikörper auf verschiedenen Lymphom-Zelllinien..... 49

Abbildung 25: Vermittlung von ADCC durch CD20-gerichtete Antikörper gegen primäre CLL Proben..... 50

Abbildung 26: *In vivo* B-Zell-Depletion durch CD20-gerichtete Antikörper. 52

Abbildung 27: *In vivo* B-Zell Depletion CD20-gerichteter Antikörper in FcαRI (CD89) transgenen Mäusen. 53

Abbildung 28: Einfluss der ADCP CD20-gerichteter Antikörper auf die B-Zell Depletion.... 54

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der in dieser Arbeit genutzten Lymphomzelllinien nach ihrem natürlichen Verlauf 5

Tabelle 2: CD20-Antikörper..... 7

Tabelle 3: Übersicht wichtiger humaner Fc-Rezeptoren von IgG- und IgA-Antikörper 12

Tabelle 4: Verwendete Lectine und durch sie bevorzugt gebundene Glykosylierung..... 23

Tabelle 5: Verwendete Zelllinien..... 24

Tabelle 6: Protokoll zur Präparation von MNC und PMN..... 25

Tabelle 7: Protokoll zur Generierung von Monozyten..... 26

Tabelle 8: Verwendete Chemikalien..... 75

Tabelle 9: Verwendete Geräte..... 76

Tabelle 10: Verwendete Software..... 77

Tabelle 11: Verwendete Lösungen..... 77

Tabelle 12: Verwendete Antikörper 79

Tabelle 13: Verwendete Einmalmaterialien..... 80

Tabelle 14: Verwendete Kits und Reagenzien..... 81

Tabelle 15: Durchgeführte Immunfluoreszenzen 81

Vorbemerkung

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation sind teilweise Bestandteil folgender Publikation:

Lohse, S., **Loew, S.**, Kretschmer, A., Jansen, J. H. M., Meyer, S., Ten Broeke, T., Rösner, T., Dechant, M., Derer, S., Klausz, K., Kellner, C., Schwanbeck, R., French, R. R., Tipton, T. R. W., Cragg, M. S., Schewe, D. M., Peipp, M., Leusen, J. H. W., Valerius, T. (2017): Effector mechanisms of IgA antibodies against CD20 include recruitment of myeloid cells for antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and complement-dependent cytotoxicity. *British Journal of Haematology*. doi: 10.1111/bjh.14624

1. Einleitung

1.1 Lymphatische Neoplasien

1.1.1 Epidemiologie

Wie aus dem aktuellen Report „Krebs in Deutschland“ des Robert Koch-Instituts (RKI) hervorgeht, erkrankten im Jahr 2012 in Deutschland 478.000 Menschen neu an Krebs. Im gleichen Jahr starben 220.000 Menschen hieran. Lymphatische Neoplasien (Hodgkin-Lymphome (HL), Non-Hodgkin Lymphome (NHL), lymphatische Leukämien und das multiple Myelom (MM)) hatten mit 30.000 Neuerkrankungen einen Anteil von 15% an allen Krebsneuerkrankungen (2015). Zum überwiegenden Teil gehen diese Erkrankungen von B-Zellen aus (Kuppers, 2005). CD20 (engl. Cluster of Differentiation, CD) ist ein für die B-Zell-Linie spezifisches Antigen, gegen welches seit 1997, mit der Zulassung des chimären Antikörpers Rituximab, eine zielgerichtete Therapie möglich ist. Die Therapie mit CD20-gerichteten Antikörpern spielt insbesondere bei NHL und lymphatischen Leukämien eine entscheidende Rolle (Coiffier, 2006). Im Jahr 2012 lag die Anzahl der Neuerkrankungen für NHL und lymphatische Leukämien bei 22.000 Fällen. Auch wenn NHL und lymphatische Leukämien damit für nur 4,4% aller Tumorneuerkrankungen sowie 4,1 % der tumorbedingten Todesfälle verantwortlich sind, haben sie unter den malignen Erkrankungen des hämatopoetischen Systems einen durchaus hohen Stellenwert. Non-Hodgkin-Lymphome sind in Deutschland die fünfthäufigste neudiagnostizierte Krebserkrankung des Mannes und die sechsthäufigste der Frau sowie bei beiden die sechsthäufigste tumorbedingte Todesursache (Krebs in Deutschland, Robert Koch Institut 2015).

1.1.2 Lymphome und Leukämien

Bei Lymphomen und lymphatischen Leukämien handelt es sich um maligne entartete Lymphozyten. Lymphozyten entwickeln sich, wie alle Zellen des peripheren Blutes, aus hämatopoetischen Vorläuferzellen des Knochenmarks (Pieper et al., 2013). Die hämatopoetischen Vorläuferzellen differenzieren in myeloide oder lymphoide Vorläuferzellen. Aus den lymphoiden Vorläuferzellen entstehen durch weitere Differenzierung B-Lymphozyten, T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Jede dieser Zellen kann sich zu jedem Zeitpunkt ihrer Entwicklung maligne transformieren. Dies kann zu einer Vielzahl verschiedener Neoplasien führen, welche sich klinisch heterogen verhalten.

1. Einleitung

„Historisch wurden innerhalb der lymphatischen Neoplasien Leukämien, welche eine Beteiligung von Knochenmark und Blut zeigen, den Lymphomen, welche sich als eine „Masse“ präsentieren gegenübergestellt. Von dieser Einteilung hat man Abstand genommen, da Leukämien sich zuweilen als Masse und Lymphome sich leukämisch präsentieren können und beide heute als unterschiedliche Stadien der selben Erkrankung verstanden werden.“

(Freedman et al., 2017)

Neoplastische Lymphozyten behalten regelhaft Merkmale, wie sie für ein bestimmtes Reifestadium der Zellreihe typisch sind (Lenz und Staudt, 2010). Dies kann eine Zuordnung der neoplastischen Zelle zu ihrem gesunden Gegenstück ermöglichen. Die 2008 durch die World Health Organisation (WHO) veröffentlichte und zuletzt 2016 aktualisierte vierte Edition der Klassifikation maligner hämatopoetischer Erkrankungen greift dies auf und unterscheidet zwischen Lymphomen, welche von reifen Lymphozyten oder Plasmazellen ausgehen, gegenüber Neoplasien, welche von unreifen Vorläuferzellen ausgehen. Zusätzlich werden morphologische und genetische Merkmale berücksichtigt (Swerdlow et al., 2016). Ergänzend können lymphatische Neoplasien nach dem medianen Überleben bei unbehandeltem Verlauf in indolente, aggressive und hochaggressive Lymphome eingeteilt werden (Armitage und Weisenburger, 1998).

Obwohl der Anteil von B- und T-Lymphozyten im Körper etwa gleich ist, gehen ca. 90% aller Lymphome und etwa 75% aller lymphatischen Leukämien von B-Zellen aus (Kuppers, 2005). Entartungen der T-Lymphozyten und NK-Zellen, welche in bestimmten Regionen der Erde endemisch auftreten können, stellen in Europa gemeinsam mit etwa 10% aller lymphatischen Neoplasien eine eher seltene Erkrankung dar und sind nicht Gegenstand dieser Arbeit (Shankland et al., 2012). Entarten unreife Lymphozyten entsteht das hochaggressive Krankheitsbild einer akuten lymphoblastischen Leukämie bzw. eines akuten lymphoblastischen Lymphoms, dem häufigsten Subtyp der akuten lymphatischen Leukämie. Unterscheidungsmerkmal ist hier der Blastenanteil im Knochenmark, welcher bei der lymphatischen Verlaufsform unter und bei der leukämischen Form über 25% liegt (Swerdlow et al., 2016).

Entarten reife B-Lymphozyten spricht man im Gegensatz zum Hodgkin Lymphom, welches etwa 10% aller Lymphome ausmacht, von Non-Hodgkin-Lymphomen (Shankland et al., 2012).

1. Einleitung

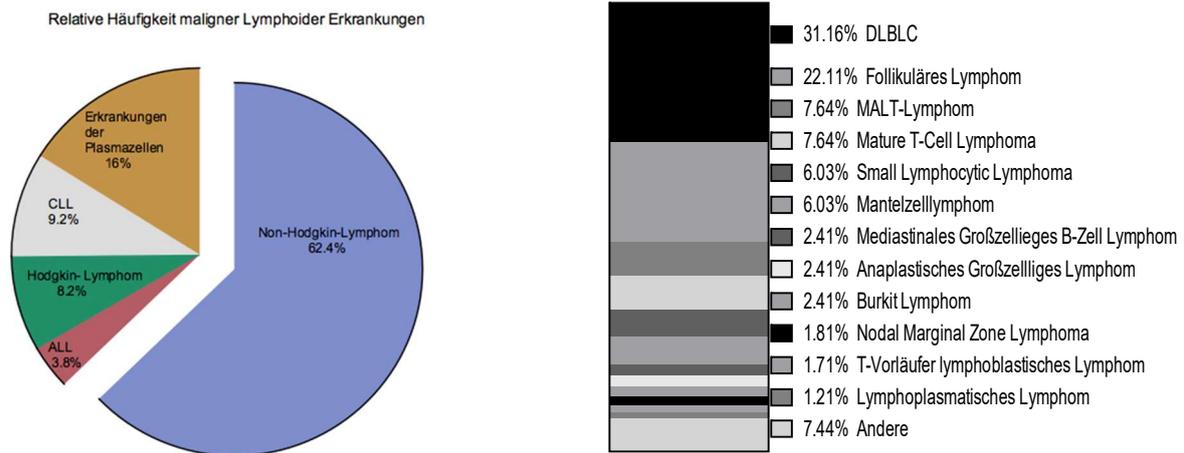


Abbildung 1: Relative Häufigkeit von lymphatischen Neoplasien und NHL (Longo et al., 2012)

1.2 CD20 in der Onkologie

1.2.1 Was ist CD20 und welche Zellen tragen es auf ihrer Oberfläche

CD20 ist ein für die B-Zell-Reihe typisches Transmembranprotein, welches mit Ausnahme hämatopoetischer Stammzellen sowie früher B-Zellen und ausgereifter Plasmazellen während der gesamten B-Zell-Reifung auf der Oberfläche exprimiert wird (Tedder und Engel, 1994). CD20 wird nur auf B-Zellen und nicht durch anderes Gewebe exprimiert. Nach seiner Entdeckung wurde CD20 als Prototyp eines Antigens für die Immuntherapie maligner Erkrankungen insgesamt identifiziert, da man mit ihm spezifisch Tumorzellen attackieren kann (Glennie et al., 2007b).

Auf der Zelloberfläche können mehrere CD20 Moleküle zu dimeren und tetrameren Komplexen assoziieren, die in Lipid Rafts organisiert sind. Neben seinem Vorkommen als Homo-Multimeren liegt CD20 in Lipid Rafts auch mit dem B-Zell-Rezeptor (engl. *B-Cell Receptor*, BCR) assoziiert vor (Beers et al., 2010a). Lipid Rafts sind wenige Nanometer große cholesterin- und sphingolipidreiche Bereiche der Zellmembran, in welchen Oberflächenrezeptoren organisiert werden können. Sie dienen unter anderem als transiente Signalplattformen für die Weiterleitung extrazellulärer Signale (Ratajczak und Adamiak, 2015). CD20 durchläuft vierfach die Membran, wobei sowohl das amino- als auch das carboxyterminale Ende auf zytosolischer Seite liegen, so dass sich eine kleine und eine große extrazelluläre Schlaufe bildet (Tedder und Engel, 1994).

Die Funktion von CD20 ist nicht vollständig geklärt. CD20 hat keinen bekannten Liganden und Knock-Out-Mäuse zeigen einen normalen Phänotyp (Cragg et al., 2005). Die aktuelle Datenlage unterstützt die Hypothese, dass CD20 Calciumsignale modifiziert, welche durch den

1. Einleitung

BCR nach Antigenbindung erzeugt werden (Beers et al., 2010a). Klinische Bedeutung gewann CD20 da es von 99% der B-Zell NHL exprimiert wird (Coiffier, 2006).

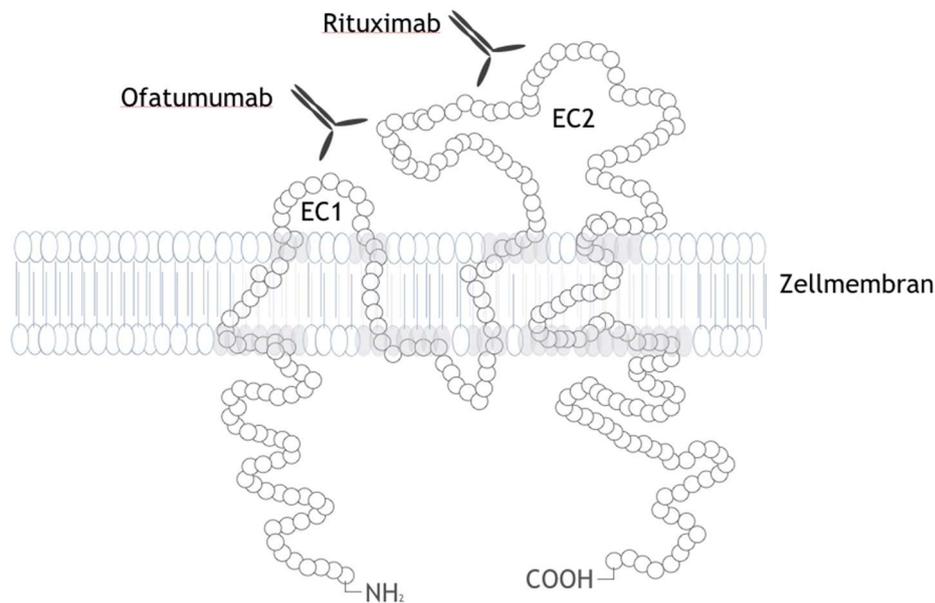


Abbildung 2: Darstellung des strukturellen Aufbaus von CD20.

CD20 durchläuft vierfach die Membran und bildet dabei die extrazelluläre Schleife 1 und 2 (EC1 und EC2). Rituximab bindet an die EC2 von CD20, Ofatumumab bindet an die EC1 (Cragg, 2011).

1.2.2 Klinik CD20-positiver B-Zell Non-Hodgkin Lymphome

95% aller NHL gehen von B-Zellen aus (Kuppers, 2005). Die Ursache für dieses Übergewicht findet sich in den genetischen Veränderungen, welche B-Zellen während ihrer Reifung von hämatopoetischen Stammzellen zu antikörperproduzierenden Plasmazellen oder zur B-Gedächtniszelle durchlaufen. Diese Veränderungen sind in der Regel chromosomale Translokationen, im Rahmen derer Tumorsuppressorgene inaktiviert, Onkogene aktiviert oder der Zellzyklus dysreguliert werden können (Kuppers, 2005). Der häufigste Subtyp mit etwa 1/3 der Fälle ist das diffus großzellige B-Zelllymphom (engl. *diffuse large B-cell lymphoma*, DLBCL). Mantelzelllymphome stellen etwa 6% aller NHL dar. Das Burkitt-Lymphom ist den aggressiv verlaufenden Lymphomen zuzuordnen und stellt mit einem Vorkommen von etwa 2,4% der NHL in Europa ein seltenes Krankheitsbild dar. Burkitt-Lymphome zeigen, insbesondere in Afrika, jedoch auch endemisches Auftreten und sind mit einer Epstein-Barr-Virus Infektion assoziiert (Longo et al., 2012).

Die chronisch lymphatische Leukämie (CLL), wird als leukämische Verlaufsform des kleinzelligen lymphozytischen Lymphom (SLL) ebenfalls den Non-Hodgkin Lymphomen zugeordnet (Shankland et al., 2012). Entartungen enddifferenzierter B-Zellen, der

1. Einleitung

Plasmazellen, werden als multiples Myelom bezeichnet. Finden sich maligne Plasmazellen im Blut des Patienten liegt eine Plasmazell-Leukämie vor. Das multiple Myelom stellt innerhalb der lymphatischen Neoplasien eine eigene Entität dar (Blade et al., 2011).

Non-Hodgkin-Lymphome stellen eine ausgesprochen heterogene Gruppe von Erkrankungen dar. Typisch ist das Vorliegen von B-Symptomen (Fieber, Nachtschweiß, ungewollte Gewichtsabnahme von >10% des Körpergewichts in 6 Monaten) sowie von vergrößertem lymphatischen Gewebe (Lymphadenopathie). Ausgehend von dem Verdacht auf ein NHL umfasst eine initiale Evaluation in der Regel neben der gründlichen Anamnese und körperlichen Untersuchung, eine ausführliche anatomische Bildgebung, eine labormedizinische Untersuchung sowie die Analyse von Patientenmaterial aus einer Lymphknoten- und Knochenmarkbiopsie (Cheson et al., 2014). Die pathologische Aufbereitung und Untersuchung des Lymphknotenbiopsats ist die Grundlage der Diagnosestellung lymphoider Neoplasien nach der WHO-Klassifikation. Weiterhin erlauben die genannten Untersuchungen in der Zusammenschau eine Einschätzung des vorliegenden Krankheitsstadiums (engl. *Staging*). Die Ann-Arbor-Klassifikation ist die verbreitetste Methode für die Feststellung des Krankheitsstadiums bei NHL.

Es werden je nach Ausbreitungsmuster 4 Stadien unterschieden, wobei das Vorkommen von auffälligen Lymphknoten auf beiden Seiten des Zwerchfells den Übergang von einer begrenzten Erkrankung (Ann-Arbor I und II) zu einem fortgeschrittenen Verlauf (Ann-Arbor III und IV) darstellt (Cheson et al., 2014). Zur Feststellung des Krankheitsstadiums bei CLL wird das *Staging*-Verfahren nach Binet genutzt (Rai und Stilgenbauer, 2016). Die Prognose der Patienten mit NHL kann mit dem Internationalen Prognostischen Index (IPI) abgeschätzt werden. Im IPI werden die Patienten nach dem Vorliegen von fünf Eigenschaften in 4 vier Risikogruppen eingeteilt.

Klinisch kann nach dem medianen Überleben bei natürlichen Verlauf zwischen indolenten und aggressiven Lymphomen (Tabelle 1) unterschieden werden.

Tabelle 1: Einteilung der in dieser Arbeit genutzten Lymphomzelllinien nach ihrem natürlichen Verlauf

Indolente Lymphome	Aggressive Lymphome	Hochaggressive Lymphome
CLL/SLL	Mantellzelllymphom DLBCL	Burkitt-Lymphom

Die Therapien der Non-Hodgkin Lymphome unterscheiden sich und hängen vom vorliegenden Subtyp, dem Stadium, dem *Grading* und den Komorbiditäten ab. Wird die Diagnose eines

1. Einleitung

aggressiven Lymphoms gestellt, muss in der Regel unmittelbar mit der Therapie begonnen werden, da dieses unbehandelt innerhalb von Wochen bis Monaten zum Tod führt. Die Therapie besteht aus einer Polychemotherapie welche in mehreren Zyklen verabreicht wird. Typisch ist die Kombination der Zytostatika Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednison (CHOP), die um das Zytostatikum Etoposid (CHOEP) oder den CD20-Antikörper Rituximab (R-CHOP) erweitert werden kann. Die Polychemotherapie kann gegebenenfalls um Strahlentherapie, supportive Zytokingabe (z.B. Granulozyten- Kolonie stimulierender Faktor, G-CSF) und Stammzelltransplantation ergänzt werden (Shankland et al., 2012) Da indolente Lymphome in frühen Stadien (Ann-Arbor I+II) durch Strahlentherapie heilbar sein können, werden sie in diesen Stadien häufig therapiert. In fortgeschrittenen Stadien (Ann-Arbor III+IV) sind Heilungen indolenter Lymphome meist nicht mehr möglich. Da für fortgeschrittene Stadien kein Überlebensvorteil einer unverzüglich gestarteten Therapie gezeigt werden konnte, hängt die Entscheidung, wann mit einer Therapie gestartet wird, maßgeblich vom Befinden des Patienten ab. Diese Strategie wird als beobachtendes Abwarten („*watch and wait*“) bezeichnet. Die Therapie erfolgt durch Chemotherapie, welche entweder als Polychemotherapie (z.B. CHOP) oder mit nur einem Zytostatikum erfolgt. Gängige Präparate hierfür sind Chlorambucil, Fludarabin und Bendamustin. Jeder Patient mit follikulärem Lymphom sollte initial Rituximab erhalten (Shankland et al., 2012).

1.2.3 Rolle CD20-gerichteter Immuntherapie in der Behandlung CD20-positiver Neoplasien

1997 wurde mit Rituximab der erste gegen eine maligne Erkrankung gerichtete Antikörper zugelassen. Rituximab ist ein chimärer Antikörper mit einer humanen konstanten und einer variablen murinen Domäne. Bereits 1980 wurde CD20 als potentielles Antigen für eine zielgerichtete Tumortherapie identifiziert (Stashenko et al., 1980). 1994 wurden erste Experimente am Menschen mit dem chimären Antikörper Rituximab durchgeführt (Maloney et al., 1994), 1997 erfolgte die Zulassung durch die Federal Drug Administration (FDA) in den USA.

Diese Zulassung erfolgte für das follikuläre Lymphom, jedoch wurden die Indikationen in den Folgejahren erweitert. Heute ist Rituximab Bestandteil der Erstlinientherapie sowie der Erhaltungstherapie follikulärer oder DLBC-Lymphome. 2011 erfolgte in Kombination mit Chemotherapeutika die Zulassung für die Therapie der CLL. Evidenzbasiert findet Rituximab breite Anwendung in der Therapie des Mantelzelllymphoms (Campo und Rule, 2014). In der Europäischen Union ist Rituximab seit 2006 weiterhin für die rheumatoide Arthritis und seit

1. Einleitung

2013 für die Behandlung der Granulomatose mit Polyangiitis (GPA, ehemals Wegener-Granulomatose) und der mikroskopischen Polyangiitis (MPA) zugelassen.

Nicht alle Patienten sprechen auf eine Behandlung mit Rituximab an oder bleiben im Verlauf ihrer Therapie sensibel. CD20-Antikörper wurden daher weiterentwickelt, wobei die zweite Generation vollständig humanisiert beziehungsweise human ist. Zu dieser Generation gehören die monoklonalen Antikörper Ofatumumab und Obinutzumab. Ofatumumab bindet im Gegensatz zu Rituximab anteilig an die kleinere extrazelluläre Domäne von CD20. Hierdurch ist Ofatumumab membrannäher und potenter in der Lage CDC zu vermitteln (Teeling et al., 2004). Die an Antikörper gebundenen Zuckerreste beeinflussen maßgeblich die Pharmakokinetik und die Pharmakodynamik (Boross und Leusen, 2012). Die gezielte Modifikation dieser an Antikörper gebundenen Zuckerreste wird als Glycoengineering bezeichnet. Obinutzumab war der erste zugelassene CD20-gerichtete Antikörper, welcher mittels Glycoengineering modifiziert wurde. Die Entfernung von Fucose führt zu einer effizienteren Bindung an FcγRIIIa und auf dieser Grundlage zu verstärkt ablaufender ADCC (Golay et al., 2013).

Tabelle 2: CD20-Antikörper (nach Okroj et al., 2013, Reichert, 2017)

CD20-Antikörper	Typ I/II	Format	Eigenschaften im Vergleich zu Rituximab
Rituximab	I	chimärer IgG1	
Tositumomab	II	Muriner IgG2a	Weniger CDC, mehr Apoptose-Induktion
Ofatumumab	I	Humaner IgG1	Mehr CDC, langsamere Off-rate bei niedriger CD20-Expression
Obinutzumab (GA-101)	II	In Glycoengineering-Technik modifizierter humanisierter IgG1	Vermindert CDC, gesteigert ADCC und Apoptose
Velatumumab	I	Humanisierter IgG1	Mehr CDC, langsamere Off-rate
Ocrelizumab	I	Humanisierter IgG1 mit modifizierter Fc	Vermindert CDC, gesteigert ADCC

1. Einleitung

Ublituximab	I	In Glycoengineering-Technik modifizierter chimärer IgG1,	Vermeht ADCC
--------------------	---	--	--------------

1.2.3.1 Einteilung CD20-gerichteter Antikörper: Typ I und Typ II

CD20 Antikörper werden in zwei Typen eingeteilt: Typ I Antikörper, z.B. Rituximab, induzieren nach CD20-Bindung eine Umverteilung von CD20 innerhalb der Membran in *Lipid-Rafts*. Typ II Antikörper, z.B. Tositumumab, führen zu keiner CD20-Umverteilung (Cragg et al., 2003). Zwischen den beiden Klassen gibt es funktionelle Unterschiede. Typ I Antikörper induzieren potent komplementabhängige Zytotoxizität (CDC), aber fast keine homotypische Aggregation. Typ II Antikörper induzieren hingegen homotypische Aggregation, aber fast kein CDC. Beide Klassen sind jedoch gleichermaßen effektiv in der Vermittlung von antikörperabhängiger zellulärer Zytotoxizität (ADCC) (Cragg et al., 2003). Die Ursachen für diese funktionellen Unterschiede sind weiterhin unklar. Mit Ausnahme von Ofatumumab binden die meisten CD20-gerichteten Antikörper an der größeren extrazellulären Domäne (EC 2) von CD20 (Polyak und Deans, 2002, Beers et al., 2010a). Untersuchungen zeigen, dass Veränderungen von CD20 nach Antikörperbindung an den Unterschieden beteiligt sein können (Beers et al., 2010a). Darüber hinaus erkennen die beiden Klassen bevorzugt unterschiedliche Subpopulationen von CD20 (Niederfellner et al., 2011, Cragg, 2011). In einer aktuellen Arbeit zeigen Cragg et al. weiterhin, dass die Entfernung des Antigen-Antikörper-Komplexes von der Zellmembran wesentlichen Einfluss auf die favorisiert ablaufenden Effektormechanismen hat (Cleary et al., 2017).

1.3 Antikörper

1.3.1 Struktureller Aufbau

1.3.1.1 Antikörper Isotypen

Antikörper, auch Immunglobuline (Ig) genannt, sind durch Plasmazellen produzierte Proteine. Sie werden dem erworbenen Immunsystem zugeordnet und ermöglichen eine spezifische Elimination von Pathogenen. Im Menschen existieren fünf verschiedenen Antikörperisotypen: Immunglobulin G (IgG), Immunglobulin A (IgA), Immunglobulin E (IgE) und Immunglobulin M (IgM) und Immunglobulin D (IgD). Einem gemeinsamen Bauplan folgend sind sie aus zwei identischen schweren Ketten (engl. *heavy chain*, HC) und zwei identischen leichten Ketten (engl. *light chain*, LC) aufgebaut. Die schweren Ketten bestehen aus einer variablen (engl. *variabel heavy*, VH) und drei konstanten Domänen (engl. *constant heavy*, CH). Die leichten

1. Einleitung

Ketten sind aus einer variablen und einer konstanten Domäne aufgebaut. VH- C α 1 und VL-CL bilden zusammen je ein antigen-bindendes Fragment (eng. *fragment antigen binding*, Fab), die beiden CH2- CH3-Domänen bilden zusammen das konstante Fragment (engl. *fragment crystallizable*, Fc). Beide Fragmente sind durch eine Gelenkregion (engl. *hinge region*) miteinander verbunden. Diese Ketten existieren im Menschen in den Varianten kappa (κ) oder lambda (λ) Leichtkette, wobei Antikörper jeweils aus nur einer dieser Varianten bestehen. Antikörper rückten in den Fokus klinischer Forschung, da mit ihnen eine zielgerichtete Therapie möglich wurde. Alle aktuell zugelassenen oder sich in Entwicklung befindlichen Antikörper sind vom IgG-Isotyp (Reichert, 2017).

1.3.1.2 Antikörper des IgA-Isotyps

Es existieren zwei Subklassen von IgA, IgA1 und IgA2, welche im Fall von IgA2 weiter in die Allotypen IgA2m(1) und IgA2m(2) eingeteilt werden. Der Unterschied zwischen den Subtypen IgA1 und IgA2 liegt in der *Hinge*-Region. Die *Hinge*-Region von IgA1 ist 16 Aminosäuren länger als die von IgA2. Weiterhin ist die längere *Hinge*-Region von IgA1 an 6 möglichen Stellen O-glykosylierbar. Die kürzere *Hinge*-Region von IgA2 führt zu einer verlängerten Verfügbarkeit, da viele Proteasen, z.B. die IgA spezifische Serin Protease von *Neisseria meningitidis* und *Haemophilus influenzae*, dort ansetzen (Woof und Kerr, 2006). Weiterhin wird die längere *Hinge*-Region mit einer erhöhten Flexibilität der Antigenbindung in Zusammenhang gebracht (Woof und Russell, 2011). Die schwere und die leichte Kette sind im Fall von IgA1 und IgA2m(1) über eine Disulfidbrücke vernetzt, wohingegen in IgA2m(2) schwere und leichte Ketten durch nicht-kovalente Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verbunden sind. Im Unterschied zu den meisten anderen Antikörperklassen, eine Ausnahme bildet IgM, besitzen beide IgA Subtypen eine 18 Aminosäuren langes C-terminales Endstück (engl. *Tailpiece*). Das *Tailpiece* spielt eine entscheidende Rolle in der Produktion polymeren IgAs. Die zwei Subklassen von IgA nehmen unterschiedliche Funktionen im Immunsystem ein. Im Serum liegen IgA-Antikörper zu etwa 90% als monomeres IgA1 vor. An den Schleimhäuten dominiert sekretorisches und dimeres IgA, wobei sich der Anteil von IgA1 zu IgA2 je nach Kompartiment unterscheidet und mit etwa 60% IgA2 in rektalem Sekret einen der höchsten Werte erreicht. (Woof und Kerr, 2006). IgA1-Antikörper wurden mit einer Neutralisierung von Virionen in Verbindung gebracht (Zhou und Ruprecht, 2014). Die verminderte Anfälligkeit von IgA2 gegenüber bakteriellen Proteasen scheint ein Vorteil in der Verteidigung gegenüber Bakterien zu sein (Pabst, 2012). Unter allen Antikörpern ist IgA die am stärksten und heterogensten glykosylierte Klasse. Für Asparagin-gebundene Glykane (N-Glykane) besitzt IgA1 vier, IgA2m(1) sechs und IgA2m(2) acht Positionen (Woof und Russell, 2011).

1. Einleitung

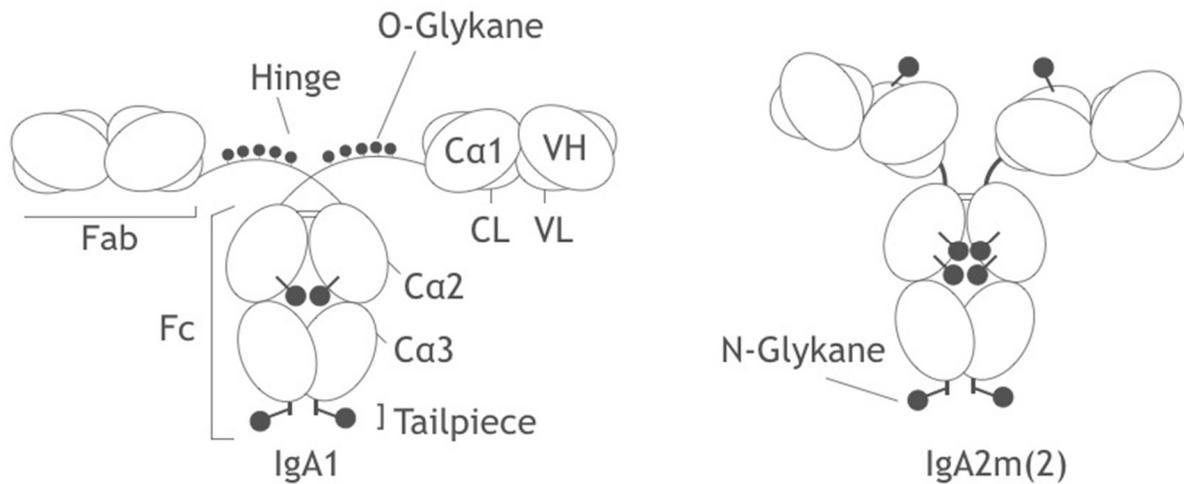


Abbildung 3: Schematische Darstellung der IgA Isotypen.
Links: IgA1, Rechts: IgA2m(2) (Woof und Russell, 2011).

