

Aus der Klinik für Innere Medizin II
mit den Schwerpunkten Hämatologie und Onkologie
(Direktion: Prof. Dr. med. Claudia Baldus)
im Universitätsklinikum Schleswig – Holstein, Campus Kiel
an der Christian – Albrechts – Universität zu Kiel

**Einfluss von c-MYC auf die antikörpervermittelte
immunologische Zytotoxizität beim Burkitt-Lymphom**

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

vorgelegt von
Andreas Scherzler
aus **Münster**

Kiel 2021

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Valerius
Klinik für Innere Medizin II mit den Schwerpunkten
Hämatologie und Onkologie

2. Berichterstatter/in: Priv.-Doz. Dr. Eva Maria Murga Penas
Institut für Humangenetik

Tag der mündlichen Prüfung: 05. Januar 2022

Zum Druck genehmigt Kiel, den 01.10.2021

gez.: Prof. Dr. Anne Letsch
(Vorsitzende der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Glossarium.....	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Das Burkitt-Lymphom.....	1
1.2 Therapie des Burkitt-Lymphoms	2
1.3 Das Protoonkogen c-MYC	3
1.4 Inhibition von c-MYC	4
1.5 Antikörpertherapie.....	5
1.5.1 Effektormechanismen von Antikörpern.....	6
1.5.2 Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität	7
1.5.3 Komplementvermittelte Zytotoxizität.....	7
1.5.4 Antikörperabhängige Phagozytose.....	8
1.5.5 CD20 als Zielantigen für die Antikörpertherapie	9
1.6 P493-6 als Modell mit regulierter c-MYC-Expression	11
1.7 Zielsetzung	12
2 Material	14
2.1 Chemikalien, Reagenzien und Medien.....	14
2.2 Verbrauchsmaterialien	15
2.3 Technische Geräte.....	15
2.4 Software	16
2.5 Testkits.....	17
2.6 Zelllinien.....	17
2.7 Antikörper.....	17
2.8 TaqMan-Proben	18
3 Methoden.....	19
3.1 Kultivierung der Zelllinien.....	19
3.2 Genexpressionsanalysen mit RT-qPCR	19
3.2.1 Isolierung der messenger RNA (mRNA).....	20
3.2.2 cDNA-Synthese	20
3.2.3 Quantitative Real-Time TaqMan PCR	21
3.3 Durchflusszytometrie	21
3.4 Western Blot.....	22
3.5 Aufbereitung von Zellen aus dem peripheren Blut.....	22

3.5.1	Gewinnung mononukleärer Zellen	23
3.5.2	Gewinnung von Granulozyten	23
3.5.3	Gewinnung von Makrophagen	23
3.5.4	Aufbereitung von humanem Vollblut	24
3.5.5	Aufbereitung von humanem Serum	24
3.6	⁵¹Chrom-Freisetzungstest	25
3.6.1	Komplementabhängige Zelltoxizität (CDC).....	25
3.6.2	Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC).....	26
3.7	Antikörperabhängige Phagozytose (ADCP)	26
3.8	P493-6 Wachstumstest.....	27
3.9	Apoptosebestimmung mit Annexin V/7-AAD	27
3.10	Zellzyklusbestimmung mit BrdU/7-AAD.....	28
3.11	Homotypische Aggregation.....	28
3.12	Auswertung, Darstellung und Statistik	28
4	Ergebnisse	30
4.1	Die Zelllinie P493-6 als c-MYC-Modellsystem	30
4.1.1	c-MYC-Expression	30
4.1.2	Immunphänotyp	32
4.1.3	Wachstumskinetik.....	34
4.1.4	Zellzyklusdistribution.....	35
4.2	Einfluss der c-MYC-Expression auf CD20-Antikörper vermittelte Effekte	36
4.2.1	Homotypische Aggregation.....	37
4.2.2	Direkte Zytotoxizität	38
4.2.3	Komplementvermittelte Zytotoxizität.....	40
4.2.4	Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität mit mononukleären Zellen ...	42
4.2.5	Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität mit Granulozyten	43
4.2.6	Zytotoxizitätstests mit Vollblut.....	45
4.2.7	Antikörperabhängige Phagozytose.....	46
4.3	c-MYC-Inhibition mit dem BET-Bromodomänen-Inhibitor JQ1	49
4.3.1	Einfluss von JQ1 auf die c-MYC-Expression	49
4.3.2	Analyse der Wachstumskinetik.....	50
4.3.3	Komplementvermittelte Zytotoxizität.....	52
5	Diskussion.....	55
5.1	Eigenschaften von P493-6-Zellen	55
5.2	Einfluss von c-MYC auf die Zytotoxizität von CD20-Antikörpern im P493-6-Modell.....	57

5.2.1	Direkte Zytotoxizität durch homotypische Aggregation.....	57
5.2.2	Indirekte Zytotoxizität in Abhängigkeit von c-MYC	58
5.3	BET-Bromodomänen-Inhibition.....	59
5.4	c-MYC als therapeutischer Angriffspunkt	60
6	Zusammenfassung	62
7	Literaturverzeichnis.....	63
8	Eigene Veröffentlichungen	70
9	Erklärung	71
10	Curriculum vitae	72
11	Danksagung	73

Glossarium

7-AAD	7-Aminoactinomycin D
Abb.	Abbildung
A. dest.	destilliertes Wasser
ADCC	antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität, engl. antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
ADCP	antikörperabhängige zellvermittelte Phagozytose, engl. antibody-dependent cell-mediated phagocytosis
Ak	Antikörper
AML	akute myeloische Leukämie
AMWF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
bZIP	engl. basic leucine zipper domain
BR	Basalfreisetzungsrage, engl. basal release
BrdU	Bromdesoxyuridin
BL	Burkitt-Lymphom
bp	Basenpaare
CD	Cluster der Differenzierung
CDC	komplementvermittelte Zytotoxizität, engl. complement-dependent cytotoxicity
CDK	cyclinabhängige Kinase, engl. cyclin-dependent kinase
CMV	Zytomegalievirus, engl. cytomegalovirus
CRP	komplementregulatorisches Protein, engl. complement-regulating protein
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten, engl. cytotoxic T-lymphocytes
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
dNPT	Desoxynukleosidtriphosphat, engl. deoxynucleoside triphosphate
EBV	Epstein-Barr-Virus
EC50	mittlere effektive Konzentration
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor, engl. epidermal growth factor
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor, engl. epidermal growth factor receptor
ELISA	engl. enzyme-linked immunosorbent assay
E:T-Ratio	Effektor zu Target-Ratio
FACS	Durchflusszytometrie, engl. fluorescence-activated cell scanning
FCS	fötale Kälberserum, engl. fetal calf serum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GMALL	German Multicenter Acute Lymphoblastic Leukemia Study Group
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (engl. granulocyte macrophage colony-stimulating factor)

HDAC	Histondeacetylase
HDACi	Histondeacetylase-Inhibitor
h.i.	hitzeinaktiviert, engl. heat inactivated
HIV	humanes Immundefizienzvirus
IgH	Immunglobulin-Schwerkette, engl. immunoglobulin heavy chain
IgK	Immunglobulin-Kappa-Leichtkette, engl. immunoglobulin kappa light chain
IgL	Immunglobulin-Lambda-Leichtkette, engl. immunoglobulin lambda light chain
kDA	Kilodalton
Kontr.	Kontrolle
Konz.	Konzentration
l	Liter
LRS	Leukozytenreduktionssystem
m	milli
M	Molar
MAK	Membranangriffskomplex
mAk	monoklonaler Antikörper
MFI	mean fluorescence intensity
Min.	Minuten
MNC	mononukleäre Zellen, engl. mononuclear cells
MTX	Methotrexat
MR	maximale Freisetzungsrage, engl. maximal release
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure, engl. messenger ribonucleic acid
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
PCD	programmierter Zelltod, engl. programmed cell death
PMN	polymorphkernige Zellen
μ	mikro
rh	rekombinant human
rpm	engl. rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
Sek.	Sekunden
Std.	Stunden
T-ALL	T-Zell akute lymphatische Leukämie
tTA	tetracyclinkontrollierter Transaktivator
UBB	Ubiquitin-B
WHO	Weltgesundheitsorganisation, engl. World Health Organization
w/	mit, engl. with
w/o	ohne, engl. without
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Das Burkitt-Lymphom

Das Burkitt-Lymphom (BL) ist eine hochmaligne B-Zelltumorerkrankung des lymphatischen Systems und wird zu den Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) gezählt (Swerdlow et al., 2016). Es wurde erstmals 1958 in Kampala, Afrika, entdeckt, an Kindern beschrieben und nach seinem Entdecker, dem Chirurgen Denis Parsons Burkitt, benannt. Die Patienten zeigten ein- oder zweiseitige Läsionen im Gesicht, insbesondere an der Maxilla oder Mandibula und verstarben innerhalb von Tagen oder Wochen (Burkitt, 1958). Das BL wurde fälschlicherweise erstmals als Sarkom beschrieben, aber später den Lymphomen zugeordnet (Epstein, 2012). Auffallend war das geografische Vorkommen dieser lymphatischen Erkrankung: sie wurde nur in tropischen, warmen Gebieten beschrieben, nicht aber in Gebirgen, wo das Klima kühl ist, weswegen Malaria (hervorgerufen durch den Parasiten *Plasmodium falciparum*) als mögliche Ursache in Betracht gezogen worden war. Tatsächlich konnte der Epstein-Barr-Virus (EBV) in der Probe nachgewiesen werden (Burkitt, 1983; Pattle et al., 2006; Epstein, 2012). Derzeit ist das BL im Kindesalter eine der häufigsten Tumorerkrankungen in Afrika (van den Bosch, 2004) (Abbildung 1).

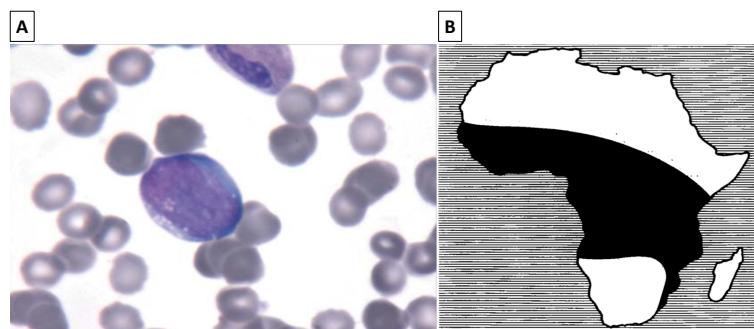


Abbildung 1. Zytologie und Verteilung des Burkitt-Lymphoms. A) Burkitt-Lymphom eines HIV Patienten. Die neoplastische Zelle zeigt einen ovalen Nucleus, kleine aber abgrenzbare Nucleoli und ein blaues Zytoplasma mit prominenten Vakuolen. Entnommen nach Ferry, 2006. **B)** Abbildung der Verbreitung des endemischen Burkitt-Lymphoms in Afrika (Region in schwarz) nach Burkitt, 1958. Das endemische Burkitt-Lymphom kommt vermehrt auch in anderen äquatorialen Ländern wie z.B. Papua-Neuguinea und Brasilien vor.

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) unterteilt die Burkitt-Lymphome in drei klinische Varianten: das endemische, das sporadische und das Immundefizienz-assoziierte Burkitt-

Lymphom. Das charakteristische Merkmal vieler BL ist eine Dysregulation des c-MYC-Gens, welches sich auf Chromosom 8 (Bande 8q24) befindet. Ursache der Dysregulation ist eine Translokation des Gens in die Nähe der Promotorregion eines der Immunglobulin(Ig)-Genloci. Diese Translokation führt zu einer Verstärkung der Expression von c-MYC. Die mit 85% häufigste Translokation ist die t(8;14)(q24;q32) an den Promotor der Ig-Schwerkette (IgH). Weitere, seltenere Translokationen betreffen die Immunglobulinleichtketten, wie z.B. die Lambda-Leichtkette (IgL) bei t(8;22)(q24;q11) und die Kappa-Leichtkette (IgK) bei t(2;8)(p12;q24) (Swerdlow et al., 2016).

Typische endemische BL-Patienten sind afrikanische Kinder (4-7 Jahre), aber auch Kinder anderer äquatorial gelegener Länder, wie z.B. Papua-Neuguinea. Die Inzidenz ist mit 3-6 Fällen pro 100.000 Kindern pro Jahr sehr hoch in Afrika (Jacobson et al., 2014). Es sind vor allem die Kieferknochen betroffen, aber auch die Gesichtsknochen, Nieren, der Gastrointestinaltrakt, die Ovarien, Brust und andere extranodale Bereiche können infiltriert sein. Eine EBV-Infektion lässt sich in nahezu allen Fällen nachweisen (Blum et al., 2004). Die endemische BL-Inzidenz korreliert mit der Malaria-Infektionsrate (Magrath, 2012).

Das sporadische BL ist eine seltene Erkrankung und im Gegensatz zum endemischen BL nicht auf den Kontinent Afrika beschränkt, sondern weltweit anzutreffen, ohne klimatische oder geographische Assoziationen. Das sporadische BL macht 1-2% der Lymphome bei Erwachsenen und ca. 30% der pädiatrischen Lymphome in Europa und den USA aus (Blum et al., 2004; Sant et al., 2010). Betroffen sind vor allem das Abdomen, insbesondere der ileozäkale Bereich, aber auch Ovarien, Nieren, Omenti (majus und minus) und andere Gewebe. Lymphknoteninfiltrationen sind bei Erwachsenen häufiger als bei Kindern. Die Patienten können außerdem unter Aszites und Pleuraergüssen leiden (Boerma et al., 2004). Im Gegensatz zu dem endemischen BL kann nur bei 15-30% der unter der sporadischen BL leidenden Patienten das EBV nachgewiesen werden (Burmeister et al., 2005).

Das Immundefizienz-assoziierte BL betrifft hauptsächlich Patienten, die mit dem humanen Immundefizienzvirus (HIV) infiziert worden sind. Seltener betroffen sind Patienten, die eine Organtransplantation bekommen haben oder Patienten mit einer kongenitalen Immundefizienz. Im Vergleich zu den meisten anderen HIV-assoziierten Lymphomen ist die BL-Rate in der HIV-positiven Bevölkerung mit dem Aufkommen der starken antiretroviralen Therapie (ART) nicht gesunken (Hleyhel et al., 2014).

1.2 Therapie des Burkitt-Lymphoms

Die Mortalität von Patienten mit BL hat sich in den letzten Jahren deutlich reduziert und ist abhängig von dem Alter der Patienten, der Lokalisation und Art des BL. Ist das zentrale Nervensystem (ZNS) oder das Knochenmark betroffen, so verschlechtert sich die Prognose

(Blum et al., 2004; Jacobson et al., 2014). Kinder mit BL haben eine bessere Überlebenschance als Erwachsene, und die Therapiestrategien unterscheiden sich. Eine standardisierte, einheitliche Therapie existiert nicht. Aufgrund des schnellen Wachstums des BL steht die frühzeitige Behandlung mit Chemotherapeutika im Vordergrund, u. U. erfolgt eine Stammzelltransplantation. Auch eine prophylaktische Behandlung des ZNS spielt eine wesentliche Rolle. Drei Chemotherapieschemata werden zur Behandlung des BL bei Erwachsenen unterschieden. Obwohl das Burkitt-Lymphom zunächst gut auf eine intensive Kombinationschemotherapie anspricht, hat eine rezidivierende bzw. refraktäre Erkrankung eine schlechte Prognose (Jacobson et al., 2014; Sesques et al., 2017). Es besteht demnach klinischer Bedarf, die Biologie der BL besser zu verstehen und neue Behandlungsansätze zu entwickeln.

1.3 Das Protoonkogen c-MYC

Das *MYC*-Gen wurde erstmals in einem Vogelretrovirus (*avian leukemia virus*) identifiziert, welches in den Tieren Myelozytomatose hervorruft und namensgebend war (Sheiness et al., 1978). Als Transkriptionsfaktor reguliert *MYC* eine große Anzahl an Genen und nimmt somit Einfluss auf den Zellzyklus, das Zellwachstum, die Differenzierung und Apoptose von Zellen. Unter normalen physiologischen Bedingungen unterliegt die Expression von *MYC* einer strengen Regulation sowohl auf Transkriptions- als auch auf Proteinebene (Ott, 2014). Eine Fehlregulation von *MYC* kann zu unkontrolliertem Wachstum führen, *MYC* ist somit ein Protoonkogen (de Alboran et al., 2001) und dessen Fehlregulation ist ein kritisches Ereignis in verschiedenen soliden und auch hämatoonkologischen Tumoren (Nesbit et al., 1999). Drei unterschiedliche isofunktionelle Gene (*c-MYC*, *n-MYC* und *l-MYC*) agieren allgemein als Zellproliferationsregulatoren, auch in der Abwesenheit von Mutationen (Ott, 2014). Das *c-MYC*-Gen liegt beim Menschen auf Chromosom 8 (Bande 8q24). Das *c-MYC*-Gen besteht aus drei Exons, wobei nur Exon 2 und Exon 3 für das Protein kodieren (Nguyen et al., 2017). Die Aktivierung von *MYC* benötigt die Bindung des Transkriptionsfaktors MAX (*MYC-associated factor X*). Die beiden Proteine bilden ein Heterodimer, welches spezifisch an die DNA-Sequenz des Promotors der Zielgene bindet (Abbildung 2). Je nach Zelltyp ist *c-MYC* für 10-20% der Genregulation verantwortlich (Perna et al., 2012).

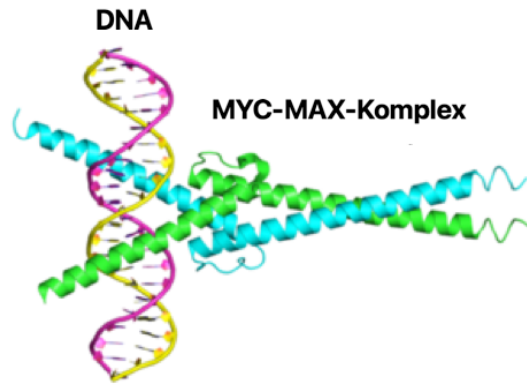


Abbildung 2. Beispiel eines MYC-MAX-Komplexes gebunden an DNA. Die Proteinstruktur besteht aus Helix-Loop-Helix-Motiven und enthält eine bZIP-Domäne. Bild nach Nair et al., 2003.

1.4 Inhibition von c-MYC

Bisherige Therapien zur Reduktion von c-MYC sind rar. Die Abwesenheit einer Ligandenbindenden Domäne auf dem c-MYC-Protein erweist sich als Hindernis bei der Suche nach einem direkten Inhibitor (Delmore et al., 2011). Eine alternative Strategie zur Reduzierung der c-MYC Genexpression liegt in der Inhibition von Aktivatoren, z.B. den Chromatinregulatoren. Diese sind in vielen Malignomen dereguliert und können durch kleine Moleküle inhibiert werden. Die BET-Familie der Bromodomänen besteht u.a. aus BRD2, BRD3, BRDT und dem BRD4. BRD4 bindet an acetyliertes Chromatin und fördert mit dem Transkriptions-Elongationsfaktor P-TEFb-Komplex der mitotischen Chromosomen die Expression von Transkriptionsfaktoren, u.a. auch von c-MYC (Jang et al., 2005).

Ein BET-Familien Bromodomänenprotein-Inhibitor ist das Thienotriazolodiazipin JQ1. Unterschieden wird ein wirksames, BRD4-bindendes Enantiomer JQ1(+) von einem unwirksamen, nicht BRD-4 bindenden JQ1(-)-Enantiomer (Filippakopoulos et al., 2010).

BRD4 ist mit vielen Enhancern assoziiert. Viele maligne Zellen weisen in ihren Schlüsselonkogenen überdurchschnittlich viele Enhancer auf, die als Superenhancer bezeichnet werden. Superenhancer sind mit c-MYC und anderen Schlüsselgenen assoziiert. Die Behandlung dieser Zellen mit dem BRD4-Inhibitor JQ1 verursachen einen Verlust von BRD4 und P-TEFb in diesen Superenhancer-Bereichen und letztendlich einen Verlust der Transkription des c-MYC-Onkogens. Tumorzellen sind abhängig von hohen Konzentrationen der BRD4 in den Superenhancer-Bereichen. JQ1 kann somit zur Störung der Superenhancer dienen und als eine Option für die selektive Ausschaltung der Schlüsselonkogene in vielen Tumorentitäten dienen (Loven et al., 2013).

1.5 Antikörpertherapie

Antikörper sind Proteine aus der Klasse der Immunglobuline. Sie werden von B-Zellen gebildet und sind das Produkt der Reaktion auf Antigene. Charakteristisch setzen sich Antikörper aus zwei leichten Ketten und zwei schweren Ketten zusammen, welche über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Abbildung 3). Es lassen sich strukturell zwei antigenbindende Fragmente (Fab-Fragment) von einem konstanten Fragment (Fc-Fragment) unterscheiden. Die Antigenbindungsstelle (variable Domäne) befindet sich auf dem Fab-Fragment. Das Fab-Fragment wird weiterhin von einer konstanten Domäne gebildet, die sich in das Fc-Fragment fortsetzt. Die Immunglobuline werden anhand ihrer konstanten Domänen in fünf verschiedene Isotypen (Klassen) eingeteilt: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM (Vidarsson et al., 2014; Kretschmer et al., 2017).

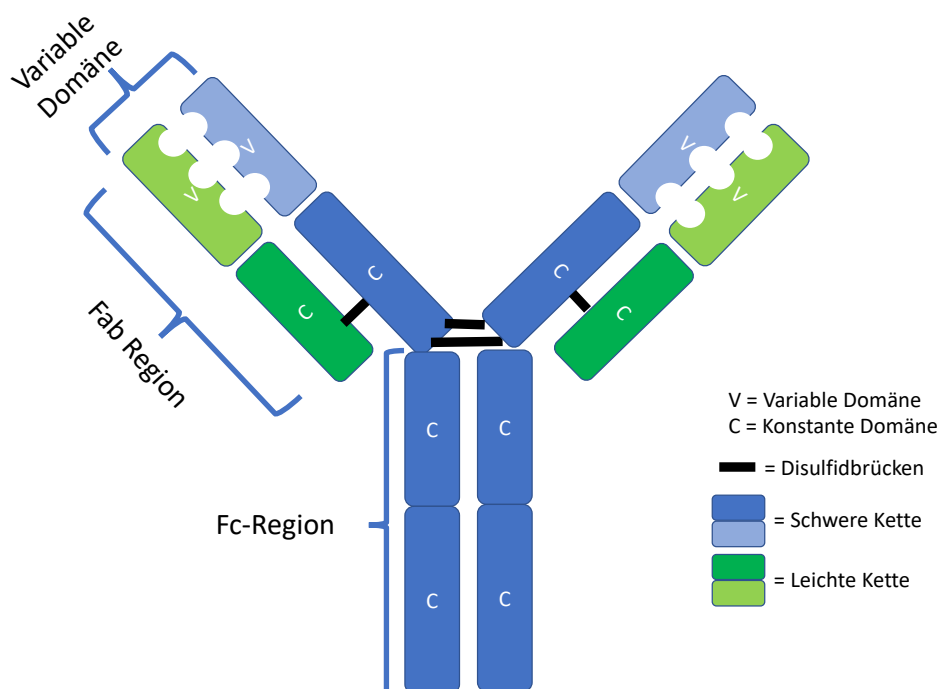


Abbildung 3. Schematische Darstellung eines Antikörpers. Antikörper setzen sich aus zwei leichten Ketten (grün) und zwei schweren Ketten (blau) zusammen, welche über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Es lassen sich strukturell zwei antigenbindende Fragmente (Fab-Region) von einem konstanten Fragment (Fc-Region) unterscheiden. Die Antigenbindungsstelle (variable Domäne, V) befindet sich auf dem Fab-Fragment.