1.3.3 Effektormechanismen von Antikörpern

Antikörpervermittelte Wirkmechanismen können in direkte und indirekte Effekte unterteilt werden. Direkte Effekte werden durch den antigenbindenden F(ab)-Teil des Antikörpers vermittelt. Indirekte Effekte werden demgegenüber durch den konstanten F(c)-Teil des Antikörpers vermittelt (Peipp et al., 2008).

1.3.3.1 F(ab)-vermittelte Effektormechanismen

Die Bindung eines Antikörpers an sein Antigen kann direkte Effekte auslösen. Beschrieben sind die Inhibition von der Rezeptor- oder Liganden-Bindung (Peipp et al., 2008). Auch eine Modulation des Rezeptors sowie eine Behinderung der Rezeptoraktivierung sind bekannte F(ab)-vermittelte Effektormechanismen (Peipp et al., 2008). Antikörper können Fc-unabhängig den direkten Tod der Zielzelle auslösen. Die unterschiedlichen Mechanismen, welche die Induktion eines Zelltods auslösen können, sind unter dem Begriff des programmierten Zelltodes (engl. *programmed cell death*, PCD) zusammengefasst. Hierzu gehören Apoptose, Autophagie und Nekroptose (Fuchs und Steller, 2015). Apoptose ist durch die Beteiligung spezifischer Cystein-Proteasen, den sog. Caspasen, sowie der Integrität der Membran und der Zellorganellen gekennzeichnet (Fuchs und Steller, 2015). Demgegenüber ist eine Schwellung und Zerreißung der Zellmembran typisch für den Prozess der Nekrose. Diese kann infolge eines Zelltraumas unkontrolliert auftreten, bei dieser Form des Zelltodes handelt es sich nicht um PCD. Jedoch kann Nekrose auch über Signalwege induziert werden. In diesem Fall spricht man von programmierter Nekrose (sog. Nekroptose) (Fuchs und Steller, 2015). Autophagie ist ein

1. Einleitung

weiterer Mechanismus des PCD. Hierbei kommt es zum Auftreten sog. Autophagosomen, welche mit Lysosomen fusionieren und eine Degregation von Zellorganellen bewirken (Fuchs und Steller, 2015). Für CD20-gerichtete Antikörper wurde, insbesondere für CLL Zellen, beschrieben, dass eine nach Antikörperbindung erfolgte Quervernetzung (engl. *cross-linking*) der Zielzellen zu Apoptose führen kann. Der Beitrag direkter Effekte an der Effektivität CD20-gerichteter Antikörper bleibt jedoch unklar (Glennie et al., 2007b).

1.3.3.2 Fc-vermittelte Effektormechanismen

Der Fc-Teil von Antikörpern kann durch lösliche Moleküle oder Zellen des Immunsystems erkannt werden. Es gibt eine Vielzahl unterschiedlicher Fc-Rezeptoren die sich in ihrer Affinität zu den verschiedenen Antikörperisotypen unterscheiden. Prinzipiell können die zellulären Effektorzellpopulationen in mononukleäre Zellen (MNC) und polymorphnukleäre Zellen (PMN) unterteilt werden. MNC bestehen aus Monozyten und Lymphozyten. PMN bestehen aus Granulozyten. Die verschiedenen Fc-Rezeptoren werden durch unterschiedliche Zellen exprimiert. Fc-Rezeptoren lassen sich in aktivierende, pro-inflammatorische (engl. *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*, ITAM) und hemmende, anti-inflammatorische (engl. *immunoreceptor tyrosine-based inhibiton motif*, ITIM) einteilen (Glennie et al., 2007a). Fc-Rezeptoren sind ähnlich den Immunglobulinen (engl. *Ig-like*) in mehrere Domänen aufgeteilt, liegen jedoch, im Gegensatz zu Antikörpern, membrangebunden vor. Nach Bindung eines Antikörpers hängt der ausgelöste Effekt maßgeblich davon ab, auf welcher Zelle der Rezeptor exprimiert ist und ob es sich um einen exzitatorischen oder inhibitorischen Rezeptor handelt. Ausgelöste Effekte können etwa Phagozytose, die Freisetzung proteolytischer Enzyme und reaktiver Sauerstoffmoleküle sein (Woof und Burton, 2004). Für Antikörper des IgG-Isotyp existieren 6 verschiedene Fc-Rezeptoren: Fc γ RI (CD64), Fc γ RII mit den Isoformen a,b und c (CD32a, b, c) sowie Fc γ RIII mit den Isoformen a und b (CD16 a, b). Nur Fc γ RI ist in der Lage, monomeres IgG zu binden und wird daher als hoch affiner Rezeptor klassifiziert. Die anderen Fc γ R haben entweder mittlere Affinität zu monomeren IgG-Antikörpern oder binden multimeres, beziehungsweise aggregierte IgG-Antikörper. Sie werden daher als niedrig affine Rezeptoren klassifiziert. Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die verschiedenen Fc γ R sowie die sie exprimierenden Zellen.

Für IgA ist der am besten beschriebene Fc-Rezeptor Fc α RI (CD89). CD89 wird von myeloischen Zellen wie neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, Makrophagen und Monozyten sowie Subpopulationen von dendritischen Zellen exprimiert (Woof und Burton, 2004). Die Bindung von IgA an CD89 erfolgt durch die extrazelluläre Domäne 1 (EC1) von CD89 zwischen den Domänen C α 2 und C α 3 des IgA. Dies unterscheidet Fc α RI von Fc γ R, da

1. Einleitung

Fc γ R an IgG mit der extrazellulären Domäne 2 (EC2) an die *Hinge*-Region des IgG bindet. Ein Molekül IgG wird von einem Fc-Rezeptor gebunden. Demgegenüber erlaubt die unterschiedliche Bindung von IgA an seinen Fc-Rezeptor eine 2:1 Stöchiometrie mit zwei gebundenen Fc-Rezeptoren auf ein IgA Molekül (Woof und Burton, 2004).

Tabelle 3: Übersicht wichtiger humaner Fc-Rezeptoren von IgG- und IgA-Antikörper (Woof und Burton, 2004)

Fc-Rezeptor	Isoformen	Affinität zu monomerem Ig	Signalkaskade	Zelluläre Verteilung
FcγRI (CD64)		hoch	exzitatorisch	Monozyten, neutrophile Granulozyten & Makrophagen, eosinophile Granulozyten
FcγRII (CD32)	Fc γ RIIa	niedrig	exzitatorisch	Monozyten, neutrophile Thrombozyten, Makrophagen, Langerhans Zellen
	Fc γ RIIb	niedrig	inhibitorisch	Monozyten, Makrophagen, B-Zellen
	Fc γ RIIc	niedrig	exzitatorisch	Monozyten, neutrophile Granulozyten, Makrophagen, B-Zellen
FcγRIII (CD16)	Fc γ RIIIa	medium	exzitatorisch	Makrophagen, NK-Zellen, einige T-Zellen und Monozyten
	Fc γ RIIIb	niedrig	exzitatorisch	neutrophile Granulozyten, Eosinophile
FcαRI (CD89)		medium	exzitatorisch	Neutrophile & eosinophile Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, Kupfer-Zellen, einige DC-Zellen

Die Bindung von IgA an CD89 induziert eine Reihe pro-inflammatorischer Effekte. Nach der Aktivierung von Granulozyten und Monozyten über CD89 erfolgt die Bildung von Sauerstoffradikalen sowie die Freisetzung zytolytischer Enzyme, welche Schädigungen und den Tod der Zielzelle verursachen können (Woof und Burton, 2004, Pasquier et al., 2005, Bakema und van Egmond, 2011). Dieser Prozess wird als antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (engl. *antibody-dependent cellular cytotoxicity*, ADCC) bezeichnet. Für CD20-gerichtete Antikörper des IgG-Isotyps wurde gezeigt, dass es in Mäusen mit Knock-Out-Mutationen für Fc γ -Rezeptoren zu einem Verlust des antineoplastischen Effektes kommt (Boross und Leusen, 2012). Die antikörperabhängige zelluläre Phagozytose (engl. *antibody-dependent cellular phagocytosis*, ADCP) stellt einen weiteren Mechanismus der Fc-abhängigen

1. Einleitung

Pathogenabwehr dar. Hierbei kommt es nach Bindung des Antikörpers an einen Fc-Rezeptor zu zytoskeletalen Veränderungen, welche letztlich zur Bildung eines Phagosoms und der Degradierung des Pathogens führen (Cleary et al., 2017). Die Rolle der ADCP an der Antitumoraktivität CD20-gerichteter Antikörper ist erst in jüngerer Vergangenheit in den Fokus wissenschaftlicher Aufmerksamkeit gerückt. Für IgA-Antikörper liegen daher keine Daten vor.

1.3.3.2.1 Das Komplementsystem und komplementabhängige Zytotoxizität (CDC)

Das Komplementsystem ist ein dem angeborenen Immunsystem zugeordneter Abwehrmechanismus des Körpers. Es handelt sich um eine Kaskade aus über 30, sich gegenseitig aktivierenden Proteinen, mit dem Ziel, Erreger oder körpereigene Zellen zu erkennen und zu eliminieren (Sim und Tsiftoglou, 2004). Unter den Komplementproteinen sind zehn Serin-Proteasen, welche physiologisch inaktiv als Proenzyme vorliegen. Der zentrale Schritt in der Komplementkaskade ist die Aktivierung des Komplementfaktors C3 durch Spaltung in die Faktoren C3a und C3b. Dies kann entweder autohydrolytisch (alternativer Weg) oder durch eine C3-Konvertase (klassischer Weg, Lektin-Weg) geschehen (Melis et al., 2015). Bei einer Aktivierung über den klassischen Weg, bindet das Erkennungsprotein C1q direkt an geladene Moleküle auf der Zelloberfläche oder an den Fc-Teil zellgebundener Immunglobuline mit C1q-Bindungsdomäne (IgG, IgM). C1q liegt mit den Serinproteasen C1r und C1s als Komplex assoziiert vor. Durch die Bindung entsteht eine Konformationsänderung, welche die Serin-Protease C1r aktiviert, die ihrerseits C1s aktiviert. C1s spaltet den Faktor C2 welcher wiederum den Faktor C4 spaltet. Die Spaltprodukte C2a und C4b assoziieren zur C3-Konvertase C4b2a. Mannan-bindendes Lektin (MBL) ist das Erkennungsprotein des Lektin-Weges und bindet an neutrale Zucker. MBL ist homolog zu C1q aufgebaut und liegt mit der Serin-Protease MASP2 assoziiert vor. Es kommt analog zum klassischen Weg zur Bildung der C3-Konvertase C4b2a (Melis et al., 2015).

1. Einleitung

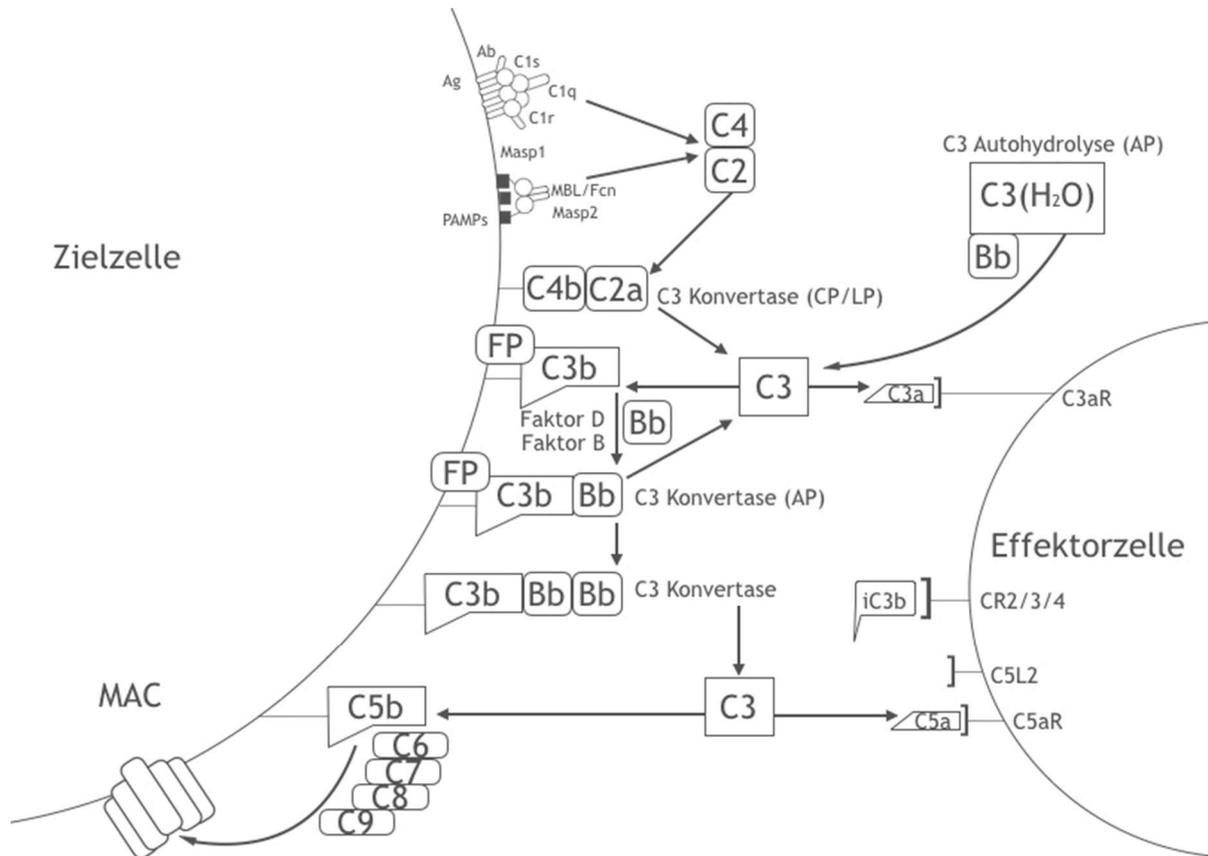


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Komplementsystems.

CP Classical Pathway, AP Alternative Pathway, MAC Membran Attack Complex (Melis et al., 2015).

Die C3-Aktivierung auf dem alternativen Weg erfolgt durch spontane Hydrolyse von C3 selbst. An das so entstandene Molekül $C3(H_2O)$ bindet der Faktor B. Nach Komplexbildung von Faktor B mit $C3(H_2O)$ kann der Faktor B durch den Faktor D gespalten werden und es entsteht die C3-Konvertase $C3iBb$. $C3a$ und $C3b$ erfüllen unterschiedliche Funktionen in der Immunantwort. $C3a$ wirkt als Anaphylatoxin, $C3b$ kann auf der Zelloberfläche binden und markiert diese. Zellgebundenes $C3b$ kann durch den Faktor B gebunden werden. Es entsteht der Komplex $C3bB$. Der Faktor B in diesem Komplex kann wiederum durch den Faktor D gespalten werden und es entsteht die C3-Konvertase $C3bBb$. Hierbei handelt es sich um eine Amplifikation des ursprünglichen Signals, da auf diesem Weg mehr $C3b$ entsteht, welches wiederum zur C3-Konvertase $C3bBb$ werden kann. $C3b$ kann an den $C4b2a$ Komplex binden und die C5-Konvertase $C4b2a3b$ bilden, welche C5 in $C5a$ und $C5b$ spaltet. $C5b$ leitet die Bildung eines Membran-Angriff Komplex (MAC) ein, welche zu einer Zelllyse führen kann. Das Komplementsystem ist stark reguliert. Zellgebundene und lösliche Moleküle stellen sicher, dass eine Aktivierung unterbrochen werden kann und nicht auf gesunde Zellen übergreift.

1.4 IgA als therapeutischer Antikörper

Das therapeutische Potential von Antikörpern des IgA-Isotyps wurde bereits für unterschiedliche Antigene untersucht. IgA bindet im Körper nicht wie IgG an den neonatalen Fc-Rezeptor FcRn. Durch die Bindung an FcRn erfolgt eine Internalisierung von Antikörpern des IgG-Isotyps. Dies wirkt einer Degradation durch Proteasen entgegen und ist ursächlich für die längere Halbwertszeit der IgG-Antikörper von etwa 21 Tagen (Ghetie und Ward, 2002). Der Asialoglykoproteinrezeptor (ASGPR) wird auf Hepatozyten exprimiert und erkennt terminale Galaktose. IgA-Antikörper werden aufgrund ihrer starken Glykosylierung durch den ASGPR gebunden und dem Blutkreislauf entzogen (Boross et al., 2013). Vorhergehende Studien zeigten, dass eine Blockierung des ASGPR die Halbwertszeit von EGFR-gerichteten IgA2-Antikörpern verlängern kann. Weiterhin zeigten *in vivo* Experimente mit EGFR-gerichteten IgA2-Antikörpern, dass diese deutlich längere Serumhalbwertszeiten aufwiesen, wenn terminale Galaktose reduziert wurde (Lohse et al., 2016).

In vorhergehenden Studien konnte bereits gezeigt werden, dass IgA-Antikörper besonders effektiv myeloische Effektorzellen rekrutieren (Dechant und Valerius, 2001). Für monomere und dimere EGFR-gerichtete IgA-Antikörper wurde in *in vitro* Studien gezeigt, dass ADCC für die Elimination EGFR-tragender Tumorzellen ein wichtiger Effektormechanismus ist (Lohse et al., 2011). Weiterhin vermittelten EGFR-gerichtete IgA2-Antikörper auch *in vivo* effektiv ADCC mittels myeloischer Effektorzellen (Lohse et al., 2016). Auch für die Antigene EpCAM, MCH Klasse II und HER-2/neu konnte gezeigt werden, dass IgA effektiv myeloische Effektorzellen rekrutiert (Dechant und Valerius, 2001, Dechant et al., 2002). Für CD20-gerichtete IgA-Antikörper ist die Datenlage jedoch weniger umfangreich. Untersucht wurde die Kapazität von Fc α RI/CD20 bispezifischen IgG-Antikörpern zur Tumorzelllyse lymphatischer Neoplasien. Die in diesen Experimenten eingesetzten bispezifischen Antikörper waren effektiv zur Tumorzelllyse in der Lage. ADCC durch myeloische PMN-Zellen war in diesem Modell der tragende Effektormechanismus (Stockmeyer et al., 2000). Bei der Untersuchung humanen IgAs *in vivo* muss bedacht werden, dass Mäuse kein funktionelles Ortholog des humanen Fc α RI (CD89) exprimieren. Es wurden daher in der Vergangenheit hFc α RI-transgene Mäuse etabliert (Boross et al., 2013). In einem für hFc α RI-transgenen Mausmodell untersuchten Pascal et al. 2012 die Effektormechanismen CD20-gerichteter IgA Antikörper (Pascal et al., 2012). In diesem Modell zeigte sich eine Zunahme der *in vivo*-Effektivität CD20-gerichteten IgA-Antikörper in hFc α RI transgenen Mäusen. Diese Daten suggerierten somit ebenfalls myeloische Effektorzellen als Rückgrat der Tumorzelllyse. In diesen Versuchen wurde die Rolle von ADCP an der beobachteten Tumorzelllyse nicht untersucht. Weiterhin wurde *in vitro*

1. Einleitung

beobachtete CDC *in vivo* nicht weiter untersucht. Die Rolle komplementvermittelter Zytotoxizität an der Effektivität von IgA-Antikörpern ist ein kontrovers diskutierter Aspekt. Dass IgA Antikörper in der Lage sind CDC zu vermitteln, wurde in der Vergangenheit gezeigt (Hiemstra et al., 1987, Lucisano Valim und Lachmann, 1991, Roos et al., 2001, Terai et al., 2006). Jedoch werden diese Ergebnisse in der Literatur kritisch diskutiert, da eine artifizielle Aktivierung des Komplementsystems nicht auszuschließen ist (Woof und Russell, 2011). Aktuell ist somit nicht klar, welchen Beitrag die Unterschiedlichen Effektormechanismen an der Effektivität CD20-gerichteter IgA-Antikörper haben.

1.5 Fragestellung und Zielsetzung

Die funktionelle Charakterisierung eines CD20-gerichteten IgA2-Antikörpers stellt den thematischen Schwerpunkt dieser Arbeit dar und hat zum Ziel, dessen therapeutisches Potential zu erfassen, sowie die zugrundeliegenden Effektormechanismen darzulegen.

Mit Rituximab steht seit 1997 für die Klinik ein chimärer, monoklonaler Antikörper gegen CD20 zur Verfügung. Alle therapeutisch eingesetzten sowie in Entwicklung befindlichen CD20-Antikörper sind vom IgG-Isotyp. Jedoch könnte ein Wechsel vom IgG- zum IgA-Isotyp oder deren Kombination eine Reihe von Vorteilen mit sich bringen: IgA-Antikörper können über Fc α RI Granulozyten sowie Monozyten und Makrophagen rekrutieren und sprechen somit eine andere Effektorpopulation als IgG-Antikörper an, wobei Granulozyten zahlenmäßig die größte Population an Effektorzellen des Körpers darstellen. Die effektivere Interaktion mit dem Fc-Rezeptor und die damit verbundene stärkere Aktivierung von zytolytischen Wirkmechanismen stellen weitere Vorteile dar. Aktuell ist somit unklar, welchen Beitrag die unterschiedlichen Effektormechanismen an der Effektivität CD20-gerichteter IgA-Antikörper haben. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Wirkmechanismen CD20-gerichteter Antikörper des IgA2-Isotyps *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen.

2. Material und Methoden

2.1 Ethikvotum und Einverständnis der Spender

Alle Experimente innerhalb dieser Arbeit wurden von der Ethikkommission der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki begutachtet. Die Blutspender wurden zufällig aus einer Gruppe von gesunden Freiwilligen ausgewählt, welche vor Analyse schriftlich ihr Einverständnis gegeben hatten. Die Erhebung der tierexperimentellen Daten erfolgte an der Universität Southampton in Übereinstimmung mit den Ethikrichtlinien der Universität.

2.2 Material

Eine vollständige Liste der verwendeten Materialien findet sich im Anhang dieser Arbeit.

2.3 Methoden

2.3.1 Molekularbiologische Methoden

2.3.1.1 Herstellung antikörperproduzierender Zellklone

Stabil transfizierte, antikörperproduzierende Einzelklone der untersuchten 1F5 Antikörper standen zu Beginn dieser Arbeit bereits zu Verfügung. Das genutzte IgA-Konstrukt basiert auf einem durch Boel etablierten und durch Dechant weiterentwickelten Produktionssystem (Boel et al., 2000, Dechant et al., 2002). Die Klonierung der variablen Regionen der 1F5 Antikörper erfolgte nach dem durch Boel geschilderten Verfahren (Boel et al., 2000). Die auf diese Weise generierten variablen Regionen wurden in den pNUT Vektor subkloniert, welcher die Gene für die leichten und schweren Ketten des IgG1- und des IgA2-Antikörpers kodiert (Beyer et al., 2009). Anschließend wurden BHK-Zellen nach einem bereits etablierten Protokoll mit dem produzierten Vektor transfiziert, und antikörperproduzierende Einzelklone mittels Grenzverdünnungsklonierung selektioniert (Beyer et al., 2009).

2.3.1.2 Produktion der rekombinanten CD20-Antikörper im Bioreaktor

Einzelklone antikörperproduzierender BHK-Zellen wurden anschließend in normalen Zellkulturflaschen mit Iscove Modified Dulbecco Medium (IMDM) (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) kultiviert. Diesem wurden 10% hitzeinaktiviertes Kälberserum (engl. *fetal calf serum*, FCS), 20 µM Methotrexat und 100 µM ZnCl₂ (beide bezogen von Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) zugesetzt. Für die Antikörperproduktion wurden 2×10^7 Zellen in Cellline CL1000 Bioreaktoren (Bioscience, Fernwald, D) ausgesät. Um die Zellanhaftung zu erhöhen, wurde die Zellsuspension mit 0.4 g kollagenbeschichteter Mikroträger (Kollagen beschichtete Solohill Microcarrier Beads von Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) inokuliert. Die

2. Material und Methoden

Suspension aus Zellen und Mikroträgern wurde wöchentlich geerntet und mit frischem Medium aufgefüllt. Die entnommenen Überstände wurden zehn Minuten bei 4000 Umdrehungen pro Minute (U/min) zentrifugiert und anschließend bei 4°C gelagert. Nach 4 Wochen wurden Zellen und Mikroträger 1:2 verdünnt. 0.2 Gramm Mikroträger wurden zusätzlich hinzugegeben und die Suspension wurde reinokuliert.

2.3.1.3 Aufreinigung der Antikörper

Die Aufreinigung der Antikörper erfolgte wie bereits zuvor beschrieben als zweistufiges Verfahren (Beyer et al., 2009).

2.3.1.3.1 Affinitätschromatografie mittels ahu- κ Matrix

In einem chromatografischen Trennverfahren wurde der gelöste Antikörper über eine stationäre Phase aus quervernetzter Agarose (Sephacrose) geführt. An die Sepharose-Kügelchen sind hierbei Kamelantikörperfragmente gegen die humane κ -Leichtkette geknüpft (sog. ahu- κ Matrix). Nach vorheriger Reinigung mit destilliertem Wasser (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) und Ethanol (BÜFA Chemikalien, Hude, D) wurde die Chromatographiesäule (XK16, GE Healthcare, St Giles, UK) zusammengesetzt und erneut mit 20% Ethanol gespült. Die Matrix wurde auf die Säule übertragen und diese mit 1% NaOH (Carl ROTH, Karlsruhe, D), destilliertem Wasser und 1 x PBS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) gespült. Es wurden 10 ml 1 x PBS auf die Säule aufgeschichtet und durch Öffnen des unteren Ventils abgelassen, so dass es zu einer Verdichtung der Matrix kam. Dieser Schritt wurde mehrmals wiederholt. Anschließend wurde die Säule an das Pumpensystem angeschlossen und mit fünf Säulenvolumen 1 x PBS (jeweils fünf Milliliter) gespült. Nachfolgend wurde das System an das HPLC-System angeschlossen und es erfolgte eine Äquilibration der Säulen mit fünf Säulenvolumen 1x PBS. Die Säule wurde anschließend bei einer Flussrate von 1 ml/min mit dem dreifachen Volumen der Antikörperlösung beladen. Der selbstproduzierte Antikörper wurde mit 0.1 M Glycin (pH 2.0) (Carl ROTH, Karlsruhe, D) gelöst und der pH wurde mit Neutralisierungspuffer (1 M Tris-HCL, pH 8.9)(Carl ROTH, Karlsruhe, D) direkt auf einen physiologischen pH ausgeglichen.

2.3.1.3.2 Größenausschlusschromatografie

Die produzierten Antikörper wurden mittels Größenexklusion auf einer 26x600 mm Superdex200-Säule und einem AKTAprime-liquid-Chromatografie-System (GE Healthcare, München, D) aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte analog zu dem durch Beyer bereits geschilderten Verfahren (Beyer et al., 2009). Da aus technischen Gründen nur ein maximales Volumen von zwei Milliliter aufgetragen werden konnte, musste das Eluat aufkonzentriert

2. Material und Methoden

werden. In Ultrafiltrationseinheiten (Vivaspin 15, 100 kDa cut off, Sartorius, Göttingen, D) wurden 14 ml des Eluats bei 4 °C und 1000 U/min zentrifugiert. Dieser Vorgang musste mehrfach wiederholt werden. Die Säule und die Schläuche wurden mit 1 x PBS gespült, anschließend wurden der monoklonale Antikörper über eine 2 ml Schleife und einer Flußrate von 1 ml/min in das System eingeführt. UV-aktive aromatische Aminosäuren absorbieren ultraviolettes Licht bei einem Maximum von 280 Nanometer (nm). Dies ist Grundlage der Proteindetektion mittels Absorptionsmessung und wurde für die Fraktionierung der selbstproduzierten 1F5 Antikörper genutzt. Die Kalibrierung der Säule erfolgte mit einem HMW Gel Filtration Calibration Set (GE Healthcare, München, D), welches nach Herstellerprotokoll verwendet wurde. Die Einstellung der Laufrate beider monoklonaler 1F5 Antikörper (Isotyp IgG1 und IgA2) erfolgte gegenüber einer Referenzkalibrierung mit 500 µg eines erworbenen, monomeren IgG1- (Cetuximab, Merck, Darmstadt, D) und IgA2-Antikörpers (IgA2 κ, Meridian Life Science Memphis, TN, USA). Unterhalb von 100 Absorptionseinheiten (AU) erfolgte die Sammlung in Fraktionen von je 10 ml, oberhalb von 100 AU in 2.5 ml Fraktionen. Die UV Absorption (bei 280 nm), der pH und die Konduktivität des ausfließenden Stroms wurde kontinuierlich aufgezeichnet und mit Unicorn 4.11 Software (GE Healthcare, München, D) analysiert. Der auf diese Weise gewonnene monomere Antikörper wurde anschließend steril filtriert und bei 4 °C gelagert.

2.3.1.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Die Bestimmung der Produktionsrate erfolgte in einem klassischen Sandwich ELISA (engl. *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*, ELISA). Die Beschichtung der optisch aktiven 8-Well Streifen (Nunc Immunosorp, Roskilde, Danmark) erfolgte über 24 Stunden bei 4 °C mit 100 µl einer 1:1000 Verdünnung mit einem von einer Ziege stammenden anti-humanen κ-Leichtketten Antikörper (Abcam, Cambridge, UK). Die nachfolgenden Schritte fanden bei Raumtemperatur statt. Anschließend erfolgten drei Waschgänge mit einer Waschlösung bestehend aus 1 x PBS mit 3% BSA (Carl ROTH, Karlsruhe, D) und 0.05% Tween20 (Merck, Darmstadt, D). Jedes Well wurde anschließend mit 100 µl 1 x PBS beladen und eine Verdünnungsreihe mit entweder 1F5-IgA2 oder 1F5-IgG1 angelegt. Die Auftragung erfolgte immer parallel zu einer Verdünnungsreihe eines gekauften IgA2 (IgA2 kappa, Meridian Life Science Memphis, TN, USA) oder IgG1 (Cetuximab, Merck, Darmstadt, D) Antikörpers in bekannter Konzentration zur Generierung einer Standardkurve. Nach einer Stunde Inkubationszeit wurde dreimal mit 1 x PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Hinzugabe eines polyklonalen, Peroxidasegekoppelten Antikörpers der Ziege gegen IgA- oder IgG-Antikörper (beide Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Hieran schloss sich erneut eine Inkubation für eine Stunde an.

2. Material und Methoden

Nachfolgend wurden alle Wells mit 1 x PBS mit 3% BSA und 0.05 % Tween 20 mehrfach ausgewaschen. Hiernach erfolgte die Zugabe von 200 µl des Substrates (Sigma Fast OPD™, MSX, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Die Umsetzung des Substrates durch die Peroxidase dauerte circa 20 min, danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 3 M Salzsäure (Carl ROTH, Karlsruhe, D) gestoppt. Die Absorption wurden im Sunrise™ Plate-Reader (Tecan Group Ltd. Männerdorf, CH) bei 492 nm Wellenlänge und einer Referenzwellenlänge von 670 nm bestimmt.

2.3.1.4.1 Nachweis von Komplementdeposition

Der Nachweis der Deposition von rekombinantem humanen C1q (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) wurde ebenfalls als Sandwich-*ELISA* durchgeführt. Die Inkubations- und Waschschriffe erfolgten analog zu dem oben geschilderten Protokoll. 96-Well Platten (Sarstedt, Nümbrecht, D) wurden mit 5 µg/ml C1q als Positivkontrolle, 1 x PBS als Negativkontrolle oder dem untersuchten Antikörper über Nacht bei 4 °C beschichtet. Nach mehrmaligem Waschen mit 1 x PBS mit 3% BSA und 0.05% Tween20 folgte die Inkubation mit 2.5 µg/ml C1q für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend wurden mehrere Waschriffe mit 1 x PBS mit 3% BSA und 0.05 % Tween 20 vorgenommen. Nachfolgend wurde den Proben ein polyklonaler HRP-gekoppelter anti-humaner C1q Antikörper (Comptech, Tyler, TX, USA) zugegeben und es folgte eine erneute Inkubation für eine Stunde. Anschließend wurde erneut mit 1 x PBS gespült und das Substrat (Sigma Fast OPD™, MSX, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) zugegeben. Die Reaktion wurde nach 15 Minuten durch Beigabe von 3M HCl unterbrochen und die Absorption im Sunrise™ Plate-Reader untersucht.

2.3.2 Biochemische Methoden

2.3.2.1 Immunfluoreszenzen

Bei dem Verfahren der Durchflusszytometrie werden einzelne Zellen in hoher Geschwindigkeit an einem Laser vorbeigeführt und verursachen dadurch Streuung. Diese Streuung lässt Rückschlüsse über Größe und Beschaffenheit der Zelle zu. Ist die Zelle zuvor mit einem Fluorochrom-markierten Antikörpern beladen worden, emittiert diese bei Durchtritt durch den Laser Fluoreszenz. Hierbei wird zwischen direkter und indirekter Immunfluoreszenz unterschieden. Bei der direkten Immunfluoreszenz wird ein Fluorochrom-markierter Primäantikörper verwendet. Die Bindung eines Fluorochrom-markierten Sekundäantikörper an einen Primäantikörper wird als indirekte Immunfluoreszenz bezeichnet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden unterschiedliche Immunfluoreszenzen durchgeführt, die Tabelle 15 im Anhang gibt eine vollständige Übersicht über diese. Für die Untersuchungen wurden $1,5 \times 10^5$ Zellen

2. Material und Methoden

mit 10 µl Antikörper einer 200 µg/ml Lösung für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit zugesetztem 1xPBS, 1% BSA sowie 0.1 % Natriumazid gewaschen. Im Falle direkter Immunfluoreszenz wurde die Antikörperbindung mit einem aus der Ziege stammenden, FITC gekoppelten Antikörper gegen die humane Kappa-Leichtkette (Caltac, Burlingam, CA) detektiert. Bei den Nachweisen der Fc-Rezeptoren wurde für die Blockierung unspezifischer Bindungen der Antikörper an die Fc-Rezeptoren 10 µl 5mg/ml Intratect zugegeben. Nach 30 Minuten Inkubation wurden die Zellen wiederum mit der o.g. Lösung gewaschen und durchflusszytometrisch analysiert. Alle Proben wurden in einem Coulter EPICS XL-MCL Durchflusszytometer (Beckman Coulter, Fullerton, CA) untersucht. Eine Messung wurde jeweils beendet, nachdem 1×10^4 Ereignisse festgestellt wurden oder 100 Sekunden vergangen waren. Die Auswertung erfolgte mit XL-System II Software (version 3.0, Beckman Coulter). Relative Fluoreszenzintensitäten wurden berechnet als die Ratio durchschnittlicher linearer Fluoreszenzintensität relevanter gegenüber irrelevanter Isotypen-gematchter Antikörper, wobei 100% den größten gemessenen Wert darstellt.

2.3.2.2 Zellviabilität

Ein Kennzeichen von Apoptose und Nekrose ist der Verlust der Integrität der Zellmembran. Proteine, welche eigentlich streng intrazellulär vorkommen wie beispielsweise Phosphatidylserin (PS), werden in nekrotischen und apoptotischen Zellen nach außen verlagert. PS kann durch eine Färbung mit Fluorochrom-markierten Annexin-V nachgewiesen und durchflusszytometrisch analysiert werden (Koopman et al., 1994). In Ergänzung erfolgt eine Färbung mit 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD). Gesunde Zellen transportieren 7-AAD aus der Zelle heraus. Eine ausbleibende Färbung in der fluoreszenzchromatografischen Analyse mit 7-AAD kann somit als Maß für die Zellviabilität herangezogen werden (Schmid, Krall, Uittenbogaart, Braun, & Giorgi, 1992). Annexin V und 7-AAD wurden von BD Bioscience (Franklin Lakes, NJ, USA) erworben und nach Herstellerprotokoll verwendet. Hierfür wurden Ramos Zellen 48 Stunden mit CD20-gerichteten 1F5-IgG1 und 1F5-IgA2 Antikörpern, entsprechenden Isotypkontrollen sowie der Positivkontrolle Tositumomab, einem Typ II CD20 Antikörper, inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Bindungspuffer, welchem 10 mM HEPES, 0,14 M NaCl (beide Merck, Darmstadt, D) und 2,5 mM CaCl₂ (Honeywell Riedel-de Haën AG, Seelze, D) zugesetzt wurden, gewaschen. Es folgte die Färbung mit Annexin-V und 7-AAD in Bindungspuffer bei Raumtemperatur für 15 Minuten. Die Messungen erfolgten auf einem FACS Canto II und wurden mit FACS Diva Software (beide BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) analysiert. Die relative Anzahl an Ramos Zellen wurde nach Zugabe von

2. Material und Methoden

Referenz *Beads* (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) ebenfalls auf einem FACS CANTO II mit FACS Diva Software bestimmt.

2.3.2.3 Immunblots

2.3.2.3.1 Western Blots

Grundlage des Proteinnachweises im Western Blot ist die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe sowie dem anschließenden Transfer auf eine Membran zur weiteren immunologischen Analyse. Für die Western Blots wurden 3-8% Tris-Acetat Gele (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) verwendet. Die Gelkammer wurde mit 2,5 µl des Antikörpers 17,5 µl 1 x PBS und 6 µl 5 x Laemli-Puffer beladen. Für die Bestimmung der Größe der analysierten Antikörper wurde eine Proteinleiter mit Banden in definierter Größe (Precision Plus Standard, Biorad) aufgetragen. Für Antikörper, welche unter denaturierenden Bedingungen untersucht wurden, erfolgte eine thermische Behandlung bei 94°C für 4 Minuten. Der Gellauf fand bei 80V über 2,5h Stunden in 1xTris-Acetat Puffer statt. Der Transfer der Antikörper auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) (Amershan Hybond™-P, GE Healthcare, St Giles, UK) fand im Anderson-Puffer (6 g Tris, 28,8 g Glycin, 10 ml 10 % SDS-Lösung 200 ml Methanol) bei 0.13 A pro Gel über 105 Minuten in einer TRANS-BLOT® SD Semi-Dry Transferzelle (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) statt. Die Membranen wurden anschließend mit Blockierungspuffer (1x-TBS + 5 % (w/v) Magermilchpulver) behandelt. Die Detektion der selbstproduzierten 1F5-Antikörper erfolgte mit Antikörpern gegen die humane α - (goat anti human α HRP), γ - (Goat Anti-Human IgG Secondary Antibody HRP) oder κ -Kette (goat anti human kappa HRP) in 2% BSA und 1,0% Magermilchpulver über 1 Stunde bei Raumtemperatur. Im Folgenden wurden die Membranen dreimal mit Western Blot-Wasch Puffer (1x TBS supplementiert mit 0,1 % v/v Tween) für 30 min gewaschen. Die Proteine wurden daraufhin mittels Chemilumineszenz (SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate Kit, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) im Gel Doc™ XR+ System (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) visualisiert.

2.3.2.3.2 Lectin Blots

Auch für die Lectin Blots wurden 3-8% Tris-Acetat Gele verwendet. Die Gelkammer wurde mit 5 µl des Antikörpers, 15 µl 1 x PBS und 6 µl 5 x Laemli-Puffer beladen. Der Gellauf und der Membrantransfer erfolgten analog zu dem o.g. Protokoll bei Western Blots. Nach dem Transfer wurde die Membran mit Blockierungspuffer (50mM Tris/HCl pH 8, 90mM NaCl, 2mM CaCl₂, 50mg/ml BSA) über Nacht bei 37°C behandelt. Am nächsten Tag erfolgte die Zugabe von 25 µl (Aleuria Aurantia, Ricinus communus agglutinin I) oder 8 µl (Concanavalin

2. Material und Methoden

A) der Lectine und eine Inkubation über 2 Stunden bei Raumtemperatur. Tabelle 4 gibt eine Übersicht über die verwendeten Lektine und die durch diese bevorzugt erkannten Glykosylierungen. Die Proben wurden hiernach mit Waschpuffer (50mM Tris/HCl pH 8, 90mM NaCl, 2mM CaCl₂, 5mg/ml BSA, 0,05% Tween20) gewaschen. Anschließend erfolgte die Detektion in Pufferlösung (0,05% Tween20) mit 0,5µg/ml NeutrAvidin-HRP über 30 Minuten. Nach Abschluss der Detektion wurde intensiv mit Pufferlösung (50 mM Tris, 90 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, pH 8.0, 5 mg/ml BSA, 0,05% Tween20) gespült. Die Chemilumineszenzdetektion erfolgte analog zum Verfahren bei den Western Blots.

Tabelle 4: Verwendete Lectine und durch sie bevorzugt gebundene Glykosylierung

Lectin	Bevorzugte Glykosylierung
Aleuria Aurantia (AAL)	Fucose- α 6-N-Acetylglucosamine
Ricinus communis agglutinin I (RCAI)	Galaktose
Concanavalin A (ConA)	α -Mannose, α -Glucose

2.3.2.4 Silberfärbung

Für die Silberfärbung wurde das Roti-Black-P Kit (Carl ROTH, Karlsruhe, D) nach Herstellerprotokoll benutzt. Es wurden 200 ng des 1F5 Antikörpers aufgetragen. Positiv geladene Silberionen lagern sich an negativ geladene Moleküle und färben diese in einer Reduktion mit Formaldehyd zu elementarem Silber-Proteinbanden schwarz. Durch Silberfärbung ist der Nachweis geringer Proteinmengen von 1 ng möglich.

2.3.3 Zellbiologische Methoden

2.3.3.1 Zellkultur

Alle benutzten Zelllinien wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig erworben. Jede Zelllinie wurde zweimal pro Woche passagiert. Adhärente Zellen wurden hierfür, nachdem ihr Kulturmedium entfernt wurde, mit Trypsin-EDTA (0,25%) vorbehandelt und für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden sie in ihrem jeweiligen Medium resuspendiert. Hiernach wurden die Zellen je nach Verdopplungszeit mit Medium 1:2 bis 1:50 verdünnt und neu ausgesät (25 cm², 75 cm², 150 cm² Kulturflaschen). Für jene Zellen die sich von vornerein in Suspension befanden, wurde der gleiche Ablauf vorgenommen ohne sie zuvor zu trypsinieren. Ramos, Raji, Daudi und BHK wurden in Roswell Park Memorial Institute 1640-Glutamax-I (RPMI 1640) mit 10% fetalem Kälbererum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin (PS) kultiviert, ARH77 und Mino in RPMI

2. Material und Methoden

1640 mit 20% FCS und 1% PS. Mec-2 und Wien-133 wurden in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) mit 10% FCS und 1% PS kultiviert, Granta-519 in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ebenfalls mit 10% FCS und 1% PS. Alle Zellen wurden in einem Inkubator bei 37 °C und 5%CO₂ gezüchtet.

Tabelle 5: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Medium	Zusätze	Referenz	
ARH77	Plasmazell- Leukämie, positiv	Zell EBV	RPMI 1640	20% FCS 1% PS	(Drewinko et al., 1984)
BHK-21 CD89+ CD16+	Niere des syrischen Goldhamsters		RPMI 1640	10% FCS 1% PS	(Dechant et al., 2007)
Daudi	Humanes Lymphom, negativ	Burkitt EBV	RPMI 1640	10% FCS 1% PS	(Klein et al., 1968)
Granta- 519	Mantelzelllymphom (B-NHL), EBV positiv		DMEM	10% FCS 1% PS	(Rudolph et al., 2004)
Mec2	Chronische Leukämie EBV positiv	B-Zell (B-CLL),	IMDM	10% FCS 1% PS	(Stacchini et al., 1999)
Mino	Mantelzelllymphom (B-NHL)		RPMI 1640	20% FCS 1%PS	(Lai et al., 2002)
Raji	Humanes Lymphom, negativ	Burkitt EBV	RPMI 1640	10% FCS 1% PS	(Pulvertaft, 1964)
Ramos	Humanes Lymphom, negativ	Burkitt EBV	RPMI 1640	10% FCS 1% PS	(Klein et al., 1975)
Wien-133	Humanes Lymphom	Burkitt	IMDM	10% FCS 1% PS	(Nacheva et al., 1987)
CHO CD20+	Chinese Hamster Cell	Ovarian	RPMI 1640	10% FCS 1% PS	Dechant, nicht publiziert

2.3.3.2 Präparation von humanem Vollblut

2.3.3.2.1 Gewinnung von PMN und MNC

Die Blutspender wurden zufällig aus einer Gruppe von gesunden Freiwilligen ausgewählt, welche vor Analyse schriftlich ihr Einverständnis gegeben hatten. Die Blutentnahme erfolgte in Citrat-Monovetten á 1,8 ml (Sarstedt, Nümbrecht, D). Die Gewinnung der Effektorzellen aus dem Blut erfolgte über einen Dichtegradienten. Das Funktionsprinzip dieser Methode ist die Separation von Molekülen auf Grundlage ihrer Sedimentationsgeschwindigkeit unter dem Einfluss von Zentrifugalkräften. Optimal wird die Auftrennung durch die Zugabe von Percoll.

2. Material und Methoden

Bei Percoll handelt es sich um kolloidales Siliciumdioxid (Silica), welches mit Polyvinylpyrrolidon (PVP) beschichtet wurde (Pertoft, 2000). PMN bestehen hauptsächlich aus neutrophilen Granulozyten. MNC bestehen überwiegend aus Monozyten und Lymphozyten. Nach der Zentrifugation schichtet sich die Suspension in 4-5 Schichten, welche sich von oben nach unten wie folgt gliedern: Serum, MNC Percoll, PMN, Erythrozyten. Die Abnahme der jeweiligen Fraktion erfolgte mit einer serologischen Pipette. Für die Pipettierung der PMN ist eine Durchstoßung der Percoll-Phase notwendig. Da auch in der Erythrozyten-Schicht PMN enthalten sind, wurde diese Phase für die Gewinnung der PMN mit aufgenommen. Dies machte im Gegensatz zur Präparation der MNC bei der Präparation der PMN eine nachfolgende Erythrozytenlyse notwendig. Tabelle 6 gibt eine Übersicht über die zur Gewinnung von MNC und PMN verwendeten Protokolle.

Tabelle 6: Protokoll zur Präparation von MNC und PMN

Arbeitsschritt		
Beladung eines 15 ml Falcon	3 ml 70% Percoll (35 ml Percoll und 15 ml 1 x PBS)	
	3 ml 63% Percoll (31.5 ml Percoll und 18.5 ml Hanks)	
	10 ml Citratblut	
Zentrifugation	20 min bei 2500 U/min, Bremseinstellung 1	
	MNC	PMN
Abnahme der Fraktion	Präparation der zweiten Fraktion von oben	Präparation der vierten und fünften Fraktion von oben
Verteilung	Überführung in 50 ml Falcon, Auffüllung mit 1 x PBS auf 50 ml	5 ml Fraktionen in 50 ml Falcon, Auffüllung mit 45 ml 1x PBS
Zentrifugation	5 min 1800 U/min mit Bremseinstellung 1	
	Verwerfung des Überstandes bzw. der oberen Schicht	
Lyse der Erythrozyten		Auffüllung mit kaltem, destilliertem Wasser auf 45 ml, 3-fache Inversion und Inkubation für 30 Sekunden
Resuspension	50 ml 1 x PBS	5 ml 10 x PBS
Zentrifugation	5 min bei 1600 U/min mit Bremsleistung 2	
		Wiederholung der Erythrozytenlyse
Resuspension	Aufnahme im Medium der Zielzellen	
Zählung	Färbung mit Trypanblau und Zählung in Neubauer-Zählkammer	

2. Material und Methoden

2.3.3.2.2 Gezielte Gewinnung von Monozyten und Makrophagen

Die gezielte Gewinnung von Monozyten und Makrophagen machte ein abweichendes Protokoll notwendig. Grundprinzip war hier ebenfalls die initiale Gewinnung von MNC über Anlage eines Dichtegradienten. Für die Optimierung der MNC-Separation wurde ein Co-Polymer aus Saccharose und Epichlorhydrin, sog. Ficoll, verwendet (Pertoft, 2000). Im Anschluss an die MNC-Gewinnung erfolgte ein magnetisches Auftrennungsverfahren (engl. *Magnetic Cell Separation*, MACS). Hierbei wurden die MNC mit einem gegen CD14-gerichteten Antikörper inkubiert, welcher an ein magnetisches Kügelchen gebunden war. Anschließend wurde die Lösung durch eine magnetische Säule geführt. Hierbei liefen die unmarkierten Zellen durch, wohingegen die markierten, CD14-positiven Zellen im magnetischen Feld zurückgehalten wurden. Anschließend konnte im Sinne einer positiven Selektion die Säule aus dem magnetischen Feld herausgenommen und die nun zurückgebliebene Fraktion CD14-positiver Zellen in Suspension überführt werden. Tabelle 7 gibt eine vollständige Übersicht über das für die Generierung von Monozyten genutzte Protokoll.

Tabelle 7: Protokoll zur Generierung von Monozyten

Aufreinigung der MNC	
Arbeitsschritt	
Erstellung des Gradienten	15 ml Ficoll-Lösung mit 20 ml 1:8 verdünntem Blut überschichtet
Zentrifugation	20 min bei 2000 U/min
	Entnahme der MNC
Waschen	40 ml 1 x PBS
Zentrifugation	5 min 1600 U/min bei RT
Resuspension	5ml 1xPBS und Auffüllung mit 1 x PBS auf 50 ml
7-fache Wiederholung des Waschvorgangs	
Resuspension	10 ml 1x PBS
Zählung	Färbung mit Trypanblau und Zählung in Neubauer-Zählkammer, Entnahme von 4×10^8 Zellen
Zentrifugation	5 min 1600 U/min bei Raumtemperatur
Resuspension	800 μ l 1xPBS pro 1×10^8 Zellen
Aufreinigung der Monozyten	
	20 μ l CD14-Beads und 80 μ l 1xPBS pro 10 Mio Zellen
Inkubation	20 Minuten bei 4°C
Resuspension	12 ml 1 x PBS

2. Material und Methoden

Vorbereitung der Säule	pro 100Mio Zellen 1 MACS LS Separation Column und 1 Filter, Einspannen der Säule in MACS Magnet an MACS-Ständer
Äquibrierung der Zellseparationsäule	Spülung der Säule mit 3 ml 1 x PBS Auftragung in 3 ml Fraktionen auf MACS LS Zellseparationsäulen
Spülung	Dreimaliges Spülen der Säule mit 3 ml 1 x PBS
Entnahme der Monozyten	Entfernung der Säule vom Magneten, Spülung 3 ml 1xPBS auf die Säule geben und mit dem Stempel durchdrücken
Zentrifugation	12ml 1xPBS dann zentrifugieren 5 min 1600 rpm RT min 1600 U/min bei Raumtemperatur
Resuspension	5 ml 1 x PBS
Zählung	Färbung mit Trypanblau und Zählung in Neubauer-Zählkammer

Die somit eluierten Monozyten wurden nach einmaligem Waschen mit 1xPBS auf eine Zelldichte von 8×10^6 eingestellt. Die Reinheit der isolierten Fraktionen wurde im Anschluss durchflusszytometrisch analysiert. Die M-CSF abhängige Generierung von Makrophagen aus Monozyten erfolgte nach einem bereits etablierten Protokoll (Leidi et al., 2009). Zusammengefasst wurden für die Erzeugung adhärenter Makrophagen die auf oben beschriebene Weise generierten Monozyten in Zellkulturflaschen mit RPMI1640, 10% FCS, 1% PenStrep, 1% nicht-essentiellen Aminosäuren (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 0.1% Natriumpyruvat, 1% (v/v) humanem Serum sowie 25 ng/ml humanem rekombinanten M-CSF und 10 ng IL-1 β (beide bezogen von Peprotech, Hamburg, D) für 7 Tage inkubiert. Anschließend erfolgte eine Polarisierung der Makrophagen in Makrophagen des M2 Phänotyp durch Zugabe von 20 ng/ml IL-4 (Peprotech, Hamburg, D). 24 Stunden vor Entnahme der Makrophagen wurden der Lösung 100 ng/ml Lipopolysaccharide (LPS) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) zugegeben. Die entnommenen Makrophagen wurden anschließend dreifach mit Kulturmedium gewaschen und nachfolgend für die Experimente verwendet.

2.3.3.2.3 Präparation von Serum

Die Präparation von humanem Serum erfolgte aus dem Vollblut gesunder Spender. Die Blutabnahme erfolgte in eine 9 ml Serum Monovette (Sarstedt, Nümbrecht, D), welche nach der Abnahme für 20 Minuten auf Eis gelagert wurde. Hiernach schloss sich eine Zentrifugation bei 2000 U/min und 4 °C über 20 Minuten an. Hiernach konnte das mit einer Pipette

2. Material und Methoden

entnommene Serum entweder sofort für Experimente verwendet oder in 5 ml Behältern bei -80 °C eingefroren werden.

2.3.3.3 Homotypische Aggregation

Homotypische Aggregation wurde auf Ramos Zellen in 24 Wells geprüft. Hierfür wurden 5×10^5 Zellen/Well ausgesät und mit $20 \mu\text{g/ml}$ des jeweiligen Antikörpers bei 37°C und $5 \text{ v/v } \% \text{ CO}_2$ gelagert. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurde mit einem EVOS Mikroskop (Advanced Microscopy Group, Life Technologies) die HA dokumentiert.

2.3.3.4 B-Zell-Depletion *in vitro*

Für die *in vitro* B-Zell-Depletion wurden isolierte Leukozyten aus dem Vollblut gesunder Spender verwendet. 27 ml Citratblut von zwei verschiedenen gesunden Spendern wurde mittels eines Ficoll-Dichtegradienten (histopaque®, Sigma Aldrich) von Erythrozyten befreit. Die auf diese Weise isolierten Leukozyten dienten in einem autologen Modell gleichzeitig als Effektor- und Zielzelle. In v-förmigen 96 Well-Platten (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D) wurde Verdünnungen der 1F5-Antikörper sowie korrespondierender Isotyp-Kontrollen gegeben ($50 \mu\text{l/well}$). Es folgte eine Inkubation über vier Stunden bei 37°C und $5 \% \text{ CO}_2$. Nach der Inkubation wurde die Zentrifugation bei 1500 U/min und 4°C über 3 Minuten durchgeführt. Der Überstand wurde verworfen. Anschließend erfolgte die FACS Färbung mit $30 \mu\text{l}$ huCD19-APC (BioLegend, San Diego; CA, USA) und huCD11b-FITC (eBioscience Inc., San Diego, CA, USA) in der Konzentration $50 \mu\text{g/ml}$ sowie $0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Die Zellen wurden hiernach resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach dem Waschen wurde $10 \mu\text{l}$ Sulfat Latex-Kügelchen ($5 \mu\text{m}$, Thermo Scientific) den Proben zugegeben. Die Anzahl der B-Zellen (CD19+) wurde in Relation zur Anzahl der Referenz-Kügelchen als „Events per Bead“ bestimmt, die Messung fand auf einem BD-Canto Durchflusszytometer statt.

2.3.3.5 $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzung Tests

$^{51}\text{Chrom}$ ist ein Radionuklid welches durch Zellen internalisiert wird. Die Freisetzung von zuvor internalisiertem radioaktivem $^{51}\text{Chrom}$ aus Zielzellen kann mittels Chemilumineszenz detektiert werden und dient als indirektes Maß für eine erfolgte Zellyse. Für die Untersuchung wurde der Antikörper in fallender Konzentration ($10, 2, 0,4, 0,8, 0,016 \mu\text{g/ml}$) auf einer mit Kulturmedium vorbereiteten 96 Well Mikrotiter Platte aufgetragen. In den Experimenten, welche mit blockierenden Komponenten (A77, 3G8, Eculizumab, Compstatin, EGTA) stattfanden, erfolgte die Zugabe der blockierenden Komponente als Verdünnungsreihe (Konzentrationen siehe die jeweilige Legende der Abbildung) und die des CD20-gerichteten Antikörpers in gleichbleibender Konzentration ($2 \mu\text{g/ml}$). Die Effektorzellen (PMN, MNC,

2. Material und Methoden

Monozyten, Makrophagen) oder Serum wurden ebenfalls vorgelegt und die auf diese Weise vorbereitete Platte bei 4 °C aufbewahrt. Die Zielzellen wurden, sofern es sich um eine adhärenente Zelllinie handelte, trypsinisiert und mit $0,6 \times 10^6$ Zellen pro Platte in ein Falcon überführt sowie bei 2000 U/min für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen, und das Pellet pro $0,6 \times 10^6$ Zellen in 100 µl Medium resuspendiert. Hiernach inkubierten die Zellen für 2 Stunden bei 37 °C mit $^{51}\text{Chrom}$. Nach diesem Inkubationsschritt wurden die Zellen dreimal mit Medium gewaschen und zwischen jedem Schritt bei 2000 U/min für fünf Minuten zentrifugiert. 5×10^3 Zellen sowie, je nach Versuchsbedingungen, Effektorzellen (siehe 2.3.3.2.1) oder Komplementkomponenten (siehe 2.3.3.2.3) wurden hinzugefügt. Die Platten inkubierten anschließend für drei (PMN, MNC, CDC) bzw. 18 Stunden (Monozyten, Makrophagen) bei 37 °C. Nach der Inkubation wurde die Reaktion durch eine Zentrifugation bei 2000 U/min über fünf Minuten beendet. 25 µl des Überstandes wurden zu 150 µl Szintillationslösung (OptiPhase SuperMix) gegeben, mit einer optisch aktiven Folie verklebt (TopSeal-A) und 15 Minuten auf einem Orbitalschüttler geschüttelt. Die Messung des freigesetzten $^{51}\text{Chrom}$ erfolgte indirekt über die durch Radioaktivität induzierte Szintillation in einem Mikrotiter-Platten Szintillations- und Lumineszenz Zähler 1450 MircoBetaTriLux (Perkin-Elmer). Die Berechnung der spezifischen Lyse erfolgte nach der Formel:

$$\% \text{spez. Lyse} = \frac{\text{exp. Szintillation} - \text{basale Szintillation}}{\text{max. Szintillation} - \text{basale Szintillation}} \times 100$$

Die maximale Szintillation wurde durch den Einsatz 1xPBS-Lösung mit 2% Triton X Zusatz gemessen, die basale Szintillation wurde in Abwesenheit von Antikörpern und Effektorzellen bestimmt. Eine unspezifische Lyse der Zielzellen durch die Effektoren alleine konnte nicht beobachtet werden. Zur Bestimmung der Kinetik der Komplementaktivierung wurde nach Zugabe des Serums die Reaktion zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0 min; 7,5 min; 15 min; 30 min; 60 min; 120 min; 240 min) abgebrochen. Dies geschah, indem die zu untersuchende 96-Well-Mikrotiter-Platte auf Eis gestellt wurde. Für die Untersuchung des Weges der Komplementaktivierung wurde ein hitzeinaktiviertes Serum verwendet. Die inkomplette Hitzeinaktivierung von Serum erfolgte bei 50° für 15 Minuten, die vollständige Hitzeinaktivierung von Serum erfolgte bei 56° C über 30 Minuten.

2.3.3.6 Tierexperimente

Die in dieser Arbeit präsentierten Tierversuche wurden durch die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Mark S. Cragg an der Universität Southampton nach den ethischen Richtlinien der Universität

2. Material und Methoden

Southampton in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki unter der Home Office License PPL30/2964 durchgeführt.

2.3.3.6.1 *In vivo* B-Zell Depletion,

Es wurde die *in vivo* Effektivität CD20-gerichteter IgA2 Antikörper anhand ihrer Fähigkeit B-Zellen in Mäusen zu depletieren untersucht. Die Experimente fanden nach einem zuvor bereits beschriebenen Protokoll statt (Beers et al., 2008). Zusammengefasst wurden Milzsuspensionen aus einer für humanes CD20 transgenen (hCD20tg) und aus einer nicht transgenen BALB/c Mäusen erstellt. Diese wurden mit 2 μM und 4 μM Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester CFSE markiert. Die Suspensionen wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und einer Empfängermaus anschließend intravenös injiziert ($1-3 \times 10^3$ /Maus). 24 Stunden nach Injektion wurde den Mäusen 10 μg 1F5-IgA2, -IgG1 oder 1xPBS injiziert. Weitere 16 Stunden später wurde den Mäusen die Milz entnommen, und es wurde eine Milzsuspension erstellt. Die Milzsuspension wurde mit APC-anti-CD19 Antikörpern markiert. Dies erfolgte um B-Zellen zu identifizieren und durchflusszytometrisch zu analysieren. Auf diese Weise wurde die Ratio von hCD20tg Zellen (*Target*) zu nicht hCD20tg Zellen (*Non-Target*) CFSE-markierter Zellen bestimmt. Die Ratio *Target:Non-Target* wurde als Maß für die *in vivo* B-Zell Depletion genutzt. Für die gezielte Untersuchung der Komplementaktivierung wurde die CFSE-markierte Milzsuspension auch C1q- oder C3-defizienten Mäusen injiziert. Da Mäuse kein funktionelles Ortholog des humanen Fc α RI exprimieren war für die gezielte Untersuchung Fc α RI-abhängiger Wirkmechanismen ebenfalls ein transgenes Mausmodell notwendig. Diese Modelle wurden in der Vergangenheit durch die Arbeitsgruppe in Southampton etabliert und lagen zu Beginn dieser Arbeit bereits vor (Beers et al., 2010b).

2.3.3.6.2 Phagozytose Untersuchungen

Die Phagozytose-Versuche wurden durch Ruth R. French, Thomas R. W. Tipton und Prof. Mark S. Cragg an der Universität Southampton durchgeführt. Die Versuche erfolgten nach einem durch die Arbeitsgruppe bereits beschriebenen Protokoll (Beers et al., 2010b). Zusammengefasst wurden knochenmarkabgeleitete Makrophagen aus dem Oberschenkel von C57Bl/6 Mäusen isoliert und in L929 Medium für 5-8 Tage kultiviert. Am Tag der Untersuchung wurden die Makrophagen mit Trypsin und Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) gelöst und in RPMI resuspendiert. Die Suspension wurde auf eine 96-Well Kulturplatte in einer Konzentration von 5×10^4 Zellen/Well verteilt und für 2-4 Stunden bei 37 °C inkubiert. Eine Milzsuspension aus einer hCD20tg Maus wurde erstellt, die Target B-Zellen wurden 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 1F5-IgA2, 1F5-IgG1 (jeweils 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) oder

2. Material und Methoden

1xPBS inkubiert und mit 5 μ M CFSE markiert. Anschließend wurden die B-Zellen zu den vorbereiteten Makrophagen im Verhältnis 5:1 gegeben, und die Probe für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Für den Versuchsansatz, der unter Blockierung von Fc α / μ R erfolgte, wurde zusätzlich der Fc α / μ R blockierende Antikörper TX57 hinzugegeben. Hiernach wurde ein APC-anti-F4/80 Antikörper (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) der Probe hinzugegeben. F4/80 ist ein murines Glycoprotein und dient, da es von den meisten murinen Makrophagen exprimiert wird, als Makrophagenmarker (Beers et al., 2010b). Im Anschluss wurden die Zellen gelöst und durchflusszytometrisch analysiert. Die Phagozytose in Prozent wurde berechnet als der Anteil CFSE und F4/80 positiver Makrophagen gegenüber der Gesamtzahl der Makrophagen (F4/80 positive Zellen).

3. Ergebnisse

3.1 Biochemische Charakterisierung und Bindungseigenschaften CD20-gerichteter Antikörper

Antikörperproduzierende Einzelklone standen zu Beginn dieser Arbeit bereits zur Verfügung. Für die Herstellung der beiden CD20-spezifischen 1F5-Antikörper vom IgA2- und IgG1-Isotyp wurden BHK-Zellen mit den entsprechenden Vektoren stabil transfiziert. Mittels limitierender Verdünnungsreihen wurden die am besten produzierenden Einzelklone isoliert. Die Einzelklone wurden simultan in 175 cm² Kulturflaschen und Cellline CL1000 Bioreaktoren kultiviert. Es zeigte sich eine starke Zunahme der 1F5-IgA2 Produktion im Bioreaktor mit einer medianen Antikörperkonzentration von $93.2 \pm 50.9 \mu\text{g/ml}$ gegenüber einer medianen Konzentration von $5.9 \pm 0.4 \mu\text{g/ml}$ in der normalen Kulturflasche (Abbildung 5 A). Anschließend wurde der monomere Antikörper aus dem Überstand mit einer gegen die humane κ -Leichtkette gerichteten Affinitätschromatographie sowie einer nachfolgend durchgeführten Größenausschluss-Chromatographie isoliert. Das Elutionsprofil zeigt, dass die Präparation hauptsächlich aus monomerem Antikörper besteht (Abbildung 5 B).