Der Einsatz monoklonaler Antikörper (mAk) in der Tumorthherapie hat sich in den letzten Jahren zu einer der erfolgreichsten Behandlungsstrategien entwickelt. Sowohl bei den soliden als auch bei den hämatologischen Neoplasien werden mAk therapeutisch eingesetzt (Weiner,

2015). In der Bundesrepublik Deutschland sind derzeit 106 Antikörper für Therapien zugelassen, über 23 Antikörper davon werden in der Tumortherapie genutzt (Paul-Ehrlich-Institut, 2018). Monoklonale Antikörper binden spezifisch an ihre Antigene, welche z.B. Wachstumsfaktorrezeptoren auf der Oberfläche von Tumorzellen sein können. Die Zielantigene auf hämatopoetischen Zellen, zu denen auch das BL gehört, sind typischerweise Oberflächenglykoproteine, die sowohl von malignen als auch von gesunden Zellen exprimiert werden, sie sind in sog. Cluster of Differentiation (CD) eingeteilt und können spezifisch für eine bestimmte Zellart oder ein Differenzierungsstadium sein (Scott et al., 2012).

Neuere Angriffspunkte für mAk in der Tumorbehandlung sind sog. Immuncheckpoint-Blocker. Durch Eingriff in die Immunregulation werden zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) indirekt für Tumorzellen sensibilisiert. CTLA-4 ist ein Rezeptor auf T-Zellen, welcher die Immunantwort der CTL hemmt. Antikörper gegen CTLA-4 wie Ipilimumab blockieren die Inhibition und führen zu einer effektiven T-Zellantwort. PD-1 (programmed cell death protein-1) ist ebenfalls ein immunregulatorischer Rezeptor auf T-Zellen. Einige Tumorzellen exprimieren den Liganden PD-L1 (programmed death ligand) auf ihrer Zelloberfläche, die an die PD-1 Rezeptoren von CTL binden und so die Immunantwort inhibieren (Pardoll, 2012; Couzin-Frankel, 2013).

1.5.1 Effektormechanismen von Antikörpern

Es existieren grundsätzlich zwei Arten von Effektormechanismen: Fab-vermittelte und Fc-vermittelte Wirkmechanismen (Lu et al., 2018).

Der Fab-vermittelte Wirkmechanismus beruht auf einem direkten, Fc-unabhängigen Effekt, welcher allein durch die Antigenbindung ausgelöst wird. Je nach Zielantigen können die direkten Fab-vermittelten Mechanismen unterschiedliche Reaktionen auslösen (Peipp et al., 2008). So konnte unter anderem gezeigt werden, dass EGFR-gerichtete Antikörper die Rezeptoraktivierung unterbinden, indem der mAk die vorgesehene Stelle für den Liganden am Rezeptor blockiert. Der Rezeptor behält hierbei seine inaktive Form bei. Es wird die Rezeptoraktivierung verhindert und die Signaltransduktion gestört (Baselga, 2001). Die direkten Wirkmechanismen können daher einen Zellzyklusarrest auslösen, welcher zu Apoptose führen kann (Peipp et al., 2008). Fab-vermittelte Effekte wurden auch für mAk in der Tumortherapie hämato-onkologischer Erkrankungen beschrieben. So konnten Cardarelli et al. zeigen, dass Rituximab nach Kreuzvernetzung CD20-positiver B-Zellen die Apoptose induzierte (Cardarelli et al., 2002).

Fc-vermittelte Wirkmechanismen sind indirekter Natur und beruhen auf einer Interaktion des Fc-Teils des Antikörpers mit Serumproteinen (Komplementfaktoren) oder Fc-Rezeptoren (FcR) auf immunologischen Effektorzellen, wie NK-Zellen, Granulozyten oder Makrophagen.

Die Interaktion des Fc-Teils führt z.B. dazu, dass die Immunzelle die Tumorzelle durch Phagozytose (engl. antibody-dependent cell-mediated phagocytosis, ADCP) oder durch antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (engl. antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) eliminiert (Seidel et al., 2013; Weiskopf et al., 2015; Heemskerk et al., 2018).

1.5.2 Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität

Die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) ist ein Mechanismus der zellulären Immunabwehr. Dabei lysieren Effektorzellen des Immunsystems aktiv eine Zielzelle, auf deren Zelloberfläche ein spezifischer Antikörper gebunden hat (Wang et al., 2015). Als Teil der humoralen Immunantwort hilft ADCC, dem Organismus die Ausbreitung zellulärer Infektionen zu limitieren oder zu verhindern. Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper gehören der IgG Klasse an. IgG-Antikörper interagieren mit Fc γ -Rezeptoren der Effektorzellen. Fc γ -Rezeptoren können aktivierend oder inhibierend auf das Immunsystem wirken. Die menschlichen Fc γ -Rezeptoren sind der Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) und der Fc γ RIII (CD16). Ferner werden Fc γ -Rezeptoren unterschiedlich in Zellen exprimiert. So exprimieren NK-Zellen nur aktivierende Fc γ RIIIa, während B-Zellen nur die inhibierenden Fc γ RIIIb exprimieren. Fc γ -Rezeptoren unterscheiden zwischen den Tierarten und komplizieren die Tier-Mensch-Modelle (Nimmerjahn et al., 2008; Bruhns et al., 2009; Pincetic et al., 2014). Die Art der Zytotoxizität unterscheidet sich je nach Effektorzelltyp. Typischerweise schütten NK-Zellen Granzym B und Perforine aus, so dass die Zielzellmembran perforiert und Granzym B eine Apoptose induzieren kann. (Wang et al., 2015). Zusätzlich zu NK-Zellen können auch myeloische Zellen, insbesondere Granulozyten, sehr effektiv ADCC vermitteln (Valerius et al., 1997; Heemskerk et al., 2018).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden *in vitro* ADCC Experimente unter Verwendung von polymorphnukleären Zellen (engl. polymorphonuclear cells, PMN) und mononukleären Zellen (engl. mononuclear cells, MNC) als Effektorzellen durchgeführt.

1.5.3 Komplementvermittelte Zytotoxizität

Das Komplementsystem ist Teil des unspezifischen, angeborenen Immunsystems. Es werden mehr als 30 Proteine mit dem Komplementsystem assoziiert, die überwiegend in der Leber gebildet werden und sowohl aktiv als auch inaktiv im peripheren Blut oder auch gebunden auf Zelloberflächen vorkommen. Die Hauptaufgabe des Komplementsystems liegt in der Demaskierung von Krankheitserregern durch Anbinden an deren Oberflächenproteinen,

welche eine konsekutive Opsonierung und Phagozytose der Erreger durch Immunzellen erlaubt. Unterschieden werden drei verschiedene Aktivierungswege: der klassische, der alternative und der Lektin-abhängige Weg (Ricklin et al., 2010). Essentiell für die Komplementkaskade und damit limitierender Schritt ist die Umwandlung von C3 in C3b und C3a (Merle et al., 2015). Die C3-Konvertierung führt zur Umwandlung von C5 in C5a und C5b und durch Zusammenlagerung von C5b, C6, C7, C8 und mehreren C9 Molekülen anschließend zur Bildung des Membranangriffskomplexes (MAC). Dieser ermöglicht durch Bildung einer Pore in der Plasmamembran das Einströmen von Ionen und Wasser und führt so zur Zelllyse (Ricklin et al., 2013). Zusätzlich zur Ausbildung des MAC kann das Komplementsystem zwei weitere Effektorfunktionen erfüllen: die Freisetzung von Anaphylatoxinen (u.a. C5a) und die Opsonisierung der Zielzelle (u.a. durch C3b) (Gelderman et al., 2004). Die Aktivierung des Komplementsystems über den klassischen Weg wird durch Antikörper ausgelöst. Vor allem Antikörper der Klasse IgG und IgM sind hierzu fähig. Aufgrund der Struktur von IgM-Ak sind diese oftmals effektiver als IgG-Ak. Die Aktivierung der Kaskade beginnt mit einem IgM-Molekül oder mindestens zwei IgG-Molekülen über den C1q-Komplex (C1q, Serinproteasen C1s und C1r). C1q bindet an das Fc-Fragment des Antikörpers (Duncan et al., 1988). Diese Interaktion führt im Folgenden zu einer autokatalytischen Aktivierung von C1s und C1r (Ugurlar et al., 2018). Dadurch werden C4 und C2 in C4a und C4b bzw. C2a und C2b gespalten. Anschließend lagern sich C2b und C4b an der Oberfläche der Zielzelle an und bilden die C3-Konvertase die, wie oben beschrieben, die komplementvermittelten Effektormechanismen initiiert (Merle et al., 2015).

Beim alternativen Weg erfolgt die Aktivierung des Komplementsystems unabhängig von C1, C2 und C4. Durch Bindung von C3 an eine Aktivatoroberfläche (wie z.B. an eine bakterielle Zelloberfläche) entsteht durch diverse Spaltungen C3b. Dieser C3b-Komplex kann durch eine autokatalytische Schleife weitere C3b-Komplexe erzeugen, die mit dem Faktor P (Properdin) binden und einen C3bBpP-Komplex generieren. Dieser C3bBpP-Komplex ist in der Lage, C5 zu spalten und letztendlich, korrelierend zum klassischen Weg, den Membranangriffskomplex zur Lyse der betroffenen Zelle zu bringen (Ricklin, 2012).

1.5.4 Antikörperabhängige Phagozytose

Neben der NK-Effektorzellen, die Hauptbestandteil der ADCC sind, spielen Makrophagen eine ebenfalls relevante Rolle bei der Eliminierung von Tumorzellen. Humane Makrophagen exprimieren auf ihrer Oberfläche alle Fc γ -Rezeptoren. Die antikörperabhängige Phagozytose (engl. antibody-dependent cellular phagocytosis, ADCP) beschreibt einen Mechanismus, in dem die mit Antikörper opsonierte Zielzelle den Fc γ -Rezeptor der Makrophagen zu

Phagozytose aktiviert. Dieses führt zur Internalisierung und Tod der Zielzelle durch Azidierung der Phagosomen (Kamen et al., 2019).

1.5.5 CD20 als Zielantigen für die Antikörpertherapie

CD20 ist ein transmembranes Phosphoprotein. Die Expression von CD20 findet während der Entwicklung von der Pro-B-Zelle bis hin zur reifen B-Zelle statt; sie fehlt in der frühen Entwicklung der B-Zelle und auf ausgereiften Plasmazellen. Ein natürlicher Ligand von CD20 ist derzeit nicht bekannt (Cragg et al., 2005). Es wird vermutet, dass CD20 als Kalziumionenkanal fungiert (Putney, 1999). Das CD20-Molekül ist durch vier transmembrane Domänen gekennzeichnet (Abbildung 4). Die N- und C-Termini befinden sich intrazellulär. Zwei Regionen sind extrazellulär lokalisiert und formen jeweils eine kleine und eine große Schleife. Auf der großen Schleife befindet sich ein Alanin-Prolin-Motif, das für die Antikörperbindung essentiell zu sein scheint (Cragg et al., 2005).

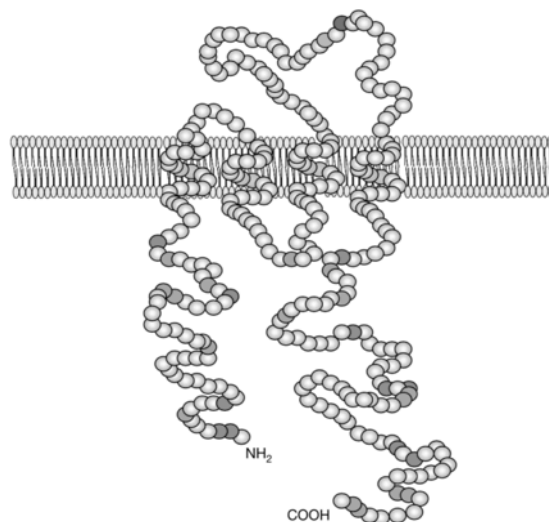


Abbildung 4. Schematische Darstellung eines CD20-Moleküls. Das CD20-Molekül besteht aus vier transmembranen Domänen, wobei sich die N- und C-Termini intrazellulär befinden. Bild nach Cragg et al., 2005.

CD20-Antikörper werden vor allem nach ihren funktionalen Eigenschaften in Typ-I und Typ-II kategorisiert (Sopp et al., 2018). Typ-I-Antikörper induzieren nach Bindung eine Ansammlung von CD20-Molekülen in Lipid Rafts, Typ-II-Antikörper besitzen diese Fähigkeit nicht. Die Lipid Raft-Umstrukturierung durch Typ-I CD20-Antikörper geht mit einer effektiven Aktivierung des Komplementsystems einhergeht (Marshall et al., 2017).

Die Mehrheit der derzeit zugelassenen CD20-Antikörper sind vom Typ-I und aktivieren daher effizient die Komplementkaskade und CDC. Aufgrund ihrer fehlenden Effizienz bei der Lipid Raft-Umstrukturierung induzieren Antikörper vom Typ-II deutlich ineffektiver CDC als

Antikörper vom Typ-I. Typ-II-Antikörper bewirken eine homotypische Aggregation der Zielzellen und können diese über direkten Zelltod eliminieren (Beers et al., 2010). Abbildung 5 veranschaulicht die verschiedenen Wirkmechanismen.

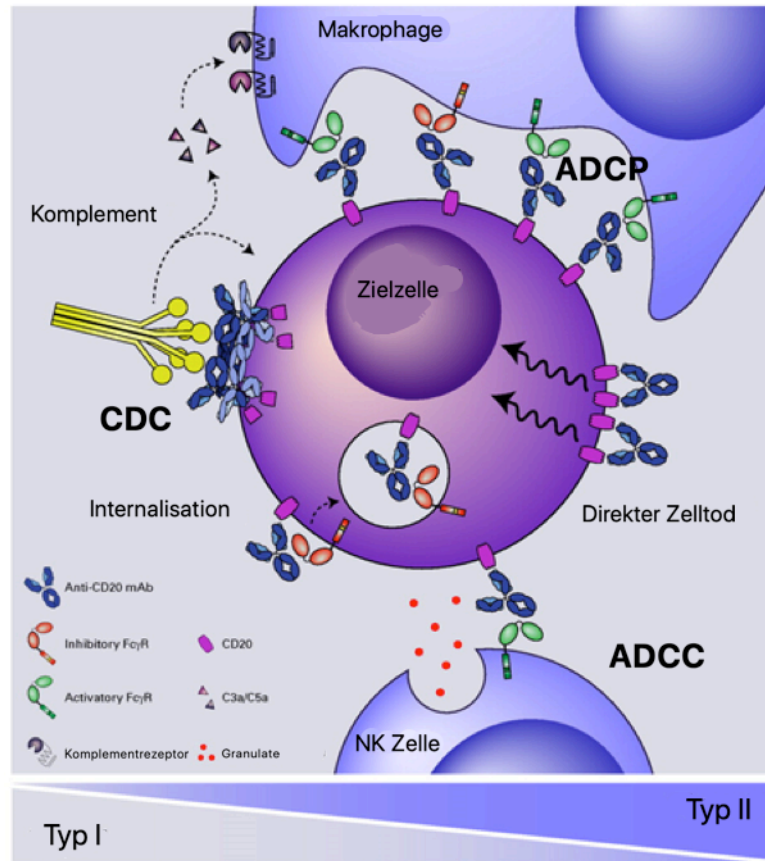


Abbildung 5. Wirkmechanismen von CD20-Antikörpern (nach Sopp et al., 2018). CD20-Antikörper haben die Fähigkeit, Zytotoxizität durch drei verschiedene Effektormechanismen zu aktivieren. Die Aktivierung des Komplementsystems führt zur komplementvermittelten Zytotoxizität (CDC). Die Aktivierung von Fc γ -Rezeptor tragenden Effektorzellen (NK-Zellen, Makrophagen) führt zur antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC) oder Phagozytose (ADCP). Der direkte Zelltod ist durch Fab-vermittelte Antikörperbindung möglich. Typ-I-Antikörper sind effektiver bei der CDC, während Typ-II-Antikörper effektiver bei direktem Zelltod sind (Sopp et al., 2018).

Der chimäre monoklonale CD20-Antikörper Rituximab war der erste von der FDA in 1997 für die Tumorthherapie zugelassene Antikörper. Funktional wird Rituximab den Typ-I-Ak zugeordnet. Der Zelltod durch Rituximab erfolgt über direkte und indirekte Effekte. Die direkten Effekte sind Zellwachstumsarrest, Induktion von Apoptose und Sensibilisierung gegenüber Chemotherapie. Die indirekten Effekte bestehen aus der CDC und der ADCC (Okroj et al., 2013).

Der Einsatz von Rituximab ist nicht auf die Krebstherapie beschränkt: zusätzlich zur Behandlung maligner B-Zellerkrankungen wie die chronische lymphatische Leukämie (CLL)

und Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) wird der Antikörper auch bei Autoimmunerkrankungen (wie z.B. der rheumatischen Arthritis und multipler Sklerose) eingesetzt (Edwards et al., 2006). In der Therapie des Burkitt-Lymphoms findet Rituximab in Kombination mit Chemotherapie Verwendung. Bei vielen Patienten bilden sich Resistenzen gegen Rituximab. Kausale Gründe dafür sind die Selektion von Tumorzellen mit geringer CD20-Expression und die Trogozytose von CD20 (Hiraga et al., 2009; Boross et al., 2012).

Ofatumumab ist ein vollständig humaner monoklonaler CD20-Antikörper und seit 2009 von der FDA für die Therapie der CLL bei Alemtuzumab- und Fludarabin-refraktären Patienten zugelassen (Boross et al., 2012). Aufgrund des geringen Absatzes außerhalb der USA wird Ofatumumab seit 2018 kommerziell nur noch auf dem US-amerikanischen Markt vertrieben. Im Gegensatz zu Rituximab bindet Ofatumumab an der kleinen Schleife des CD20-Moleküls und befindet sich in seiner gebundenen Form näher an der Zellmembran der Zielzelle. Diese Nähe ist ausschlaggebend für die effektivere C1q-Aktivierung durch den Antikörper (Pawluczak et al., 2009). Ofatumumab zeigt auch bei geringer Dichte von CD20-Molekülen eine gute CDC-Aktivität (Teeling et al., 2004).

Obinutuzumab ist ein humanisierter CD20-Antikörper und der erste monoklonale CD20-Antikörper der 2. Generation, der mit der Technik des sogenannten Glykoengineering (Glykosylierung) optimiert wurde. Obinutuzumab gehört, im Gegensatz zu Rituximab und Ofatumumab, funktional zu den Typ-II-Antikörpern. Die antikörpervermittelte Zellzytotoxizität wird vor allem durch ADCC und Phagozytose und nicht über CDC bewerkstelligt (Sopp et al., 2018). Obinutuzumab kann durch Bindung an das CD20-Molekül eine intrazelluläre Signalkaskade auslösen. Diese führt zu einem nicht-apoptotischen Zelltod durch eine Umstrukturierung des Zytoskeletts und eine erhöhte Permeabilität der Lysosomenmembran (Alduaij et al., 2011; Honeychurch et al., 2012). Verschiedene Studien konnten zeigen, dass der Einsatz von Obinutuzumab im Vergleich zu Rituximab eine gute Alternative in der Therapie von B-Zell-Lymphomen darstellt (Mossner et al., 2010; Freeman et al., 2018).

1.6 P493-6 als Modell mit regulierter c-MYC-Expression

P493-6 ist eine Burkitt-Lymphom ähnliche Zelllinie mit der Eigenschaft, die c-MYC-Expression durch einen mit Tetracyclin induzierbaren Promotor regulieren zu können (Pajic et al., 2000). P493-6 wurde aus einer EBV/EBNA1-positiven B-Zelllinie generiert. Dazu wurden die Zellen mit einem *myc-tet* DNA-Konstrukt (BC266), bestehend aus einem EBV-abgeleiteten Vektor (pHEBO) mit zwei c-MYC-Codons und einem tetracyclinabhängigen Promotor (tetO7-TP), stabil transfiziert (Abbildung 6).

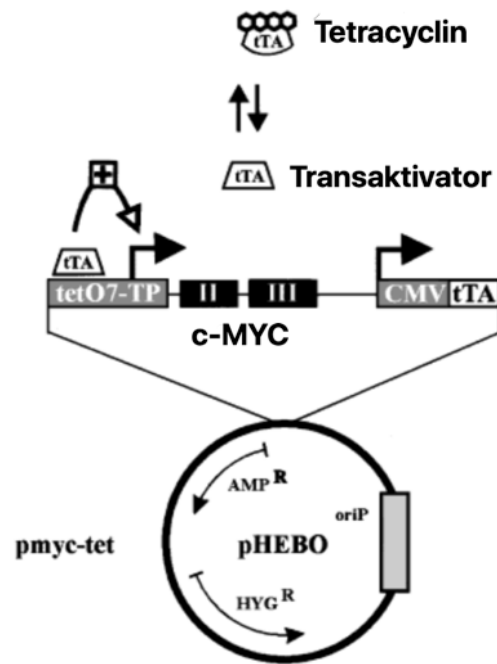


Abbildung 6. Konditionelle Expression von MYC in der B-Zelle P493-6 über eine stabile Transfektion mit c-MYC. Ein reversibel mit Tetracyclin beladender tetracyclinabhängiger Transkriptionsfaktor (tTA) bindet an den tetO7-TP-Promotor und aktiviert die Transkription von c-MYC. Die Expression des Transaktivators selbst wird über einen Zytomegalievirus(CMV)-Promotor gesteuert. Nach Pajic et al., 2000.

P493-6-Zellen exprimieren konstitutiv c-MYC in hohen Konzentrationen, ähnlich wie die Burkitt-Lymphome. Der unter der Kontrolle des CMV-Promotors stehende Transaktivator tTa aktiviert den tetO7-TP-Promotor und führt zu einer Expressierung von c-MYC. Bei Anwesenheit von Tetracyclin wird die c-MYC-Expression unterbunden, da Tetracyclin an den tTA bindet und die Aktivierung des tetO7-TP-Promotors unterbleibt. Bei einer Unterdrückung der c-MYC-Expression arretieren P493-6-Zellen im G0/G1 Zellzyklusstadium, bei c-MYC-Expression erfolgt keine Apoptose (Pajic et al., 2000). P493-6-Zellen sind somit ein gutes Modell zur Analyse des Einflusses von c-MYC auf die Effektorfunktionen von monoklonalen Antikörpern.