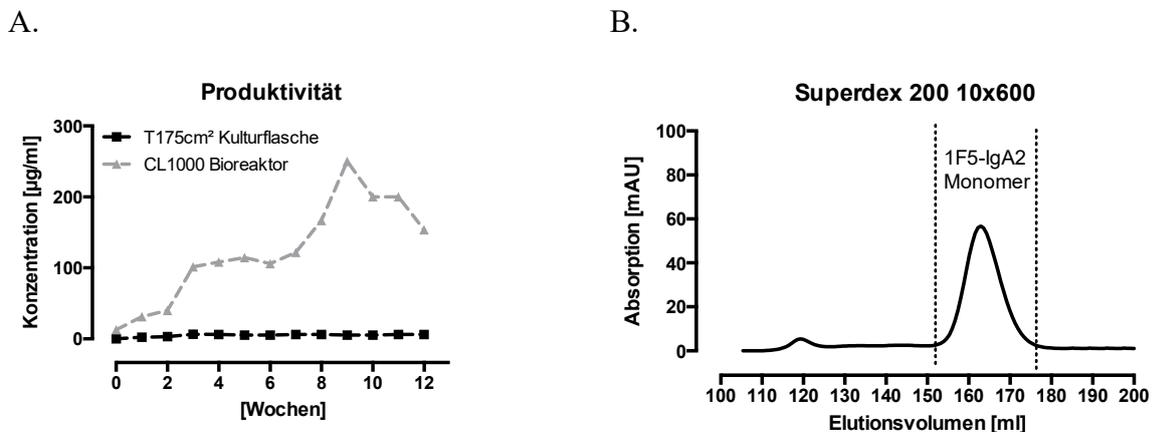


Abbildung 5: Produktion und Aufreinigung des 1F5-IgA2 Antikörpers. Nachweis der Antikörperproduktion über die Zeit mit Isotyp-spezifischen Sandwich ELISA mit einem gegen die κ -Kette gerichteten Antikörper sowie einem Peroxidase-gekoppeltem Antikörper gegen die α -Kette (A). Aufreinigung des produzierten 1F5-IgA2 Antikörper mittels Größenausschlusschromatografie auf einer 26x600 mm Superdex 200 Säule (B).

Die auf diese Weise produzierten 1F5-IgG1 und 1F5-IgA2 Antikörper wurde mittels Gelelektrophorese unter nicht-reduzierenden und reduzierenden Bedingungen auf ihr molekulares Gewicht und ihre Reinheit untersucht. Zur Proteindetektion wurde eine Silberfärbung eingesetzt. 1F5-IgG1 zeigte unter nicht-reduzierenden Bedingungen eine Bande bei der zu erwartenden molekularen Masse von 150 kDa (Abbildung 6 A1, Bahn 1). Proben des

3. Ergebnisse

1F5-IgA2 Antikörper zeigten unter nicht-reduzierenden Bedingungen Banden mit der Masse von 160 -170 kDa. Weiterhin ist eine Dissoziation in Homodimere der leichten und schweren Ketten (Abbildung 6 A1, Bahn 2) zu beobachten, welche typisch für IgA2 Antikörper des IgA2m(1) Allotyps ist (Lohse et al., 2012).

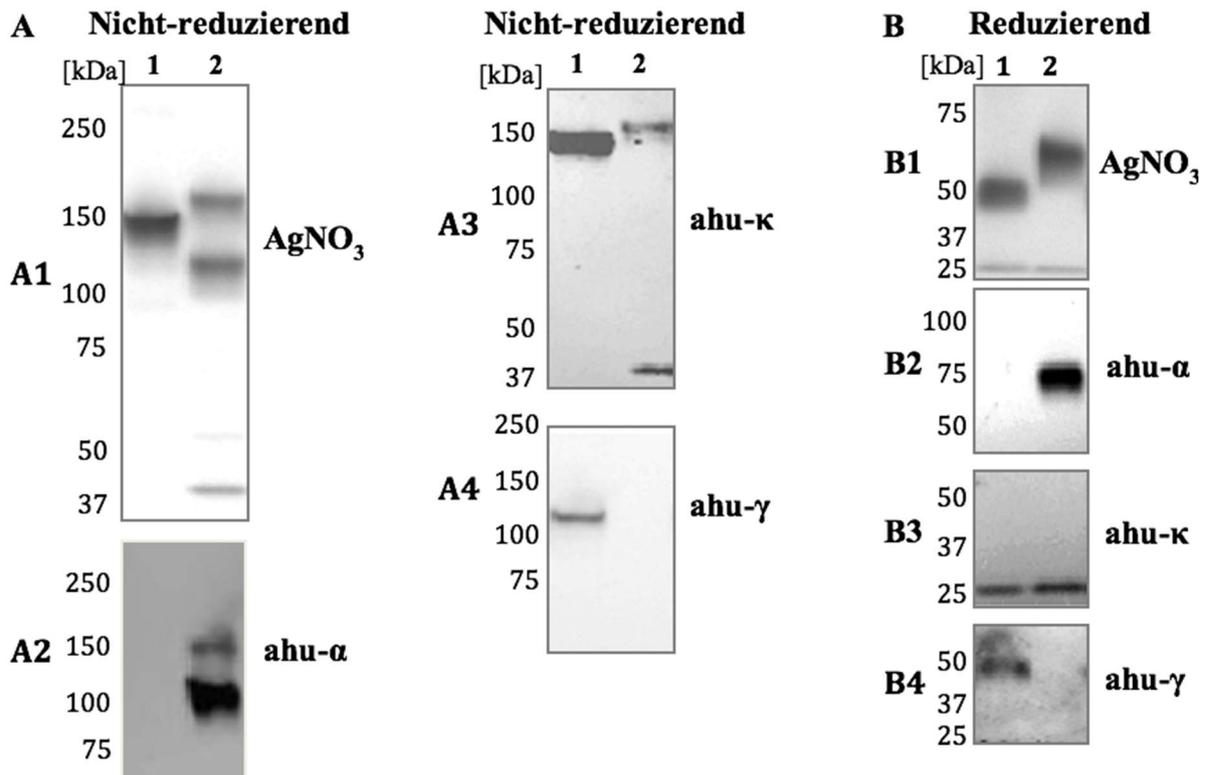


Abbildung 6: Biochemische Charakterisierung CD20-gerichteter 1F5 Antikörper. Rekombinant hergestellte Antikörper wurden auf 3-8% Tris-Acetat Gelen gelelektrophoretisch separiert und unter denaturierenden nicht-reduzierenden (A) und reduzierenden (B) Bedingungen untersucht. Die Reinheitsprüfung erfolgte mittels Silbernitrat-Färbung (AgNO_3) (A1) und (B1). Die Proteine wurden auf PVDF Membranen transferiert und mit Peroxidase-gekoppelten Antikörpern gegen humane α (A2 und B2), κ (A3 und B3) oder γ -Ketten (A4 und B4) gefärbt. Bahnen: 1. 1F5-IgG1, 2. 1F5-IgA2.

Unter reduzierenden Bedingungen dissoziierten beide Antikörper in leichte und schwere Ketten, welche bei der erwarteten Molekülmasse von 25 kDa für die κ -Kette, 50 kDa für die γ -Kette und 60-70 kDa für die α -Kette detektiert werden konnten (Abbildung 6 B1). Immunblots mit Antikörpern gegen die humanen α -, κ - und γ -Ketten bestätigten diese Ergebnisse (Abbildung 6 A2-4 und B2-4). Die Glykosylierung der Antikörper wurde in Lectin-Blots untersucht. 1F5-IgA2 zeigte ein starkes Signal für α -1,2 gebundene Fucose verglichen mit 1F5-IgG1 (Abbildung 7 A). Beide Antikörper zeigten schwache Signale für terminale Galaktosylierung (Abbildung 7 B). In Lectin Blots mit *Concanavalin A*, welches α -gebundene Mannose als Teil der Kern-Oligosaccharide detektiert, zeigte 1F5-IgA2 ein deutlich stärkeres Signal als 1F5-IgG1. Weiterhin zeigte sich in Untersuchungen mit *Griffonia simplicifolia*

3. Ergebnisse

Lectin, dass 1F5-IgG1 stärker α -gebundene Galaktose aufweist als der korrespondierende 1F5-IgA2 Antikörper.

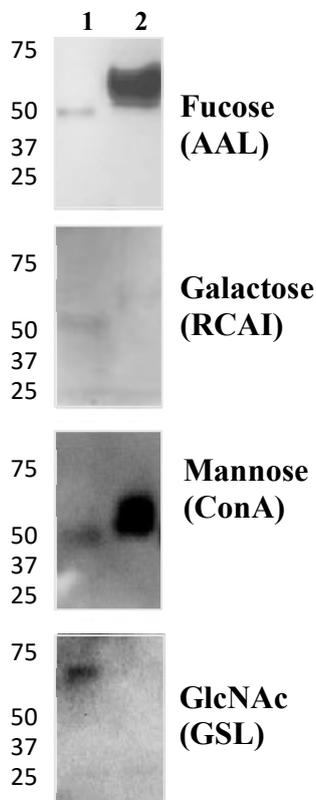


Abbildung 7: Untersuchung der Glykosylierung CD20-gerichteter Antikörper.

Die Glykosylierung CD20-gerichteter Antikörper wurde in Lectin Blots mit biotinylierten Lektinen, *Aleuria Aurantia* Lektin (AAL) (A), *Ricinus communis* Agglutinin I (RCAI) (B), *Concanavalin A* (ConA) (C) und *Griffonia Simplicifolia* Lectin (GSL) (D) untersucht. Bahnen: 1. 1F5-IgG1, 2. 1F5-IgA2.

Die Bindung von 1F5-IgA2 und 1F5-IgG1 an das Zielantigen CD20 sowie an die Fc-Rezeptoren CD89 und CD16 wurde durch indirekte Immunfluoreszenzen auf CD20 exprimierenden Ramos Zellen sowie Fc α RI/FcR γ - oder Fc γ RIII/FcR γ ko-transfizierten BHK Zellen untersucht. 1F5-IgG1 und 1F5-IgA2 banden gleichermaßen effektiv an CD20 exprimierende Ramos Zellen (Abbildung 8 A, EC50 Werte: 72.9 ± 15.7 und 81.4 ± 15.8 μ g/ml für 1F5-IgA2 und 1F5-IgG1). Sowohl 1F5-IgA2 als auch die IgA-Isotypkontrolle banden an CD89- aber nicht an CD16-exprimierende BHK Zellen. 1F5-IgG1 und die IgG1-Isotypkontrolle banden an CD16- aber nicht an CD89-exprimierende BHK Zellen (Abbildung 8 B). Die Messungen zeigen zusammengenommen, dass die selbstproduzierten, monomeren Antikörper 1F5-IgA2 und 1F5-IgG1 spezifisch sowohl an das Zielantigen CD20 als auch an ihre jeweiligen Fc-Rezeptoren CD16 und CD89 banden.

3. Ergebnisse

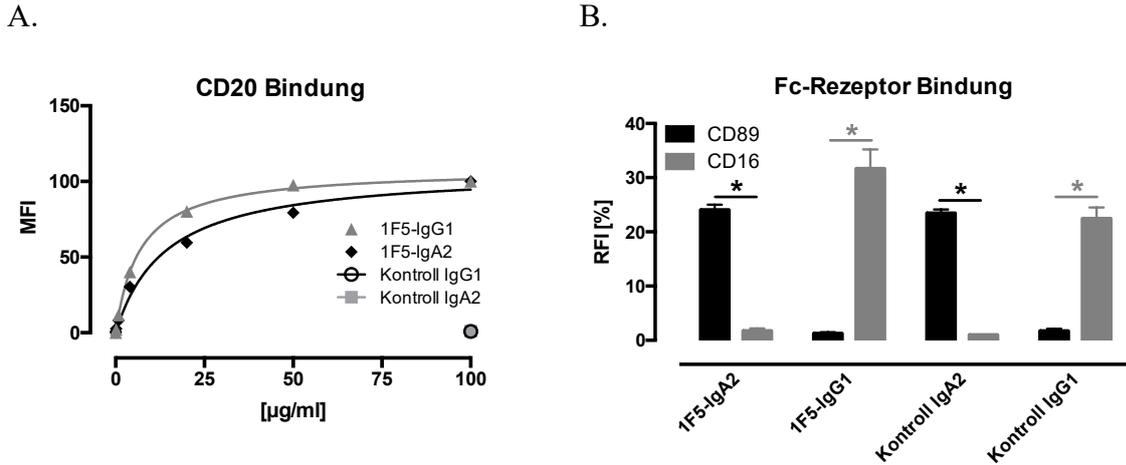


Abbildung 8: Bindungseigenschaften CD20 gerichteter Antikörper. Die Bindung von 1F5-IgG1, 1F5-IgA2 und den Kontrollantikörpern an CD20 exprimierende Ramos Zellen (A) sowie an Fc α RI (CD89) oder Fc γ RIII (CD16) exprimierende BHK Zellen (B) wurde durch indirekte Immunfluoreszenz mit einem gegen die humane Leichtkette gerichteten, FITC-markierten Antikörper analysiert. Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten werden als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) der „mittleren Fluoreszenz Intensität“ (A) bzw der „relativen Fluoreszenz Intensität [%]“ (B) dargestellt. In B werden signifikante Unterschiede ($p \leq 0,01$) zwischen IgG1 und IgA2 Antikörpern durch * angegeben.

3.2 Direkte Effekte CD20 gerichteter IgG1- und IgA2- Antikörper

Die Vermittlung direkter Effekte, wie die Induktion von Apoptose, Nekrose oder homotypische Aggregation ist insbesondere für Typ II Antikörper ein gut beschriebener Fab-vermittelter Wirkmechanismus (Cragg et al., 2003). Die Fähigkeit zur Apoptose- und Nekroseinduktion beider CD20-gerichteter 1F5 Antikörper auf CD20-exprimierende Ramos Zellen wurde fluoreszenzchromatographisch untersucht. Die Zielzellen wurden 48 Stunden mit CD20-gerichteten 1F5-IgG1 und 1F5-IgA2 Antikörpern, entsprechenden Isotypkontrollen sowie der Positivkontrolle Tositumomab, einem Typ II CD20 Antikörper, inkubiert. Dem Nachweis von Apoptose diente eine Färbung mit Annexin V-FITC. Es zeigte sich eine signifikante Apoptoseinduktion durch 1F5-IgG1 als auch durch 1F5-IgA2 im Vergleich jeweils korrespondierenden Isotypkontrolle (Abbildung 9 A). Die Fähigkeit CD20-gerichteter 1F5-Antikörper zur Nekroseinduktion wurde mittels 7-AAD Färbung untersucht (Abbildung 9 B). Es zeigte sich eine signifikante Induktion durch 1F5-IgA2, jedoch nicht durch 1F5-IgG1 gegenüber der jeweiligen Isotypkontrolle. Ergänzend wurde die Depletion von Ramos Zellen durch CD20-gerichtete 1F5-Antikörper untersucht. Es wurde die Anzahl der Tumorzellen in Relation zu hinzugegeben *Beads* in Referenz gesetzt (Abbildung 9 C). Beide 1F5 Antikörper waren in der Lage im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle B-Zellen signifikant zu depletieren.

3. Ergebnisse

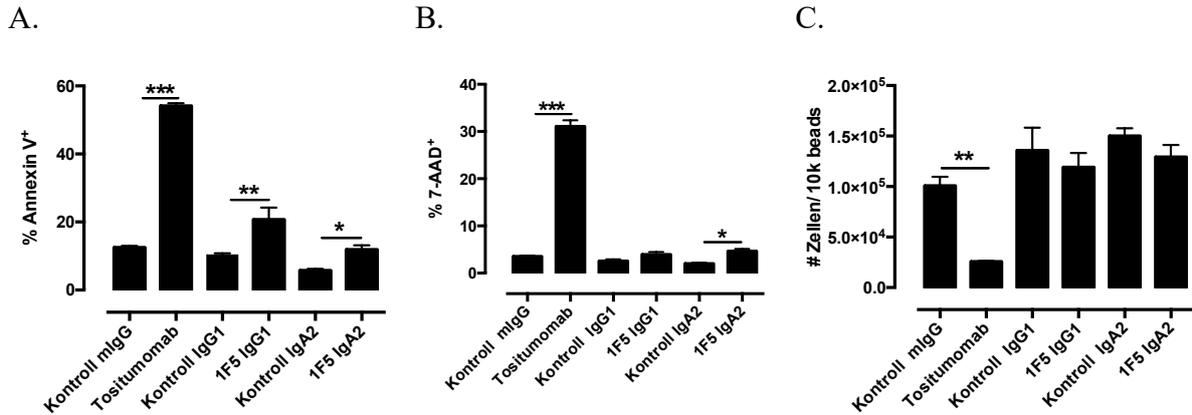


Abbildung 9: Fab-vermittelte Effektormechanismen CD20-gerichteter Antikörper. Die Fähigkeit zur Apoptose- und Nekroseinduktion CD20-gerichteter Antikörper wurde analysiert. Ramos Zellen wurden 48 Stunden mit Antikörpern inkubiert. Annexin V-FITC -**(A)** und 7-AAD - **(B)** Färbungen wurden fluorezenzchromatographisch gemessen, weiterhin wurde die totale Anzahl der Ramos Zellen in Relation zu Referenz *Beads* **(C)** berechnet. Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung von „% Annexin V+“ in **(A)**, „% 7-AAD+“ in **(B)** und „#Zellen/10k Beads“ in **(C)** angegeben. Signifikante Unterschiede werden mit * für $p \leq 0.05$, ** für $p \leq 0.01$ und *** für $p \leq 0.001$ dargestellt.

Anschließend wurde das Potential CD20-spezifischer Antikörper homotypische Aggregation zu induzieren untersucht. Hierfür wurden Ramos Zellen 48 Stunden mit Antikörpern inkubiert. Bei diesen Versuchen zeigte sich, dass 1F5-IgG1 mit mittlerer und 1F5-IgA2 mit niedriger Effektivität homotypische Aggregation induzieren (Abbildung 10). Apoptose, Nekrose und homotypische Aggregation konnten durch den Typ II CD20 Antikörper Tositumomab effektiv induziert werden.

3. Ergebnisse

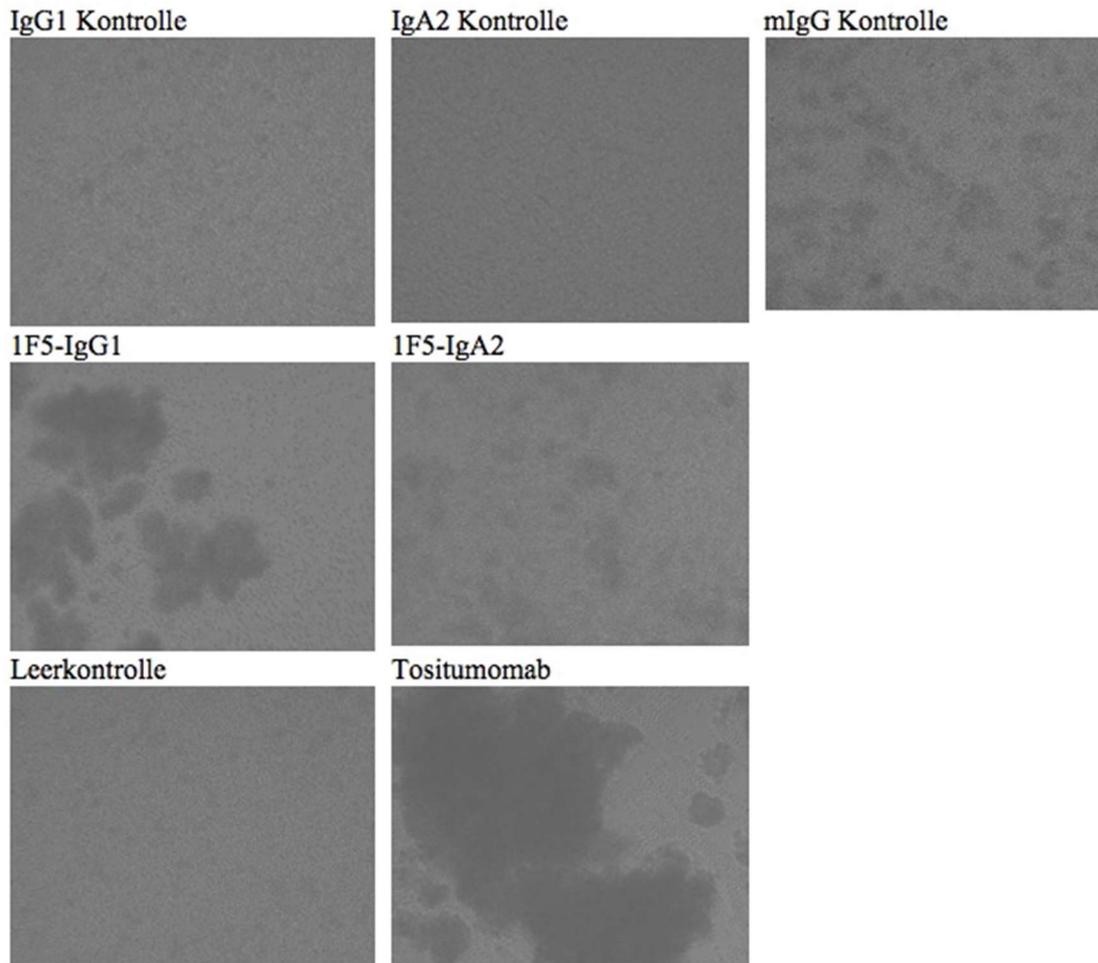


Abbildung 10: Homotypische Aggregation durch CD20-gerichtete Antikörper.

Ramos Zellen (2×10^4) wurden für 48 Stunden mit $20 \mu\text{g/ml}$ Antikörpern behandelt und anschließend deren Fähigkeit zur homotypischen Aggregation lichtmikroskopisch dokumentiert. Die dargestellten Aufnahmen wurden auf einem EVOS Mikroskop gemacht und zeigen repräsentative Ausschnitte aus drei unabhängigen Experimenten.

3.3 B-Zell Depletion im Vollblut

Im Vollblut können Antikörper neben dem Komplementsystem über ihren Fc-Teil Effektorzellpopulationen für die Tumorlyse aktivieren. Für eine initiale Evaluation der Fähigkeit zur antikörper-abhängigen zell-vermittelten Zytotoxizität (ADCC) wurden $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungsversuche mit Vollblut durchgeführt. Interessanterweise zeigten sich 1F5-IgG1 und -IgA2 Antikörper in der Vermittlung von ADCC gegen Ramos Zellen in $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungsversuchen mit dem Vollblut gesunder Spender gleichermaßen effektiv (Abbildung 11).

3. Ergebnisse

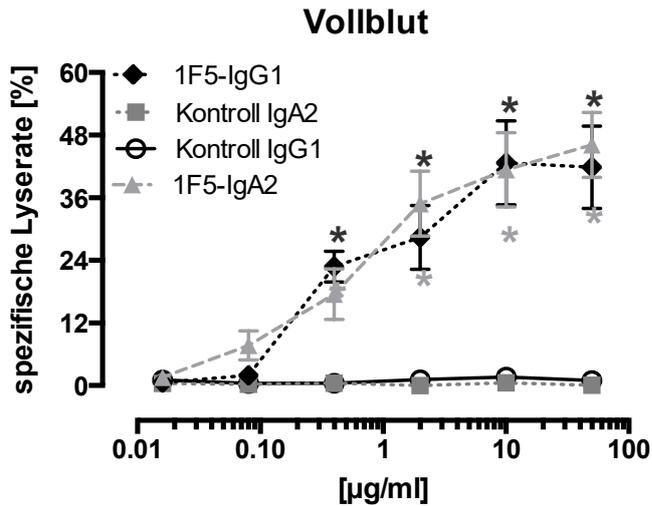


Abbildung 11: Antikörper-vermittelte Tumorlyse mit Vollblut als Effektorquelle. Die Fähigkeit zur Tumorlyse von Ramos Zellen durch 1F5-IgA2 und 1F5-IgG1 wurde in ⁵¹Chromfreisetzungstests untersucht. Gezeigt werden die Ergebnisse aus fünf unabhängigen Experimenten als Mittelwert ± SEM der „spezifischen Lyserate [%]“. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0.001$) zwischen CD20-gerichteten und Kontrollantikörpern werden durch * gezeigt.

Nachfolgend wurde untersucht, ob die CD20-gerichteten Antikörper auch normale B-Zellen aus dem Vollblut gesunder Spender zu depletieren vermögen. Hierfür wurden die PMN und MNC Fraktionen zusammengeführt und autologe B-Zellen dienten als Zielzellen. Nach erfolgter Inkubation mit entweder 1F5-IgG1 oder 1F5-IgA2 wurden die Zellen auf CD11b/CD19 gefärbt und auf diese Weise die Anzahl der verbliebenen B-Zellen evaluiert. In diesen Untersuchungen zeigte sich, dass beide Antikörper effektiv in der Lage zur B-Zell Depletion sind (Abbildung 12). 1F5-IgG1 benötigte für die effiziente Vermittlung jedoch niedrigere Konzentrationen als der korrespondierende IgA2 Antikörper (EC50: 1F5-IgG1 = 0.06 µg/ml, 1F5-IgA2 = 0.28 µg/ml).

3. Ergebnisse

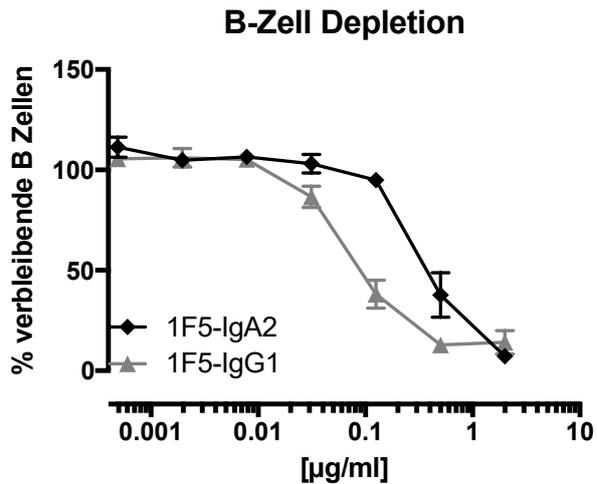


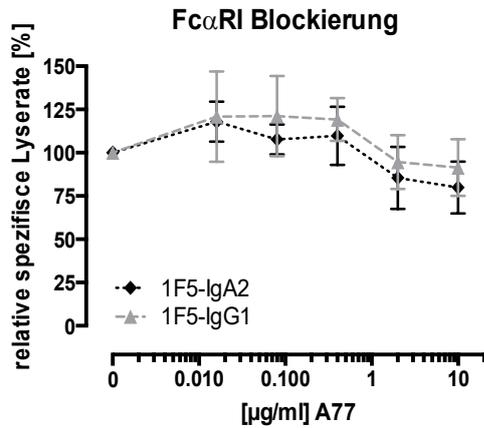
Abbildung 12: B-Zell Depletion durch 1F5-Antikörper des IgA2 und IgG1 Isoytyps.

1F5-IgA2 und 1F5-IgG1 vermittelte B-Zell Depletion wurde in einem autologen Modell mit isolierten humanen Leukozyten durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt werden die Ergebnisse zweier unabhängiger Experimente als „% verbliebene B-Zellen“.

Es stellte sich die Frage, welchen Anteil die durch Effektorzellen vermittelte Zytotoxizität (ADCC) gegenüber der komplementabhängigen Zytotoxizität (CDC) an der beobachteten Tumorlyse hat. Um den Einfluss der ADCC zu untersuchen, wurde der gegen CD89 (Fc α RI) gerichteter Antikörper A77 (Abbildung 13 A) bzw. der gegen CD16 (Fc γ RIII) gerichtete Antikörper 3G8 (Abbildung 13 B) den Ansätzen zugegeben. In diesen Versuchen zeigte sich, dass die durch CD20-gerichtete 1F5-Antikörper vermittelte Tumorlyse bei Verwendung von Vollblut durch die Blockade von CD16 und CD89 nicht in signifikanter Weise beeinflusst wurde.

3. Ergebnisse

A.



B.

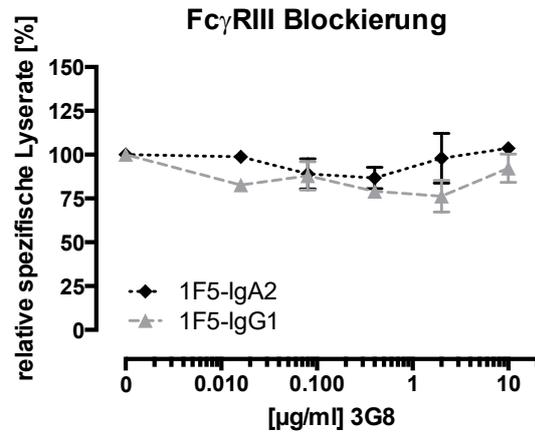


Abbildung 13: Einfluss der Effektorzellaktivierung in der B-Zell-Depletion im Vollblut. Um den Beitrag von ADCC im Vollblut zu untersuchen, wurde in 51 Chrom-Freisetzungsversuchen mit Ramos Zellen zu 5 μ g/ml des jeweiligen CD20 Antikörpers steigende Konzentrationen des CD89-spezifischen Antikörpers A77 (A) oder des CD16 Antikörpers 3G8 (B) gegeben. Gezeigt werden die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten als Mittelwert \pm SEM der „relativen spezifische Lyserate [%]“.

Für die Untersuchung des Anteils der CDC an der beobachteten Zytotoxizität wurde in 51 Chrom-Freisetzungsversuchen der gegen den Komplementfaktor C5 gerichtete Antikörper Eculizumab (Abbildung 14 A) oder C3-blockierendes Compstatin (Abbildung 14 B) zugegeben. Eculizumab war in der Lage, die mit Vollblut vermittelte Zytotoxizität beider 1F5-Antikörper dosisabhängig zu inhibieren. Compstatin blockierte die durch IgA-vermittelte Tumolyse effektiver als die durch IgG1. Diese Daten zeigen eine unerwartet prominente Rolle der komplementabhängigen Zytotoxizität unter diesen Versuchsbedingungen.

3. Ergebnisse

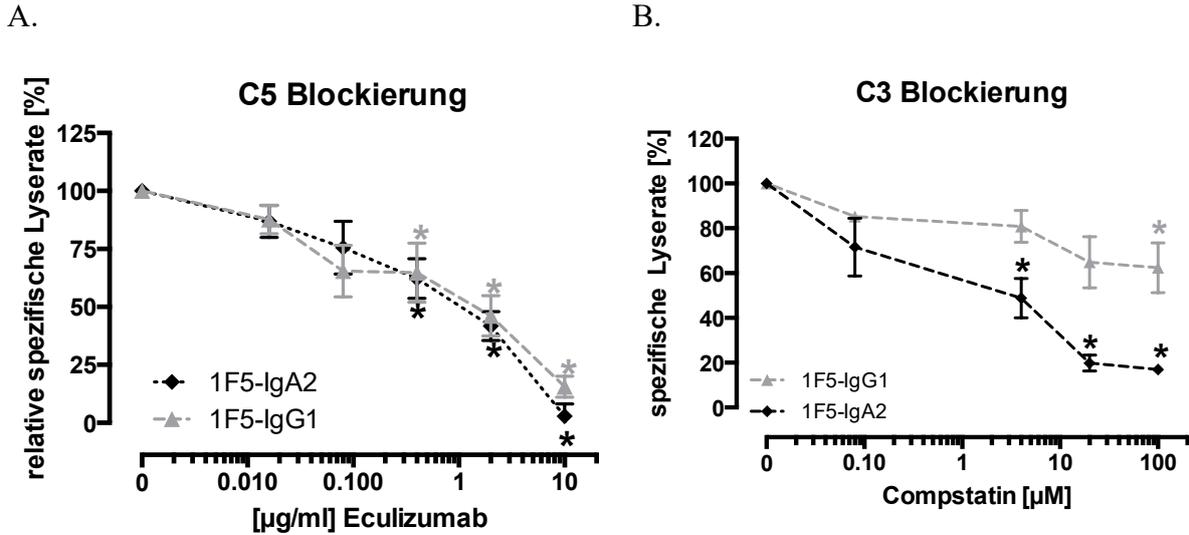


Abbildung 14: Einfluss der CDC an der B-Zell-Depletion im Vollblut. In $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungsversuchen wurden Ramos Zellen zu $5 \mu\text{g/ml}$ des jeweiligen CD20 Antikörpers steigende Konzentrationen des C5-gerichteten Antikörpers Eculizumab (A) oder des C3 blockierenden Compstatin (B) gegeben. Gezeigt werden die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten als Mittelwert \pm SEM der „relativen spezifische Lyserate [%]“ in (A) und der „spezifischen Lyserate [%]“ in (B). Signifikante Unterschiede ($p \leq 0.01$) zwischen behandelten und unbehandelten Proben (nicht dargestellt) sind mit * gekennzeichnet.