1.7 Zielsetzung

Die Fragestellung dieser Dissertation war, ob die c-MYC-Expressionsstärke in B-Zellen einen Einfluss auf die Sensitivität der Zellen gegenüber antikörperabhängiger komplement- und zellvermittelter Zytotoxizität hat. Als Modell für Burkitt-Lymphome diente die P493-6-Zelllinie, CD20 wurde als Zielantigen für den Einsatz monoklonaler Antikörper gewählt. Dabei sollten auch der Einfluss der c-MYC-Expression auf phänotypische Eigenschaften der P493-6 Zelle

evaluiert werden, wie z.B. die Expression charakteristischer Oberflächenproteine, die Wachstumskinetik und die Fähigkeit zur homotypischen Aggregation.

2 Material

2.1 Chemikalien, Reagenzien und Medien

Tabelle 1 zeigt die in dieser Arbeit genutzten Chemikalien, Reagenzien, Medien sowie Medienzusätze.

Tabelle 1. Übersicht der verwendeten Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller, Ort, Land
0.05% Trypsin-EDTA	Gibco Life Technologies, Paisley, UK
Natriumchromat (^{51}Cr), (Na_2CrO_4); 185 MBq/ml	Hartmann Analytic, Braunschweig, D
Aqua dest.	Gibco Life Technologies, Paisley, UK
Accutase	GE Healthcare, Solingen, D
Albumin Fraktion V, proteasefrei (aus Rinderplasma)	Carl ROTH, Karlsruhe, D
Cell Dissociation Buffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Dimethylsulfoxid USP Grade	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Doxycyclin	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Gibco Life Technologies, Paisley, UK
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Gibco Life Technologies, Paisley, UK
Easycoll Separating Solution	Biochrom AG, Berlin, D
Ethanol vergällt, ca 99%	BÜFA Chemikalien, Hude, D
fötales Kälberserum (FCS)	Gibco Life Technologies, Paisley, UK
Genitacin 50 mg/ml	Gibco Life Technologies, Paisley, UK
Hank's Balanced Salt Solution	PAA Laboratories, Pasching, D
Hygromycin B 50 mg/ml	Gibco Life Technologies, Paisley, UK
Lepirudin (Refludan®)	Celgene, München, D
Methanol	Merck, Darmstadt, D
Methotrexat (hydrate powder) (MTX)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Monocyte Attachment Medium	PromoCell, Heidelberg, D
Natriumazid	Merck, Darmstadt, D
Optiphase Supermix	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Paraformaldehyd (30.03 g/mol)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
PBS (Natriumphanylbutyrat)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Precision Plus Protein™ Standard	Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen, D
Penicillin und Streptomycin (Pen/Strep)	Gibco Life Technologies, Paisley, UK
Polysorbat 20	Merck, Darmstadt, D
Refludan	Celgene Europe, Hayes, UK
Makrophagenkolonie-stimulierender Faktor (M- CSF)	Cellgro, CellGenix/Metreon Bioproducts, Freiburg, D

Tabelle 1 ff.

Bezeichnung	Hersteller, Ort, Land
Granulozyten-/Makrophagenkolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF)	Cellgro, CellGenix/Metreon Bioproducts, Freiburg, D
RPMI-1640 Medium	Gibco Life Technologies, Paisley, UK
Salzsäure 25%	Carl ROTH, Karlsruhe, D
SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Natriumpyruvat 100 mM	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
TritonX 100	Merck, Darmstadt, D
Trypanblaulösung (0.4%)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
X-Vivo Medium	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, D

2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Tabelle 2. Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller, Ort, Land
96-well Platte (flacher Boden/runder Boden)	Sarstedt, Nümbrecht, D
96-well Platte (v-förmiger Boden)	Anicrin, Scorze, I
6-well Platte (flacher Boden)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Cell Strainer (70 µl Nylon)	BD Biosciences, Bedford, MA, USA
Citrat-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, D
Combitips advanced 2.5 ml (steril/unsteril)	Eppendorf, Hamburg, D
FACS-Röhrchen (5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Röhren (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	Th. Geyer, Renningen, D
Reagent Reservoir (50 ml)	VWR, Darmstadt, D
Safe Seal micro tube (2 ml/1.5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Safety-Multifly-Set	Sarstedt, Nümbrecht, D
Serologische Pipetten (2 ml/10 ml/25 ml/50 ml, steril)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Serumröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, D
Zellkulturflaschen (160 ml und 400 ml)	Greiner, Frickenhausen, D

2.3 Technische Geräte

Die verwendeten technischen Geräte sind in der Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3. Übersicht über die verwendeten technischen Geräte

Bezeichnung	Hersteller, Ort, Land
1450 MicroBeta TriLux LSC & Luminescence Counter; Wallac	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Brutschrank (Hera Safe 240)	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
ChemiDoc™ XRS+ System	Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen, D
Durchflusszytometer (Epics XL-MCL bzw. Navios 3L 10C)	Beckmann Coulter, Krefeld, D
ELISA Plate Reader (Sunrise)	TECAN, Männedorf, CH
Lichtmikroskop (Axiovert 40C/ AxioStarplus)	Zeiss, Oberkochen, D
LightCycler 480	Roche Molecular Systems, CA, USA
Magnetrührer (Hi-Mix S)	Heidolph Instruments, Schwabach, D
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg, D
Plattenschüttler (Titramax101)	Heidolph Instruments, Schwabach, D
Reinluftbank (Hera safe)	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Waage (XB 2200C)	Precisa Gravimetrics, Dietikon, CH
Wasserbad	Memmert, Schwabach, D
X-cell SureLock© Mini Cell System	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Zentrifuge (Galaxy Mino)	VWR, Darmstadt, D
Zentrifuge (Heraeus Multifuge 3S+, Megafuge 1.0R)	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA

2.4 Software

Zur Berechnung und Darstellung der Ergebnisse wurden die in Tabelle 4 dargestellten Softwareprogramme genutzt.

Tabelle 4. Übersicht über die verwendete Software

Bezeichnung	Hersteller, Ort, Land
1450 MicroBeta Workstation Software	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Microsoft Office 2016	Microsoft, Redmond, WA, USA
Yasara 12.7.16	Yasara Bioscience, Wien, Österreich
Kaluza 5.0	Beckmann Coulter, Krefeld, D
Prism 4.0 und 5.0	Graphpad Software, La Jolla, CA, USA
CXP Analysis	Beckmann Coulter, Krefeld, D
LightCycler Software 1.5.0	Roche Molecular Systems, CA, USA

2.5 Testkits

Tabelle 5 zeigt die im Labor verwendeten Testkits.

Tabelle 5. Übersicht der verwendeten Kits und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller, Ort, Land
FITC Annexin V Apoptose Detektionskit mit 7-AAD	Biolegend, Koblenz, D
RNeasy Mini Plus	Qiagen, Hilden, D
LightCycler Probe Master	Roche Molecular Systems, CA, USA
First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas/ThermoFisher Scientific, St. Leon-Rot, D
FITC BrdU Flow Kit	BD Bioscience, CA, USA

2.6 Zelllinien

Tabelle 6 zeigt die verwendeten Zelllinien, die alle humanen Ursprungs sind.

Tabelle 6. Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Bezugsquelle	Kulturbedingungen
P493-6	EBV/EBNA1- positive B-Zelllinie mit tetracyclinabhängigem c-MYC-Promotor	Arbeitsgruppe Schewe, Universitätsklinikum Kiel (Pajic et al., 2000)	90% RPMI-1640 + 10% h.i. FCS + 1% Pen/Strep
DAUDI	Burkitt-Lymphom, EBV-positiv	DSMZ, Braunschweig, D	90% RPMI-1640 + 10% h.i. FCS + 1% Pen/Strep
RAJI	Burkitt-Lymphom, EBV-positiv, t(8;14)	DSMZ, Braunschweig, D	80% RPMI-1640 + 20% h.i. FCS + 1% Pen/Strep

2.7 Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten therapeutischen Antikörper wurden über die Hausapotheke bezogen. Antikörper für die Durchflusszytometrie wurden bei den jeweiligen Herstellern bestellt (Tabelle 7). Alle Antikörper sind gegen humane Antigene gerichtet.

Tabelle 7. Übersicht der verwendeten monoklonalen Antikörper

Bezeichnung	Antigen	Hersteller
Rituximab, human, IgG1	CD20	Roche, Basel, CH
Obinutuzumab, humanisiert, IgG2	CD20	Roche, Basel, CH
Ofatumumab, human, IgG1	CD20	Genmab, Utrecht, NL
Eculizumab, humanisiert, IgG2	C5-Komplementfaktor	Alexion, New Haven, CT, USA
CD20-FITC, Maus, IgG2a	CD20	Beckmann Coulter, Krefeld, D
CD47-FITC, Maus, IgG1	CD47	eBioscience/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
CD55-FITC, Maus, IgG1	CD55	eBioscience/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
CD59-FITC, Maus, IgG1	CD59	eBioscience/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Alpha-Tubulin (11H10), HRP-konjugiert, Kaninchen, IgG		Cell Signaling Technology, Frankfurt, D
c-myc (9E10), Peroxidase-konjugiert, Maus, IgG1	c-MYC	Merck, Darmstadt, D

2.8 TaqMan-Proben

Die verwendeten TaqMan Proben wurden von Fermentas/ThermoFisher Scientific bezogen (Tabelle 8).

Tabelle 8. Übersicht der verwendeten TaqMan-Proben

Gen	Bezeichnung (Assay ID)	Amplicon-Länge (bp)
MYC	Hs00153408_m1	107
CD47	Hs00179953_m1	102
GAPDH	Hs03929097_g1	58
UBB	Hs00430290_m1	120

3 Methoden

3.1 Kultivierung der Zelllinien

Die hier verwendeten Zelllinien sind Suspensionszellen und wurden bei 95% Luftfeuchtigkeit, 5% CO₂ und 37°C kultiviert. Als Wachstums- und Nährstoffmedium wurde RPMI-1640 mit Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin (100 µg/ml) (Gibco™/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) genutzt, und je nach Zelllinie wurden entweder 10% (P493-6, DAUDI) oder 20% (RAJI) hitzeinaktiviertes FCS (Gibco™/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) beigefügt. Die Behandlung der Zellen erfolgte unter einer sterilen Reinluftbank (Hera Safe; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Es wurden sterile Einweg-Plastikmaterialien benutzt (Sarstedt, Nümbrecht, D).

Die Zellen in den Kulturflaschen wurden, wenn nicht anders beschrieben, wöchentlich zweimal entnommen, um das verbrauchte Medium zu wechseln. Hierbei wurden die Zellen fünf Min. bei 688 x g zentrifugiert, um diese sowohl von toten Zellen als auch von verbrauchtem Medium zu trennen. Die Zellen wurden in frischem Medium aufgenommen und ein kleines Aliquot 1:1 v/v mit Trypanblau angefärbt und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Anschließend wurde die Zelldichte der Kulturen auf 0.4×10^6 vitaler Zellen pro ml eingestellt. Spätestens nach 30 Passagen wurden die Zellen nicht weiter für Versuche verwendet und durch frisch aufgetaute Zellen ersetzt.

P493-6-Zellen können mit Doxycyclin (einem Antibiotikum der Tetracyclin-Gruppe) zum c-MYC-Expressionsarrest gebracht werden. Vor der Verwendung wurden die P493-6-Zellen frisch auf eine Zellkonzentration von 0.4×10^6 Zellen/ml eingestellt und für drei Tage entweder in Tetracyclin-freiem R10-Medium kultiviert (P493-6 MYC^{high}), oder in R10-Medium mit 0.1 µg/ml_Doxycyclin, (P493-6 MYC^{low}).

3.2 Genexpressionsanalysen mit RT-qPCR

Die Genexpressionsstärken wurden mit einer quantitativen reversen Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) bestimmt.

3.2.1 Isolierung der messenger RNA (mRNA)

Die Extraktion der mRNA aus den Zellen erfolgte mit dem „RNeasy Mini Plus“-Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben. Die Zellen (4×10^6) wurden mit 350 μ l RLT-Puffer (99% RLT-Lösung und 1% Mercaptoethanol) lysiert. Dem Lysat wurden 350 μ l 70%iger Ethanol zugeführt und die Suspension mit einer Pipette homogenisiert. Die Probe wurde dann in eine RNeasy Spin-Säule (Qiagen, Hilden, D) überführt und bei 10000 rpm für 15 Sek. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Es wurden 350 μ l RW1-Lösung der Säule hinzugegeben und weitere 15 Sek. bei 10000 rpm zentrifugiert. Wiederum wurde der Überstand verworfen. Damit die später extrahierte Gesamt-RNA nicht durch DNA kontaminiert wird, wurden 10 μ l DNase mit 70 μ l RDD-Puffer der Säule beigegeben und 30 Min. inkubiert. Danach wurden wiederum 350 μ l RW1 Puffer der Säule zugefügt und für 15 Sek. bei 10000 rpm zentrifugiert. Es folgten zwei Waschschrte mit je 500 μ l RPE-Lösung, wobei die Probe bei 10000 rpm für 15 Sek. zentrifugiert wurde. Die mRNA wurde dann im letzten Schritt durch Zugabe von 40 μ l RNA-freien Wassers auf die trockene Säule und anschließender Zentrifugation bei 10000 rpm für eine Minute gewonnen. Die mRNA-Konzentration wurde photometrisch mit einem BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg, D) ermittelt und die Integrität der RNA auf einem Agarosegel überprüft.

3.2.2 cDNA-Synthese

Die gewonnene RNA muss in eine komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden, damit diese durch die PCR amplifiziert werden kann. Hierbei wurden spezifische Oligo-(dT)₁₈-Primer (xc) genutzt, welche selektiv an das 3'-poly(A)-Ende der mRNA binden, um die cDNA-Synthese zu beginnen. Die gewonnene cDNA wurde dann für die quantitative Real-Time TaqMan PCR genutzt. Alle Schritte wurden nach Herstellerangaben (Fermentas/ThermoFisher Scientific, St. Leon-Rot, D) durchgeführt. Für jede Probe wurde das Äquivalent von sowohl 1 μ g mRNA als auch 1 μ l Oligo-(dT)₁₈-Primer hinzugegeben und mit nukleasefreiem Wasser auf insgesamt 11 μ l aufgefüllt. Es wurden dann weiterhin 4 μ l Reaktionspuffer (5 x), 1 μ l RiboLock RNase Inhibitor (20 U/ μ l), 2 μ l dNTP Mix (10 mM) und M-MuLV Reverse Transkriptase (20 U/ μ l) aus dem „First Strand cDNA Synthesis“-Kit (Fermentas/ThermoFisher Scientific, St. Leon-Rot, D) hinzugegeben und bei 37°C für 60 Min. inkubiert. Die Synthese wurde darauffolgend durch die Erhitzung auf 70°C für fünf Min. gestoppt und die Proben anschließend bei -70°C eingefroren.

3.2.3 Quantitative Real-Time TaqMan PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist seit 1983 eine etablierte Methode zum Nachweis bzw. zur Klonierung bestimmter DNA-Sequenzen durch Amplifikation spezifischer DNA-Template-Stränge. Die Methode basiert auf abwechselnden Zyklen von Erhitzung (Denaturierungsphase), Abkühlung (Annealingphase) und Synthesephase. Durch Erhitzung werden die DNA-Doppelstränge in Einzelstränge getrennt. Bei der darauffolgenden Abkühlung verbinden sich komplementäre kurze Sense- und Antisense-Einzelstrangfragmente (sog. Primer) mit den Einzelsträngen und eine DNA-Polymerase elongiert diese mit Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTP) (Bartlett et al., 2003).

Die quantitative Real-Time TaqMan PCR unterscheidet sich von der klassischen PCR durch die Verwendung einer sog. TaqMan Probe und der 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase. Die TaqMan Probe ist ein DNA-Strang, der komplementär zur Ziel-DNA ist. Am 5'-Ende der TaqMan Probe hängt ein kovalent gebundenes Fluorophor und am 3'-Ende ein gebundener Quencher. Die Nähe des Quenchers unterdrückt die Fluoreszenz des Fluorophors. Während der Annealing-Phase verbindet sich die TaqMan-Probe mit der Ziel-DNA und bei der Elongation wird das Fluorophor durch die 5'-3'-Exonukleasefunktion der Taq-Polymerase vom Strang entfernt. Das nun freigewordene Fluorophor kann durch die gewonnene Distanz zum Quencher fluoreszieren (Bustin, 2000).

Die Messungen der Versuche der quantitativen Real-Time TaqMan PCR wurde mit dem LightCycler 480 (Roche Molecular Systems, CA, USA) und 384-Well LightCycler-Platten (Sarstedt, Nümbrecht, D) durchgeführt. Die Versuche wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Jeder Probe wurden 0.5 µl cDNA, 4.5 µl MilliQ-Wasser, 0.5 µl Primer und 4.5 µl LightCycler 480 Probes Master qPCR-Mix (Roche Molecular Systems, CA, USA) hinzugefügt. Die Starttemperatur betrug 95°C und wurde für 10 Minuten aufrechterhalten. Ein Zyklus bestand aus einer Schmelzphase bei 95°C für 10 Sek. und einer Annealing-/Elongationsphase von 50 Sek. bei 60°C. Es wurden 45 Zyklen in einer Messung durchgeführt. Die erhobenen Daten wurde mit der Software LightCycler Software 1.5.0 (Roche Molecular Systems, CA, USA) ausgewertet. Die verwendeten TaqMan-Proben von LifeTechnologies (Fermentas/Thermo Scientific, St. Leon-Rot, D) sind in der Tabelle 8 aufgelistet.

3.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (FACS) ist ein Messverfahren, welches die Analyse von Zellen hinsichtlich ihrer Form, Größe, Anzahl und Struktur durch Anfärben erlaubt (Murphy, 2009). Die Proben werden durch eine Kapillare geleitet, wo sie mit hoher Geschwindigkeit einzeln an einem Laserstrahl vorbeifließen. Laserphotodetektoren registrieren die Vorwärts- und

Seitwärtsstreuung des Lichts und können somit die Zellgröße und Zellgranularität bestimmen. Durch Anfärben mit Fluoreszenzfarbstoffen oder Fluorochrom-markierten Antikörpern lässt sich die Expression von Proteinen in oder auf der Zelle nachweisen. Die Auswertung der Versuche erfolgte mit Hilfe der Software Kaluza (Beckmann Coulter, Krefeld, D). Bei der Verwendung von zelloberflächen-spezifischen Antikörpern kann zudem eine Unterscheidung der Zellen aufgrund der Expression von Oberflächenmarkern wie z.B. der CD20-Expression erfolgen. Die P493-6-Zellen wurden für den Nachweis mit Oberflächenmarkern in einem Gesamtvolumen von 100 μ L PBA aufgenommen und zusammen mit 10 μ L der entsprechenden Nachweisantikörper (Tabelle 7) für 30 – 60 Min. im Dunkeln auf Eis inkubiert. Nach dem Waschen mit 3 mL PBA wurden die Zellen in 500 μ L PBA resuspendiert und deren Fluoreszenzsignal gemessen.

3.4 Western Blot

Um c-MYC-Proteine nachweisen zu können, müssen diese isoliert und von den übrigen Proteinen getrennt werden. Proteine können über ihre molekularen Massen mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt werden. Für die Gele der SDS-PAGE wurde das *Xcell SureLock® Mini Cell System* verwendet. Nach Lyse der Zellen wurden die Proteinproben mit 5 x Probenpuffer verdünnt und bei 95°C für 5 Min. denaturiert. Es folgte eine Zentrifugation der Proben bei 16000 U/Min. und 5 Min. Als Proteinstandard wurden 5 μ l des *Precision Plus Protein™ Standard* auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine wurde bei 100-120 Volt und 1-2 Std. durchgeführt. Zum Nachweis von c-MYC wurde ein an Meerrettichperoxidase konjugierter c-MYC-Antikörper nach Herstellerangaben verwendet. Zur Kontrolle wurde ein Antikörper gegen alpha-Tubulin, ebenfalls an Meerrettichperoxidase konjugiert, genommen. Zur Darstellung der Proteine wurde *SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate* mit dem *ChemiDoc™ XRS+ System* verwendet.

3.5 Aufbereitung von Zellen aus dem peripheren Blut

Venöses Blut wurde von verschiedenen gesunden Spendern nach deren Einverständnis entnommen. Die durchgeführten Experimente wurden von der Ethik-Kommission der Christian-Albrecht-Universität zu Kiel genehmigt (Aktenzeichen: D 557/16).

3.5.1 Gewinnung mononukleärer Zellen

Um die Blutkoagulation zu verhindern, wurden S-Monovetten 7,5 ml LH (Sarstedt, Nümbrecht, D) mit Heparin verwendet. 5 ml des Blutes wurden auf 7,5 ml Ficoll-Paque PLUS (Merck, Darmstadt, D) geschichtet pipettiert und anschließend für 30 Min. bei 2000 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Die mononukleären Zellen (MNC) bilden einen Ring auf der Ficolllösung und wurden dann mithilfe einer 5 ml-Pipette entnommen, in ein 50 ml Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, D) überführt und zweimal mit DPBS (1x) (Gibco™/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) gewaschen. Die MNC wurden dann 30 Sek. mit 45 ml Aqua dest. behandelt, um eventuell verbliebene Erythrozyten zu lysieren, mit 5 ml DPBS (10x) (Gibco™/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) wurde abschließend neutralisiert. Nach dem letzten Waschgang wurden die Zellen in 10 ml DPBS (1x) aufgenommen, gezählt und auf die jeweils benötigte Zellzahl eingestellt.

3.5.2 Gewinnung von Granulozyten

Auch bei der Gewinnung granulozytärer Zellen aus dem venösen Blut muss die Blutkoagulation verhindert werden. Für die Blutabnahme wurden S-Monovetten 7,5 ml LH (Sarstedt, Nümbrecht, D) mit flüssigem Heparin verwendet. Nach der Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll wurde die Schicht am Boden des Röhrchens unterhalb des MNC-Ringes einschließlich der Erythrozyten entnommen. Die gewonnenen Zellen wurden gewaschen und mit Aqua dest. zweimal behandelt, um die Erythrozyten zu lysieren. Es folgte ein letzter Waschschrift. Die Zellen wurden dann in Medium aufgenommen, gezählt und entsprechend der benötigten Zellzahl eingestellt.

3.5.3 Gewinnung von Makrophagen

Die Gewinnung von Makrophagen erfolgte in vier Schritten:

1. Gewinnung von MNC durch einen Ficoll-Gradienten,
2. Isolation der Monozyten aus MNC durch Adhärenz,
3. Differenzierung der Makrophagen aus Monozyten mittels M-CSF,
4. Lösen der Makrophagen von der Plastikoberfläche.

10 ml Blut aus einer Leukozytenreduktionskammer wurden in ein 50 ml Röhrchen überführt und auf insgesamt 40 ml Volumen mit DPBS (1x) ergänzt. Das nun verdünnte Blut wurde auf vier 50 ml Röhrchen verteilt, die mit je 20 ml Ficoll-Paque gefüllt waren. Es folgte eine Zentrifugation bei 2000 rpm für 30 Min. ohne Bremse. Die MNC-Ringe wurden abgenommen, in neue 50 ml Röhrchen überführt, auf 40 ml Volumen mit DPBS (1x) aufgefüllt und bei 5 min

und 1600 rpm mit Bremse zentrifugiert. Diese Waschprozedur wurde zweimal wiederholt und nach jeder beendeten Zentrifugation wurden die Röhrchen zusammengeführt. Es folgte eine Lyse der Erythrozyten mit Aqua dest. und ein letzter Waschschrift. Die gewonnenen MNC wurden in 10 ml DPBS (1x) aufgenommen, gezählt und auf 30×10^6 Zellen mit 6 ml Monocyte-Attachment-Medium (PromoCell, Heidelberg, D) in einer Kulturflasche zur Adhäsion verteilt. Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei 37°C. Anschließend wurde die Kulturflasche mit dem eigenen Medium gespült, das Medium verworfen und zweimalig mit 5 ml PBS gespült. Für die Adhäsion der MNC wurden 6 ml X-Vivo Medium (Biozym, Hessisch Oldendorf, D) hinzugegeben und die Zellen über Nacht bei 37°C inkubiert. Am zweiten Tag wurde der Überstand verworfen, die Kulturflasche mit den nun gewonnenen adhärenen Monozyten zweimalig mit PBS gespült und mit 6 ml X-Vivo Medium, 50 ng/ml M-CSF und 10% hitzeinaktiviertem humanen AB Serum aus Spenderblut ergänzt. Am dritten Tag wurde das verbrauchte Medium erneuert. Am siebten Tag wurden die nun zu M_0 -Makrophagen differenzierten Monozyten für die Experimente verwendet. Um die Makrophagen von den Zellkulturflaschen zu trennen, wurden diese mit 5 ml Dissoziationspuffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, abzentrifugiert und in 5 ml R10-Medium aufgenommen werden. Abschließend wurden die Makrophagen gezählt und auf die benötigte Zellzahl eingestellt.

3.5.4 Aufbereitung von humanem Vollblut

Für die Verwendung von humanem Vollblut wurden S-Monovetten 7,5 ml LH mit Heparin verwendet. Um ein weiteres Gerinnen zu verhindern, wurde Lepirudin (Refludan®) in einer Konzentration von 10 µg/ml hinzugegeben.

3.5.5 Aufbereitung von humanem Serum

Das venöse Blut wurde in S-Monovetten 9 ml Z (Sarstedt, Nümbrecht, D) mit Gerinnungsaktivatoren aufgenommen. Das Blut wurde dann 5 Min. bei Zimmertemperatur gelagert und anschließend für 15 Min. auf Eis gelegt. Darauffolgend wurde das Blut bei 4°C und 2000 rpm für 20 Min. zentrifugiert, um die festen, geronnenen Blutbestandteile vom Serum zu trennen. Das Serum wurde abgenommen und bei -80°C für spätere Versuche eingefroren.

3.6 ⁵¹Chrom-Freisetzungstest

Der ⁵¹Chrom-Freisetzungstest (*chromium release assay*) ist eine etablierte Methode für die Analyse der Zytotoxizität von Effektorzellen sowie des Komplementsystems. Der Methode liegt zugrunde, dass die Zielzellen mit radioaktivem Chrom (⁵¹Cr) markiert werden, welches an intrazytoplasmatische Proteine bindet. Die spontane Freisetzung von radioaktivem Chrom findet nur im geringen Maße statt, diese wird als *Basalrelease* bezeichnet. Durch Zugabe von Effektorzellen bzw. Effektoren werden die Zielzellen lysiert und es kommt zu der Freisetzung des intrazellulären radioaktiven ⁵¹Chroms. Je höher die Lyse, desto mehr radioaktives Chrom kann gemessen werden. Die maximale Radioaktivität wird durch die Freisetzung des kompletten intrazellulären Chroms mit einem Detergens erreicht und entspricht der 100%igen Lyse der Zielzellen. Unter der Annahme, dass jede Zelle die gleiche Menge an ⁵¹Chrom aufnimmt, ergibt sich die prozentuale Lyse der Zielzellen durch die messbare Radioaktivität im Überstand abzüglich des *Basalrelease* in Relation zum Maximalrelease abzüglich des Basalrelease (Abbildung 7). Der gemessene Wert liegt dann zwischen dem basalen und dem maximalen Release.

$$\frac{I_{measured} - I_{basal_release}}{I_{max_Release} - I_{basal_release}} \times 100$$

Abbildung 7. Berechnung der prozentualen Lyserate. $I_{measured}$ = gemessene Strahlung der Probe, $I_{basal_release}$ = gemessene Hintergrundstrahlung, $I_{Max_Release}$ = maximale Strahlung bei Lyse aller ⁵¹Cr-markierten Zellen durch ein Detergens.

3.6.1 Komplementabhängige Zelltoxizität (CDC)

Die Zielzellen wurden gezählt und 0.5×10^6 Zellen pro 96-Well-Zellkulturplatte entnommen. Die Zellen wurden zentrifugiert und vom Medium getrennt und anschließend für zwei Stunden mit 50 µl radioaktivem ⁵¹Chrom inkubiert. Um das nicht aufgenommene ⁵¹Chrom zu entfernen, wurden die Zielzellen dreimal gewaschen und in frischem Medium aufgenommen. Es wurden dann jeweils 50 µl mit je 5000 chromierten Zielzellen in jedes verwendete Well einer 96-Well-Rundbodenplatte pipettiert. Es wurden 50 µl Effektoren (Serum oder Vollblut), 100 µl Zellkulturmedium und 10 µl der gewünschten Antikörperkonzentration hinzugeben. Die Zellkulturplatten wurden dann im Anschluss bei 37°C und 5% CO₂ für drei Stunden im Brutschrank gehalten. Während dieser Inkubationszeit sollten die Antikörper an die jeweiligen Antigene binden, und die Effektoren die Lyse der Zielzellen herbeiführen. Das daraufhin

freigesetzte $^{51}\text{Chrom}$ kann anschließend im Überstand gemessen werden. Bei 2000 rpm wurden die Platten fünf Minuten lang zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0R), um die verbliebenen Zellen am Boden zu konzentrieren. Jeweils 25 μl Überstand wurden aus jedem Well entnommen und in eine 96-Well-Szintillationsmessplatte mit 150 μl Szintillationsmix (beides Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) überführt. Mit einer Top Seal A Folie (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) wurden dann die Platten bedeckt und für 15 Min. Mithilfe eines Orbitalschüttlers (Titramax 101; Heidolph Instruments, Schwabach, D) geschüttelt. Die abschließende Messung und Auswertung der Platten des durch Lyse freigesetzten $^{51}\text{Chroms}$ erfolgte mit dem Szintillationsmessgerät (1450 MicroBeta TriLux; Perkin Elmer, Waltham, MA, USA).

3.6.2 Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC)

Die Zielzellen für die ADCC wurden gezählt und auf die gewünschte Zellzahl eingestellt. Anschließend wurden die Zellen für zwei Stunden mit 50 μl $^{51}\text{Chrom}$ bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die mononukleären bzw. granulozytären Zellen aus dem peripheren Blut wie unter 0 und 3.5.2 beschrieben aufbereitet. Die Zellzahl der MNC wurde auf 4×10^6 und die der Granulozyten auf 8×10^6 Zellen pro ml eingestellt. Es wurden 50 μl dieser Effektorzellsuspension, 100 μl Zellkulturmedium, 10 μl der gewünschten Antikörper und 50 μl der mit $^{51}\text{Chrom}$ markierten Zielzellen pro Well in eine 96-Well-Zellkulturplatte überführt. Die darauffolgenden Schritte sind identisch zu der Methodik der komplementabhängigen Zelltoxizität (Kapitel 3.6.1).

3.7 Antikörperabhängige Phagozytose (ADCP)

Bei den antikörperabhängigen Phagozytoseversuchen sollte in Abhängigkeit von Antikörpern die Phagozytosefähigkeit der Makrophagen für maligne Zellen getestet werden. Die benötigten Makrophagen wurden wie unter 3.5.3 beschrieben generiert und in eine 8-Well Ibidi Objekträgerplatte (Ibidi, Madison, WI, USA) überführt. Eine darauffolgende zweistündige Inkubation sollte gewährleisten, dass die Makrophagen sich am Boden der Platte festsetzen. Es wurden nun die Zielzellen in der jeweiligen gewünschten Zelldichte hinzugegeben. Handelte es sich bei den Zielzellen um P493-6-Zellen, so wurde Doxycyclin in einer Endkonzentration von 0.1 $\mu\text{g/ml}$ hinzugefügt. Darauffolgend wurden die gewünschten Antikörpermengen hinzugegeben und die Platte für zwei Tage bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Nach der Inkubation wurde jedes Well durchmischt, 25 μl entnommen und mit 25 μl Trypanblaulösung vermischt und die Zellzahl der Targetzellen abschließend mit einer

Neubauer-Zählkammer (Paul Marienfeld, Königshofen, D) bestimmt. Die Zählung wurde zweimal wiederholt und der Mittelwert errechnet.

3.8 P493-6 Wachstumstest

C-MYC ist ein Transkriptionsfaktor, der bei Inhibition zu Apoptose oder G₀-Zellzyklusarrest führt. Um das Wachstum von c-MYC-gehemmten und c-MYC-exprimierenden P493-6-Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen mit und ohne Doxycyclin (0.1 µg/ml) in einer Zelldichte von 0.4 x 10⁶ Zellen pro ml in einer 8-Well-Platte mit 4 ml Medium pipettiert. Das Zellmedium wurde während der gesamten Zeit nicht gewechselt oder erneuert. Die P493-6-Zellen wurden dann täglich in einer Neubauer-Zählkammer mit Trypanblau über 13 Tage ausgezählt.

3.9 Apoptosebestimmung mit Annexin V/7-AAD

Zur Unterscheidung von Zellzyklusarrest und Zelltod wurden die Zellen mit FITC-Annexin V/7-AAD gefärbt und im Durchflusszytometer gemessen. Annexin V ist ein kalziumabhängiges Protein, welches sich intrazellulär an der Plasmamembran befindet. Annexin V hat außerdem die Eigenschaft, Phosphatidylserin binden zu können. Bei frühapoptotischen Zellen findet eine Translokation von Phosphatidylserin von der intrazellulären auf die extrazelluläre Seite der Zellmembran statt. Durch eine spezielle Anfärbung mit Fluorchrom-markiertem Annexin V können so frühapoptotische Zellen detektiert werden. Bei nekrotischen Zellen dringt Annexin V unspezifisch in die Zellen ein. Um hier zwischen frühapoptotisch und nekrotisch unterscheiden zu können, wurden den Zellen außerdem mit 7-AAD (7-Amino-Aktinomycin D) (Biolegend, San Diego, CA, USA) inkubiert. 7-AAD bindet an die DNA von nekrotischen Zellen und wird nicht von gesunden, intakten Zellen aufgenommen. Unterschieden wird nun zwischen vitalen Zellen (Annexin V-negativ und 7-AAD-negativ), frühapoptotischen Zellen (Annexin V-positiv und 7AAD-negativ) und nekrotischen Zellen (Annexin V-positiv und 7-AAD-positiv). Die Zielzellen wurden auf eine Zellzahl von 0.7 x 10⁶ Zellen/ml in PBS eingestellt, anschließend 200 µl der Zellsuspension in 5 ml-FACS-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, D) überführt und bei 1800 rpm 3 Min. zentrifugiert. Daraufhin folgten zwei Waschschrte mit DPBS (1x). Die Zellen wurden dann in 100 µl Annexin V-Bindepuffer (Biolegend, San Diego, CA, USA) aufgenommen und je nach Fragestellung wurden 4 µl Annexin V oder/und 7-AAD hinzugefügt. Nach 15-minütiger Inkubation wurden die Zellen gewaschen und in 200 µl Bindepuffer zur Messung im Durchflusszytometer aufgenommen.

3.10 Zellzyklusbestimmung mit BrdU/7-AAD

Bromdesoxyuridin (BrdU) ist ein synthetisches Analogon von Thymidin, welches während der S-Phase des Zellzyklus in DNA eingebaut wird. BrdU wird in besonders hohen Konzentrationen von proliferierenden Zellen assimiliert und kann mit Antikörpern nachgewiesen werden. In Verbindung mit 7-AAD können Zellpopulationen in G₀/G₁, S und G₂/M Zellzyklusphasen eingeteilt werden.

P493-6-Zellen wurden auf eine Zellzahl von 0.4×10^6 Zellen/ml eingestellt. Um MYC^{low} P493-6-Zellen zu erhalten, wurden sie drei Tage mit Doxycyclin inkubiert. Verwendet wurde das FITC BrdU Flow Kit (BD Biosciences, CA, USA). Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

3.11 Homotypische Aggregation

Als homotypische Aggregationen werden Zusammenlagerungen von Zellen der gleichen Zellart bezeichnet (Alduaij et al., 2011). CD20-Antikörper vom Typ-II, wie z.B. Obinutuzumab, können homotypische Aggregationen hervorrufen.

Für den Versuchsaufbau wurden P493-6-Zellen in einer 6-Well-Platte mit 2 ml Zellmedium und einer Zelldichte von 0.4×10^6 Zellen/ml ausgesät. Um MYC^{low} P493-6-Zellen zu erhalten, wurden diese mit 0.1 µg/ml Doxycyclin drei Tage lang behandelt. Nach der Inkubation wurden die Antikörper in einer Konzentration von 250 µg/ml hinzugegeben und nach bestimmten Zeitintervallen (20 Min., 40 Min., 1 Std., 2 Std., 4 Std., 24 Std.) die Zellen unter einem Lichtmikroskop untersucht und fotografiert.

3.12 Auswertung, Darstellung und Statistik

Mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel erfolgte die Auswertung der Rohdaten. Die Daten der TaqMan PCR wurde mit dem Programm LightCycler Software 1.5.0 (Roche Molecular Systems, CA, USA) ausgewertet. Kaluza (Beckmann Coulter, Krefeld, D) wurde für die Auswertung der Daten aus der Durchflusszytometrie benutzt. Die graphische Darstellung und die Berechnung der Statistiken der Daten wurde mit Hilfe von Prism 4.0 und Prism 5.0 (Graphpad Software, La Jolla, CA, USA) erstellt. Die Punkte bzw. die Höhe der Balken stellen den jeweiligen Mittelwert dar, während der Fehler durch den Standardfehler (standard error of mean, SEM) repräsentiert wird. Die Konstruktion der Punkte im Punktdiagramm erfolgte durch Berechnung der nichtlinearen Regressionskurve zu einer Dosis-Wirkungskurve. Die mittleren

effektiven Konzentrationen (EC_{50}) wurden aus den Kurven bestimmt. Ein T-Test und der einfaktorielle oder zweifaktorielle ANOVA mit Post-hoc Analyse (Bonferroni) wurde für die statistische Auswertung herangezogen.

4 Ergebnisse

4.1 Die Zelllinie P493-6 als c-MYC-Modellsystem

Die c-MYC-Expression lässt sich bei P493-6-Zellen mit Doxycyclin unterdrücken (ein sog. „Tet-Off“-System). Aus Gründen der Übersicht werden in den folgenden Passagen die nativen, nicht mit Doxycyclin behandelten P493-6-Zellen mit hoher c-MYC-Expression als P493-6 MYC^{high} bezeichnet. Die P493-6-Zellen mit unterdrückter c-MYC-Expression werden als P493-6 MYC^{low} bezeichnet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden MYC^{high}- und MYC^{low}-P493-6-Zellen hinsichtlich der c-MYC-Expression überprüft und ihre phänotypischen Eigenschaften miteinander verglichen.

4.1.1 c-MYC-Expression

Die RT-PCR ist derzeit eine der sensitivsten etablierten Methoden für die Bestimmung der Genexpression. Um Expressionen vergleichen zu können, müssen diese mit einem konstant exprimierten Gen verglichen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression von c-MYC sowohl in MYC^{low}- als auch in MYC^{high}-P493-6-Zellen mit Hilfe der quantitativen TaqMan PCR untersucht. Diese wurde der Expression von humanem Ubiquitin B (UBB) gegenübergestellt und normiert, da UBB unabhängig von der c-MYC-Regulierung ist und konstant exprimiert wird.

Die Abbildung 8 zeigt die Expression von c-MYC in Doxycyclin-behandelten MYC^{low}- und unbehandelten MYC^{high}-P493-6-Zellen über einen Zeitraum von vier Tagen. Das Medium wurde während dieser Zeit nicht gewechselt, Doxycyclin wurde nur initial zugesetzt. Alle Versuche wurden dreimal durchgeführt, an Tag 4 war es einmal. In MYC^{high}-P493-6-Zellen war die c-MYC-Expression in Relation zu UBB sehr hoch: 371.06% ± 143.48% an Tag 0, 240.65% ± 37.34% an Tag 1, 201.94% ± 37.94% an Tag 2, 208.90% ± 52.81% an Tag 3 und 214.29% an Tag 4 (Abbildung 8A). Die Doxycyclin-behandelten P493-6-Zellen wiesen schon nach einem Tag eine stark verminderte c-MYC-Expression auf (Abbildung 8A), diese betrug 24.22% ± 8.4% im Verhältnis zu der Expression von UBB. In den darauffolgenden Tagen konnte eine leichte Erhöhung der Expression von c-MYC mRNA im Vergleich zu Tag 1 beobachtet werden: 30.49% ± 9.58% an Tag 2, 46.73% ± 19.14% an Tag 3 und 78.69% an Tag 4. Vergleicht man die c-MYC-Expression der MYC^{low}- mit den MYC^{high}-P493-6-Zellen, so sind die Unterschiede bei Tag 1 (p = 0.0025), Tag 2 (p = 0.0085) und Tag 3 (p = 0.0113) signifikant (Abbildung 8B).

Insgesamt konnte also die c-MYC-Expression bei P493-6-Zellen durch Doxycyclinbehandlung schon nach einem Tag signifikant unterdrückt werden. Über die folgenden zwei Tage stieg die c-MYC-Expression leicht an, blieb aber weiterhin deutlich unter der c-MYC-Expression der MYC^{high}-P493-6-Zellen (Abbildung 8B).

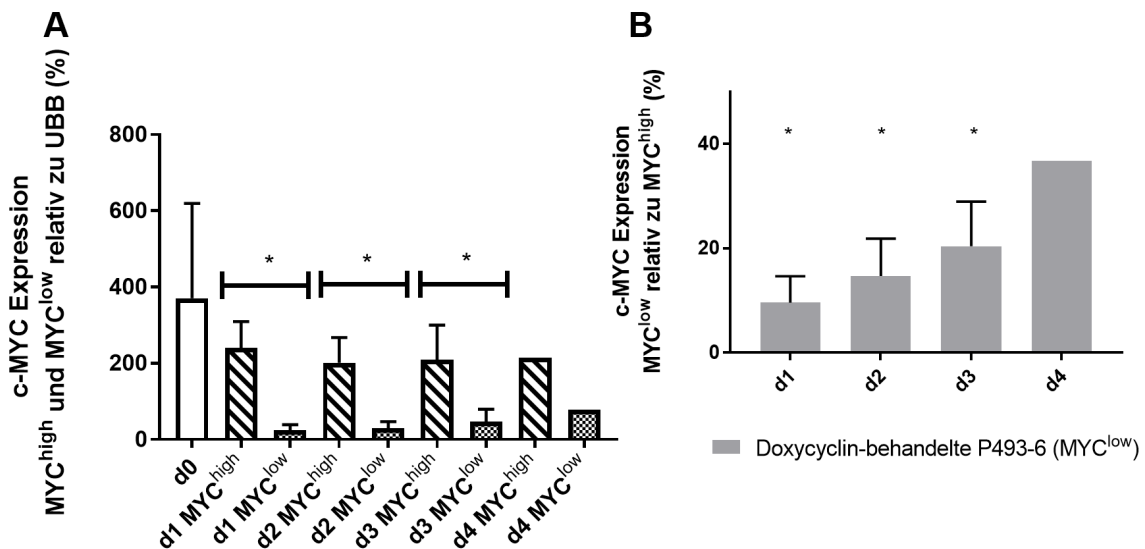


Abbildung 8. Doxycyclin supprimiert effektiv die Expression von c-MYC in P493-6-Zellen. Die Abbildungen zeigen die c-MYC-Expressionsspiegel von Doxycyclin-behandelten (MYC^{low})- und unbehandelten (MYC^{high})-P493-6-Zellen, erhoben mit einer quantitativen TaqMan PCR über 4 Tage (d). MYC^{low}-Zellen wurden mit 0.1 µg/ml Doxycyclin behandelt. **(A)** Dargestellt ist das Expressionsniveau von c-MYC relativ zur Expression von humanem Ubiquitin B (UBB). **(B)** c-MYC Expressionsspiegel von MYC^{low}- Zellen relativ zu MYC^{high}- Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede wurden mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA; *: p < 0.05) bestimmt.

Der Western Blot ist eine etablierte analytisch-technische Methode zur Detektion von Proteinen in homogenisierten Zellen. Abbildung 9 zeigt das Ergebnis des Immunoblots für das c-MYC-Protein nach 24 Std. und nach 48 Std. ohne und mit Doxycyclin-Behandlung. Die MYC^{high}-P493-6-Zellen exprimierten deutlich c-MYC, während bei MYC^{low}- Zellen das c-MYC-Protein weder nach 24 Std. noch nach 48 Std. nachgewiesen werden konnte. Eine Doxycyclin-Behandlung führt somit erfolgreich zur Unterdrückung der c-MYC-Expression.

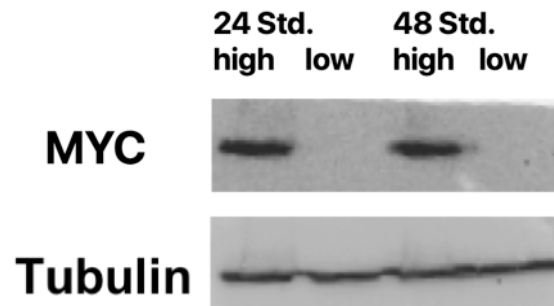


Abbildung 9. Nachweis der c-MYC Suppression durch Doxycyclin in P493-6-Zellen. Die Abbildung zeigt einen Western Blot von Doxycyclin-behandelten P493-6 (MYC^{low}) und unbehandelten P493-6 (MYC^{high}) Zellen nach 24 Std. und 48 Std. Inkubationszeit. Als Expressionskontrolle wurde das Protein Tubulin verwendet.