3.4 Komplementabhängige Zytotoxizität CD20-gerichteter IgA2 und IgG1 Antikörper

Der Beitrag komplementabhängiger Zytotoxizität an der therapeutischen Effektivität CD20-gerichteter Antikörper ist kontrovers (Woof und Russell, 2011) und wurde für IgA-Antikörper nicht erwartet, da diese über keine C1q Bindungsstelle verfügen (Duncan und Winter, 1988). Sandwich-ELISA Untersuchungen bestätigen, dass rekombinantes humanes C1q an 1F5-IgG1 und den IgG-Kontrollantikörper, jedoch nicht an 1F5-IgA oder den IgA Kontrollantikörper bindet (Abbildung 15).

3. Ergebnisse

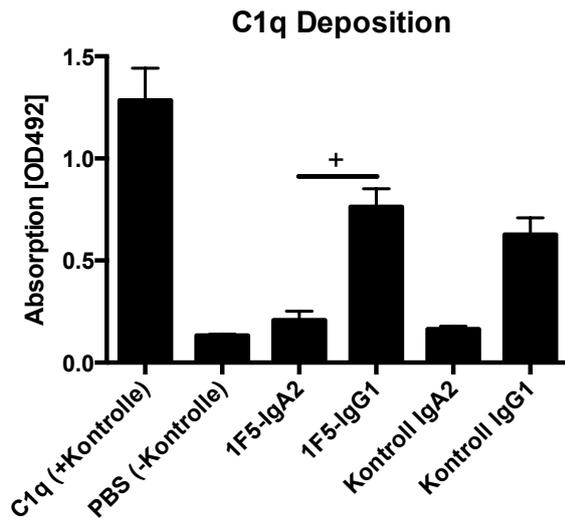
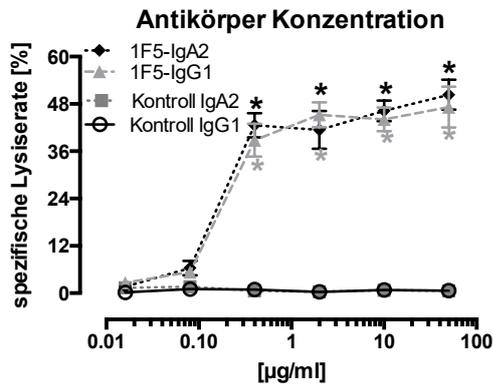


Abbildung 15: Nachweis der C1q Deposition an die Antikörperisotypen IgG1 und IgA2. Untersucht wurde die Deposition von humanen C1q-Protein an Antikörper des IgG1 und IgA2 Isotypen in Sandwich-ELISA Experimenten. Gezeigt werden die Ergebnisse aus vier unabhängigen Experimenten als Mittelwert \pm SEM der „Absorption [OD492]“. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0.001$) zwischen 1F5-IgA2 und 1F5-IgG1 sind mit + gekennzeichnet.

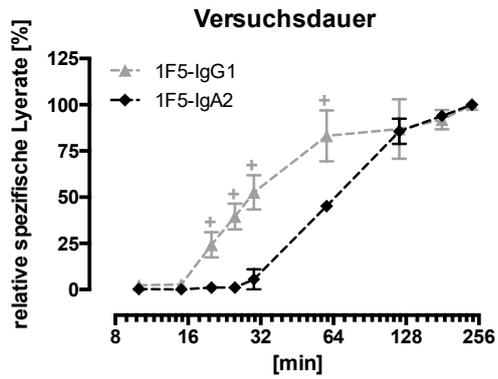
Nachfolgend wurden CD20-gerichtete 1F5-IgG1 und -IgA2 Antikörper hinsichtlich ihrer Fähigkeit CDC zu induzieren untersucht. Dabei zeigt sich in dreistündigen $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungsversuchen unter Zugabe von Serum in sättigenden Konzentrationen, dass beide Antikörper in gleichem Ausmaß CDC auf Ramos Zellen vermitteln (Abbildung 16 A). Die Kinetik der CDC Aktivierung wurde untersucht, indem die Reaktion zu unterschiedlichen Zeitpunkten unterbrochen wurde. Hier zeigt sich wiederum, dass 1F5-IgG-vermittelte CDC einer schnelleren Kinetik unterliegt, als es bei der durch 1F5-IgA vermittelten CDC der Fall ist (Abbildung 16 B). Anschließend wurde die Abhängigkeit der CDC von der Serumkonzentration untersucht (Abbildung 16 C). 1F5-IgG1 induziert CDC bereits unter signifikant niedrigeren Serumkonzentrationen als 1F5-IgA2. Die langsamere Kinetik sowie der Bedarf höherer Serumkonzentrationen deuten darauf hin, dass die komplementvermittelte Tumorlyse durch 1F5-IgA2 über den alternativen Weg der Komplementaktivierung erfolgt.

3. Ergebnisse

A.



B.



C.

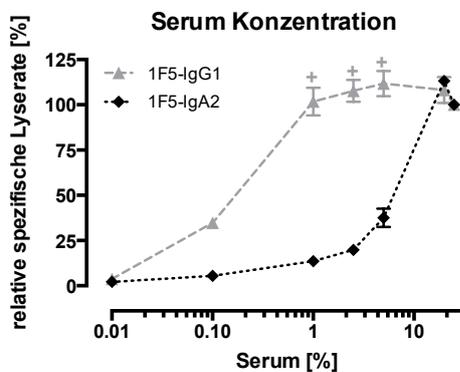


Abbildung 16: Komplementrekrutierung durch CD20-gerichtete Antikörper. Es wurde die Fähigkeit zur Vermittlung von CDC durch CD20-gerichtete Antikörper gegen Ramos Zellen in $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungstests untersucht (A). Es erfolgte eine Evaluation der Kinetik (B) sowie der erforderlichen Serumkonzentrationen (C). Gezeigt werden die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Experimenten als Mittelwert \pm SEM der „spezifischen Lyserate [%]“ (A) oder der „relativen spezifischen Lyserate [%]“ (B, C). Signifikante Unterschiede ($p \leq 0.001$) zwischen CD20-gerichteten Antikörpern und der jeweiligen Isotyp-Kontrolle sind mit * gekennzeichnet.

EGTA bindet Calcium und hemmt die Aktivierung des alternativen Weges. Die Zugabe von EGTA inhibierte die komplementabhängige Zytotoxizität von 1F5-IgA2 stärker als die des korrespondierenden IgG1-Antikörpers (Abbildung 17 A). Hitzeinaktivierung von Serum bei 50° für 15 Minuten kompromittiert die Aktivität des Faktors B und damit einhergehend die des alternativen Weges der Komplementaktivierung. Unter diesen Versuchsbedingungen war die Fähigkeit von 1F5-IgA2 zur Vermittlung von CDC deutlich reduziert. Demgegenüber war die durch 1F5-IgG1 vermittelte CDC nicht eingeschränkt. Beide Antikörper waren nicht in der Lage, CDC mit vollständig hitzeinaktiviertem Serum (56°C für 30 Minuten) zu vermitteln (Abbildung 17 B). Zusammengefasst implizieren diese Daten, dass die durch CD20-spezifische 1F5-IgA2 vermittelte CDC gegenüber Ramos Zellen über den alternativen Weg der

3. Ergebnisse

Komplementaktivierung erfolgt. Demgegenüber erfolgt durch 1F5-IgG1 vermittelte CDC über den klassischen Weg der Komplementaktivierung.

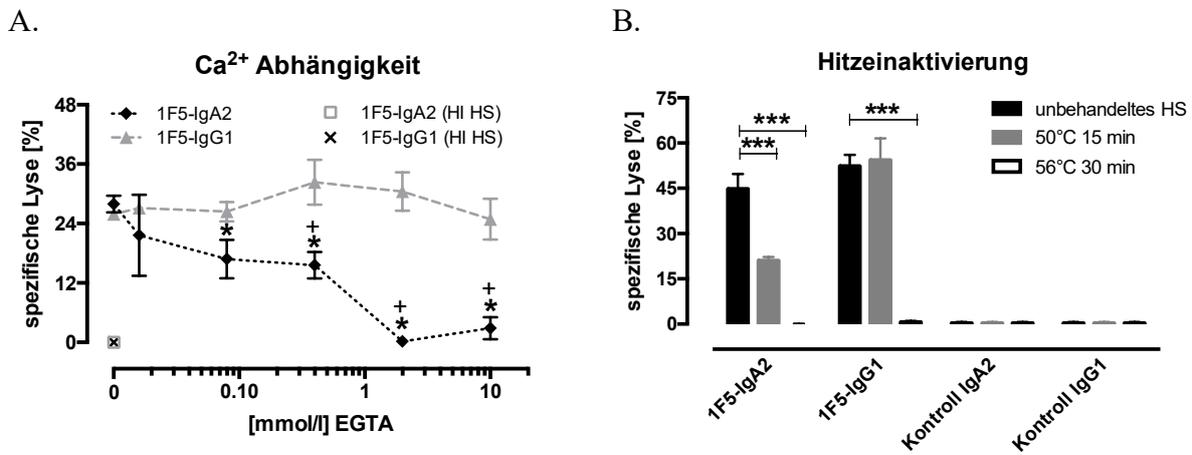


Abbildung 17: Analyse der Komplementaktivierung durch CD20-gerichtete Antikörper.

In ⁵¹Chrom-Freisetzungstests wurde die Fähigkeit zur Vermittlung von CDC durch CD20-gerichtete Antikörper gegen Ramos Zellen untersucht. **(A)** zeigt die Abhängigkeit der gemessenen CDC von der Calcium-Konzentration, **(B)** zeigt die Kompromittierung der CDC durch Hitzeinaktivierung des humanen Serums. Gezeigt werden die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten als Mittelwert ± SEM der „spezifischen Lyserate [%]“. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0.001$) sind mit *** gekennzeichnet.

Im Anschluss wurde untersucht, ob die Fähigkeit CD20-gerichteter Antikörper CDC zu vermitteln, auf Ramos Zellen beschränkt ist. Hierfür wurden ⁵¹Chrom-Freisetzungstests mit verschiedenen Zielzellen durchgeführt (Abbildung 18). Es konnte gezeigt werden, dass durch 1F5-IgG1 und 1F5-IgA2 Antikörper signifikant CDC auf Ramos, Daudi, Wien-133 (alle Burkitt-Lymphom) und Granta-519 (Mantelzelllymphom) Zellen vermittelt werden kann. Hingegen sind beide Antikörper nicht in der Lage CDC auf Mec2 (chronische B-Zell Leukämie), Mino (Mantelzelllymphom), ARH77 (reife B-Zellen) und Raji (Burkitt-Lymphom) Zellen zu induzieren.

3. Ergebnisse

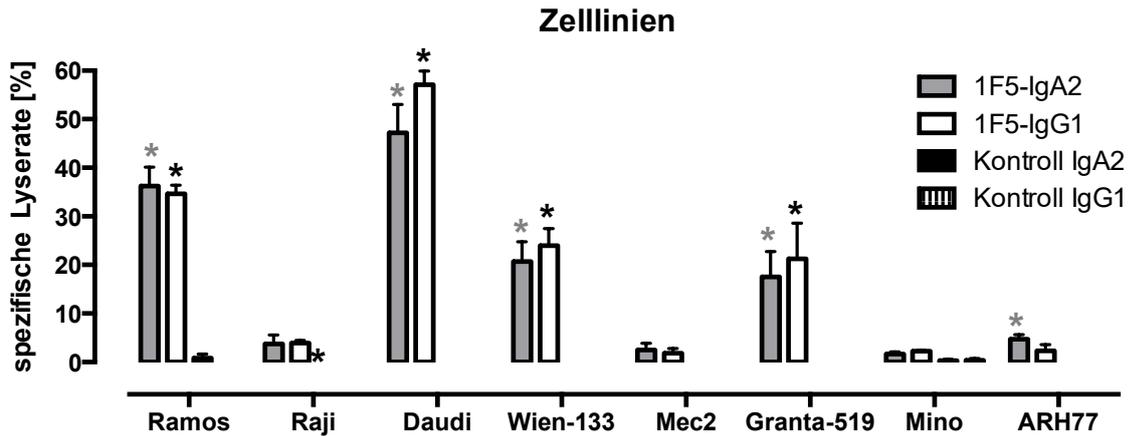


Abbildung 18: Vermittlung von CDC durch CD20-gerichtete Antikörper auf verschiedenen Tumor-Zelllinien. Mehrere Lymphom-Zelllinien wurden in $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungstests mit humanem Serum und den 1F5-Antikörpern inkubiert. Gezeigt werden die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten als Mittelwert \pm SEM der „spezifischen Lyserate [%]“. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0.001$) zwischen CD20-gerichteten Antikörpern und der jeweiligen Isotyp-Kontrolle sind mit * gekennzeichnet.

Daran anschließend erfolgte die Untersuchung, ob 1F5-IgA2 und 1F5-IgG1 Antikörper in der Lage sind, auf primären CLL Zellen CDC zu induzieren (Abbildung 19). In diesen Experimenten zeigte sich, dass beide Antikörper gleichermaßen effektiv in der Vermittlung komplementabhängiger Zytotoxizität gegen primäre Tumorzellen agieren.

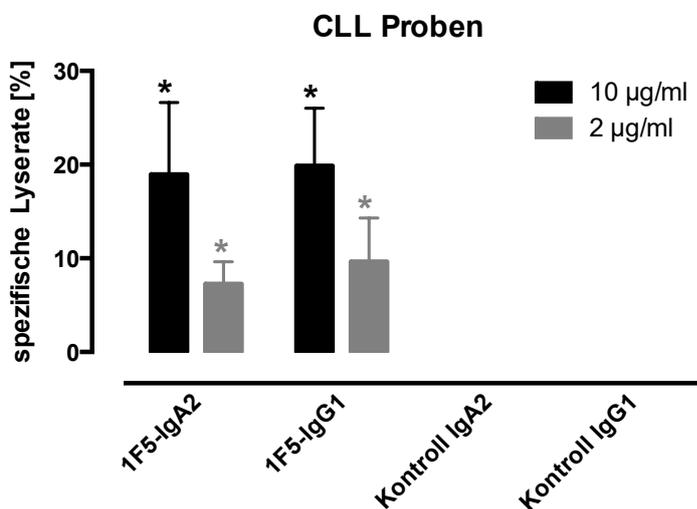


Abbildung 19: Vermittlung von CDC durch CD20- gerichtete Antikörper gegen primäre CLL-Proben. Untersucht wurde, inwieweit die eingesetzten CD20-Antikörper auf primären Patientenproben mit dem Serum gesunder Spender als Komplementquelle, CDC vermitteln können. Gezeigt werden die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten als Mittelwert \pm SEM der „spezifischen Lyserate [%]“. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0.001$) zwischen CD20-gerichteten Antikörpern und der jeweiligen Isotypenkontrolle sind mit * gekennzeichnet.

3.5 Aktivierung von Effektorzellen durch CD20-gerichtete IgG1 und IgA2 Antikörper

Die Fähigkeit CD20-gerichteter Antikörper des IgG1- und IgA2-Isotyps, Effektorzellen zu rekrutieren, wurde in $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungstests geprüft. In den dreistündigen ADCC Untersuchungen mit isolierten, GM-CSF aktivierten PMN, welche hauptsächlich aus neutrophilen Granulozyten bestanden, erwies sich 1F5-IgA2 signifikant effektiver als 1F5-IgG1 (Abbildung 20 A). Demgegenüber zeigten Untersuchungen mit isolierten MNC als Effektorzellen, funktionell hauptsächlich bestehend aus NK-Zellen, dass 1F5-IgG1 diese signifikant effektiver für ADCC aktivieren kann als der 1F5-IgA2 Antikörper (Abbildung 20 B).

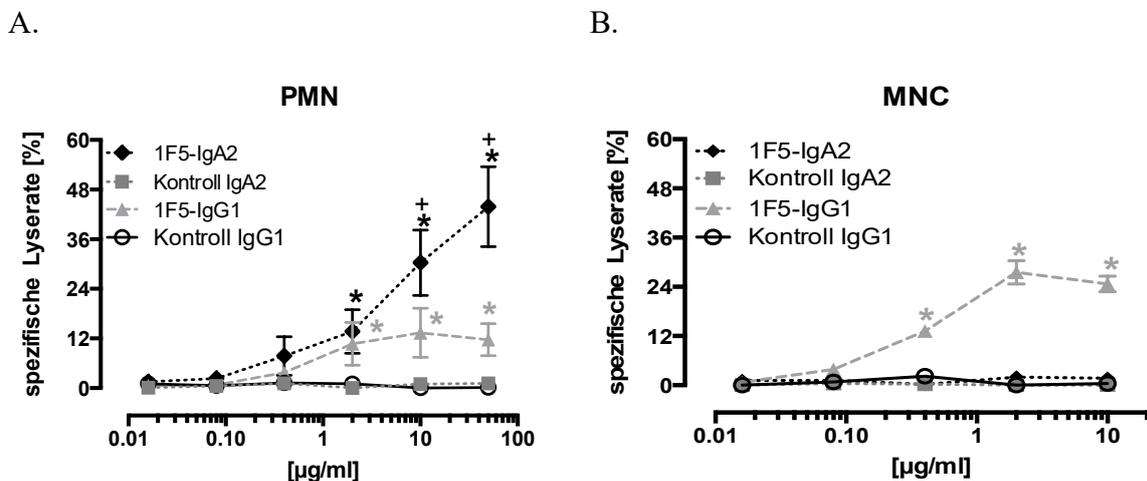


Abbildung 20: Effektorzellaktivierung durch CD20-gerichtete Antikörper. Ramos Zellen wurden in $^{51}\text{Chrom}$ freisetzungstest mit 1F5-IgA2 und 1F5-IgG1 sowie isolierten PMN (A) oder MNC (B) inkubiert. Gezeigt werden die Ergebnisse aus fünf unabhängigen Experimenten als Mittelwert \pm SEM der „spezifischen Lyserate [%]“. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,001$) zwischen CD20-gerichteten Antikörpern und der jeweiligen Isotypkontrolle sind mit * gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede zwischen 1F5-IgA2 und 1F5-IgG1 sind durch + gekennzeichnet.

Auch unter Verwendung isolierter Monozyten als Effektorzellen waren CD20-gerichtete 1F5-IgA2 Antikörper signifikant effektiver als 1F5 Antikörper vom IgG1 Isotyp (Abbildung 21 A). Weiterhin wurde die Fähigkeit der Antikörper zur Aktivierung von Makrophagen untersucht. Es wurden aus Monozyten mittels M-CSF gereifte Makrophagen verwendet. Im Ergebnis erwiesen sich 1F5-IgA2 und 1F5-IgG1 Antikörper als gleichermaßen effektiv in der Aktivierung Monozyten-abgeleiteter Makrophagen zur ADCC gegen Ramos Zellen (Abbildung 21 B).

A. B.

3. Ergebnisse

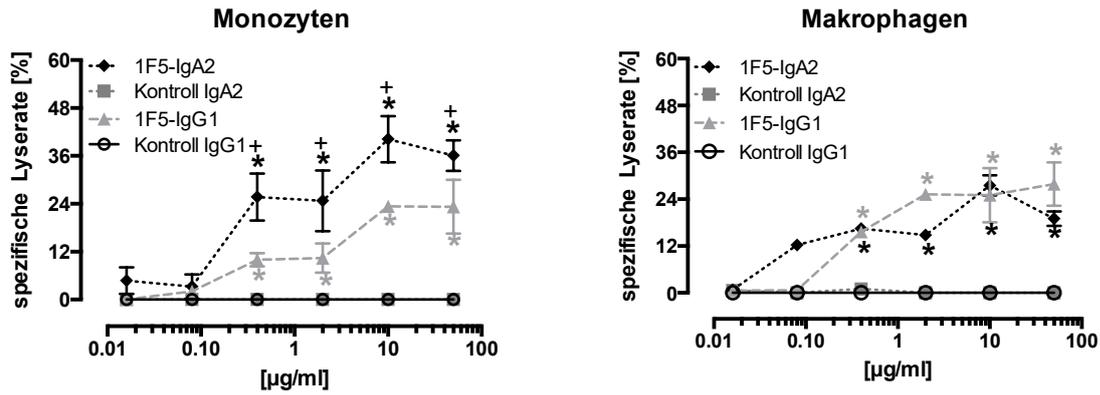


Abbildung 21: Aktivierung von Monozyten und Makrophagen durch CD20-gerichtete Antikörper. Ramos Zellen wurden in 51 Chromfreisetzungstest mit 1F5-IgA2 und 1F5-IgG1 sowie isolierten Monozyten (A) oder Monozyten-abgeleitete Makrophagen (B) inkubiert. Gezeigt werden die Ergebnisse aus fünf unabhängigen Experimenten als Mittelwert \pm SEM der „spezifischen Lyserate [%]“. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0.001$) zwischen CD20-gerichteten Antikörpern und der jeweiligen Isotypkontrolle sind mit * gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede zwischen 1F5-IgA2 und 1F5-IgG1 sind durch + gekennzeichnet.

Nachfolgend wurde die Expression von Fc α RI (CD89) sowie den Fc γ Rezeptoren I (CD64), II (CD32) und III (CD16) auf Monozyten und Makrophagen untersucht (Abbildung 22). Es zeigte sich, dass auf beiden Effektorzellpopulationen nur geringe Mengen CD89 exprimiert werden (Abbildung 22 A). Makrophagen exprimieren zwar Fc γ RII (CD32), jedoch konnten weiterführende Analysen zeigen, dass neben dem exzitatorischen Fc γ RIIa (CD32a) auch die inhibitorische Isoform Fc γ RIIb (CD32b) exprimiert wird (Abbildung 22 B). Dies könnte die eher geringe Aktivität des 1F5 Antikörpers vom IgG1 Isotyp mit diesen Effektorzellen erklären.

3. Ergebnisse

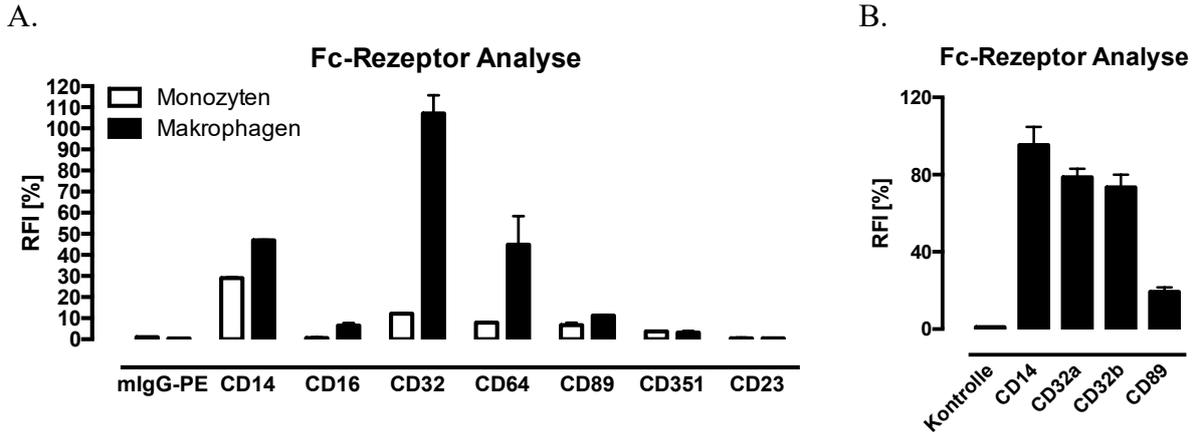


Abbildung 22: Fc-Rezeptor Analyse auf Monozyten und Makrophagen

Die Expression von Fc-Rezeptoren auf Monozyten und Makrophagen wurde mittels direkter Immunfluoreszenz untersucht (A). Die Expression von CD89 sowie unterschiedlicher CD32 Isoformen auf Makrophagen wurde mit indirekten Immunfluoreszenzen untersucht (B). Gezeigt werden die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten als Mittelwert \pm SEM der "relativen Fluoreszenz Intensität [%]" dargestellt.

Im Folgenden wurde untersucht, inwieweit die Fähigkeit von 1F5-IgA2 Antikörpern, ADCC auf PMN zu vermitteln, auf Ramos Zellen beschränkt ist. Für diese Experimente wurden acht verschiedene Zelllinien in 51 Chrom-Freisetzungstests mit PMN als Effektorzellen untersucht. Einleitend wurden die Oberflächenexpression von CD20 mittels direkter Immunfluoreszenz auf Ramos, Raji, Daudi, Wien-133, Mec2, Granta-519, MINO und ARH77 Zellen untersucht (Abbildung 23). Die höchste CD20 Expression zeigten Granta-512 Zellen, gefolgt von Daudi, Wien-133 und Mec2 Zellen. Mittlere Expressionen zeigten Ramos und ARH77 Zellen. Raji und Mino Zellen wiesen die geringste Expression von CD20 auf.

3. Ergebnisse

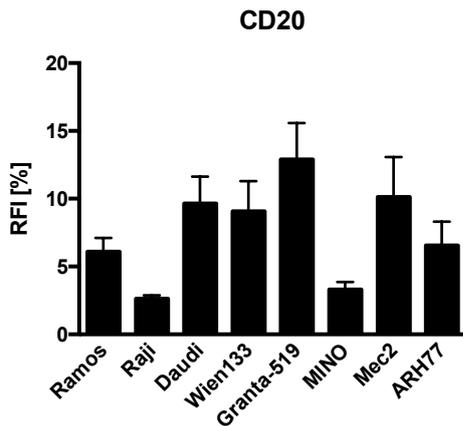


Abbildung 23: CD20 Oberflächenexpression verschiedener Lymphom-Zelllinien. In direkten Immunfluoreszenz-Analysen wurde die Expression von CD20 untersucht. Gezeigt werden die Ergebnisse aus sechs unabhängigen Experimenten als Mittelwert \pm SEM der „relativen Fluoreszenz Intensität [%]“.

In 51 Chrom-Freisetzungstests mit GM-CSF stimulierten PMN Effektorzellen war der 1F5-IgA2 Antikörper in der Lage, signifikante Tumorlyse von Ramos, Daudi, Granta-519, Raji und Wien-133 Zellen zu induzieren. Keine signifikante Tumorlyse konnte gegen Mec2, MINO, ARH77 und Raji Zellen vermittelt werden. 1F5-IgA2 Antikörper vermittelten somit effektiv PMN-abhängig Zytotoxizität gegen unterschiedliche Lymphomezellen, während der vergleichbare IgG1-Antikörper keine Wirkung zeigte.

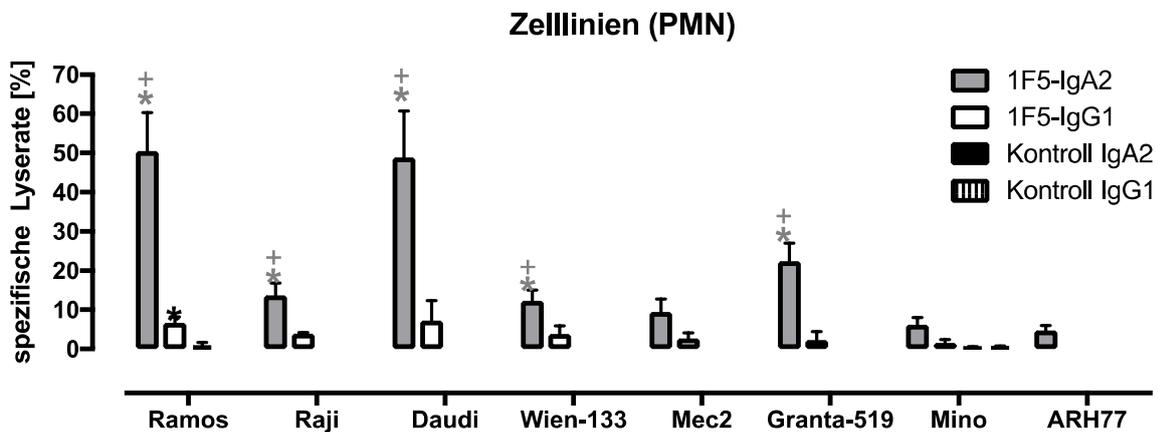


Abbildung 24: Vermittlung von ADCC durch CD20-gerichtete Antikörper auf verschiedenen Lymphom-Zelllinien. Die Fähigkeit von CD20 Antikörpern (10 μ g/ml) PMN-vermittelt ADCC gegen verschiedene Lymphomzellen zu induzieren, wurde in 51 Chrom-Freisetzungstests untersucht. Gezeigt werden die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten als Mittelwert \pm SEM der „spezifischen Lyserate [%]“. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0.001$) zwischen CD20-gerichteten Antikörpern und Kontrollantikörpern sind mit * gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede zwischen 1F5-IgA2 und 1F5-IgG1 sind durch + gekennzeichnet.

3.6 1F5-IgA2 und -IgG1 Antikörper vermitteln Tumorzellyse gegen primäre CLL Zellen

In weiteren $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungstests wurde untersucht, inwieweit sich primäre CLL-Zellen von Patienten lysieren lassen. Primäre CLL Zellen wurden isoliert und anschließend mit GM-CSF aktivierten PMN (Abbildung 25 A) oder MNC (Abbildung 25 B) sowie den CD20-gerichteten Antikörpern analysiert. In diesen Experimenten zeigte sich, dass der 1F5-IgA2 Antikörper mit GM-CSF stimulierten PMN Zellen signifikant effektiver ADCC induziert als der 1F5-IgG1 Antikörper. In ADCC Versuchen mit MNC als Effektoren, induzierten 1F5-IgG1 Antikörper signifikant effektiver spezifische Tumorzellyse als 1F5-IgA2 Antikörper.

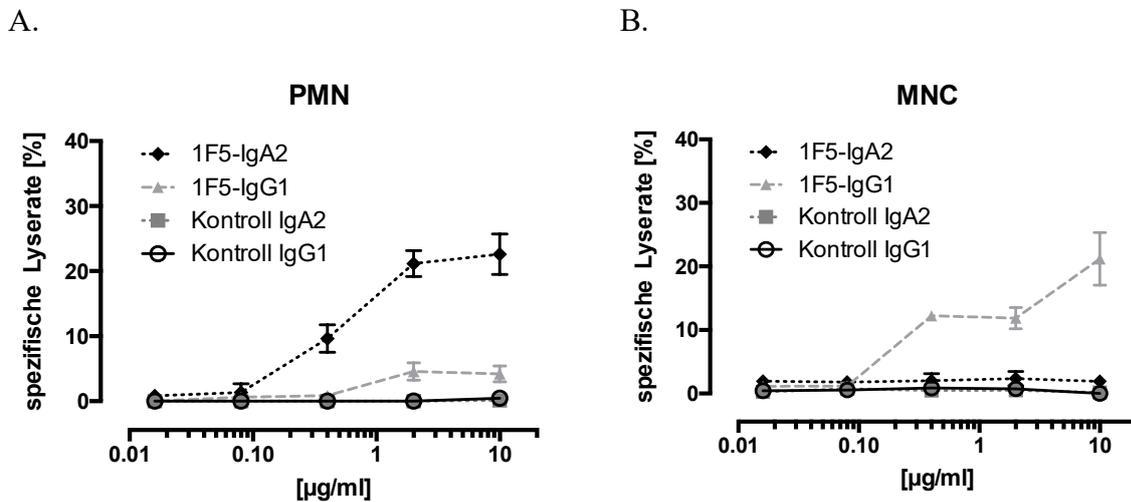


Abbildung 25: Vermittlung von ADCC durch CD20-gerichtete Antikörper gegen primäre CLL Proben. Aus dem peripheren Blut eines Patienten mit CLL wurden Tumorzellen sowie PMN (A) und MNC (B) Effektorzellen isoliert und in $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungstests untersucht. Gezeigt werden die Ergebnisse von Triplikaten als Mittelwert \pm SEM der „spezifischen Lyserate [%]“.