4.1.2 Immunphänotyp

Immunphänotypische Oberflächenmerkmale (engl. Cluster of Differentiation, CD) sind typischerweise membrangebundene Glykoproteine. Eine etablierte Methode für die Analyse der Oberflächenmarker ist die Immunfluoreszenz.

Abbildung 10 zeigt die Expression der Oberflächenproteine CD20, CD47, CD55 und CD59 von MYC^{high} - und MYC^{low} -P493-6-Zellen. Die Abszissenachse der Histogramme beschreibt die Fluoreszenzintensität (FI) und ist proportional zu den vorhandenen Bindungsstellen (Antigenen). Die Ordinatenachse beschreibt die Anzahl der Ereignisse (Counts) und somit die Anzahl der Zellen. Die Versuche wurden insgesamt dreimal wiederholt.

Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) des B-Zell-spezifischen CD20 Oberflächenmarkers liegt bei 140 Einheiten für die behandelten MYC^{low} -Zellen und bei 48 Einheiten für die unbehandelten MYC^{high} -Zellen. Durch die c-MYC-Reduktion erhöhte sich die CD20-Expression auf die 2.9-fache Menge gegenüber der c-MYC exprimierenden Zellen (n=3).

CD47 ist ein transmembranes Protein. Es bindet membranöse Integrine, Thrombospondin-1 und das Signal-regulierende Protein alpha ($\text{SIRP}\alpha$). CD47 sendet ein „don't eat me“-Signal an das Immunsystem und verhindert somit die Phagozytose. Die CD47-Expression zeigte in der Immunfluoreszenz keinen wesentlichen Unterschied zwischen den MYC^{high} - und MYC^{low} -P493-6-Zellen.

CD55, auch Komplementzerfall beschleunigender Faktor (engl. Complement decay accelerating factor, DAF) genannt, reguliert das Komplementsystem an der Zelloberfläche. Die Expression von CD55 zeigte eine durchschnittliche Fluoreszenzintensität von 42 Einheiten bei den MYC^{high} - und 108 Einheiten bei den MYC^{low} -P493-6-Zellen. Die MYC^{low} -P493-6-Zellen zeigten hier eine 2.5-fache Erhöhung der Expression.

CD59, auch Protectin genannt, hemmt die Bildung des Membranangriffskomplexes (MAC) durch Eingriff in die Komplementkaskade. Die gemessene MFI der MYC^{low}- und MYC^{high}-P493-6-Zellen zeigte keine Unterschiede in der Expression.

Die Inhibition von c-MYC bewirkt also eine Erhöhung der CD20- und CD55-Rezeptordichten an der Zelloberfläche der P493-6-Zellen. Unbeeinflusst hinsichtlich der c-MYC-Expression zeigen sich hingegen die CD47- und CD59-Rezeptordichten.

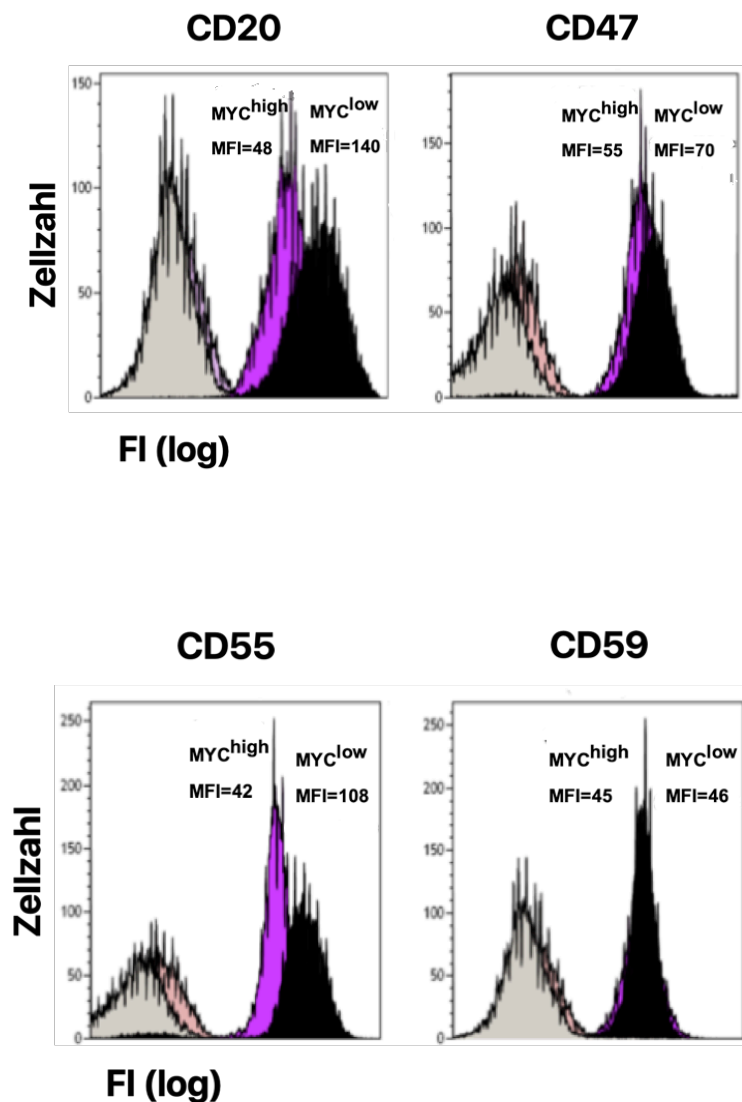


Abbildung 10. Expression der CD20, CD47, CD55 und CD59 Oberflächenmarker bei MYC^{low}- (schwarz) und MYC^{high}-P493-6-Zellen (lila). Gemessen wurde die Fluoreszenzintensität (FI) (dargestellt in der Abzissenachse) gegenüber der Anzahl der Ereignisse (Zellzahl) (dargestellt in der Ordinatenachse). Die Färbung erfolgte mit Fluorochrom-markierten Antikörpern. Die Abbildung zeigt eine repräsentative Messung von insgesamt 3 Messungen. Angegeben sind die MFI als Mittelwert von n=3. Grau, rosa: Isotypkontrollen.

Ein ähnliches Ergebnis bzgl. der CD47-Rezeptordichte zeigte sich auch in der PCR: die mRNA-Expression wies zwischen MYC^{low} - und MYC^{high} -P493-6-Zellen keine signifikanten Unterschiede auf und fiel im Vergleich zu UBB deutlich geringer aus. Am Tag 0 waren es $5.39\% \pm 1.72\%$, am Tag 1 waren es $6.57\% \pm 2.67\%$ bei MYC^{high} und $4.57\% \pm 1.19\%$ bei MYC^{low} , $4.67\% \pm 1.29\%$ MYC^{high} und $5.17\% \pm 1.17\%$ MYC^{low} am Tag 2, am Tag 3 waren es $5.15\% \pm 1.37\%$ MYC^{high} und $5.64\% \pm 1.63\%$ MYC^{low} , und 4.4% MYC^{high} und 6.52% MYC^{low} am Tag 4 (Abbildung 11).

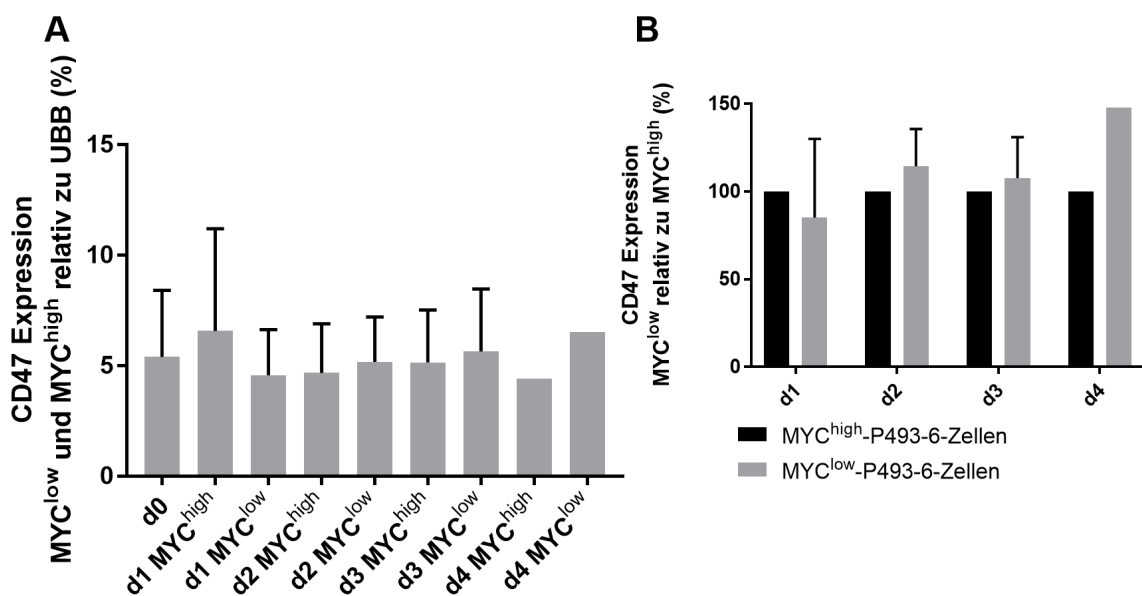


Abbildung 11. Die CD47-Expression ist unabhängig von der c-MYC-Konzentration in P493-6-Zellen. Die Abbildungen zeigen die CD47-Expressionsspiegel von MYC^{low} - und MYC^{high} -P493-6-Zellen erhoben mit einer quantitativen TaqMan PCR. **(A)** Expression relativ zu humanem Ubiquitin (UBB) in %. **(B)** CD47-Expression von MYC^{low} - relativ zu MYC^{high} -P493-6-Zellen (auf 100% gesetzt). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten. Eine zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA; $n=3$; $p < 0.05$) ergab keine signifikanten Unterschiede.

4.1.3 Wachstumskinetik

Pajic et al. konnten 2020 zeigen, dass bei Unterdrückung der c-MYC-Expression P493-6-Zellen in einem G_0/G_1 Zellzyklusstadium arretieren und demnach nicht mehr wachsen. Das Zellwachstum ohne und mit Doxycyclin wurde wie unter 3.8 beschrieben untersucht ($n=6$). Die MYC^{low} - und MYC^{high} - P493-6-Zellen zeigten in ihren Wachstumskurven einen kontinuierlichen

Anstieg der Zellzahl (Abbildung 12). Die MYC^{high}-Zellen erreichten ihre maximale Zellzahl von durchschnittlich 2.42×10^6 Zellen/ml am Tag 5, während die MYC^{low}-P493-6-Zellen ihr Maximum erst an Tag 9 erreichten (nicht in der Abbildung 12 dargestellt). Signifikante Unterschiede zeigten sich ab dem dritten Tag mit 1.99×10^6 (MYC^{high}) und 0.9×10^6 Zellen/ml der MYC^{low}-P493-6-Zellen ($p = 0.0048$). Weitere signifikante Unterschiede konnten an den Tagen 4, 5, und 6 festgestellt werden. Am Tag 7 überschritten sich die Wachstumskurven von MYC^{high}- und MYC^{low}-P493-6-Zellen. Durch Inhibition der c-MYC-Expression wird das Wachstum der P493-6 Zellen verlangsamt.

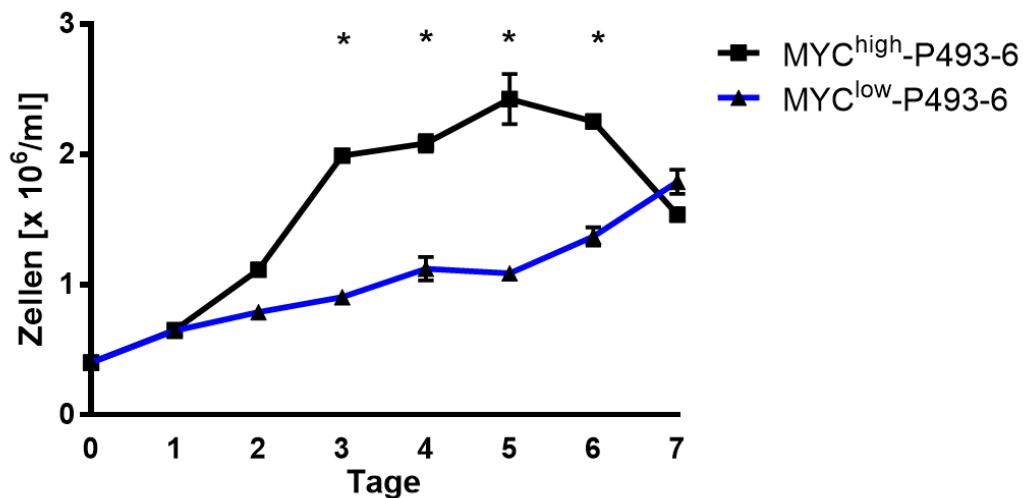


Abbildung 12. Niedrige c-MYC-Expressionen hemmen das Wachstum der P493-6-Zellen. Die Abbildung zeigt die Wachstumskinetik der MYC^{low}- (blaue Kurve) und MYC^{high}- (schwarze Kurve) P493-6-Zellen über einen Zeitraum von 7 Tagen. Das Zellmedium wurde während des gesamten Zeitraums nicht gewechselt und es wurde nach initialer Gabe von $0.1 \mu\text{g/ml}$ Doxycyclin kein weiteres Antibiotikum mehr hinzugefügt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von sechs unabhängigen Experimenten. Signifikante Wachstumsunterschiede zwischen den behandelten und unbehandelten P493-6-Zellen wurden mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA; $n=6$; *: $p < 0.05$) bestimmt.

4.1.4 Zellzyklusdistribution

Zellproliferation und Zellzyklusverteilung sind wichtige Indikatoren für die Zellvitalität. Pajic et al. konnten zeigen, dass die MYC^{low}-P493-6-Zellen in einem G₀/G₁ Zellzyklusstadium arretieren (Pajic et al., 2000). Um die Distribution der Zellzyklusstadien mit den in dieser Arbeit verwendeten P493-6-Zellen zu analysieren, wurde Bromdesoxyuridin (BrdU) wie unter 3.10 beschrieben verwendet. Nach 3 Tagen in Kultur befanden sich durchschnittlich mehr MYC^{low}-P493-6-Zellen im G₀/G₁-Stadium als MYC^{high}-Zellen ($80.6\% \pm 0.86\%$ vs. $63.94\% \pm 2.98\%$).

Dieser Unterschied ist signifikant ($p = 0.0026$). Sowohl in der S- als auch in der G₂-Phase zeigte sich die Anzahl an MYC^{low}-Zellen erniedrigt gegenüber der Anzahl der MYC^{high}-P493-6-Zellen (S-Phase: MYC^{high} 22.41% \pm 1.9%, MYC^{low} 9.87% \pm 1%; G₂-Phase: MYC^{high} 10.74% \pm 1.07%, MYC^{low} 6.1% \pm 0.49%), wobei sich nur für die S-Phase signifikante Unterschiede zeigen ($p = 0.0111$). Abbildung 13 veranschaulicht die Ergebnisse. Die Hemmung der c-MYC-Expression führt zu einem Zellzyklusarrest und somit zur Hemmung der Proliferation.

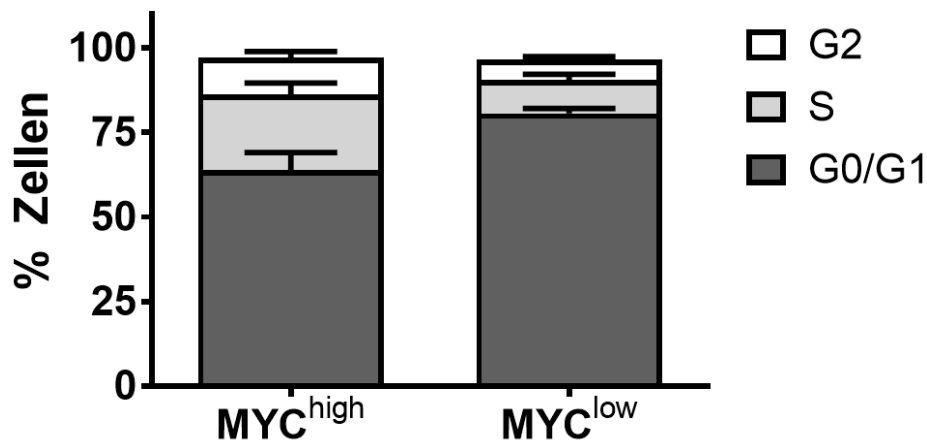


Abbildung 13. Eine niedrige c-MYC-Expression führt bei P493-6-Zellen zu einem G0/G1 Zellzyklusarrest. Die Abbildung zeigt die Distribution der Zellzyklusphasen von MYC^{high}- und MYC^{low}-P493-6-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der Verteilung der Zellen über die drei Zellzyklusphasen G0/G1, S und G2 von drei unabhängigen Experimenten. Die MYC^{high}- und MYC^{low}-P493-6 Zellen wurden initial auf 0.4×10^6 Zellen/ml eingestellt. MYC^{low}-Zellen wurden drei Tage mit Doxycyclin (0.1 μ g/ml) inkubiert. Zum Nachweis der Zellzyklusstadien wurde Bromdesoxyuridin verwendet.

4.2 Einfluss der c-MYC-Expression auf CD20-Antikörper vermittelte Effekte

Zytotoxizitäts- und Phagozytoseversuche wurden durchgeführt, um die Lyse-Effekte der CD20-Antikörper auf MYC^{low}- und MYC^{high}-P493-6-Zellen zu untersuchen. Die Versuche wurden mit verschiedenen Effektoren durchgeführt: mononukleäre oder granulozytäre Zellen, Komplementproteine im Serum und einer Kombination der beiden (Vollblut), sowie Makrophagen.

4.2.1 Homotypische Aggregation

Die Induktion von homotypischen Aggregationen ist eine Eigenschaft der CD20-Antikörper vom Typ-II und durch die Zelladhäsion der B-Zellen untereinander charakterisiert. Zur Untersuchung des Einflusses von c-MYC auf die homotypische Aggregation wurden P493-6-Zellen, wie unter 3.11 beschrieben, vorbereitet. Abbildung 14 zeigt einen Auszug der Ergebnisse. Schon nach 40 Minuten konnte bei den P493-6-Zellen, die mit Obinutuzumab (Typ-II-Antikörper) behandelt worden waren, eine Aggregation festgestellt werden. Die Aggregation der MYC^{low}-P493-6-Zellen hob sich visuell deutlicher ab verglichen mit den MYC^{high}-P493-6-Zellen: sie zeigte sich in Form einzelner, größerer Konglomerate. P493-6-Zellen, welche mit Rituximab behandelt worden waren, zeigten erst nach zwei Stunden homotypische Aggregationen. Auch hier konnte visuell ein Unterschied der MYC^{low}- zu den MYC^{high}-P493-6-Zellen festgestellt werden: die MYC^{low}-P493-6 Zellen wiesen eine höhere Zelldichte in der Aggregation auf. Die Negativkontrollen der MYC^{low}- und MYC^{high}-P493-6-Zellen ohne Antikörper verblieben auch nach 4 Stunden aggregationslos.

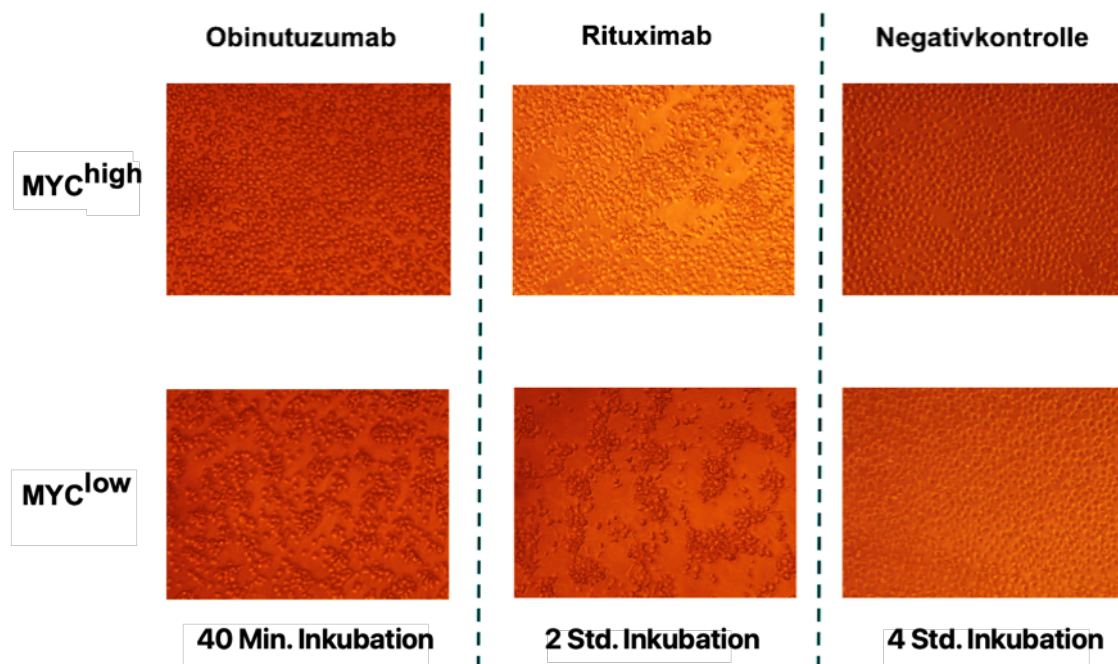


Abbildung 14. Unter niedriger c-MYC-Expression zeigen sich homotypische Aggregationen von Obinutuzumab- und Rituximab-behandelten P493-6-Zellen. Die Abbildung zeigt die homotypischen Aggregationen von MYC^{high}- und MYC^{low}-P493-6-Zellen unter Behandlung mit Obinutuzumab und Rituximab (Antikörperkonzentrationen 250 µg/ml). Die Negativkontrolle wurde nicht mit Antikörpern behandelt. Insgesamt lassen sich mit beiden CD20-Ak sowohl bei MYC^{high} als auch bei MYC^{low} Aggregationen feststellen. MYC^{low}-P493-6-Zellen aggregierten generell stärker als die MYC^{high}-P493-6-Zellen.

4.2.2 Direkte Zytotoxizität

Zur Untersuchung, ob die c-MYC-Expression in den B-Zellen Einfluss nimmt auf die Sensitivität gegenüber einer direkten zytotoxischen Wirkung von CD20-Antikörpern, wurden MYC^{low}- und MYC^{high}-P493-6-Zellen mit den Antikörpern 1 Std. inkubiert und durchflusszytometrische Zellvitalitätsmessungen nach Färbung mit FITC-Annexin V/7-AAD durchgeführt. Exemplarisch ist das Ergebnis der Messung nach Rituximab-Behandlung als Punktwolkenhistogramm in Abbildung 15 dargestellt. Die Histogramme sind in vier Quadranten eingeteilt. Der untere linke Quadrant (grüne Punkte) zeigt die Verteilung der vitalen Zellen, während der obere rechte Quadrant (rot) die Verteilung der spätapoptotischen/nekrotischen und der untere rechte Quadrant die Verteilung der apoptotischen Zellen darstellt.