3.7 *In vivo* Effektivität CD20-gerichteter IgA2 Antikörper

Nachfolgend wurde die *in vivo* Effektivität CD20-gerichteter IgA2 Antikörper anhand ihrer Fähigkeit B-Zellen in Mäusen zu depletieren untersucht. B-Zellen aus für humanes CD20 transgenen Mäusen (hCD20+) sowie aus nicht transgenen BALB/c Mäusen wurden isoliert, mit CFSE markiert und einer nicht-transgenen Empfängermaus intravenös injiziert. 24 Stunden nach der Injektion wurden der Empfängermaus 50 µg 1F5-IgA2, -IgG1 oder PBS als Kontrolle intravenös injiziert. Weitere 16 Stunden später wurde den Mäusen die Milz entnommen. Eine Milzsuspension wurde erstellt und mit APC-anti-CD19-Antikörper gefärbt. Anschließend folgte eine durchflusszytometrische Analyse der verbliebenen B-Zellen, so dass das Verhältnis von hCD20-positiven B-Zellen (*Target*) zu nicht-transgenen B-Zellen (*Non-Target*) ermittelt werden konnte. 1F5-IgA2 und 1F5-IgG1 depletierten gleichermaßen effektiv hCD20-positive B-Zellen in Mäusen (Abbildung 26 A).

Im nächsten Schritt wurde der Beitrag von CDC an der *in vivo* gemessenen B-Zell-Depletion in BALB/c Mäusen untersucht. Es stellte sich heraus, dass die Kapazität von 1F5-IgA2 und 1F5-IgG5 Antikörpern zur Vermittlung von B-Zell-Depletion weder in C3- (Abbildung 26 B) noch in C1q-defizienten Mäusen (Abbildung 26 C) signifikant vermindert war.

3. Ergebnisse

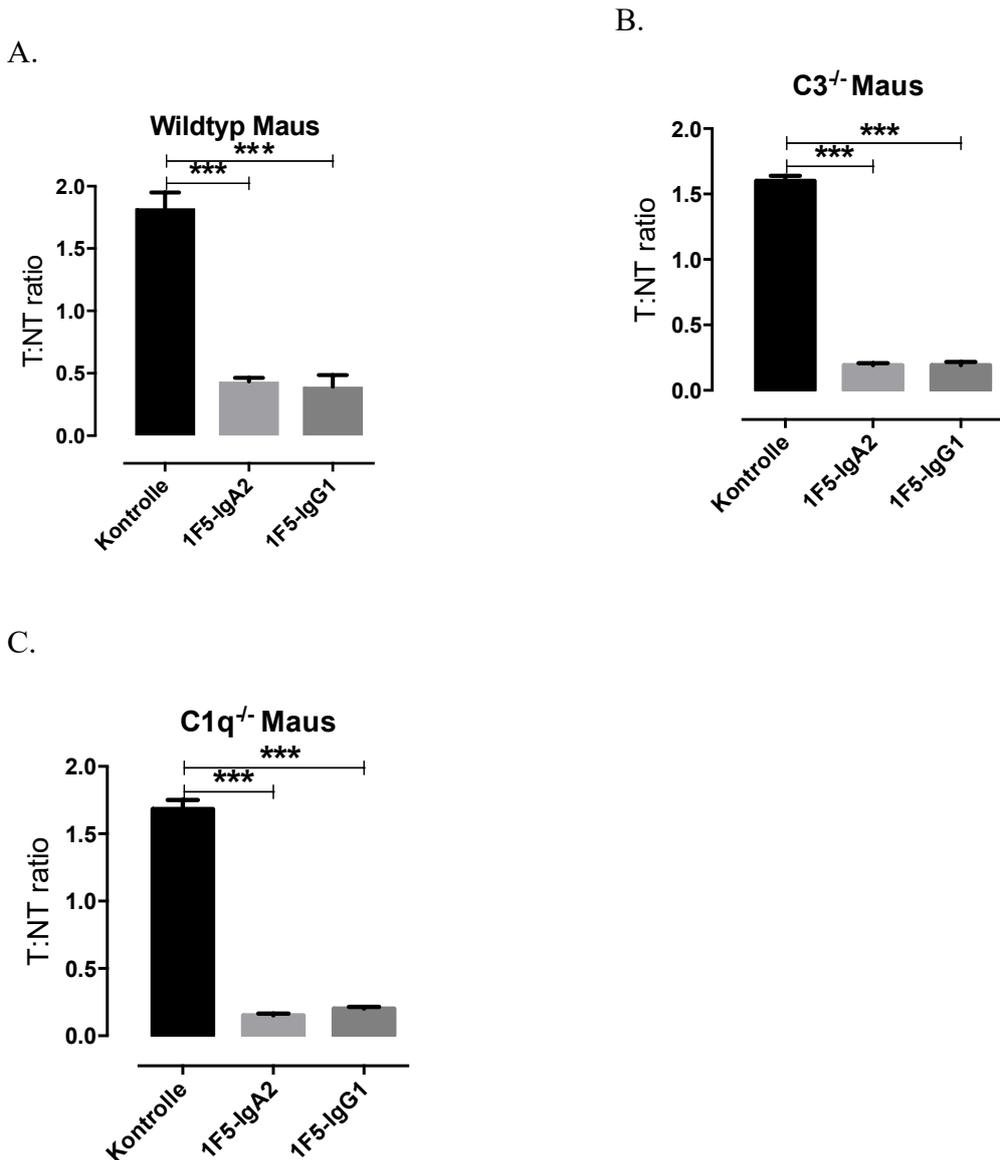


Abbildung 26: *In vivo* B-Zell-Depletion durch CD20-gerichtete Antikörper. Empfängermausen wurden CFSE-markierte hCD20-positive murine B-Zellen und die CD20-gerichteten Antikörper injiziert um die antikörper-abhängige Depletion von milzständigen B-Zellen zu untersuchen. (A) zeigt die Depletion in Wildtyp BALB/c Mäusen. (B) zeigt die B-Zell Depletion in C3-defizienten Mäusen, (C) die in C1q-defizienten Mäusen. Gezeigt werden die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten als Mittelwert \pm SD des „Target/Non-Target Ratio“. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0.001$) zwischen den CD20-spezifischen Antikörpern und der Kontrolle sind mit *** gekennzeichnet.

Mäuse exprimieren kein funktionelles Ortholog des humanen Fc α RI (CD89) (Monteiro und Van De Winkel, 2003). Den Beitrag Fc α RI-abhängiger Effektormechanismen an der *in vivo* B-Zell-Depletion wurde daher in für humanes CD89 transgenen (hCD89tg) Mäusen untersucht. Der Empfängermaus wurden 10 μ g des Primärantikörper intravenös injiziert, der weitere Versuchsablauf erfolgte analog zur geschilderten *in vivo* B-Zell-Depletion in BALB/c Wildtyp Mäusen. In diesen Experimenten zeigte sich, dass die Fähigkeit zur B-Zell-Depletion CD20-gerichteter 1F5-Antikörper des IgA2 Isotyps durch die Anwesenheit des Fc α RI nicht signifikant

3. Ergebnisse

beeinflusst wurde (Abbildung 27). Weiterhin wurde auch die Fähigkeit von 1F5-IgG1 zur B-Zell-Depletion nicht signifikant beeinflusst, dies wurde jedoch auch nicht erwartet, da 1F5-IgG1 nicht an CD89 bindet.

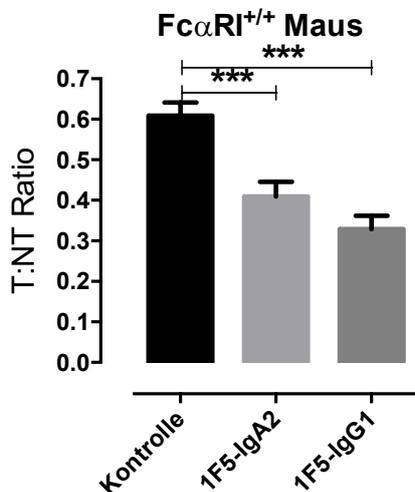


Abbildung 27: *In vivo* B-Zell Depletion CD20-gerichteter Antikörper in FcαRI (CD89) transgenen Mäusen. Die Fähigkeit zur B-Zell-Depletion von CD20 Antikörpern wurde *in vivo* in hCD89 transgenen Mäusen untersucht. Gezeigt werden die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten als Mittelwert \pm SD des „Target/Non-Target Ratio“. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0.001$) zwischen den CD20-spezifischen Antikörpern und der Kontrolle sind mit *** gekennzeichnet.

3.8 Evaluation von Fcα/μR als mögliches Ziel weitergehender Forschung

Der Beitrag der CDC an der durch die beiden CD20-gerichteten 1F5 Antikörper *in vitro* vermittelten Tumorlyse zeigte sich in dieser Form nicht für die B-Zell-Depletion *in vivo*. Frühere Studien in diesen und anderen Modellen zeigten, dass das Komplementsystem für die effektive Depletion hCD20-transgener B-Zellen nicht notwendig ist (Beers et al., 2008). Diese Daten legen nahe, dass andere Effektormechanismen die Abwesenheit komplementabhängiger Zytotoxizität oder FcαRI-abhängiger Wirkmechanismen an der *in vivo* Depletion hCD20 transgener B-Zell kompensieren. Ein möglicher Ansatz könnte ein zusätzlicher Rezeptor für IgA sein, der murine Fcα/μR (Cho et al., 2006). Um den Beitrag von Fcα/μR zu untersuchen, wurden ADCP Experimente durchgeführt. In diesem Experiment wurden knochenmarkabgeleitete Makrophagen als Effektorzellen genutzt. Die Zielzellen wurden in An- oder Abwesenheit des Fcα/μR blockierenden Antikörpers TX57 mit 1F5-IgA2 oder 1F5-IgG1 opsoniert. Wie erwartet zeigte sich für 1F5-IgG1 kein Unterschied in der beobachteten ADCP CD20-transgener B-Zellen nach Zugabe von TX57 (Abbildung 28 A). Dies wurde auch nicht erwartet, da Antikörper des IgG-Isotyp nicht an Fcα/μR binden. Für 1F5-IgA zeigte sich eine deutliche Abnahme der ADCP bei Blockierung von Fcα/μR (Abbildung 28 B). Diese Daten legen eine wichtige Rolle von Fcα/μR an der *in vivo* Depletion IgA2-opsonierter Zielzellen nahe.

3. Ergebnisse

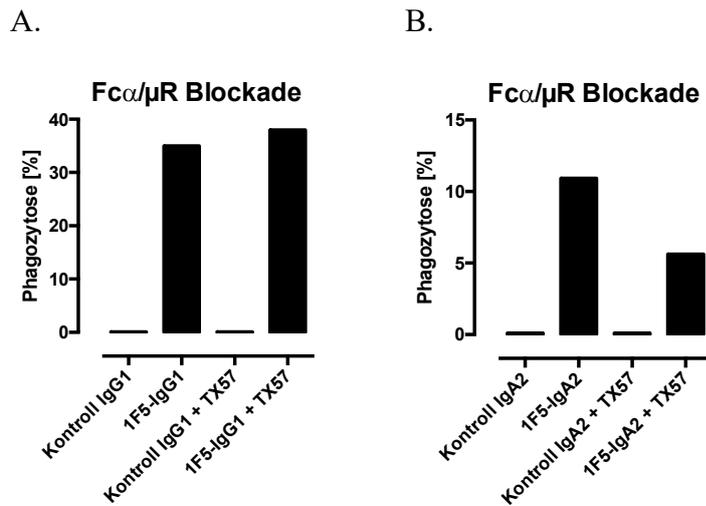


Abbildung 28: Einfluss der ADCP CD20-gerichteter Antikörper auf die B-Zell Depletion. Knochenmarkabgeleitete murine Makrophagen wurden mit 1F5-IgG1 (A) oder 1F5-IgA2 (B) opsonierten Zielzellen in An- oder Abwesenheit des Fc α / μ R blockierenden Antikörper TX57 in Phagozytoseversuchen untersucht. Gezeigt werden die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten als Mittelwert \pm SEM der „Phagozytose [%]“.

4. Diskussion

Gegen CD20 gerichtete Antikörper gehören seit 1997 zur Standardtherapie lymphatischer Neoplasien und konnten seitdem dazu beitragen, das Überleben der Patienten signifikant zu verlängern (Habermann et al., 2006). Jedoch besitzen aktuelle Therapien ihre Limitationen. So spricht etwa die Hälfte der Patienten auf eine Therapie mit Rituximab nicht an oder wird im Verlauf der Therapie gegen diese resistent (van Meerten und Hagenbeek, 2010). Eine Weiterentwicklung der CD20-gerichteten Therapie ist daher wünschenswert und notwendig. Alle zugelassenen Antikörper gegen CD20 sind ebenso wie die sich in der Entwicklung befindenden vom IgG-Isotyp (Lim et al., 2010). Antikörper des IgG-Isotyps besitzen den Vorteil, dass für sie gut etablierte Produktions- und Aufreinigungssysteme existieren, IgG im Serum eine lange Halbwertszeit besitzt und die Zulassungsbehörden mit den gängigen Sicherheitsbedenken vertraut sind (Wurm, 2004). Weiterhin sind IgG-Antikörper effektiv in der Lage, NK-Zellen und Komplement zur Tumorzelltötung zu rekrutieren (Lohse et al., 2012, Derer et al., 2012, Peipp et al., 2015). Jedoch können unterschiedliche Faktoren zu einem Therapieversagen oder zu einer geminderten Effektivität von IgG-basierter Immuntherapie führen. So kann es zu einer Interaktion von IgG1 mit dem inhibitorischen Fc γ RIIb kommen. Es wurde beschrieben, dass Polymorphismen der Fc γ -Rezeptoren sowie die Interaktion von IgG-Antikörpern mit nicht-signalübertragenden Fc γ -Rezeptoren (z.B. Fc γ -RIIb) ebenfalls negativ auf die vermittelte Tumorzelllyse wirken können (Meyer et al., 2016). CD20-gerichtete Antikörper des IgA-Isotyps könnten hier eine Ergänzung der bestehenden Therapie sein.

Das therapeutische Potential von Antikörpern des IgA-Isotyp wurde bereits für unterschiedliche Antigene untersucht. Die meisten dieser Studien nutzten gegen EpCAM, EGFR, HER-2/neu oder MHC Klasse II gerichtete IgA-Antikörper (Huls et al., 1999, Lohse et al., 2010, Lohse et al., 2011, Lohse et al., 2012, Dechant et al., 2002). In diesen Studien konnte gezeigt werden, dass IgA-Antikörper besonders effektiv myeloische Effektorzellen für ADCC gegen Tumorzellen rekrutieren können. Diese Ergebnisse konnten in vorhergehenden Studien mit bispezifischen Fc α RI x CD20 Antikörpern bestätigt werden (Stockmeyer et al., 2000). In einem für humanes Fc α RI-transgenen Mausmodell untersuchten Pascal et al. 2012 die Effektormechanismen CD20-gerichteter IgA Antikörper. In diesem Modell zeigte sich eine Zunahme der *in vivo* Effektivität CD20-gerichteter IgA-Antikörper in humanen Fc α RI-transgenen Mäusen. In diesen Versuchen wurde jedoch kein Versuch unternommen, die Rolle von ADCP an der beobachteten Tumorzelllyse zu untersuchen. Weiterhin wurde *in vitro* beobachtete CDC *in vivo* nicht untersucht (Pascal et al., 2012). Ziel dieser Arbeit war es, daraus folgend die Wirkmechanismen CD20-gerichteter Antikörper des IgA2-Isotyp zu untersuchen.

4.1 Direkte Wirkmechanismen CD20-gerichteter IgA-Antikörper

1F5-IgA2 und 1F5-IgG1 induzierten gleichermaßen effektiv homotypische Aggregation und Apoptose, jedoch konnte nur 1F5-IgA2 signifikant Nekrose vermitteln. Sowohl 1F5-IgA2 als auch 1F5-IgG1 waren, gegenüber der jeweils korrespondierenden Isotypkontrolle, signifikant in der Lage B-Zellen zu depletieren. Vergleicht man jedoch die durch direkte Effekte vermittelte Zytotoxizität von 1F5-IgA und 1F5-IgG mit der des Typ II CD20-Antikörpers Tositumomab, waren beide 1F5-Antikörper nur zu moderater Zytotoxizität in der Lage. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen spielten direkte Effektormechanismen für die beobachtete Tumortoxizität lediglich eine untergeordnete Rolle. Cragg et al. konnten zeigen, dass direkte Effekte, insbesondere für die durch Typ II Antikörper vermittelte Zytotoxizität, relevante Effektormechanismen sind (Cragg et al., 2003). In Anbetracht der schwachen Vermittlung direkter Effekte gegenüber dem Typ II Antikörper Tositumomab wäre der CD20-gerichtete 1F5-IgA Antikörper unter diesen Versuchsbedingungen nicht als Typ II Antikörper zu klassifizieren.

4.2 Indirekte Wirkmechanismen CD20-gerichteter IgA-Antikörper

4.2.1 Komplementvermittelte Zytotoxizität durch CD20-gerichtete IgA2 Antikörper

CD20-gerichtete IgA2-Antikörper sind in der Lage signifikant CDC gegen unterschiedliche Lymphomzelllinien und frisch isolierte humane CLL-Zellen zu vermitteln. Weiterhin legen Blockierungsversuche mit Vollblut als Effektorquelle nahe, dass CDC unter diesen Versuchsbedingungen einer der maßgeblichen Effektormechanismen ist. An der effektiven Depletion syngener B-Zellen in Mäusen durch humane CD20-gerichtete Antikörper des IgA2 Isotyp hatte CDC in dem hier genutzten Modell jedoch keinen Beitrag.

Es liegt eine Vielzahl an Untersuchungen vor, welche den Beitrag des Komplementsystems an den durch monoklonale Antikörper vermittelten Antitumoreffekten untersuchen. Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist jedoch erschwert, da es zahlreiche Aspekte gibt, welche die Aktivität des Komplementsystems beeinflussen (Derer et al., 2014a, Melis et al., 2015, Okroj et al., 2013). Cragg et al. konnten bereits 2003 zeigen, dass nicht alle CD20-gerichteten Antikörper gleichermaßen effektiv das Komplementsystem für die Tumorzelllyse aktivieren. So sind Antikörper, welche eine Umverteilung von CD20 in lipidreiche Regionen bewirken, deutlich potenter in der Vermittlung von CDC (Cragg et al., 2003). Welche Effekte durch einen CD20-gerichteten Antikörper vermittelt werden, hängt stark vom Epitop der Antikörper ab. Die Lokalität des Epitops entscheidet maßgeblich über die Entfernung sowie die Orientierung, welche der Antigen-Antikörper Komplexes zur Zellmembran einnimmt. Beides sind

4. Diskussion

entscheidende Prädiktoren für die Vermittlung von CDC (Teeling et al., 2006, Niederfellner et al., 2011). Weiterhin unterscheiden sich die Effektormechanismen in Abhängigkeit von der CD20 Konzentration auf der Zelloberfläche. Van Meerten et al. zeigten, dass es für Rituximab eine sigmoidale Korrelation zwischen der CD20 Konzentration auf der Zelloberfläche und dessen Fähigkeit zur CDC gibt (van Meerten et al., 2006). Es wird argumentiert, dass es sich bei CDC und ADCC um komplementäre Mechanismen der Pathogenabwehr handelt, und Zellen, welche gegenüber CDC resistent sind, durchaus empfänglicher gegenüber ADCC sein können, et vice versa (van Meerten et al., 2006).

Studien in genetisch veränderten Mäusen haben gezeigt, dass die durch Rituximab vermittelte Zytotoxizität gegen Lymphomzellen vor allem von Fc-Rezeptor-vermittelten Effekten abhängt. Komplementvermittelte Zytotoxizität leistete in diesem Modell keinen Beitrag an der zu beobachtenden Abtötung der Tumorzellen (Beers et al., 2010b). In abweichenden Modellen spielte CDC jedoch eine durchaus prominente Rolle. So zeigten Versuche in Mäusen mit murinen Lymphomzellen (EL4), welche mit humanem CD20 transfiziert wurden, dass der protektive Einfluss von Rituximab in C1q defizienten Mäusen komplett verloren geht (Di Gaetano et al., 2003). Studien an immunkompetenten Mäusen, welchen intravenös Zellen der für humanes CD20 transgenen murinen B-Zell Neoplasie 38C13-CD20⁺ injiziert wurden, zeigten bei Wegfall des Komplementsystems ebenfalls einen Verlust der protektiven Wirkung von Rituximab (Golay et al., 2006). Eine Limitation der Untersuchung von Komplementaktivierung *in vivo* ist, dass Mäuse nur rudimentär über einen klassischen Weg der Komplementaktivierung verfügen (Okroj et al., 2013).

Komplement liegt im Körper nicht in unbegrenztem Ausmaß vor, und in Abhängigkeit von der CD20-Expressionsdichte auf der Oberfläche, der Tumorlast sowie der Menge des applizierten Antikörpers kommt es zu einer Erschöpfung der verfügbaren Komplementfaktoren. Beurskens et al. beschreiben diesen Effekt in einer klinischen Studie mit CLL-Patientin nach Infusion von Ofatumumab und Chemotherapie. In dieser Studie zeigte sich, dass es insbesondere bei hoher Tumorlast sowie höheren Mengen applizierten Antikörpers zu einer Erschöpfung komplementvermittelter Zytotoxizität kommt (Beurskens et al., 2012). Darüber hinaus hängt der Beitrag des Komplementsystems an der Tumorzellyse sowohl von der Tumorlast (Boross et al., 2011) als auch von der Lokalisation ab (Gong et al., 2005, Wang et al., 2009). Für das folliculäre Lymphom konnte gezeigt werden, dass die Komplementregulatoren CD55 und CD59 nach Rituximab-Therapie gesteigert auf den Zielzellen zu finden sind. Die Fähigkeit von Rituximab *in vitro* CDC zu vermitteln, korreliert mit dem Level von CD55 und CD59 auf der Oberfläche (Golay et al., 2001). Dies wird als Schutzmechanismus der Krebszelle gegen das

4. Diskussion

Komplementsystem verstanden, jedoch sind diese Regulatoren als Prädiktoren für ein Ansprechen auf eine CD20-gerichtete Therapie durch Rituximab ungeeignet (Weng und Levy, 2001).

Klinisch befindet sich mit dem humanen CD20-gerichteten IgG1 Antikörper Ofatumumab bereits ein Antikörper in Anwendung, dessen optimierte Effektivität insbesondere auf eine gesteigerte CDC zurückgeführt werden kann. Das Epitop von Ofatumumab liegt in der kleinen Domäne von CD20. Nach Bindung an CD20 befindet sich Ofatumumab membrannäher als Rituximab und löst sich langsamer aus seiner Bindung mit CD20. Dies resultiert in einer gegenüber Rituximab gesteigerten CDC (Teeling et al., 2004). Klinischen Einsatz findet Ofatumumab im Rahmen der Therapie von unbehandelten oder therapieresistenten Patienten mit CLL, welche in der Regel eine niedrige CD20 Expression aufweisen (Golay et al., 2001). In Kombination mit Chemo- und Immuntherapie stellt Ofatumumab hier eine Ergänzung des bestehenden Repertoires dar (Coiffier et al., 2008, Byrd et al., 2014, Hillmen et al., 2015).

In den hier vorliegenden Versuchen konnte bestätigt werden, dass CD20-gerichtete IgA2 Antikörper kein C1q binden. C1q ist der Aktivator des klassischen Weges der Komplementkaskade. IgA Antikörper besitzen kein C1q-Bindungsmotiv, wie es Antikörper des IgG-Isotyp besitzen, und sind daher nicht in der Lage C1q zu binden (Duncan und Winter, 1988). Es besteht die Möglichkeit, dass CD20-gerichtete IgA Antikörper eine Komplementaktivierung über den alternativen oder den Lectin-Weg auslösen. Das IgA Antikörper in der Lage sind diese beiden Wege zu triggern wurde in der Vergangenheit gezeigt (Hiemstra et al., 1987, Lucisano Valim und Lachmann, 1991, Roos et al., 2001, Terai et al., 2006). IgA Antikörper sind, wenn bestimmte Glykosylierungen (Mannose und/oder N-Acetylglucosamin) vorhanden und für das Komplementsystem zugänglich sind, in der Lage, Komplement über den Lectin-Weg zu aktivieren (Roos et al., 2001, Terai et al., 2006). Jedoch werden diese Ergebnisse in der Literatur kritisch diskutiert, da unter den getesteten Versuchsbedingungen hitzeaggregiertes IgA verwendet wird, und eine artifizielle Aktivierung des Komplementsystems nicht auszuschließen ist (Woof und Russell, 2011). Zudem scheint eine Aktivierung vor dem Hintergrund, dass IgA Antikörper die Komplementaktivierung durch IgG- und IgM-Antikörper hemmen, eher widersprüchlich (Russell et al., 1989, Griffiss und Goroff, 1983, Vidarsson et al., 2001).

Es ist somit das Zusammenspiel zahlreicher Faktoren welche die Effizienz von komplementvermittelter Zytotoxizität bestimmen (Derer et al., 2012). Zu diesen Faktoren zählen Expression, Modulation und Regulation des Zielantigens, die An- oder Abwesenheit von Komplement regulierenden Proteinen, die Mikroumgebung des Tumors, aber auch intrinsische

4. Diskussion

Eigenschaften des Antikörpers wie seine Glykosylierung oder das erkannte Epitop (Okroj et al., 2013). Okroj et al. resümieren in ihrem Review von 2013, dass es sich bei CDC und ADCC um komplementäre Mechanismen der Pathogenabwehr handelt und die oftmals widersprüchlichen Daten bezüglich des Stellenwertes der CDC in *in vitro* und *in vivo* Versuchen vor dem Hintergrund unübersichtlich vieler Variablen nicht ausreichend vergleichbar seien (Okroj et al., 2013).

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Daten legen eine prominente Rolle des alternativen Weges der Komplementaktivierung nahe. Dieser Schluss wird durch die Beobachtung unterstützt, dass CD20-gerichtete IgA2 Antikörper um CDC zu vermitteln im Vergleich zu IgG1 höhere Serumkonzentrationen und längere Inkubationszeiten benötigten. Diese Daten stehen im Einklang mit vorherigen Studien, die gezeigt haben, dass die Aktivierung des klassischen Wegs schneller ist und niedrigere Komplementkonzentrationen benötigt als der alternative Weg (Root et al., 1972, Kerr, 1980, Roberts und Phillips, 1983). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der C3 Inhibitor Compstatin effektiver IgA-vermittelte Effekte im Vollblut inhibierte als solche, welche durch IgG1 vermittelt werden, wobei Compstatin effektiver den alternativen als den klassischen Weg hemmt (Nilsson et al., 1998). Die Fähigkeit beider Isotypen zur B-Zell-Depletion war in C3 – und C1q-defizienten Mäusen nicht reduziert. Diese Daten sprechen dafür, dass CDC *in vivo* unter den gegebenen Versuchsbedingungen keinen Einfluss auf die Effektivität CD20-gerichteter Antikörper hat und bestätigt damit die Daten vorausgegangener Studien (Beers et al., 2010b).

4.2.2 Effektorzellaktivierung durch CD20-gerichtete IgA2-Antikörper

1F5-IgA2 war *in vitro* in der Lage, PMN Zellen für ADCC zu aktivieren. Dies ist insofern bedeutsam, da PMN Zellen die häufigste Effektorzellpopulation im menschlichen Blut sind und signifikant zur therapeutischen Effektivität monoklonaler Antikörper beitragen können (Uchida et al., 2004, Gong et al., 2005, Minard-Colin et al., 2008, Gul et al., 2014). In den vorliegenden Untersuchungen waren CD20-gerichtete IgA2 Antikörper nicht in der Lage, NK-Zellen für ADCC aktivieren. Dies wurde auch nicht erwartet, da NK-Zellen den wichtigsten Fc-Rezeptor für IgA, Fc α RI, auf der Oberfläche nicht exprimieren. Jedoch wird durch NK-Zellen der für IgG1-vermittelte Zytotoxizität wichtige Fc γ RIIIa exprimiert, was die Überlegenheit von 1F5-IgG1 gegenüber 1F5-IgA2 in den vorliegenden ADCC Untersuchungen mit MNC als Effektorquelle erklären kann (Dechant et al., 2002, van Egmond et al., 2000, Bakema et al., 2011). In der Vergangenheit wurde demonstriert, dass Fc-vermittelte Effektormechanismen einen entscheidenden Beitrag an den durch Antikörper vermittelten Effekten gegen Tumore

4. Diskussion

haben (Clynes et al., 2000). Die Überlegenheit der IgA-Antikörper, in den hier vorliegenden ADCC-Untersuchungen mit PMN Zellen, könnte durch die Verteilung und Funktion der beteiligten Fc-Rezeptoren erklärt werden. Für Antikörper des IgG-Isotyp existieren 6 verschiedene Fc-Rezeptoren: Fc γ RI (CD64), Fc γ RII mit den Isoformen a,b und c (CD32a, b, c) sowie Fc γ RIII mit den Isoformen a und b (CD16 a, b). Fc γ RIIIb ist ein nicht-signaltransduzierender Rezeptor, welcher insbesondere durch neutrophile Granulozyten, der häufigsten Zellpopulation in der PMN Fraktion des Blutes, exprimiert wird. Mit Fc γ RIIb existiert darüber hinaus inhibitorischen IgG-Rezeptor, welcher insbesondere durch Monozyten, Makrophagen, und B-Zellen exprimiert wird. Beide Rezeptoren können zu einer verstärkten Internalisierung von CD20 (Tipton et al., 2015) oder zu einer Reduktion der verfügbaren Antikörper führen und stellen damit Limitationen CD20-gerichteter Therapie mit IgG-Antikörpern dar (Derer et al., 2014b).

Weiterhin sind für die Effektorzellaktivierung durch IgG-Antikörper wichtigen Fc-Rezeptoren Fc γ RIIIa und Fc γ RIIa Polymorphismen bekannt, welche die Affinität der Rezeptoren zu IgG beeinflussen können (Koene et al., 1997). Dies hat klinische Implikationen, da ein Zusammenhang zwischen dem Ansprechen auf eine CD20-gerichtete Antikörpertherapie und dem Vorliegen oben genannter Polymorphismen beschrieben wurde (Weng und Levy, 2003). Für Fc γ RIIIa geht der Polymorphismus V158F (Austausch der Aminosäure Phenylalanin (F) gegen Valin (V) in Position 158) mit einer erhöhten Affinität gegenüber humanem IgG1 einher. Klinische Untersuchungen an Patienten mit folliculären Lymphomen zeigten, dass Patienten, welche für den Valin-Polymorphismus des Fc γ RIIIa homozygot sind, ein günstigeres Ansprechen auf eine CD20-gerichtete Therapie mit Rituximab zeigten (Cartron et al., 2002). Für CLL-Patienten konnte dieser Zusammenhang nicht beobachtet werden (Dornan et al., 2010). Größere Studien stellten die vorherigen Untersuchungen für das folliculäre Lymphom in Frage, da in ihnen kein verbessertes Ansprechen und kein Überlebensvorteil unter Trägern des Valin-Polymorphismus gefunden werden konnte (Ghesquieres et al., 2012).

Diese Limitationen sind für Antikörper des IgA-Isotyp nicht beschrieben. Bisher wurde kein inhibitorischer Fc α -Rezeptor gefunden. Darüber hinaus wurden bisher keine nicht-signaltransduzierenden Rezeptoren mit relevanter Affinität zu IgA erkannt. Die sigmoidale Korrelation zwischen CD20 Expression und ADCC konnten van Meerten et al. nicht für ADCC beobachten (van Meerten et al., 2006). Beers et al. argumentieren, dass sich in diesen Untersuchungen die CD20-Konzentration in einem für ADCC bereits gesättigten Bereich befand, und es hier ebenfalls eine Abhängigkeit der ADCC von der CD20 Expression zu erwarten ist. (Beers et al., 2010b).

4. Diskussion

In vivo zeigte sich, dass beide Antikörper gleichermaßen effektiv in der Lage sind, B-Zell Depletion zu vermitteln. Blockierungsversuche mit Fc α RI lieferten keinen Hinweis, dass in dem hier genutzten Modell ADCC einen Anteil an der beobachteten B-Zell Depletion *in vivo* hatten. Die hier vorliegenden Daten stehen somit nicht in Einklang mit vorhergegangenen *in vivo* Experimenten, welche ADCC als wesentlichen Effektormechanismus der *in vivo* B-Zell Depletion beschrieben (Pascal et al., 2012).