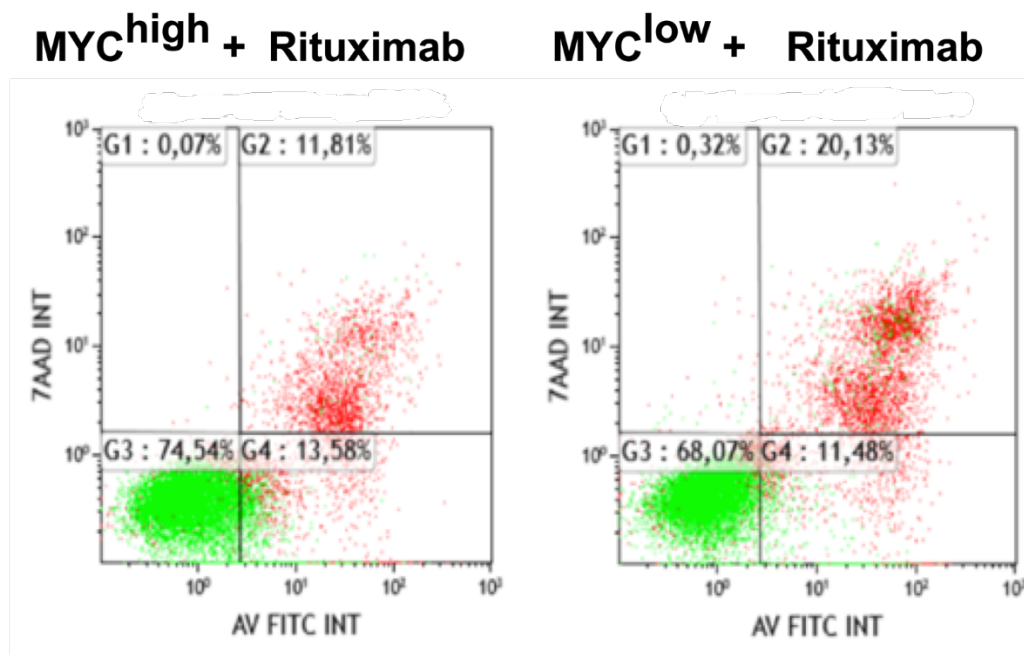


Abbildung 15. Vitalität der MYC^{high}- und MYC^{low}-P493-6-Zellen unter Behandlung mit Rituximab. MYC^{low} Zellen wurden vor dem Versuchsansatz drei Tage mit Doxycyclin (0.1 µg/ml) inkubiert. Die Rituximab-Konzentration betrug 50 µg/ml, die Inkubationszeit 1 Stunde. Der untere linke Quadrant (grüne Punkte) repräsentiert die vitalen Zellen, während der obere rechte Quadrant (rot) die spätapoptotischen/nekrotischen und der untere rechte Quadrant die apoptotischen Zellen darstellt.

Abbildung 16 zeigt eine zusammenfassende Darstellung der durchflusszytometrischen FITC-Annexin V/7-AAD Messungen von MYC^{low}- und MYC^{high}-P493-6-Zellen unter Behandlung mit den Antikörpern Rituximab, Ofatumumab und Obinutuzumab. Der EGFR-Antikörper

Cetuximab wurde bei den hier beschriebenen Versuchen als Kontrollantikörper (Negativkontrolle) genutzt. Die meisten Zellen waren nach der einstündigen Inkubation mit Cetuximab lebendig (MYC^{high} 80.64% ± 1.27%; MYC^{low} 76.16% ± 2.35%). Die Anzahl der nekrotischen Zellen belief sich bei den MYC^{high} auf 11.78% ± 0.29% und bei den MYC^{low}-Zellen auf 16.13% ± 1.35%. Apoptotische Zellen wiesen den geringsten Anteil auf mit 7.45% ± 1.21% bei den MYC^{high}- und 7.47% ± 1.08% bei den MYC^{low}-P493-6 Zellen. Die Unterschiede zwischen MYC^{low}-und MYC^{high}-Zellen zeigten keine Signifikanz (n=3). Auch nach Rituximab-Behandlung waren die meisten Zellen vital (MYC^{high} 72.27% ± 2.12%; MYC^{low} 61.31% ± 4.73%), während die Anzahl der nekrotischen Zellen höher als die der apoptotischen Zellen ausfiel (MYC^{high} 15.6% ± 1.93%; MYC^{low} 22.12% ± 1.53% vs. MYC^{high} 11.48% ± 2.35%; MYC^{low} 16.2% ± 3.29%). Die Unterschiede wiesen keine Signifikanz auf. Nach Ofatumumab-Behandlung ergab sich ein ähnliches Verteilungsmuster wie bei Rituximab und keine signifikanten Unterschiede zwischen MYC^{high} und MYC^{low} Zellen. Der Hauptanteil der Zellen war vital (MYC^{high} 82.42% ± 1.93%; MYC^{low} 70.27% ± 6.02%). Die Anzahl der nekrotischen Zellen war auch hier höher als die der apoptotischen Zellen (MYC^{high} 11.78% ± 1.15%; MYC^{low} 16.64% ± 2.8% vs. MYC^{high} 5.52% ± 0.75%; MYC^{low} 13.14% ± 4.48%). Die Anzahl der vitalen Zellen bei Obinutuzumab, dem einzigen Typ-II-Antikörper, waren ähnlich hoch wie bei den anderen Antikörpern (MYC^{high} 79.79% ± 0.83%; MYC^{low} 55.94% ± 5.66%), allerdings konnte ein signifikanter Unterschied zwischen MYC^{high} und MYC^{low} Zellen festgestellt werden (p = 0.0078). Auch die Menge der nekrotischen Zellen fiel hier höher aus die der apoptotischen Zellen (MYC^{high} 12.38% ± 1.34%; MYC^{low} 26.67% ± 3.56% vs. MYC^{high} 7.4% ± 1.61%; MYC^{low} 16.46% ± 2.02%). Dies ist vereinbar mit der Eigenschaft von Obinutuzumab, als Typ II-Ak den direkten Zelltod über Fab zu induzieren.

Zusammenfassend hat die Behandlung mit verschiedenen CD20-Antikörpern nur einen geringen Einfluss auf die Vitalität der P493-6-Zellen, sowohl mit hoher als auch mit niedriger MYC-Expression, die meisten P493-6 Zellen sind vital. Eine Ausnahme bildet die Behandlung mit Obinutuzumab, welche quantitativ zu einer höheren Anzahl von nekrotischen Zellen führte. Dies steht im Einklang mit dem Charakteristikum von Obinutuzumab, den direkten Zelltod induzieren zu können.

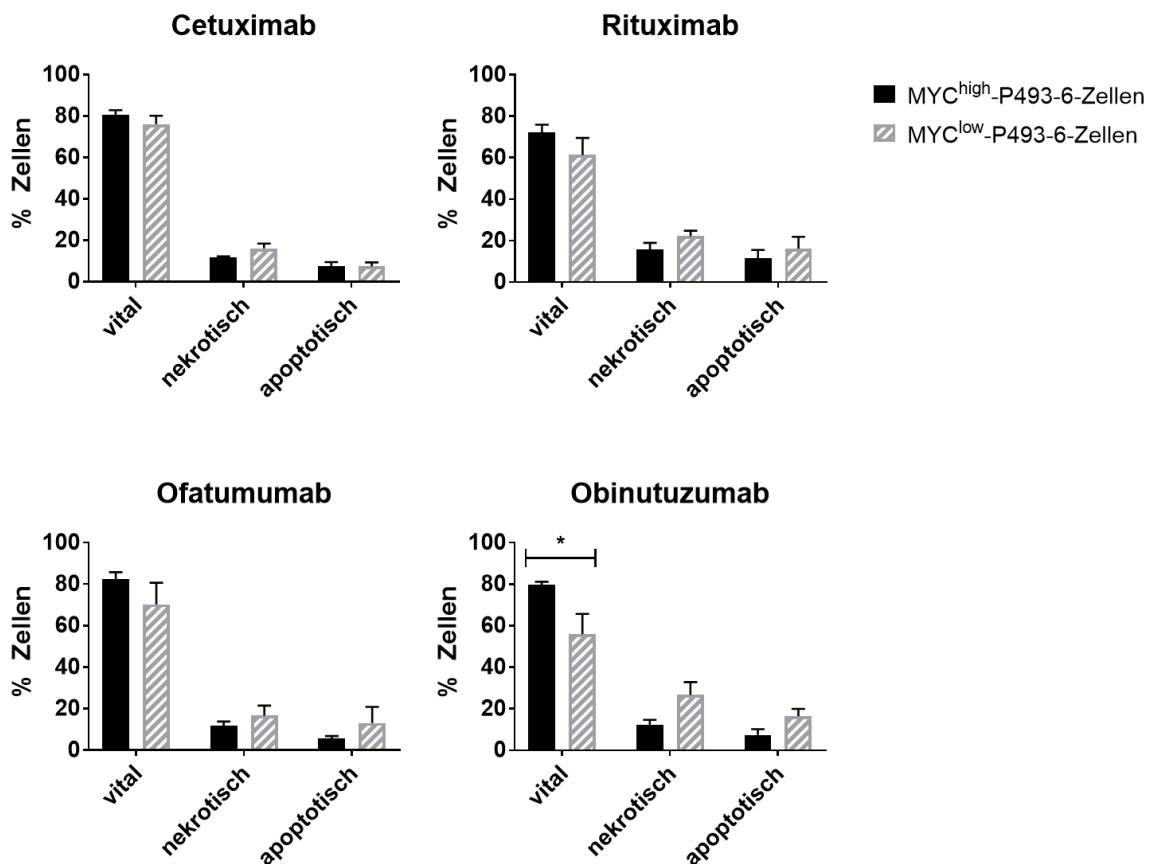


Abbildung 16. Vitalitäten von P493-6 MYC^{high}- und MYC^{low}-Zellen nach Inkubation mit CD20-Antikörpern. Die MYC^{high}- und MYC^{low}-P493-6 Zellen wurden initial auf 0.4×10^6 Zellen/ml eingestellt und die Antikörper für eine Stunde in einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ zugegeben. Zusätzlich wurden die MYC^{low}-Zellen vorab für 3 Tage mit Doxycyclin (0.1 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert. Der EGFR-Antikörper Cetuximab diente als Negativkontrolle. Die Ergebnisse der FACS-Messungen sind nach vitalen, nekrotischen und apoptotischen Zellen eingeteilt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils drei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede wurden mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA; *: $p < 0.05$) bestimmt.

4.2.3 Komplementvermittelte Zytotoxizität

Das Serum enthält weder immunkompetente Zellen noch Gerinnungsfaktoren. Es besteht aus Proteinen (u.a. Proteine des Komplementsystems), Elektrolyten, Antikörpern, Hormonen und exogenen Substanzen (z.B. Medikamente). Effekte, die durch Nutzung von Serum als Effektor entstehen, können demnach nicht durch Immunzellen hervorgerufen worden sein, sondern durch die vorhandenen Bestandteile im Serum.

Die Zytotoxizitätsanalyse wurde wie unter 3.6.1 beschrieben durchgeführt und dreimal wiederholt. Die Abbildung 17 zeigt die Resultate mit den CD20-Antikörpern Rituximab, Ofatumumab und Obinutuzumab. Bei allen Antikörpern wiesen die MYC^{low}-P493-6-Zellen im Vergleich zu den MYC^{high}-P493-6-Zellen eine erhöhte Lyserate auf. Signifikante Unterschiede fanden sich im CDC-Versuch mit Rituximab und Obinutuzumab, insbesondere mit höheren Ak-Konzentrationen. Mit der maximalen Rituximabkonzentration wiesen MYC^{low}-P493-6 Zellen eine durchschnittliche Lyserate von $41.22\% \pm 11.15\%$ auf, die Lyserate der MYC^{high}-P493-6 Zellen betrug $18.99\% \pm 9.47\%$. Die Differenz betrug durchschnittlich 22.23% und war signifikant ($p = 0.0033$).

Mit Ofatumumab konnten hohe Lyseraten sowohl bei MYC^{low}- als auch bei MYC^{high}-P493-6 Zellen erreicht werden (Ak-Konz. $50 \mu\text{g/ml}$: MYC^{high} $45.86\% \pm 5.43\%$, MYC^{low} $51.99\% \pm 5.16\%$), allerdings konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Die CDC mit Obinutuzumab wies ein ähnliches signifikantes Ergebnis in hohen Ak-Konzentrationen auf verglichen mit Rituximab (Ak-Konz. $50 \mu\text{g/ml}$: MYC^{high} $28.91\% \pm 7.74\%$, MYC^{low} $47.78\% \pm 6.23\%$, $p = 0.0225$). Die Differenz zwischen MYC^{low} und MYC^{high} Lyseraten von 18.87% lagen mit Obinutuzumab etwas niedriger als mit Rituximab.

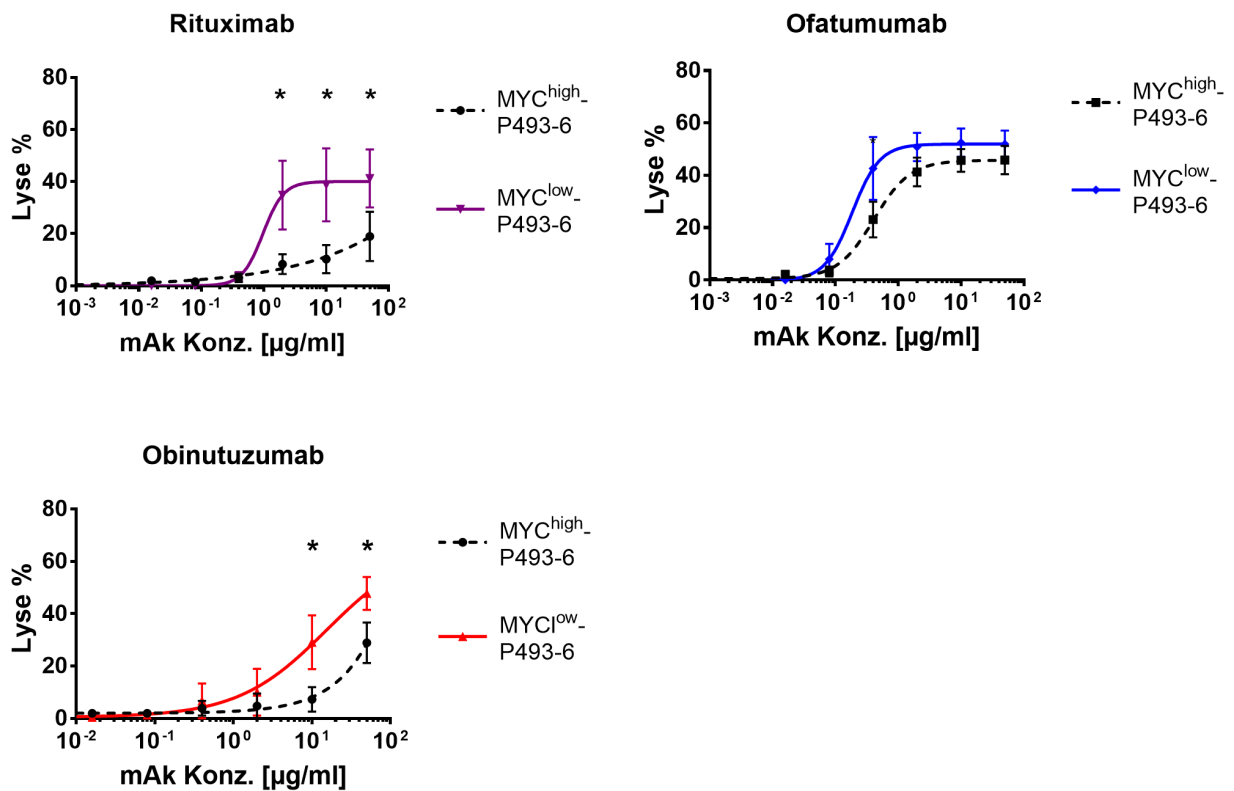


Abbildung 17. Niedrige c-MYC-Expressionen erhöhen die komplementvermittelte Zytotoxizität der CD20-Antikörper gegenüber P493-6-Zellen. Die Abbildungen zeigen die Ergebnisse der Zytotoxizitätsversuche mit MYC^{low}- und MYC^{high}-P493-6-Zellen mit Serum im Chromfreisetzungstest. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede der komplementvermittelten Zytotoxizitäten zwischen MYC^{high}- und MYC^{low}-P493-6-Zellen wurden mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA; n=3; *: p < 0.05) bestimmt.

4.2.4 Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität mit mononukleären Zellen

Mononukleäre Zellen (MNC) sind Zellen, die einen runden Nukleus haben. Darunter fallen Lymphozyten, NK-Zellen und Monozyten. Diese Zellen wurden wie unter 3.5.1 beschrieben gewonnen und die ADCC-Versuche sind fünfmal wiederholt worden. Die Quantifizierung der Effizienz der Antikörper, gemessen an den maximalen und minimalen Lyseraten, wurde durch Verdünnungsreihen der Antikörper ermittelt (10 μ g/ml, 2 μ g/ml, 0.4 μ g/ml, 0.08 μ g/ml, 0.16 \times 10⁻¹, 0.32 \times 10⁻² μ g/ml).

Im Chromfreisetzungstest konnten bei keinem der CD20-Antikörper signifikante Unterschiede zwischen MYC^{low}- und MYC^{high}-P493-6-Zellen sowohl bzgl. der EC50-Werte als auch bzgl. der maximalen Lyse ermittelt werden (Abbildung 18). Bezüglich der erreichten Lyseraten unterscheiden sich jedoch die Antikörper signifikant voneinander. Mit Obinutuzumab, in

Übereinstimmung mit seiner Eigenschaft als Typ-II-Antikörper, zeigte sich ein höheres zytotoxisches Potential als mit Ofatumumab oder Rituximab (Ak-Konz. 10 µg/ml: MYC^{high} 51.62% ± 5.2%, MYC^{low} 52.13% ± 1.76%).

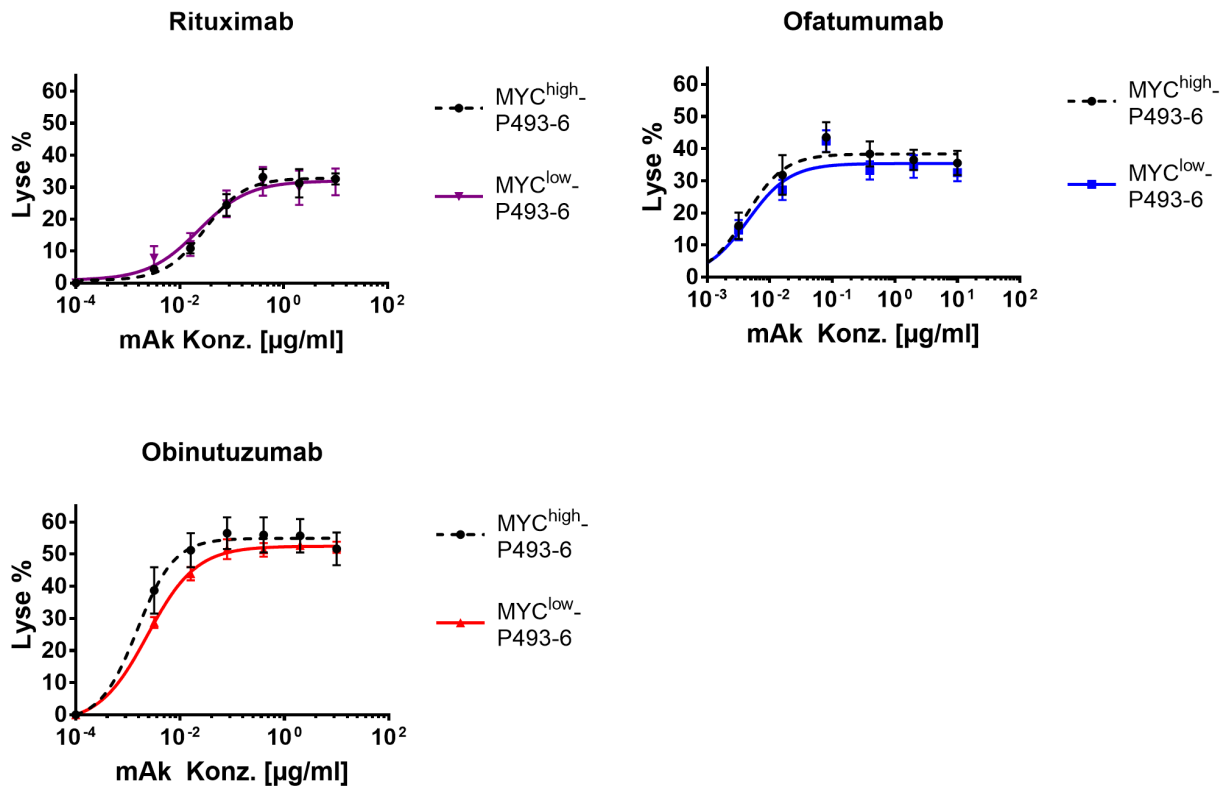


Abbildung 18. Die c-MYC-Expression hat keinen Einfluss auf die MNC-vermittelte Zytotoxizität gegenüber P493-6-Zellen unter der Behandlung mit CD20-mAk. Die Abbildungen zeigen die Lyseraten von MYC^{low}- und MYC^{high}-P493-6-Zellen im Chromfreisetzungstest in Abhängigkeit der CD20-Antikörper Rituximab, Ofatumumab und Obinutuzumab. Die Effektor zu Target-Ratio (E:T-Ratio, MNC zu P493-6) betrug. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von fünf unabhängigen Experimenten. Unterschiede in den Lyseraten zwischen MYC^{high}- und MYC^{low}-P493-6-Zellen wurden mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) auf ihre Signifikanz ($p < 0.05$) geprüft.

4.2.5 Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität mit Granulozyten

Granulozyten gehören zu den weißen Blutzellen und werden aufgrund ihrer Form auch polymorphnukleäre Leukozyten (PMN) genannt. Im Blut existieren drei Typen von Granulozyten: Basophile, Neutrophile und Eosinophile.

Um die Aktivität der Granulozyten in der ADCC zu untersuchen, mussten die Granulozyten, wie unter 3.5.2 beschrieben, gewonnen werden. Die Chromfreisetzungsversuche wurden dreimal wiederholt.

Die Abbildung 19 zeigt die Ergebnisse mit Granulozyten und den CD20-Antikörpern Rituximab, Ofatumumab und Obinutuzumab. Die maximale Lyserate bei allen drei CD20-Antikörpern lag bei durchschnittlich 4-6% und zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen MYC^{low}- oder MYC^{high}-P493-6-Zellen. Granulozyten haben mit CD20-Antikörpern vom IgG-Isotyp keinen oder bestenfalls einen nur sehr geringen Einfluss auf die Lyse von P493-6-Zellen.

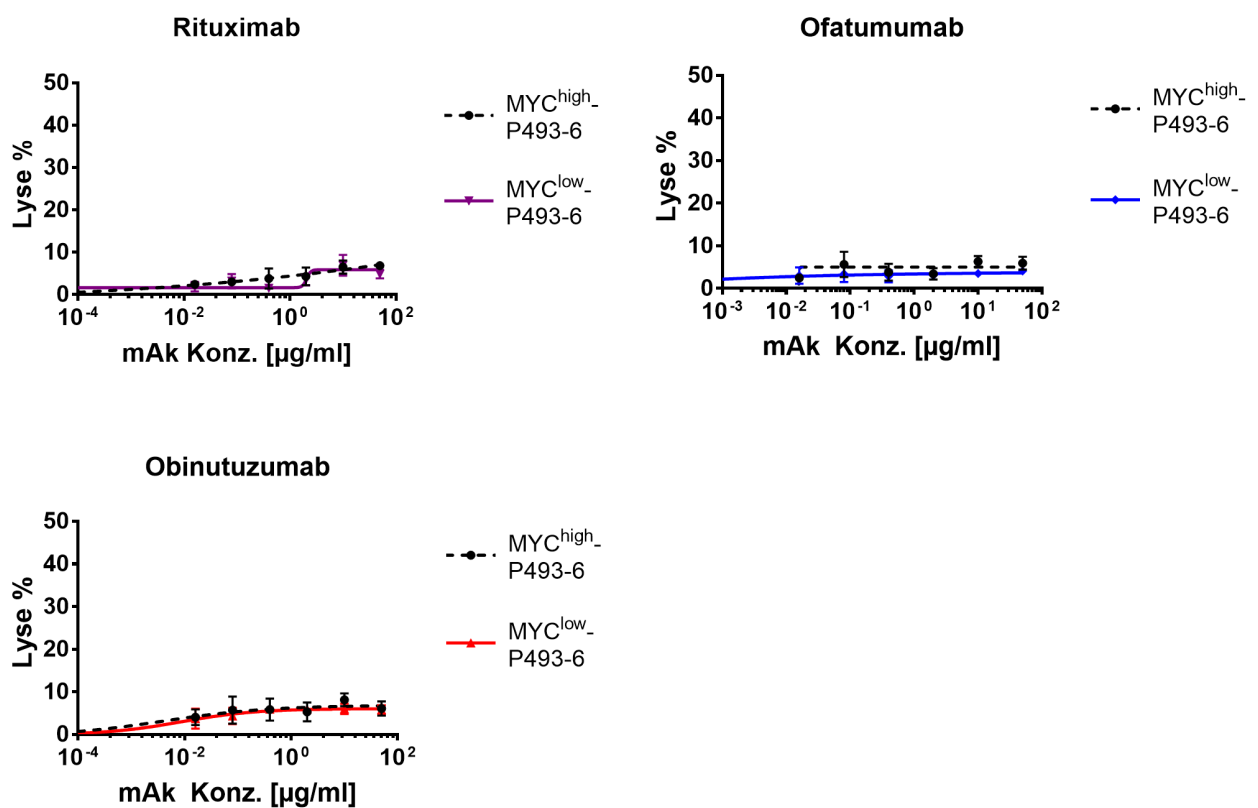


Abbildung 19. Granulozytäre Zellen haben mit CD20-IgG-Antikörpern keinen zytotoxischen Effekt auf P493-6-Zellen. Die Abbildungen zeigen die Lyseraten von MYC^{low}- und MYC^{high}-P493-6-Zellen im Chromfreisetzungstest in Abhängigkeit der CD20-Antikörper Rituximab, Ofatumumab und Obinutuzumab. Die E:T-Ratio betrug. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten. Unterschiede in den Lyseraten zwischen MYC^{high}- und MYC^{low}-P493-6-Zellen wurden mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) auf ihre Signifikanz ($p < 0.05$) geprüft.

4.2.6 Zytotoxizitätstests mit Vollblut

Vollblut enthält unter anderem mononukleäre und granulozytäre Zellen sowie Komplementproteine. Die Abbildung 20 zeigt die Ergebnisse der Zytotoxizitätsversuche mit MYC^{low} - und MYC^{high} -P493-6 als Zielzellen und mit Vollblut und den drei CD20-Antikörpern Rituximab, Ofatumumab und Obinutuzumab. Die Versuche wurden fünffach durchgeführt. Die Lyseraten mit den höchsten Antikörperkonzentrationen sind in Tabelle 9 zusammengestellt.

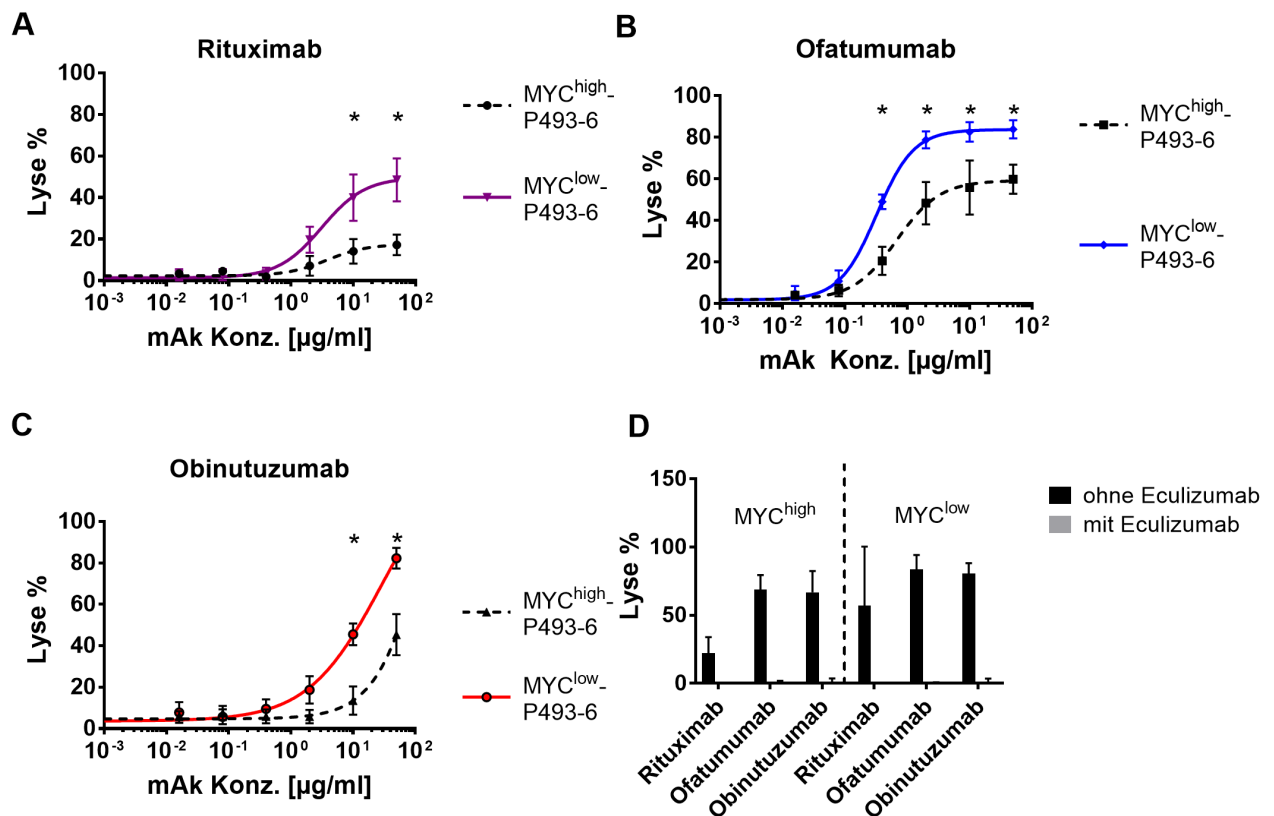


Abbildung 20. CD20-Antikörper zeigen zusammen mit Vollblut höhere zytotoxische Effekte auf P493-6-Zellen mit niedriger c-MYC-Expression als auf P493-6-Zellen mit hoher c-MYC-Expression. Die Abbildungen zeigen die Lyseraten von MYC^{low} - und MYC^{high} -P493-6-Zellen mit den CD20-Antikörpern (A) Rituximab, (B) Ofatumumab und (C) Obinutuzumab in unterschiedlichen Konzentrationen. (D) Lyse der Zellen mit allen drei CD20-Antikörpern bei 50 $\mu\text{g/ml}$ in Abwesenheit (schwarze Balken) und in Gegenwart (graue Balken) des mAk Eculizumab. Eculizumab blockiert die Komplementkaskade. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von fünf unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede wurden mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA; *: $p < 0.05$) bestimmt.

Tabelle 9. Lyseraten von MYC^{high}- und MYC^{low}-P493-6-Zellen mit Vollblut in Abhängigkeit von CD20-Antikörpern. Angegeben sind die Lyseraten für Rituximab, Ofatumumab und Obinutuzumab bei einer Konzentration von 50 µg/ml. Angegeben sind die Mittelwerte von 5 Experimenten mit der Standardabweichung (SEM).

CD20-ANTIKÖRPER	LYSERATE MYC ^{HIGH} -P493-6	LYSERATE MYC ^{LOW} -P493-6
RITUXIMAB	17.19% ± 4.97%	48.56% ± 10.36%
OFATUMUMAB	59.89% ± 7.00%	83.91% ± 4.33%
OBINUTUZUMAB	45.35% ± 9.93%	82.32% ± 5.03%

Mit allen drei CD20-Antikörpern konnten gute Lyseraten erzielt werden, die bei MYC^{low}-P493-6-Zellen im Vergleich zu den MYC^{high}-P493-6-Zellen in allen Fällen signifikant gesteigert werden konnten (Abbildung 20 und Tabelle 9). Die Lyseraten mit Rituximab fielen im Vergleich zu den anderen beiden Antikörpern am niedrigsten aus. Die Unterschiede zwischen MYC^{low} und MYC^{high} waren sowohl bei einer Antikörperkonzentration von 50 µg/ml als auch 10 µg/ml signifikant ($p < 0.0001$). Ofatumumab konnte mit 50 µg/ml die höchsten Lyseraten vorweisen. Signifikante Unterschiede zeigten sich bei den Antikörperkonzentrationen von 50 µg/ml ($p = 0.001$), 10 µg/ml ($p = 0.002$), 2 µg/ml ($p < 0.0001$) und 0.4 µg/ml ($p < 0.0001$). Die Lyseraten mit Obinutuzumab waren höher als die mit Rituximab. Die Lyseraten von MYC^{low}-P493-6-Zellen waren sowohl mit Ofatumumab als auch mit Obinutuzumab ähnlich hoch, mehr als 80%. Allerdings fiel die Differenz der Lyserate zwischen MYC^{low}- und MYC^{high}-Zellen unterschiedlich aus: 36.97% mit Obinutuzumab und 24.02% mit Ofatumumab.

Die Effekte der Lyse mit Vollblut können auf CDC und auf ADCC beruhen. Um den Anteil der Lyse durch CDC zu zeigen, wurde Eculizumab, ein C5-Antikörper, zu der maximalen Konzentration der drei CD20-Antikörper zugegeben (Abbildung 20D). Durch die Bindung an C5 und dessen Inaktivierung verhindert Eculizumab die Komplementkaskade. In Anwesenheit von Eculizumab (10 µg/ml) konnte keine Lyse nachgewiesen werden, somit sind die Zytotoxizitätseffekte mit Vollblut komplett auf CDC und nicht auf ADCC zurückzuführen.

4.2.7 Antikörperabhängige Phagozytose

Makrophagen sind wesentlich bei der Tumorbeseitigung beteiligt. Sie sind fähig, maligne Zellen zu phagozytieren und somit zu zerstören. Der Phagozytoseversuch soll untersuchen, ob Makrophagen im Beisein von Rituximab P493-6-Zellen phagozytieren können und ob c-MYC hierbei eine Rolle spielt. Alle Versuche wurden fünfmal wiederholt und wie in 3.7 beschrieben durchgeführt.

Die Versuche wurden sowohl in Anwesenheit von Makrophagen als auch - als Negativkontrolle - in deren Abwesenheit durchgeführt. Um Effekte des Fc-Fragments der Antikörper ausschließen zu können, wurden zwei verschiedene Negativkontrollen durchgeführt: 1) in Abwesenheit von Antikörpern und 2) durch Zugabe von Cetuximab, ein nichtbindender EGFR-Antikörper.

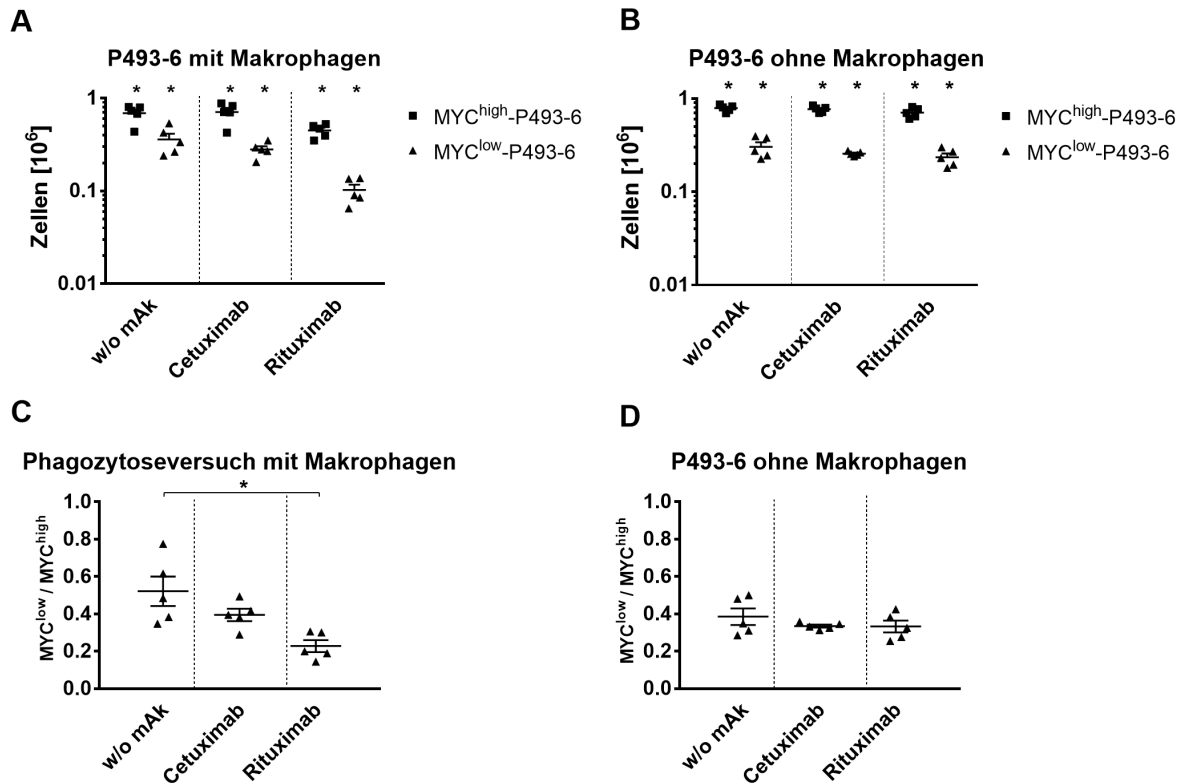


Abbildung 21. Eine niedrige c-MYC-Expression erhöht die Sensitivität von P493-6-Zellen gegenüber Rituximab-vermittelter Phagozytose. Initial wurden 0.1×10^6 P493-6 MYC^{high} - und MYC^{low} -Zellen ausgesät und 0.05×10^6 Makrophagen pro Well hinzugegeben (E/T-Ratio 0.5). Cetuximab und Rituximab wurden in einer Konzentration von $50 \mu\text{g/ml}$ hinzugefügt. Die Auszählung erfolgte nach zwei Tagen. Die Abbildung zeigt die Zahl der vitalen Zellen in Anwesenheit (A) und Abwesenheit (B) von Makrophagen. In (C) und (D) ist jeweils das Verhältnis von MYC^{low} - zu MYC^{high} -P493-6-Zellen dargestellt. MYC^{low} -Zellen weisen generell eine geringere Zellzahl als MYC^{high} auf. Signifikante Unterschiede wurden mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA; $n=5$ *: $p < 0.05$) bestimmt, wobei die Zellzahlen zwischen den MYC^{high} - und MYC^{low} -Zellen verglichen wurden.

Generell wurde sowohl in Anwesenheit als auch bei Abwesenheit von Makrophagen nach zwei Tagen eine signifikant geringere Zellzahl von MYC^{low} - im Vergleich zu MYC^{high} -P493-6-Zellen gezählt (Abbildung 21). Dies betraf sowohl die Zellen im Versuchsansatz mit Rituximab, als auch die beiden Negativkontrollen ohne Antikörper und mit dem irrelevanten Antikörper

Cetuximab). Auffällig ist die deutlich geringere Zellzahl der Rituximab-behandelten MYC^{high}- und MYC^{low}-Zellen im Beisein von Makrophagen (MYC^{high} $0.45 \pm 0.07 \times 10^6$, MYC^{low} $0.1 \pm 0.03 \times 10^6$) im Vergleich zu den Negativkontrollen (Zellzahl ohne Ak: MYC^{high} $0.69 \times 10^6 \pm 0.15$, MYC^{low} $0.36 \times 10^6 \pm 0.12$; Zellzahl mit Cetuximab: MYC^{high} $0.71 \times 10^6 \pm 0.17$, MYC^{low} $0.28 \times 10^6 \pm 0.05$) (Abbildung 21A). Dieser Unterschied zeigte sich nicht bei Abwesenheit der Makrophagen (Abbildung 21B).

Im Beisein von Rituximab war die Zellzahl der MYC^{low}-Zellen im Vergleich zu den MYC^{high}-Zellen in Anwesenheit von Makrophagen signifikant reduziert (Abbildung 21A). Das Verhältnis von MYC^{low}- zu MYC^{high}-Zellen betrug in Anwesenheit von Makrophagen ohne Beigabe von Antikörpern durchschnittlich 0.52 ± 0.18 , für die Negativkontrolle mit Cetuximab $0.39 \pm 0.7.4$, und 0.23 ± 0.31 im Beisein von Rituximab (Abb. 21C). Der Phagozytoseversuch ohne Beigabe von Makrophagen zeigt erwartungsgemäß keine quantitativen Zellmengenunterschiede zwischen dem CD20-Antikörper Rituximab und dem nichtbindenden EGFR-Antikörper (Abbildung 21D).

Der alleinige Vergleich der prozentualen Zellzahlreduktion reicht nicht aus, um eine Schlussfolgerung ziehen zu können, ob die Makrophagen einen Einfluss auf die Zellzahlreduktion haben. Effekte wie die generelle Wachstumshemmung bei MYC^{low}-P493-6-Zellen tragen zu der verminderten Zellzahl bei. Um diesen Effekt im Vergleich zu eliminieren, müssen die Zellzahlverhältnisse bei Abwesenheit und Anwesenheit der Makrophagen direkt miteinander verglichen werden. Unter Beisein von Rituximab betrug das Verhältnis von MYC^{low}- zu MYC^{high}-Zellen in Abwesenheit von Makrophagen 0.33 ± 0.32 , in Anwesenheit von Makrophagen lag das Verhältnis bei 0.23 ± 0.31 (Abbildung 22). Dieser Unterschied ist signifikant ($p = 0.0499$, Student T-Test). Somit sind die MYC^{low}-P493-6 Zellen mit niedriger c-MYC-Expression sensibler für eine Phagozytose unter Rituximab als die Zellen mit hoher c-MYC-Expression.

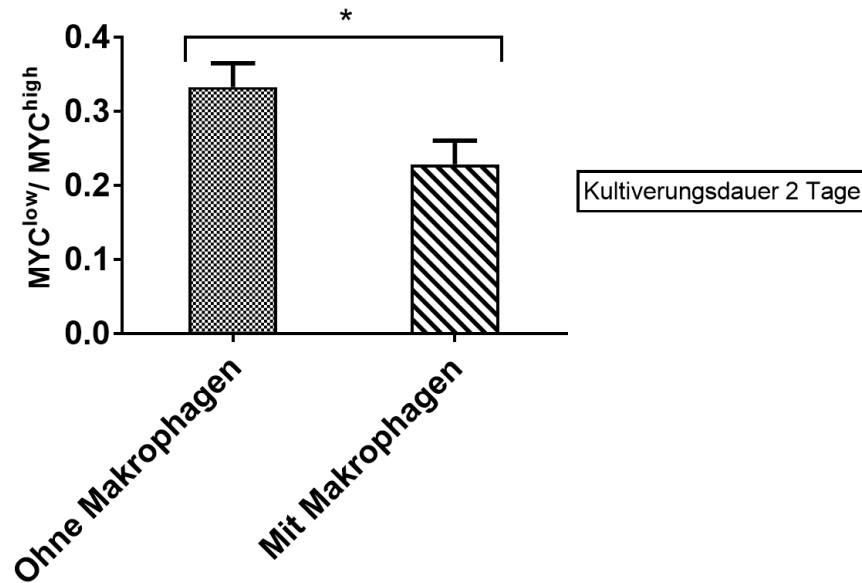


Abbildung 22. Die Sensitivität von B-Zellen gegenüber antikörperabhängiger Phagozytose ist von der c-MYC-Expression abhängig. Die Abbildung zeigt das Verhältnis von MYC^{low}- zu MYC^{high}-P493-6-Zellen bei An- bzw. Abwesenheit von Makrophagen. Die P493-6-Zellen wurden mit 50 µg/ml Rituximab behandelt. Initial wurden die P493-6-Zellen auf eine Zellzahl von 0.1×10^6 Zellen eingestellt. Die hinzugegebene Makrophagenzahl betrug 0.05×10^6 Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von fünf unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede wurden mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA; *: $p < 0.05$) bestimmt.

4.3 c-MYC-Inhibition mit dem BET-Bromodomänen-Inhibitor JQ1

Um eine klinisch anwendbare Reduktion der c-MYC-Expression zu erreichen, wurde der Inhibitor JQ1 verwendet. JQ1 gehört zu der Gruppe der Thienotriazolodiazepine und ist ein potenter BET-Inhibitor. JQ1 inhibiert die BRD4 und BRD3 Bromodomänenproteine. Unterschieden wird ein wirksames, an das BRD3/4-bindene Enantiomer JQ1(+) von einem unwirksamen, nichtbindenden JQ1(-) (Filippakopoulos et al., 2010).