4.3 Phagozytose durch CD20-gerichtete IgA2-Antikörper

Als weiterer indirekter Effektormechanismus ist die Fc-abhängige Aktivierung phagozytischer Zellen möglich. Mäuse exprimieren kein funktionelles Ortholog des humanen Fc α RI. Jedoch wird der IgA- und IgM-Rezeptor Fc α / μ R (CD351) auf Makrophagen und B-Zellen, insbesondere in der Milz exprimiert (Shibuya et al., 2000, Cho et al., 2006, Yoo et al., 2011). In den hier dargestellten Vorversuchen zeigte sich, dass es bei der Blockade des murinen Fc α / μ R zu einer Kompromittierung Fc-abhängiger ADCP kommt. Minard-Colin et al. konnten in Versuchen an immunkompetenten Mäusen zeigen, dass es nach Tumorzellinjektion in Folge der Depletion von Makrophagen zu einem völligen Verlust der zuvor beobachteten B-Zell Depletion kommt (Minard-Colin et al., 2008).

Auch Tipton et al. konnten zeigen, dass ADCP einer für die *in vivo* B-Zell Depletion essentieller Effektormechanismus ist (Tipton et al., 2015). Es sind weitergehende Experimente notwendig, um die Rolle Makrophagen-vermittelter Phagozytose an der B-Zell Depletion durch CD20-gerichtete IgA-Antikörper zu untersuchen. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die Expression von Fc α / μ R auf Makrophagen abhängig von dem Gewebe ist, in welchem sich diese befinden, und Makrophagen in verschiedenen Kompartimenten unterschiedliche Rollen zukommen (Hamre et al., 2003). Weiterhin ist die Untersuchung der ADCP *in vivo* nach Depletion der Makrophagen notwendig. Darüberhinausgehend könnte die Depletion einzelner Effektorzellpopulationen zum Verständnis der beteiligten Mechanismen an der zu beobachtenden Zytotoxizität beitragen.

4.4 Ausblick

Zusammenfassend demonstrieren die Daten die Effektivität eines CD20-gerichteten IgA2 Antikörpers in der Abtötung CD20-positiver Lymphomzellen *in vitro* und *in vivo*. Eine Zuordnung des CD20-gerichteten 1F5-IgA2 Antikörpers in eine der beiden Klassen CD20-gerichteter Antikörper scheint aufgrund der gegebenen Daten nicht sinnvoll. 1F5-IgA2

4. Diskussion

vermittelte *in vitro* effektiv ADCC und CDC, jedoch keine direkten Effekte und imponiert damit als klassischer Typ I CD20-gerichteter Antikörper. Jedoch ließen sich diese Daten *in vivo* nicht bestätigen. Es konnte gezeigt werden, dass hierfür eine Vielzahl unterschiedlicher Faktoren in Frage kommt. Wahrscheinlich ist hier eine Beteiligung Fc-abhängiger Aktivierung phagozytierender Zellen. Zur weiteren Untersuchung des Beitrags IgA-vermittelter ADCP *in vivo* sind murine Fc α / μ R knock-out Modelle sowie eine Depletion phagozytierender Zellen mittels Clodronat-haltiger Liposomen essentiell (Yoo et al., 2011, Legrain et al., 2015). Antigen-Modulation gilt als zentraler Mechanismus des Therapieversagens von Rituximab (Beers et al., 2010a). Dass CD20 nach Antikörperbindung in hoher Konzentration auf der Zelle verfügbar bleibt, wird als ein Vorteil CD20-gerichteter Therapie angesehen. Beers et al. stellen diese Daten jedoch als artifiziell infrage, da es sich um kultivierte B-Zellen handelt (Beers et al., 2010b). In den peripheren B-Zellen gesunder Spender sei eine Antigenmodulation zu beobachten. Insbesondere Typ I Antikörper führen bereits kurz nach ihrer Bindung an CD20 zu einer Modulation des Antigens. Der Komplex aus Antigen-Antikörper wird durch Trogozytose ins Zellinnere verlagert und degradiert. Typ II Antikörper zeigen ein deutlich geringeres Potential für Antigenmodulation. Hieraus resultiert eine längere Serum-Halbwertszeit von Typ II Antikörpern. Dies sind wichtige Faktoren antineoplastischer Immuntherapien, da die Antigenmodulation Fc-abhängige Effektormechanismen behindert (Tipton et al., 2015). Inwieweit IgA-Antikörper eine Umverteilung und Internalisierung von CD20 vermitteln, ist durch künftige Versuche zu untersuchen.

5. Zusammenfassung

Die funktionelle Charakterisierung eines CD20-gerichteten IgA2-Antikörpers stellt den thematischen Schwerpunkt dieser Arbeit dar und hatte zum Ziel, dessen therapeutisches Potential zu erfassen sowie die zugrundeliegenden Effektormechanismen darzulegen.

Mit Rituximab steht seit 1997 für die Klinik ein chimärer, monoklonaler Antikörper gegen CD20 zur Verfügung. Alle aktuell therapeutisch eingesetzten sowie in der Entwicklung befindlichen CD20-Antikörper sind Antikörper des IgG-Isotyp. Jedoch könnte ein Wechsel von den Antikörpern des IgG- zu solchen des IgA-Isotyp eine Reihe von Vorteilen mit sich bringen: IgA-Antikörper können über Fc α RI Granulozyten sowie Monozyten und Makrophagen aktivieren und sprechen somit eine andere Effektorpopulation als IgG-Antikörper an, wobei Granulozyten zahlenmäßig die größte Population an Effektorzellen des Körpers darstellen. Die effektivere Interaktion mit dem Fc-Rezeptor und der damit verbundenen stärkeren Aktivierung von zytolytischen Wirkmechanismen stellen weitere Vorteile dar. Interessanterweise sind 1F5-IgG1 und –IgA2 in der Vermittlung von Zytotoxizität gegen verschiedene Lymphom-Zelllinien mit dem peripheren Vollblut gesunder Spender als Effektorquelle gleichermaßen effektiv. Weiterhin sind 1F5-IgA2 und 1F5-IgG1 gleichermaßen effektiv in der Depletion von hCD20-positiven B-Zellen in Mäusen. Der untersuchte IgA2 Antikörper gegen CD20 ist in der Lage, signifikant CDC gegen unterschiedliche Lymphom-Zelllinien und frisch isolierte humane CLL Zellen zu vermitteln. Diese Daten legten *in vitro* eine unerwartet prominente Rolle komplementvermittelter Zytotoxizität nahe, welche sich in komplementdefizienten Mäusen nicht bestätigen ließ. 1F5-IgA2 war *in vitro* in der Lage, effektiv PMN Zellen zur Tumorzelllyse auf verschiedenen Lymphom-Zelllinien und primäreren CLL-Proben zu aktivieren. Die Untersuchung der *in vivo* Effektivität des CD20-gerichteten IgA-Antikörpers in Fc α RI transgenen Mäusen konnte jedoch keinen Beitrag Fc α RI-abhängiger Mechanismen an der gemessenen Zytotoxizität feststellen und stehen damit nicht in Einklang mit vorhergehenden Studien. Versuche mit phagozytierenden Makrophagen legen ADCP als relevanten Effektormechanismus für die effektive *in vivo* B-Zell Depletion durch CD20-gerichtete IgA-Antikörper nahe. Zur weitergehenden Analyse sind hier anschließende Experimente notwendig. Zusammenfassend demonstrieren die Daten die Effektivität eines CD20-gerichteten IgA2 Antikörpers in der Abtötung CD20-positiver Lymphomzellen *in vitro* und *in vivo*. IgA Antikörper könnten somit das Immuntherapeutische Repertoire gegen lymphatische Neoplasien wirksam ergänzen.

6. Literaturverzeichnis

Armitage, J. O. & Weisenburger, D. D. (1998): New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *J. Clin. Oncol.*, 16, 2780-95.

Bakema, J. E., Ganzevles, S. H., Fluitsma, D. M., Schilham, M. W., Beelen, R. H., Valerius, T., Lohse, S., Glennie, M. J., Medema, J. P. & Van Egmond, M. (2011): Targeting Fc α RI on polymorphonuclear cells induces tumor cell killing through autophagy. *J. Immunol.*, 187, 726-32.

Bakema, J. E. & Van Egmond, M. (2011): The human immunoglobulin A Fc receptor Fc α RI: a multifaceted regulator of mucosal immunity. *Mucosal Immunol.*, 4, 612-24.

Beers, S. A., Chan, C. H., French, R. R., Cragg, M. S. & Glennie, M. J. (2010a): CD20 as a target for therapeutic type I and II monoclonal antibodies. *Semin. Hematol.*, 47, 107-14.

Beers, S. A., Chan, C. H., James, S., French, R. R., Attfield, K. E., Brennan, C. M., Ahuja, A., Shlomchik, M. J., Cragg, M. S. & Glennie, M. J. (2008): Type II (tositumomab) anti-CD20 monoclonal antibody out performs type I (rituximab-like) reagents in B-cell depletion regardless of complement activation. *Blood*, 112, 4170-7.

Beers, S. A., French, R. R., Chan, H. T., Lim, S. H., Jarrett, T. C., Vidal, R. M., Wijayaweera, S. S., Dixon, S. V., Kim, H., Cox, K. L., Kerr, J. P., Johnston, D. A., Johnson, P. W., Verbeek, J. S., Glennie, M. J. & Cragg, M. S. (2010b): Antigenic modulation limits the efficacy of anti-CD20 antibodies: implications for antibody selection. *Blood*, 115, 5191-201.

Beurskens, F. J., Lindorfer, M. A., Farooqui, M., Beum, P. V., Engelberts, P., Mackus, W. J., Parren, P. W., Wiestner, A. & Taylor, R. P. (2012): Exhaustion of cytotoxic effector systems may limit monoclonal antibody-based immunotherapy in cancer patients. *J. Immunol.*, 188, 3532-41.

Beyer, T., Lohse, S., Berger, S., Peipp, M., Valerius, T. & Dechant, M. (2009): Serum-free production and purification of chimeric IgA antibodies. *J. Immunol. Methods*, 346, 26-37.

Blade, J., Fernandez De Larrea, C., Rosinol, L., Cibeira, M. T., Jimenez, R. & Powles, R. (2011): Soft-tissue plasmacytomas in multiple myeloma: incidence, mechanisms of extramedullary spread, and treatment approach. *J. Clin. Oncol.*, 29, 3805-12.

Boel, E., Verlaan, S., Poppelier, M. J., Westerdal, N. A., Van Strijp, J. A. & Logtenberg, T. (2000): Functional human monoclonal antibodies of all isotypes constructed from phage display library-derived single-chain Fv antibody fragments. *J. Immunol. Methods*, 239, 153-66.

Boross, P., Jansen, J. H. M., De Haij, S., Beurskens, F. J., Van Der Poel, C. E., Bevaart, L., Nederend, M., Golay, J., Van De Winkel, J. G. J., Parren, P. W. H. I. & Leusen, J. H. W. (2011): The in vivo mechanism of action of CD20 monoclonal antibodies depends on local tumor burden. *Haematologica*, 96, 1822-1830.

6. Literaturverzeichnis

Boross, P. & Leusen, J. H. (2012): Mechanisms of action of CD20 antibodies. *Am. J. Cancer Res.*, 2, 676-90.

Boross, P., Lohse, S., Nederend, M., Jansen, J. H., Van Tetering, G., Dechant, M., Peipp, M., Royle, L., Liew, L. P., Boon, L., Van Rooijen, N., Bleeker, W. K., Parren, P. W., Van De Winkel, J. G., Valerius, T. & Leusen, J. H. (2013): IgA EGFR antibodies mediate tumour killing in vivo. *EMBO Mol. Med.*, 5, 1213-26.

Byrd, J. C., Brown, J. R., O'Brien, S., Barrientos, J. C., Kay, N. E., Reddy, N. M., Coutre, S., Tam, C. S., Mulligan, S. P., Jaeger, U., Devereux, S., Barr, P. M., Furman, R. R., Kipps, T. J., Cymbalista, F., Pocock, C., Thornton, P., Caligaris-Cappio, F., Robak, T., Delgado, J., Schuster, S. J., Montillo, M., Schuh, A., De Vos, S., Gill, D., Bloor, A., Dearden, C., Moreno, C., Jones, J. J., Chu, A. D., Fardis, M., Mcgreivy, J., Clow, F., James, D. F. & Hillmen, P. (2014): Ibrutinib versus ofatumumab in previously treated chronic lymphoid leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 371, 213-23.

Campo, E. & Rule, S. (2014): Mantle cell lymphoma: evolving management strategies.

Cartron, G., Dacheux, L., Salles, G., Solal-Celigny, P., Bardos, P., Colombat, P. & Watier, H. (2002): Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood*, 99, 754-758.

Cheson, B. D., Fisher, R. I., Barrington, S. F., Cavalli, F., Schwartz, L. H., Zucca, E. & Lister, T. A. (2014): Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification. *J. Clin. Oncol.*, 32, 3059-68.

Cho, Y., Usui, K., Honda, S., Tahara-Hanaoka, S., Shibuya, K. & Shibuya, A. (2006): Molecular characteristics of IgA and IgM Fc binding to the Fcα/μR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 345, 474-8.

Cleary, K. L. S., Chan, H. T. C., James, S., Glennie, M. J. & Cragg, M. S. (2017): Antibody distance from the cell membrane regulates antibody effector mechanisms. *J. Immunol.*, 198, 3999-4011.

Clynes, R. A., Towers, T. L., Presta, L. G. & Ravetch, J. V. (2000): Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat. Med.*, 6, 443-6.

Coiffier, B. (2006): Monoclonal antibody as therapy for malignant lymphomas. *C. R. Biol*, 329, 241-54.

Coiffier, B., Lefebvre, S., Pedersen, L. M., Gadeberg, O., Fredriksen, H., Van Oers, M. H., Wooldridge, J., Kloczko, J., Holowiecki, J., Hellmann, A., Walewski, J., Flensburg, M., Petersen, J. & Robak, T. (2008): Safety and efficacy of ofatumumab, a fully human monoclonal anti-CD20 antibody, in patients with relapsed or refractory B-cell chronic lymphocytic leukemia: a phase 1-2 study. *Blood*, 111, 1094-100.

Cragg, M. S. (2011): CD20 antibodies: doing the time warp. *Blood*, 118, 219-20.

6. Literaturverzeichnis

- Cragg, M. S., Morgan, S. M., Chan, H. T., Morgan, B. P., Filatov, A. V., Johnson, P. W., French, R. R. & Glennie, M. J. (2003): Complement-mediated lysis by anti-CD20 mAb correlates with segregation into lipid rafts. *Blood*, 101, 1045-52.
- Cragg, M. S., Walshe, C. A., Ivanov, A. O. & Glennie, M. J. (2005): The biology of CD20 and its potential as a target for mAb therapy. *Curr Dir Autoimmun*, 8, 140-74.
- Dechant, M. & Valerius, T. (2001): IgA antibodies for cancer therapy. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 39, 69-77.
- Dechant, M., Vidarsson, G., Stockmeyer, B., Repp, R., Glennie, M. J., Gramatzki, M., Van De Winkel, J. G. J. & Valerius, T. (2002): Chimeric IgA antibodies against HLA class II effectively trigger lymphoma cell killing. *Blood*, 100, 4574-4580.
- Dechant, M., Beyer, T., Schneider-Merck, T., Weisner, W., Peipp, M., van de Winkel, J.G. & Valerius, T. (2007) Effector mechanisms of recombinant IgA antibodies against epidermal growth factor receptor. *The Journal of Immunology*, 179, 2936-2943
- Derer, S., Bauer, P., Lohse, S., Scheel, A. H., Berger, S., Kellner, C., Peipp, M. & Valerius, T. (2012): Impact of epidermal growth factor receptor (EGFR) cell surface expression levels on effector mechanisms of EGFR antibodies. *J. Immunol.*, 189, 5230-9.
- Derer, S., Beurskens, F. J., Rosner, T., Peipp, M. & Valerius, T. (2014a): Complement in antibody-based tumor therapy. *Crit. Rev. Immunol.*, 34, 199-214.
- Derer, S., Glorius, P., Schlaeth, M., Lohse, S., Klausz, K., Muchhal, U., Desjarlais, J. R., Humpe, A., Valerius, T. & Peipp, M. (2014b): Increasing FcγRIIa affinity of an FcγRIII-optimized anti-EGFR antibody restores neutrophil-mediated cytotoxicity. *mAbs*, 6, 409-21.
- Di Gaetano, N., Cittera, E., Nota, R., Vecchi, A., Grieco, V., Scanziani, E., Botto, M., Introna, M. & Golay, J. (2003): Complement activation determines the therapeutic activity of rituximab in vivo. *J. Immunol.*, 171, 1581-1587.
- Dornan, D., Spleiss, O., Yeh, R. F., Duchateau-Nguyen, G., Dufour, A., Zhi, J., Robak, T., Moiseev, S. I., Dmoszynska, A., Solal-Celigny, P., Warzocha, K., Loscertales, J., Catalano, J., Afanasiev, B. V., Larratt, L., Rossiev, V. A., Bence-Bruckler, I., Geisler, C. H., Montillo, M., Wenger, M. K. & Weisser, M. (2010): Effect of FCGR2A and FCGR3A variants on CLL outcome. *Blood*, 116, 4212-22.
- Drewinko, B., Mars, W., Minowada, J., Burk, K. H. & Trujillo, J. M. (1984): ARH-77, an established human IgG-producing myeloma cell line. I. Morphology, B-cell phenotypic marker profile, and expression of Epstein-Barr virus. *Cancer*, 54, 1883-92.
- Duncan, A. R. & Winter, G. (1988): The binding site for C1q on IgG. *Nature*, 332, 738-40.
- Freedman, A. S., Friedberg, O. W. & Aster, J. C. (2017): Classification of the hematopoietic neoplasms [Online]. Waltham, MA, USA: UpToDate. Verfügbar:

6. Literaturverzeichnis

<https://www.uptodate.com/contents/classification-of-the-hematopoietic-neoplasms>
[Zugegriffen 17.05.2017 2017].

Fuchs, Y. & Steller, H. (2015): Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 16, 329-44.

Ghesquieres, H., Cartron, G., Seymour, J. F., Delfau-Larue, M. H., Offner, F., Soubeyran, P., Perrot, A., Brice, P., Bouabdallah, R., Sonet, A., Dupuis, J., Casasnovas, O., Catalano, J. V., Delmer, A., Jardin, F., Verney, A., Dartigues, P. & Salles, G. (2012): Clinical outcome of patients with follicular lymphoma receiving chemoimmunotherapy in the PRIMA study is not affected by FCGR3A and FCGR2A polymorphisms. *Blood*, 120, 2650-2657.

Ghetie, V. & Ward, E. S. (2002): Transcytosis and catabolism of antibody. *Immunol. Res.*, 25, 97-113.

Glennie, M. J., French, R. F., Cragg, M. S. & Taylor, C. (2007a): Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies. *Mol. Immunol.*, 44, 3823-3837.

Glennie, M. J., French, R. R., Cragg, M. S. & Taylor, R. P. (2007b): Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies. *Mol. Immunol.*, 44, 3823-37.

Golay, J., Cittera, E., Di Gaetano, N., Manganini, M., Mosca, M., Nebuloni, M., Van Rooijen, N., Vago, L. & Introna, M. (2006): The role of complement in the therapeutic activity of rituximab in a murine B lymphoma model homing in lymph nodes. *Haematologica*, 91, 176-83.

Golay, J., Da Roit, F., Bologna, L., Ferrara, C., Leusen, J. H., Rambaldi, A., Klein, C. & Introna, M. (2013): Glycoengineered CD20 antibody obinutuzumab activates neutrophils and mediates phagocytosis through CD16B more efficiently than rituximab. *Blood*, 122, 3482-91.

Golay, J., Lazzari, M., Fachinetti, V., Bernasconi, S., Borleri, G., Barbui, T., Rambaldi, A. & Introna, M. (2001): CD20 levels determine the in vitro susceptibility to rituximab and complement of B-cell chronic lymphocytic leukemia: further regulation by CD55 and CD59. *Blood*, 98, 3383-9.

Gong, Q., Ou, Q., Ye, S., Lee, W. P., Cornelius, J., Diehl, L., Lin, W. Y., Hu, Z., Chen, Y., Wu, Y., Meng, Y. G., Gribling, P., Lin, Z., Nguyen, K., Tran, T. N., Zhang, Y., Rosen, H., Martin, F. & Chan, A. C. (2005): Importance of cellular microenvironment and circulatory dynamics in B cell immunotherapy. *J. Immunol.*, 174, 817-826.

Griffiss, J. M. & Goroff, D. K. (1983): IgA blocks IgM and IgG-initiated immune lysis by separate molecular mechanisms. *J. Immunol.*, 130, 2882-5.

Gul, N., Babes, L., Siegmund, K., Korthouwer, R., Bogels, M., Braster, R., Vidarsson, G., Ten Hagen, T. L., Kubes, P. & Van Egmond, M. (2014): Macrophages eliminate circulating tumor cells after monoclonal antibody therapy. *J. Clin. Invest.*, 124, 812-23.

6. Literaturverzeichnis

- Habermann, T. M., Weller, E. A., Morrison, V. A., Gascoyne, R. D., Cassileth, P. A., Cohn, J. B., Dakhil, S. R., Woda, B., Fisher, R. I., Peterson, B. A. & Horning, S. J. (2006): Rituximab-CHOP versus CHOP alone or with maintenance rituximab in older patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J. Clin. Oncol.*, 24, 3121-7.
- Hamre, R., Farstad, I. N., Brandtzaeg, P. & Morton, H. C. (2003): Expression and modulation of the human immunoglobulin A Fc receptor (CD89) and the FcR γ chain on myeloid cells in blood and tissue. *Scand. J. Immunol.*, 57, 506-16.
- Hiemstra, P. S., Gorter, A., Stuurman, M. E., Van Es, L. A. & Daha, M. R. (1987): Activation of the alternative pathway of complement by human serum IgA. *Eur. J. Immunol.*, 17, 321-6.
- Hillmen, P., Robak, T., Janssens, A., Babu, K. G., Kloczko, J., Grosicki, S., Doubek, M., Panagiotidis, P., Kimby, E., Schuh, A., Pettitt, A. R., Boyd, T., Montillo, M., Gupta, I. V., Wright, O., Dixon, I., Carey, J. L., Chang, C. N., Lisby, S., Mckeown, A. & Offner, F. (2015): Chlorambucil plus ofatumumab versus chlorambucil alone in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukaemia (COMPLEMENT 1): a randomised, multicentre, open-label phase 3 trial. *Lancet*, 385, 1873-83.
- Huls, G., Heijnen, I. a. F. M., Cuomo, E., Van Der Linden, J., Boel, E., Van De Winkel, J. G. J. & Logtenberg, T. (1999): Anti-tumor effector mechanisms recruited by phage display-derived fully human IgG₁ and IgA₁ monoclonal antibodies. *Cancer Res.*, 59, 5778-5784.
- Kerr, M. A. (1980): The human complement system: assembly of the classical pathway C3 convertase. *Biochem. J.*, 189, 173-81.
- Klein, E., Klein, G., Nadkarni, J. S., Nadkarni, J. J., Wigzell, H. & Clifford, P. (1968): Surface IgM-kappa specificity on a Burkitt lymphoma cell in vivo and in derived culture lines. *Cancer Res.*, 28, 1300-10.
- Klein, G., Giovanella, B., Westman, A., Stehlin, J. S. & Mumford, D. (1975): An EBV-genome-negative cell line established from an American Burkitt lymphoma; receptor characteristics. EBV infectibility and permanent conversion into EBV-positive sublines by in vitro infection. *Intervirology*, 5, 319-34.
- Koene, H. R., Kleijer, M., Algra, J., Roos, D., Von Dem Borne, A. E. & De Haas, M. (1997): Fc γ RIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc γ RIIIa, independently of the Fc γ RIIIa-48L/R/H phenotype. *Blood*, 90, 1109-14.
- Koopman, G., Reutelingsperger, C. P., Kuijten, G. A., Keehnen, R. M., Pals, S. T. & Van Oers, M. H. (1994): Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, 84, 1415-20.
- Kuppers, R. (2005): Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat. Rev. Cancer*, 5, 251-62.

6. Literaturverzeichnis

- Lai, R., McDonnell, T. J., O'Connor, S. L., Medeiros, L. J., Oudat, R., Keating, M., Morgan, M. B., Curiel, T. J. & Ford, R. J. (2002): Establishment and characterization of a new mantle cell lymphoma cell line, Mino. *Leuk. Res.*, 26, 849-55.
- Legrain, S., Su, D., Breukel, C., Detalle, L., Claassens, J. W., Van Der Kaa, J., Izui, S., Verbeek, J. S. & Coutelier, J. P. (2015): Involvement of Fc α / μ Receptor in IgM anti-platelet, but not anti-red blood cell autoantibody pathogenicity in mice. *J. Immunol.*, 195, 4171-5.
- Leidi, M., E. Gotti, L. Bologna, E. Miranda, M. Rimoldi, A. Sica, M. Roncalli, G. A. Palumbo, M. Introna, J. Golay. (2009): M2 macrophages phagocytose rituximab-opsonized leukemic targets more efficiently than M1 cells in vitro. *J Immunol.* 182, 4415-4422.
- Lenz, G. & Staudt, L. M. (2010): Aggressive lymphomas. *N. Engl. J. Med.*, 362, 1417-29.
- Lim, S. H., Beers, S. A., French, R. R., Johnson, P. W., Glennie, M. J. & Cragg, M. S. (2010): Anti-CD20 monoclonal antibodies: historical and future perspectives. *Haematologica*, 95, 135-43.
- Lohse, S., Brunke, C., Derer, S., Peipp, M., Boross, P., Kellner, C., Beyer, T., Dechant, M., Van Der Winkel, J. G., Leusen, J. H. & Valerius, T. (2012): Characterization of a mutated IgA2 antibody of the m(1) allotype against the epidermal growth factor receptor for the recruitment of monocytes and macrophages. *J. Biol. Chem.*, 287, 25139-50.
- Lohse, S., Derer, S., Beyer, T., Klausz, K., Peipp, M., Leusen, J. H., Van De Winkel, J. G., Dechant, M. & Valerius, T. (2011): Recombinant dimeric IgA antibodies against the epidermal growth factor receptor mediate effective tumor cell killing. *J. Immunol.*, 186, 3770-8.
- Lohse, S., Meyer, S., Meulenbroek, L. A., Jansen, J. H., Nederend, M., Kretschmer, A., Klausz, K., Moginger, U., Derer, S., Rosner, T., Kellner, C., Schewe, D., Sondermann, P., Tiwari, S., Kolarich, D., Peipp, M., Leusen, J. H. & Valerius, T. (2016): An anti-EGFR IgA that displays improved pharmacokinetics and myeloid effector cell engagement in vivo. *Cancer Res.*, 76, 403-17.
- Lohse, S., Peipp, M., Beyer, T., Valerius, T. & Dechant, M. (2010): Impact of human IgA antibodies on complement-dependent cytotoxicity mediated by combinations of EGF-R antibodies. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 58, 303-312.
- Longo, D. L., Fauci, A. S., Kasper, D. L., Hauser, S. L., Jameson, J. L. & Loscalzo, J. 2012. *Harrison: Innere Medizin*, Berlin, ABW Wissenschaftsverlag GmbH. (Hrsg)
- Lucisano Valim, Y. M. & Lachmann, P. J. (1991): The effect of antibody isotype and antigenic epitope density on the complement-fixing activity of immune complexes: a systematic study using chimaeric anti-NIP antibodies with human Fc regions. *Clin. Exp. Immunol.*, 84, 1-8.
- Maloney, D. G., Liles Tm Fau - Czerwinski, D. K., Czerwinski Dk Fau - Waldichuk, C., Waldichuk C Fau - Rosenberg, J., Rosenberg J Fau - Grillo-Lopez, A., Grillo-Lopez a Fau - Levy, R. & Levy, R. (1994): Phase I clinical trial using escalating single-dose infusion of

6. Literaturverzeichnis

chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8) in patients with recurrent B-cell lymphoma.

Melis, J. P., Strumane, K., Ruuls, S. R., Beurskens, F. J., Schuurman, J. & Parren, P. W. (2015): Complement in therapy and disease: Regulating the complement system with antibody-based therapeutics. *Mol. Immunol.*, 67, 117-30.

Meyer, S., Nederend, M., Jansen, J. H., Reiding, K. R., Jacobino, S. R., Meeldijk, J., Bovenschen, N., Wuhrer, M., Valerius, T., Ubink, R., Boross, P., Rouwendal, G. & Leusen, J. H. (2016): Improved in vivo anti-tumor effects of IgA-Her2 antibodies through half-life extension and serum exposure enhancement by FcRn targeting. *MAbs*, 8(1), 87-98

Minard-Colin, V., Xiu, Y., Poe, J. C., Horikawa, M., Magro, C. M., Hamaguchi, Y., Haas, K. M. & Tedder, T. F. (2008): Lymphoma depletion during CD20 immunotherapy in mice is mediated by macrophage Fc γ RI, Fc γ RIII, and Fc γ RIV. *Blood*, 112, 1205-13.

Monteiro, R. C. & Van De Winkel, J. G. (2003): IgA Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol.*, 21, 177-204.

Nacheva, E., Fischer, P., Karpas, A., Sherrington, P., Hayhoe, F. G., Manolov, G., Manolova, Y., Ferstl, G., Haas, O. & Gadner, H. (1987): Complex translocation t(8;12;14) in a cell line derived from a child with nonendemic Burkitt-type acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 28, 145-53.

Niederfellner, G., Lammens, A., Mundigl, O., Georges, G. J., Schaefer, W., Schwaiger, M., Franke, A., Wiechmann, K., Jenewein, S., Sloodstra, J. W., Timmerman, P., Brannstrom, A., Lindstrom, F., Mossner, E., Umana, P., Hopfner, K. P. & Klein, C. (2011): Epitope characterization and crystal structure of GA101 provide insights into the molecular basis for type I/II distinction of CD20 antibodies. *Blood*, 118, 358-67.

Nilsson, B., Larsson, R., Hong, J., Elgue, G., Ekdahl, K. N., Sahu, A. & Lambris, J. D. (1998): Compstatin inhibits complement and cellular activation in whole blood in two models of extracorporeal circulation. *Blood*, 92, 1661-7.

Okroj, M., Osterborg, A. & Blom, A. M. (2013): Effector mechanisms of anti-CD20 monoclonal antibodies in B cell malignancies. *Cancer Treat. Rev.*, 39, 632-9.

Pabst, O. (2012): New concepts in the generation and functions of IgA. *Nat. Rev. Immunol.*, 12, 821-32.

Pascal, V., Laffleur, B., Debin, A., Cuvillier, A., Van Egmond, M., Drocourt, D., Imbertie, L., Pangault, C., Ztarte, K., Tiraby, G. & Cogne, M. (2012): Anti-CD20 IgA can protect mice against lymphoma development: evaluation of the direct impact of IgA and cytotoxic effector recruitment on CD20 target cells. *Haematologica*, 97, 1686-1694.

Pasquier, B., Launay, P., Kanamaru, Y., Moura, I. C., Pfirsch, S., Ruffie, C., Henin, D., Benhamou, M., Pretolani, M., Blank, U. & Monteiro, R. C. (2005): Identification of Fc α RI as

6. Literaturverzeichnis

an inhibitory receptor that controls inflammation: dual role of FcR γ ITAM. *Immunity*, 22, 31-42.

Peipp, M., Dechant, M. & Valerius, T. (2008): Effector mechanisms of therapeutic antibodies against ErbB receptors. *Curr. Opin. Immunol.*, 20, 436-43.

Peipp, M., Derer, S., Lohse, S., Staudinger, M., Klausz, K., Valerius, T., Gramatzki, M. & Kellner, C. (2015): HER2-specific immunoligands engaging NKp30 or NKp80 trigger NK-cell-mediated lysis of tumor cells and enhance antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Oncotarget*, 6, 32075-88.

Pertoft, H. (2000): Fractionation of cells and subcellular particles with Percoll. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 44, 1-30.

Pieper, K., Grimbacher, B. & Eibel, H. (2013): B-cell biology and development. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 131, 959-71.

Polyak, M. J. & Deans, J. P. (2002): Alanine-170 and proline-172 are critical determinants for extracellular CD20 epitopes; heterogeneity in the fine specificity of CD20 monoclonal antibodies is defined by additional requirements imposed by both amino acid sequence and quaternary structure. *Blood*, 99, 3256-62.

Pulvertaft, J. V. (1964): Cytology of Burkitt's tumor (african lymphoma). *Lancet*, 1, 238-40.

Rai, K. R. & Stilgenbauer, S. (2016): Staging and prognosis of chronic lymphocytic leukemia [Online]. Waltham, MA, USA: UpToDate. Verfügbar: https://www.uptodate.com/contents/staging-and-prognosis-of-chronic-lymphocytic-leukemia?source=search_result&search=cll%20staging&selectedTitle=1~150 - H6 [Zugegriffen 17.05.2017 2017].

Ratajczak, M. Z. & Adamiak, M. (2015): Membrane lipid rafts, master regulators of hematopoietic stem cell retention in bone marrow and their trafficking. *Leukemia*, 29, 1452-7.

Reichert, J. M. (2017): Antibodies to watch in 2017. *mAbs*, 9, 167-181.

Robert-Koch-Institut. (2015): Krebs in Deutschland 2011/2012. Berlin, Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg)

Roberts, A. P. & Phillips, R. (1983): The relative importance of the classical and alternative complement pathways in serum bactericidal activity against *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.*, 16, 69-74.

Roos, A., Bouwman, L. H., Van Gijlswijk-Janssen, D. J., Faber-Krol, M. C., Stahl, G. L. & Daha, M. R. (2001): Human IgA activates the complement system via the mannan-binding lectin pathway. *J. Immunol.*, 167, 2861-8.

6. Literaturverzeichnis

- Root, R. K., Ellman, L. & Frank, M. M. (1972): Bactericidal and opsonic properties of C4-deficient guinea pig serum. *J. Immunol.*, 109, 477-86.
- Rudolph, C., Steinemann, D., Von Neuhoff, N., Gadzicki, D., Ripperger, T., Drexler, H. G., Mrasek, K., Liehr, T., Claussen, U., Emura, M., Schrock, E. & Schlegelberger, B. (2004): Molecular cytogenetic characterization of the mantle cell lymphoma cell line GRANTA-519. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 153, 144-50.
- Russell, M. W., Reinholdt, J. & Kilian, M. (1989): Anti-inflammatory activity of human IgA antibodies and their Fab α fragments: inhibition of IgG-mediated complement activation. *Eur. J. Immunol.*, 19, 2243-9.
- Shankland, K. R., Armitage, J. O. & Hancock, B. W. (2012): Non-Hodgkin lymphoma. *The Lancet*, 380, 848-857.
- Shibuya, A., Sakamoto, N., Shimizu, Y., Shibuya, K., Osawa, M., Hiroshima, T., Eyre, H. J., Sutherland, G. R., Endo, Y., Fujita, T., Miyabayashi, T., Sakano, S., Tsuji, T., Nakayama, E., Phillips, J. H., Lanier, L. L. & Nakauchi, H. (2000): Fc α / μ receptor mediates endocytosis of IgM-coated microbes. *Nat. Immunol.*, 1, 441-6.
- Sim, R. B. & Tsiftoglou, S. A. (2004): Proteases of the complement system. *Biochem. Soc. Trans.*, 32, 21-7.
- Stacchini, A., Aragno, M., Vallario, A., Alfarano, A., Circosta, P., Gottardi, D., Faldella, A., Rege-Cambrin, G., Thunberg, U., Nilsson, K. & Caligaris-Cappio, F. (1999): MEC1 and MEC2: two new cell lines derived from B-chronic lymphocytic leukaemia in prolymphocytoid transformation. *Leuk. Res.*, 23, 127-36.
- Stashenko, P., Nadler, L. M., Hardy, R. & Schlossman, S. F. (1980): Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen. *J. Immunol.*, 125, 1678-85.
- Stockmeyer, B., Dechant, M., Van Egmond, M., Tutt, A. L., Sundarapandiyam, K., Graziano, R. F., Repp, R., Kalden, J. R., Gramatzki, M., Glennie, M. J., Van De Winkel, J. G. J. & Valerius, T. (2000): Triggering Fc α RI (CD89) recruits neutrophils as effector cells for CD20- directed antibody therapy. *J. Immunol.*, 165, 5954-5961.
- Swerdlow, S. H. a.-O. H. O. O., Campo, E., Pileri, S. A., Harris, N. L., Stein, H., Siebert, R., Advani, R., Ghielmini, M., Salles, G. a. a.-O. H. O. O., Zelenetz, A. D. & Jaffe, E. S. a.-O. H. O. O. (2016): The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*, 127(20), 2375-90.
- Tedder, T. F. & Engel, P. (1994): CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes. *Immunol. Today*, 15, 450-4.
- Teeling, J. L., French, R. R., Cragg, M. S., Van Den Brakel, J., Pluyter, M., Huang, H., Chan, C., Parren, P. W., Hack, C. E., Dechant, M., Valerius, T., Van De Winkel, J. G. & Glennie, M. J. (2004): Characterization of new human CD20 monoclonal antibodies with potent cytolytic activity against non-Hodgkin lymphomas. *Blood*, 104, 1793-800.

6. Literatuurverzechnis

Teeling, J. L., Mackus, W. J., Wiegman, L. J., Van Den Brakel, J. H., Beers, S. A., French, R. R., Van Meerten, T., Ebeling, S., Vink, T., Slootstra, J. W., Parren, P. W., Glennie, M. J. & Van De Winkel, J. G. (2006): The biological activity of human CD20 monoclonal antibodies is linked to unique epitopes on CD20. *J. Immunol.*, 177, 362-71.

Terai, I., Kobayashi, K., Vaerman, J. P. & Mafune, N. (2006): Degalactosylated and/or denatured IgA, but not native IgA in any form, bind to mannose-binding lectin. *J. Immunol.*, 177, 1737-45.

Tipton, T. R., Roghanian, A., Oldham, R. J., Carter, M. J., Cox, K. L., Mockridge, C. I., French, R. R., Dahal, L. N., Duriez, P. J., Hargreaves, P. G., Cragg, M. S. & Beers, S. A. (2015): Antigenic modulation limits the effector cell mechanisms employed by type I anti-CD20 monoclonal antibodies. *Blood*, 125, 1901-9.

Uchida, J., Hamaguchi, Y., Oliver, J. A., Ravetch, J. V., Poe, J. C., Haas, K. M. & Tedder, T. F. (2004): The innate mononuclear phagocyte network depletes B lymphocytes through Fc receptor-dependent mechanisms during anti-CD20 antibody immunotherapy. *J. Exp. Med.*, 199, 1659-69.

Valerius, T., Stockmeyer, B., Van Spriel, A. B., Graziano, R. F., Van Den Herik-Oudijk, I. E., Repp, R., Deo, Y. M., Lund, J., Kalden, J. R., Gramatzki, M. & Van De Winkel, J. G. (1997): Fc α RI (CD89) as a novel trigger molecule for bispecific antibody therapy. *Blood*, 90, 4485-92.

Van Egmond, M., Van Garderen, E., Damen, C. A., Van Amersfort, E. S., Van Zandbergen, G., Van Hattum, J., Kuiper, J. & Van De Winkel, J. G. J. (2000): Fc α RI⁺ liver Kupffer cells: reappraisal of the role of immunoglobulin A in immunity. *Nat. Med.*, 6, 680-685.

Van Meerten, T. & Hagenbeek, A. (2010): CD20-targeted therapy: the next generation of antibodies. *Semin. Hematol.*, 47, 199-210.

Van Meerten, T., Van Rijn, R. S., Hol, S., Hagenbeek, A. & Ebeling, S. B. (2006): Complement-induced cell death by rituximab depends on CD20 expression level and acts complementary to antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Clin. Cancer Res.*, 12, 4027-35.

Vidarsson, G., Van Der Pol, W. L., Van Den Elsen, J. M., Vile, H., Jansen, M., Duijs, J., Morton, H. C., Boel, E., Daha, M. R., Corthesy, B. & Van De Winkel, J. G. (2001): Activity of human IgG and IgA subclasses in immune defense against *Neisseria meningitidis* serogroup B. *J. Immunol.*, 166, 6250-6.

Wang, S. Y., Veeramani, S., Racila, E., Cagley, J., Fritzing, D. C., Vogel, C. W., John, W. S. & Weiner, G. J. (2009): Depletion of the C3 component of complement enhances the ability of rituximab-coated target cells to activate human NK cells and improves the efficacy of monoclonal antibody therapy in an in vivo model. *Blood*, 114, 5322-5330.

Weng, W. K. & Levy, R. (2001): Expression of complement inhibitors CD46, CD55, and CD59 on tumor cells does not predict clinical outcome after rituximab treatment in follicular non-Hodgkin lymphoma. *Blood*, 98, 1352-7.

6. Literaturverzeichnis

Weng, W. K. & Levy, R. (2003): Two immunoglobulin G Fc receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J. Clin. Oncol.*, 21, 3940-3947.

Woof, J. M. & Burton, D. R. (2004): Human antibody-Fc receptor interactions illuminated by crystal structures. *Nat. Rev. Immunol.*, 4, 89-99.

Woof, J. M. & Kerr, M. A. (2006): The function of immunoglobulin A in immunity. *J. Pathol.*, 208, 270-82.

Woof, J. M. & Russell, M. W. (2011): Structure and function relationships in IgA. *Mucosal Immunol.*, 4, 590-7.

Wurm, F. M. (2004): Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotechnol*, 22, 1393-8.

Yoo, E. M., Trinh, K. R., Lim, H., Wims, L. A. & Morrison, S. L. (2011): Characterization of IgA and IgM binding and internalization by surface-expressed human Fc α / μ receptor. *Mol. Immunol.*, 48, 1818-26.

Zhou, M. & Ruprecht, R. M. (2014): Are anti-HIV IgAs good guys or bad guys? *Retrovirology*, 11, 109.

7. Anhang

7.1 Verwendete Chemikalien

Tabelle 8: Verwendete Chemikalien

β-Mercapto-Ethanol	Carl ROTH, Karlsruhe, D
Agar Agar (Seakam®)	Lonza Group Ltd., CH
Ampizillin	Carl ROTH, Karlsruhe, D
Aqua dest.	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Accutase	GE Healthcare, Solingen, D
Albumin Fraktion V, proteasefrei BSA	Carl ROTH, Karlsruhe, D
Calzium Chlorid Dihydrat	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
CaCl ₂	Honeywell Riedel-de Haën AG, Seelze, D
⁵¹ Chrom	Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig, D
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Sialine (1x/10x)	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Dimethyl Sulfoxide USP Grade	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Smart Ladder	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Dialysiertes FCS	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Easycoll Separating Solution	Biochrom AG, Berlin, D
Ethidium-Bromid	Carl ROTH, Karlsruhe, D
Ethanol vergällt, ca 99%	BÜFA Chemikalien, Hude, D
FCS	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Geneticin 50 mg/ml	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Hank's Balanced Salt Solution (1x)	PAA Laboratories, Pasching, D
Isopropanol (2-Propanol)	Carl ROTH, Karlsruhe, D
Lepirudin (Refludan®)	Celgene, München, D
Magermilchpulver	Carl ROTH, Karlsruhe, D
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Carl ROTH, Karlsruhe, D
MEM NEAA 100x	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Methionin Sulfoximin	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Methanol	Merck, Darmstadt, D
MOPS SDS Running Buffer (20x)	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
NatriumAzid	Merck, Darmstadt, D
Natriumchlorid (NaCl)	Carl ROTH, Karlsruhe, D
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl ROTH, Karlsruhe, D
Optiphase Supermix	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Paraformaldehyd	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Penicillin und Streptomycin (PenStrep, PS)	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
RPMI-1640 Medium	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Salzsäure 25%	Carl ROTH, Karlsruhe, D
Trypsin-EDTA (0,05%)	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
TritonX 100	Merck, Darmstadt, D
Trypan Blue Solution 100ml (0,4%)	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Tween 20	Merck, Darmstadt, D

7. Anhang

Soc Medium	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
EGTA	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Annexin-V	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Via-Probe (7-AAD)	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
HEPES	Merck, Darmstadt, D
NaCl	Merck, Darmstadt, D
CaCl ₂	Honeywell Riedel-de Haën AG, Seelze, D
SigmaFAST o-Phenylendiamine dihydrochloride (OPD)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
3M HCL	Merck, Darmstadt, D
8-Well Streifen	Nunc Immunosorp, Roskilde, Danmark
IMDM	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Glycin	Carl ROTH, Karlsruhe, D
Tris-Hydrochlorid	Carl ROTH, Karlsruhe, D
1 x PBS	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Lipopolysaccharide (LPS)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

7.2 Verwendete Geräte

Tabelle 9: Verwendete Geräte

1450 MicroBeta TriLux. LSC & Luminescence Counter	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
AF 200 Eismaschine	Scotsman Ice Systems; Vernon Hills, IL, USA
ÄKTaprime liquid chromatography system“	GE Healthcare, St Giles, UK
Durchflusszytometer (Epics/ Navios)	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Experion Pro260, Bio-Rad, Hercules, CA, USA).	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Galaxy Mino Zentrifuge	VWR, Darmstadt, D
Gel Doc™ XR+ System	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Hera cell 240 Brutschrank	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Hera safe Reinluftbank	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Heraeus Multifuge 3S+ Zentrifuge	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Heraeus Megafuge 1.0R Zentrifuge	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Heraeus Multifuge 4 KR Zentrifuge	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
HeroLab Transilluminator	HeroLAB; Wiesloch D
Lichtmikroskop (Axiovert 40C/ Axiostarplus)	Zeiss, Oberkochen, D
Magnetrührer Hi-Mix S	Heidolph Instruments, Schwabach, D
pH211 Microprocessor pH Meter	Hanna instruments, Woonsocket, Rhode Island, USA
Poly-Prep®-Chromatographie Tropfsäule	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
PowerPack HC	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Titramax101 Orbialschüttler	Heidolph Instruments, Schwabach, D

7. Anhang

TRANS-BLOT® SD SEMI-DRY Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Sunrise™ Plate-Reader	Tecan Group Ltd, Männerdorf, CH
SuperDex™200 10 x 30	GE Healthcare, St Giles, UK
Syngene Gelvue GVS20	Syngene Frederick, MD, USA
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Wasserbad	Memmert, Schwabach, D
XB 120a Waage	Precisa Gravimetrics, Dietikon, CH
XB 2200C Waage	Precisa Gravimetrics, Dietikon, CH
Wide Mini-Sub® Cell GT Agarosegelkammer	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
FACS-Canto-II	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA

7.3 Verwendete Software

Tabelle 10: Verwendete Software

GraphPad Prism 6	Graphpad Software, La Jolla, CA, USA
Microsoft Office 2011	Microsoft, Redmond, WA, USA
XL-System II V3.0	Beckmann Coulter, Krefeld, D
MicroBeta Windows Workstation	Beckmann Coulter, Krefeld, D
Unicorn 5.01	GE Healthcare, St Giles, UK
ImageJ	Open source software Schindelin, J.; Rueden, C. T. & Hiner, M. C. et al. (2015), "The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis", Molecular Reproduction and Development, PMID 26153368
XFluor4	Tecan Group, Männerdorf, CHE
Quantity One	Bio-Rad, Hemel Hempstead, UK
Endnote X7	Thomson Reuters, New York, NY, USA

7.4 Verwendete Lösungen

Tabelle 11: Verwendete Lösungen

1xTBS Puffer	10 mM Tris pH 7,5 150 mM NaCl
1xTBS-Tween Puffer (Waschpuffer 1)	20 mM Tris pH 7,5 500 mM NaCl 0,05 % Tween 20
1xTBS-Tween Puffer (Waschpuffer 2)	20 mM Tris-HCl pH 7,5 500 mM NaCl 0,4 % Tween 20
1xTBT-Tween/Triton Puffer (Waschpuffer 3)	20 mM Tris-HCl pH 7,5 500 mM NaCl 0,4 % Tween 20 4 % Triton X-100
Elutionspuffer ahu-κ Aufreinigung	0,1 M Glycin pH 2

7. Anhang

Neutralisierungspuffer für ahu-κ Aufreinigung	1 M Tris pH 8,9
Bindungspuffer IMAC-Aufreinigung	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 10 mM Imidazol pH 8
Elutionspuffer IMAC Aufreinigung	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 250 mM Imidazol pH 8
Elektrotransferpuffer (Anderson-Puffer)	6 g Tris 28,8 g Glycin 10 ml 10 % SDS-Lösung 200 ml Methanol
Entfärbungspuffer für PVDF-Membranen Puffer 1 (Entfärbung)	50 ml 5 M NaCl 14,4 ml Eisessig Auf 500 ml H ₂ O
Puffer 2 (Neutralisierung)	1,5 M Tris pH 7
LB-Medium	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl pH 7,5 nach Autoklavieren + 1,5 % Agar nach Abkühlen: + 100 µg/ml Ampicillin
SOC-Medium	20 g Trypton 5 g Hefeextrakt 0,5 g NaCl 10 ml KCl (20mM) Nach Autoklavieren: + 5 mM MgCl ₂ + 20 ml 1M Glucoselösung
5x Laemmli-Puffer	1650 µl 1M Tris pH 6,8 3438 µl 10%SDS 2500 µl Glycerin 0,62 mg Bromphenolblau Mit Aqua dest. Auf 10 ml Für den reduzierenden Puffer: + 2,3 µl Beta-Mercaptoethanol/100 µl Puffer
Percoll-Dichtegradienten 70% Percoll	35 ml Percoll 15 ml 1xPBS
63% Percoll	31,5 ml Percoll 18,5 ml Hanks
FACS-Puffer (Waschpuffer)	1xPBS 1% BSA 0,01% Natriumazid

7.5 Verwendete Antikörper

Tabelle 12: Verwendete Antikörper

Antikörper	Spezifität	Hersteller/Quelle
3G8	Humanes CD16 (Fc γ RIII)	Vorhandenes Hybridom, (Valerius et al., 1997)
A77	Humanes CD 89 (Fc α RI)	Vorhandenes Hybridom (Valerius et al., 1997)
Anti-CD20 Muriner IgG2a, FITC gekoppelt	CD20	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Anti-human CD89 monoklonaler Maus IgG1	Humanes CD89 (Fc α RI)	R&D Systems, Wiesbaden, D
Anti-Human IgA (α -chain specific)-Peroxidase-Antibody, produced in goat	Humane α -Kette	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Anti-Human IgA, Peroxidase-gekoppelter Antikörper, produziert in Ziegen	Humane α -Kette	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Anti-Human IgG Peroxidase-gekoppelter Antikörper, produziert in Ziegen	Fc-Teil des humanem IgG	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Cetuximab	EGFR	Merck, Darmstadt, D
Eculizumab	Humaner Komplementfaktor C5	Alexion Pharmaceuticals, Cheshire, CT, USA
Goat Anti-Human κ -FITC	Humane κ -Kette	Caltech, Pasadena, CA, USA
IgA2 κ	Kontroll IgA-Antikörper	Meridian Life Science Memphis, TN, USA
Maus anti human C1q-Antikörper, HRP-gekoppelt	Humanes C1q	Comptech, Tyler, TX, USA
Maus anti human CD14 IgA2	Humanes CD14	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Maus anti human CD14-IgG2A, FITC-gekoppelt	Humanes CD14	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Maus anti human CD16 Fc γ RIII) IgG1, FITC-gekoppelt	Humanes CD16 (Fc γ RIII)	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Maus anti human CD23 IgG1 Antikörper, APC-gekoppelt	Humanes CD23	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Maus anti human CD32 (Fc γ RII) IgG2, PE-gekoppelt	Humanes CD32 (Fc γ RII)	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Maus anti human CD64 (Fc γ RI)- IgG1, FITC-gekoppelt	Humanes CD64 (Fc γ RI)	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Maus anti human CD89 (Fc α RI)-IgG1, FITC-gekoppelt	Humanes CD89 (Fc α RI)-	R&D Systems, Wiesbaden, D

7. Anhang

Monoklonaler muriner CD32b-gerichteter IgG2A Antikörper	Humanes CD32b (Fc γ RIIb)	R&D Systems, Wiesbaden, D
PE-markierter CD20-gerichteter IgG1 Antikörper	Humanes CD20	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Polyklonaler Kaninchen anti human CD351 (Fc α / μ R) IgG Antikörper, FITC-gekoppelt	Humaner Fc α / μ R	Biorbyt, Cambridge, UK
Polyklonaler Rabbit Anti-Human IgA - FITC	Humane α -Kette	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Polyklonaler Ziege CD32a-gerichteter IgG Antikörper	Humanes CD32a (Fc γ RIIa)	R&D Systems, Wiesbaden, D
Rituximab	Humanes CD20	Bezogen über Zentralapotheke
Tositumomab	Humanes CD20	Bezogen über Zentralapotheke
TX57	Fc α / μ R	(Cho et al., 2006), zu Verfügung gestellt von Prof. Akira Shibuya
Ziege anti human α HRP	Humane α -Kette	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ziege anti human IgG HRP	Humane γ -Kette	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ziege anti human κ -Light Chain HRP	Humane κ -Kette	BIOZOL Diagnostica, Eching, Germany
Ziege anti human κ -Light Chain polyklonal	Humane κ -Kette	Abcam, Cambridge, UK
Ziege anti human κ -light Chain specific FITC-gekoppelter Antikörper	Humane κ Leichtkette	Southern Biotech, Birmingham, AL

7.6 Verwendete Einmalmaterialien

Tabelle 13: Verwendete Einmalmaterialien

96-Well Platte	Thermo Scintific, Waltham, MA, USA
96-Well-Platte	Sarstedt, Nümbrecht, D
BD Falcon Cell Strainer (70 μ l Nylon)	BD Biosciences, Bedford, MA, USA
Citrat-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, D
Combitips advanced 2,5 ml (steril/ unsteril)	Eppendorf, Hamburg, D
Express TM Plus-Systems	Merck, Darmstadt, D
FACS-Röhrchen (5ml)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Falcons (15 ml/ 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Immuno Module (ELISA-Streifen)	Nunc, Roskilde, DK
Micro-Schraubröhrchen (2 ml/ 1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Parafilm Verschlussfolie	Th. Geyer, Renningen, D
Poly-Prep [®] Chromatography colums	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Reagent Reservoir (50 ml)	VWR International, West Chester, PA, USA
Safe Seal micro tube (2 ml/ 1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, D

7. Anhang

Safety-Multifly-Set	Sarstedt, Nürnberg, D
Serologische Pipetten (2/ 10/ 25/ 50 ml, steril)	Sarstedt, Nürnberg, D
Serum-Röhrchen	Sarstedt, Nürnberg, D
Sterile Spatel	VWR International, West Chester, PA, USA
Top-Seal A	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
VIVASPIN 6 10,000 MWCO PES	Sartorius GmbH, Göttingen, D
Zellkulturflaschen mit Filter	Greiner, Frickenhausen, D
Zellkulturschalen	Sarstedt, Nürnberg, D

7.7 Verwendete Kits & Reagenzien

Tabelle 14: Verwendete Kits und Reagenzien

7-AAD Viability Staining Solution	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Aleuria aurantia Lektin	Vector Laboratories, Burlingame, Ca, USA
Annexin V-FITC	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Concanavalin A	Vector Laboratories, Burlingame, Ca, USA
Humanes C1q Protein	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
IL-1 β	Peptotech, Hamburg, D
IL4	Peptotech, Hamburg, D
M-CSF	Peptotech, Hamburg, D
nicht-essentielle Aminosäuren	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Ricinus communis agglutinin A	Vector Laboratories, Burlingame, Ca, USA

7.8. Durchgeführte Immunfluoreszenzen

Tabelle 15: Durchgeführte Immunfluoreszenzen

Versuch	Zellen (Anzahl)	Primärer Antikörper	Sekundärer Antikörper	Inkubationszeiten
Direkte Immunfluoreszenzen				
CD14- Expression	Monozyten, Makrophagen (1,5 x 10 ⁵)	Monoklonaler Antikörper CD14- FITC	-	1h bei 4°C
CD16- Expression	Monozyten, Makrophagen (1,5 x 10 ⁵)	Monoklonaler Antikörper CD16 (Fc γ RIII) – FITC- gekoppelt	-	1h bei 4°C Intratect 10 μ l 5mg/ml
CD20 Expression	Ramos, Raji, Daudi, Wien-	CD20-FITC Muriner IgG2a, Klon B9E9;	-	1h bei 4°C

7. Anhang

	133, Granta-519, Mino, MEC-2, ARH 77 (1,5 x 10 ⁵)	FITC gekoppelt		
CD23-Expression	Monozyten, Makrophagen (1,5 x 10 ⁵)	Maus anti human CD23 IgG1 Antikörper, APC-gekoppelt	-	1h bei 4°C
CD32-Expression	Monozyten, Makrophagen (1,5 x 10 ⁵)	Monoklonaler Antikörper CD32 (FcγRII) – PE-gekoppelt	-	1h bei 4°C Intratect 10 µl 5mg/ml
CD351-Expression	Monozyten, Makrophagen (1,5 x 10 ⁵)	Polyklonaler Kaninchen anti human CD351 (Fcα/μR) IgG Antikörper, FITC-gekoppelt	-	1h bei 4°C Intratect 10 µl 5mg/ml
CD64-Expression	Monozyten, Makrophagen (1,5 x 10 ⁵)	Monoklonaler Antikörper CD64 (FcγRI) – FITC-gekoppelt	-	1h bei 4°C Intratect 10 µl 5mg/ml
CD89-Expression	Monozyten, Makrophagen (1,5 x 10 ⁵)	Maus anti human CD89 (FcαRI)-IgG1, FITC-gekoppelt	-	1h bei 4°C Intratect 10 µl 5mg/ml
Indirekte Immunfluoreszenzen				
Bindung an CD20	CD20 exprimierende CHO-Zellen (1,5 x 10 ⁵)	1F5-IgA2, 1F5-IgG, Kontrollantikörper	Ziege anti human κ-light Chain specific FITC-gekoppelter Antikörper /polyklonaler Kaninchen-	Jeweils 1h bei 4°C

7. Anhang

			antihuman-IgA-FITC	
Bindung an FcαRI/ FcRγ	BHK21 FcαRI/ FcRγ Kotransfiziert (1,5 x 10 ⁵)	1F5-IgA2, 1F5-IgG, Kontrollantikörper	Ziege anti human κ- light Chain specific FITC-gekoppelter Antikörper / Polyklonaler Rabbit Anti-Human IgA - FITC	Jeweils 1h bei 4°C
Bindung an FcγRIIIa/FcRγ-	BHK 21 FcγRIIIa/FcRγ Kotransfiziert (1,5 x 10 ⁵)	1F5-IgA2, 1F5-IgG, Kontrollantikörper	Ziege anti human κ- light Chain specific FITC-gekoppelter Antikörper	Jeweils 1h bei 4°C
CD89- Expression	Makrophagen (1,5 x 10 ⁵)	Anti-human CD89 monoklonaler Maus IgG1	Ziege anti human κ- light Chain specific FITC-gekoppelter Antikörper	Jeweils 1h bei 4°C Intratect 10 μl 5mg/ml
CD32a- Expression	Makrophagen (1,5 x 10 ⁵)	Polyklonaler gegen humanes CD32a- gerichteter IgG Antikörper aus der Ziege	Ziege anti human κ- light Chain specific FITC-gekoppelter Antikörper	Jeweils 1h bei 4°C Intratect 10 μl 5mg/ml
CD32b- Expression	Makrophagen (1,5 x 10 ⁵)	monoklonaler gegen humasnes CD32b- gerichteter IgG2a Antikörper	Ziege anti human κ- light Chain specific FITC-gekoppelter Antikörper	Jeweils 1h bei 4°C Intratect 10 μl 5mg/ml
CD14- Expression	Makrophagen (1,5 x 10 ⁵)	Monoklonaler gegen humanes CD14- gerichteter IgG1 Antikörper	Ziege anti human κ- light Chain specific FITC-gekoppelter Antikörper	Jeweils 1h bei 4°C

Abkürzungsverzeichnis

7

7-AAD 7-Amino-Actinomycin D

A

ASGPR..... Asialoglykoproteinrezeptor

AU.....Absorbtionseinheiten

B

BCR..... B-Zell Rezeptor

C

CD..... Cluster of Differentiation

CDC..... komplementabhängige Zytotoxizität

CFSE..... Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester

CH..... Constant heavy

CHOEP ...Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Etoposid, Prednison

CHOPCyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednison

CLL.....Chronisch lymphatische Leukämie

D

DLBCL Diffus großzelliges B-Zelllymphom

E

EDTAEthylendiamintetraessigsäure

ELISA..... Enzyme-linked Immunosorbent Assay

F

Fab..... Fragment antigen binding

Fc Fragment crystallizable

FDA..... Federal Drug Administration

G

G-CSF.. Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor

GPA..... Granulomatose mit Polyangiitis

H

HC..... Heavy Chain

HL..... Hodgkin Lymphom

HRP Horseradish Peroxidase

I

Ig Immunglobulin

IgAImmunglobulin A

IgD Immunglobulin D

IgE..... Immunglobulin E

IgG Immunglobulin G

IgMImmunglobulin M

IMDM Iscove Modified Dulbecco Medium

IPI Internationaler Prognostischer Index

ITAMImmunoreceptor tyrosine-based activation motif

ITIM Immunoreceptor tyrosine- based inhibiton motif

L

LC Light Chain

LPS.....Lipopolysaccharide

M

MAC..... Membran-Angriff Komplex

MACS..... Magnetic Cell Separation

MBL Mannan-bindendes Lektin

MM..... Multiples Myelom

MNC Mononukleäre Zellen

MPA..... Mikroskopische Polyangiitis

N

NHL.....Non Hodgkin Lymphom

NK-Zellen natürliche Killerzelle

nm Nanometer

P

PCD..... Programmed Cell Death

PMN Polymorphnukleäre Zellen

PS Phosphatidylserin

PVDF..... Polyvinylidenfluorid

PVP Polyvinylpyrrolidon

R

R-CHOP Rituximab, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednison

RKI Robert Koch-Institut

S

SLLKleinzelliges lymphozytisches Lymphom

U

U/min Umdrehungen pro Minute

V

VH..... Variabel Heavy

W

WHO..... Wolrd Health Organisation

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass diese Dissertation – abgesehen von der Beratung durch meine akademischen Lehrer – nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist und die Arbeit unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden ist. Sie hat weder im Ganzen noch zum Teil an anderer Stelle im Rahmen eines Promotionsverfahrens vorgelegen. Teile dieser Dissertation sind zur Veröffentlichung eingereicht worden.

Ferner erkläre ich, dass ich noch keine früheren Promotionsversuche unternommen habe. Für die mündliche Prüfung wird die Form der Disputation gewählt. Der Zulassung von Zuhörern/Zuhörerinnen bei der mündlichen Prüfung wird nicht widersprochen.

Kiel, (Sebastian Loew)

Danksagung

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Thomas Valerius für das Überlassen des Themas und das in mich gesetzte Vertrauen. Weiterhin bedanke ich mich bei Prof. Dr. Martin Gramatzki für die Möglichkeit, dass ich diese Arbeit in seinem Haus absolvieren konnte. Der medizinischen Fakultät danke ich für die Gewährung des Promotionsstipendiums, dieses war mir wertvolle Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Meinem Betreuer Dr. Stefan Lohse danke ich für die Einführung in die Methoden, die Geduld bei dem gemeinsamen verfassen der Publikation sowie für das Korrekturlesen. Meiner IgA-Mitstreiterin und Ko-Autorin, Frau Anna Kretschmer, danke ich für das gemeinsame Verfassen der Publikation und wünsche Ihr für die weitere Bearbeitung des Themas nur das Beste.

Weiterhin möchte ich dem gesamten wissenschaftlichem Team im Mildred-Scheel-Haus, insbesondere Dr. Thies Rößner, Dr. Stefanie Derer, Prof. Dr. Mathias Peipp, PD Dr. Christian Kellner und Dr. Katja Klaus für die geduldige Beantwortung methodischer und wissenschaftlicher Fragen während der experimentellen Phase im Labor bedanken.

Der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Marc Cragg (Antibody and Vaccine Group, Cancer Sciences Unit, Faculty of Medicine, Southampton University Hospitals, Southampton) danke ich für die Durchführung der Tierexperimente.

Der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Jannete Leusen (Immunology, University Medical Center Utrecht, Utrecht), insbesondere Dr. Peter Boross, Marco Jansen und Saskia Meyer, möchte ich für die Durchführung der Apoptose -Experimente danken.

Prof. Dr. Akira Shibuya (Department of Immunology, Institute of Basic Medical Science, University of Tsukuba, Ibaraki, Japan) danke ich für die Bereitstellung des TX57 Antikörpers. Weiterhin möchte ich den technischen Assistentinnen Chrystin Wildgrube, Yasmin Brodtmann und Kathinka Tüxen für die exzellente technische Unterstützung danken.

Am Ende gilt mein ganz besonderer Dank meiner Familie, insbesondere meiner Frau, ohne deren Unterstützung das Anfertigen dieser Arbeit niemals möglich gewesen wäre.