4.3.1 Einfluss von JQ1 auf die c-MYC-Expression

Der Effekt von JQ1 auf die Expression von c-MYC in P493-6-Zellen wurde im Western Blot sichtbar gemacht. Dazu wurden P493-6-Zellen mit JQ1(+) in vier verschiedenen Konzentrationen (0.1 µM, 0.25 µM, 0.5 µM und 1 µM) sowohl für einen als auch zwei Tage inkubiert. Gleiches wurde mit dem inaktiven Enantiomer JQ1(-) in einer 1 µM-Konzentration durchgeführt. c-MYC konnte in allen Ansätzen in ähnlicher Stärke nachgewiesen werden

(Abbildung 23). Die Behandlung von P493-6-Zellen mit dem JQ1-Inhibitor führt also nicht zu einer Erniedrigung der c-MYC-Expression.

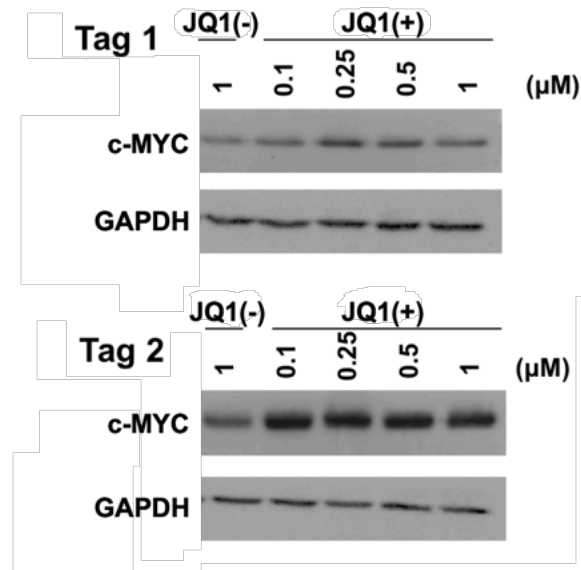


Abbildung 23. JQ1(+) supprimiert die c-MYC-Expression in P493-6-Zellen nicht. Die Abbildung zeigt den c-MYC-Immunoblot von JQ1-behandelten P493-6-Zellen nach ein und zwei Tagen Inkubation. Als Negativkontrolle diente JQ1(-) bei einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$. Die c-MYC-Expression ist deutlich als Bande erkennbar und ließ sich nicht durch JQ1(+) reduzieren. Zur Expressionskontrolle wurde die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) mitbestimmt.

4.3.2 Analyse der Wachstumskinetik

Untersucht werden sollte, ob durch die Behandlung mit JQ1 ein Wachstumsarrest bei den beiden humanen Burkitt-Lymphom-Zelllinien DAUDI und RAJI zu erreichen ist, dazu wurden die Zellen mit JQ1(+) und JQ1(-) in fünf verschiedenen Konzentrationen behandelt. Die Zellen wurden initial auf 0.4×10^6 Zellen pro Well ausgesät und über insgesamt vier Tage täglich gezählt, das Medium wurde nicht ausgetauscht. Diese Versuche wurden dreimal wiederholt. Die Behandlung der DAUDI-Zellen mit dem aktiven JQ1 führte zu einer dosisabhängigen Wachstumsinhibition, die an Tag 3 und Tag 4 deutlich wird (Abbildung 24). Bei einer Konzentration von $0.25 \mu\text{M}$ konnte eine leichte, nicht signifikante Zellzahlminderung an Tag vier beobachtet werden (JQ1(+): $0.56 \pm 0.1 \times 10^6$, JQ1(-): $0.76 \pm 0.05 \times 10^6$ Zellen). Ein möglicher, aber nicht signifikanter Wachstumsarrest konnte bei einer Konzentration von $0.5 \mu\text{M}$ beobachtet werden (JQ1(+): $0.33 \pm 0.09 \times 10^6$, JQ1(-): $0.63 \pm 0.06 \times 10^6$ Zellen). Hohe Konzentrationen von $1 \mu\text{M}$ und $2 \mu\text{M}$ schienen toxisch für die mit JQ1(+) behandelten Zellen zu sein: die Anzahl der Zellen reduzierte sich bis unter die ursprünglich eingesetzte Zellzahl

von 0.4×10^6 und betrug nach vier Tagen nur noch $0.26 \pm 0.19 \times 10^6$ ($1 \mu\text{M}$) und $0.15 \pm 0.13 \times 10^6$ ($2 \mu\text{M}$) (Abbildung 24).

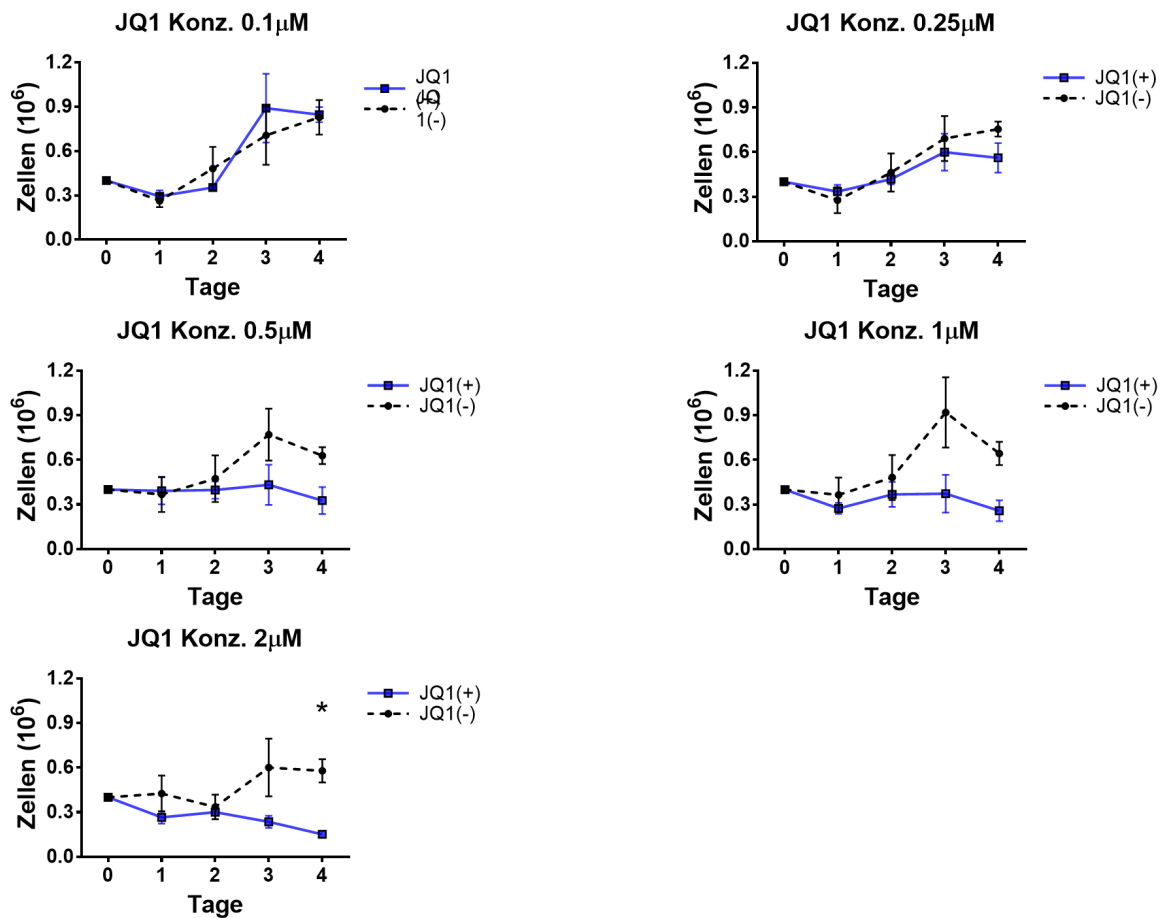


Abbildung 24. Hohe JQ1(+)- Konzentrationen bewirken einen Wachstumsarrest von DAUDI-Zellen. Die Abbildungen zeigen 4-Tages-Wachstumskinetiken von DAUDI-Zellen bei unterschiedlichen JQ1 Konzentrationen. Blaue Kurven: JQ1(+), schwarze Kurven: JQ1(-). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede wurden mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA; $n=3$; $*$: $p < 0.05$) bestimmt.

Bei RAJI konnten mit den niedrigen JQ1-Konzentrationen von $0.1 \mu\text{M}$ und $0.25 \mu\text{M}$ keine Differenzen im Wachstum festgestellt werden. An Tag 4 fiel die Wachstumsrate bei einer $0.5 \mu\text{M}$ Konzentration geringer aus als die der Negativkontrolle (JQ1(+): $0.625 \pm 0.42 \times 10^6$, JQ1(-): $0.97 \pm 0.03 \times 10^6$ Zellen), aber der Standardfehler ist vergleichsweise hoch, sodass auch hier keine Signifikanz vorliegt. Signifikant sind die Unterschiede der beiden höchsten Konzentrationen ($1 \mu\text{M}$ und $2 \mu\text{M}$) an Tag 4. Hier zeigt sich im Mittelwert kein Wachstum mit JQ1(+), der Unterschied war signifikant zur Negativkontrolle ($1 \mu\text{M}$ $p = 0.0044$, $2 \mu\text{M}$ $p = 0.0224$) (Abbildung 25).

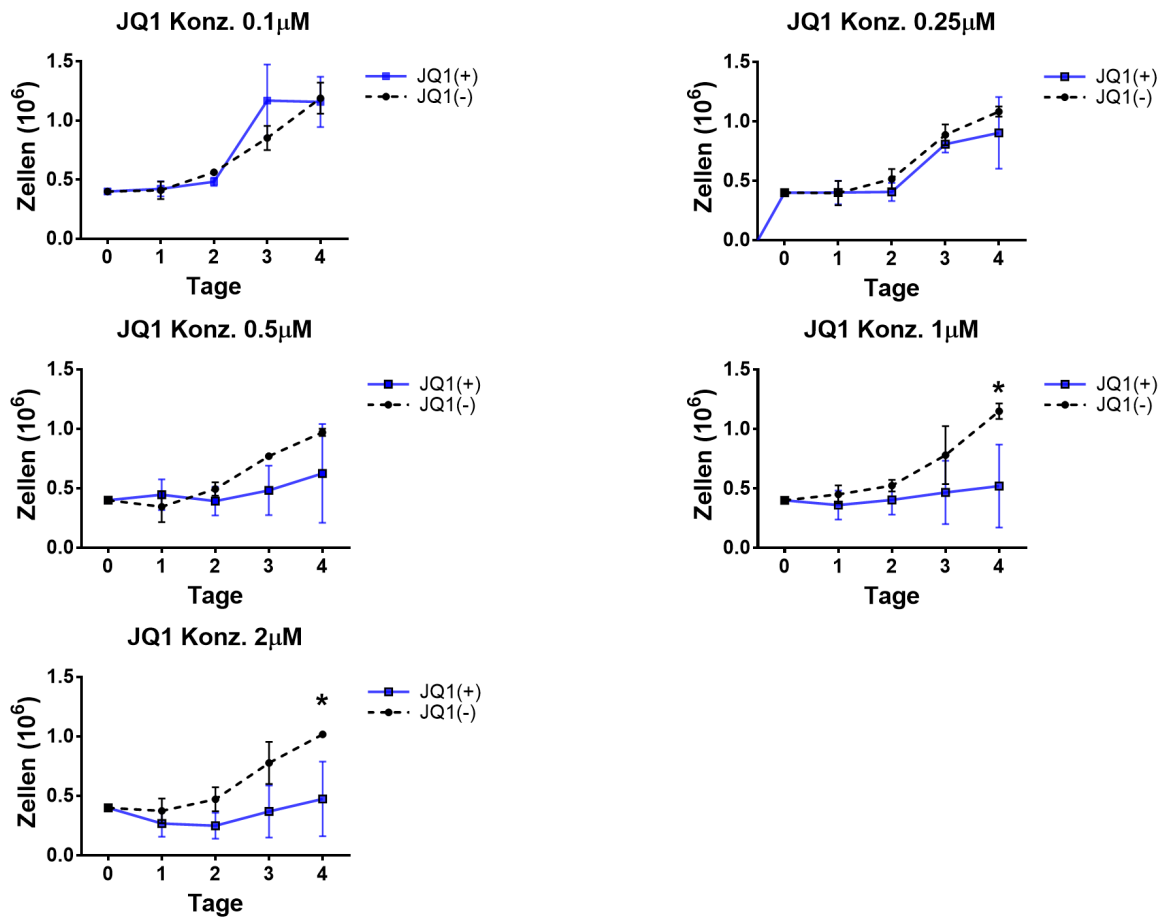


Abbildung 25. Hohe JQ1(+)- Konzentrationen bewirken einen Wachstumsarrest der RAJI-Zellen. Die Abbildungen zeigen 4-Tages-Wachstumskinetiken bei unterschiedlichen JQ1 Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede wurden mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA; $n=3$; *: $p < 0.05$) bestimmt.

4.3.3 Komplementvermittelte Zytotoxizität

Um den Einfluss von JQ1 auf die CD20-Antikörper abhängige komplementvermittelte Zytotoxizität zu untersuchen, wurden RAJI-Zellen mit vier verschiedenen JQ1-Konzentrationen 24 Std. vorbehandelt. Als Antikörperkontrolle wurde Cetuximab verwendet. Die CDC-Versuche wurden fünfmal durchgeführt.

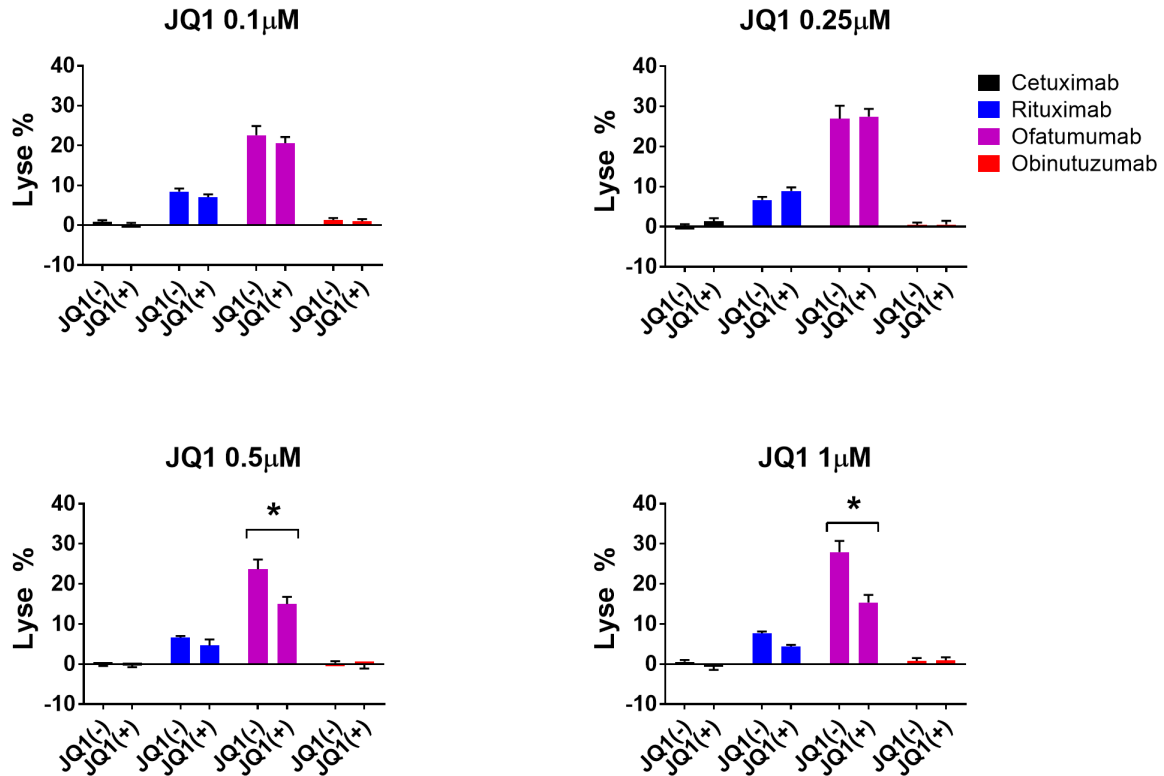


Abbildung 26. JQ1(+)- unterdrückt die CDC-Aktivität von Ofatumumab bei RAJI-Zellen. Die Versuche wurden mit JQ1-behandelten RAJI-Zellen durchgeführt. Die Antikörperkonzentrationen betragen 50 μg/ml. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede wurden mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA; n=3; *: p < 0.05) bestimmt.

Verglichen mit Rituximab und Obinutuzumab, konnte durch Ofatumumab bei allen Inhibitorkonzentrationen die höchste Lyserate erreicht werden (Abbildung 26). Diese betrug durchschnittlich 20.59% ± 1.55% bei einer Konzentration von 0.1 μM JQ1(+) und 22.61% ± 2.28% für JQ1(-). Mit der Konzentration von 0.25 μM betrug die Lyserate durchschnittlich 27.49% ± 1.93% für JQ1(+) und 26.69% ± 1.93% für JQ1(-). Signifikante Unterschiede konnten in den Konzentrationen 0.5 μM und 1 μM beobachtet werden (0.5 μM p = 0.0008; 1 μM p < 0.0001). Hierbei wurden die mit dem aktiven Enantiomer behandelten Zellen schlechter lysiert. Die durchschnittlichen Lyseraten für die 0.5 μM Konzentration mit Ofatumumab lag bei 15.02% ± 1.73% für JQ1(+) und 23.69% ± 2.4% für JQ1(-). Für die 1 μM Konzentration betrug diese 15.39% ± 1.87% für JQ1(+) und 27.92% ± 2.8% für JQ1(-).

Mit Rituximab konnten nur geringe Lyseraten erzielt werden. Die Lyserate betrug durchschnittlich 7-8% für beide Enantiomere, meist etwas darunter, die Unterschiede waren

nicht signifikant. Unter Obinutuzumab und dem Kontrollantikörper Cetuximab wurden keine Lyseraten erzielt (Abbildung 26).

5 Diskussion

Die Fragestellung dieser Dissertation war, ob eine hohe c-MYC-Onkogenexpression in malignen B-Zellen einen negativen Einfluss auf die CD20-Antikörper abhängige Zytotoxizität hat. Monoklonale CD20-Antikörper nehmen eine wichtige Rolle in der Therapie von Burkitt-Lymphomen ein. In der Arbeit wurden sowohl komplement- als auch zellvermittelte Mechanismen untersucht. Die Burkitt-Lymphom-ähnliche Zelllinie P493-6 diente dabei als In vitro-Modell, die eine c-MYC-Überexpression, wie sie in Burkitt-Lymphomen vorkommt, simulieren kann (Pajic et al., 2000). Mithilfe von Doxycyclin lässt sich die c-MYC-Expression unterdrücken. P493-6-Zellen eignen sich also gut als Modell für Untersuchungen zu Abhängigkeiten von c-MYC.

5.1 Eigenschaften von P493-6-Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst die Validität von P493-6 als c-MYC-Modellsystem untersucht. Unter Verwendung von Doxycyclin konnte eine rasche Abnahme der c-MYC-Expression sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene gezeigt werden. Dies entspricht den Beobachtungen von Pajic et al. (Pajic et al., 2000). Nach Inhibition der c-MYC-Expression kam es zu einem verminderten Zellwachstum und einem G0/G1-Arrest der Zellen. Diese Beobachtung spiegelt die Ergebnisse von Pajic et al. wider, welcher auch die Induktion eines G0/G1 Arrestes detektieren konnte. Die durch Tetracyclin in der c-MYC-Expression inhibierten Zellen (MYC^{low}) wiesen schon nach zwei Tagen ein gehemmtes Wachstum auf verglichen mit den nativen P493-6-Zellen, nahmen dann das Wachstum aber wieder auf. Dieses graduelle Wachstum der MYC^{low} -P493-6-Zellen könnte durch eine Depletion von Doxycyclin hervorgerufen worden sein, da in den Versuchen das Doxycyclin nicht erneuert wurde. Die generelle Halbwertszeit von Doxycyclin im Zellmedium beträgt 24 Stunden (Gomez-Martinez et al., 2013). Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Inkubationszeiträume sowie die verwendete Doxycyclinkonzentration waren ausreichend, um die c-MYC-Expression nachweislich nahezu vollständig unterdrücken zu können. Werden die MYC^{low} -P493-6-Zellen mit Doxycyclin-freiem Medium gewaschen, zeigt sich ein rascher Anstieg der c-MYC-Expression innerhalb von vier Stunden (Pajic et al., 2000).

Im nächsten Abschnitt dieser Arbeit wurde der Einfluss von c-MYC auf den Immunphänotyp von P493-6-Zellen untersucht. Zusätzlich zu ihren physiologischen Eigenschaften und Aufgaben stellen Oberflächenantigene wichtige Angriffspunkte in der Tumorbehandlung dar. So konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Expression von CD20 durch c-MYC beeinflusst wird: in Abwesenheit von c-MYC wurde eine erhöhte Expression von CD20

detektiert. Die Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen aus anderen Studien. Yu et al. (2005) konnten nachweisen, dass die Reduktion von c-MYC in P493-6-Zellen signifikant mit der Erhöhung der CD20 Expression einhergeht. Die Expression des Zielantigens ist essentiell für die Antikörpertherapie. Geringe Moleküldichten sind mit Resistenzen gegenüber der Therapie assoziiert (van Meerten et al., 2006; Smida et al., 2016). C-MYC beeinflusst auch die CD55 Expression: eine Reduktion von c-MYC hatte eine erhöhte CD55 Expression, verglichen mit den nativen P493-6-Zellen, zur Folge. CD55 stellt als *Complement decay accelerating factor* einen potentiellen Angriffspunkt in der Tumorbehandlung dar und ist derzeit Gegenstand von Untersuchungen (Dho et al., 2018).

Casey et al. (2016) zeigten, dass c-MYC die Expression von CD47 auf T-Zellen der akuten lymphoblastischen Leukämien (T-ALL) und der P493-6-Zellen beeinflusst: eine geringe c-MYC-Expression korreliert hier mit einer geringen CD47-Expression, dies führt zu einer Tumorregression. Im Rahmen dieser Arbeit konnte in den P493-6-Zellen keine Korrelation zwischen der c-MYC- und der CD47-Expression bestätigt werden, weder auf der mRNA- noch auf der Proteinebene. Ein möglicher Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse kann die unterschiedliche Durchführung der Versuche sein. Casey et al. haben primär alle P493-6-Zellen mit Doxycyclin behandelt. Sobald diese kein c-MYC mehr exprimierten, wurden die Zellen, die hohes c-MYC in den Versuchen exprimieren sollten, von Doxycyclin durch Waschen befreit. Es ist vorstellbar, dass aufgrund der wiederholten hohen c-MYC-Expression eine generelle, reaktive, unspezifische Überexpression vieler Gene, darunter auch CD47, die Ursache für die von Casey beobachtete Differenz ist. Casey et al. haben in ihren Versuchen den Fokus auf eine bestimmte Reihe von T-ALL-Zellen gelegt. Die von ihnen verwendete Zelllinie Jurkat besitzt Superenhancer für CD47, während P493-6 keine Superenhancer für CD47 vorweisen kann (Betancur et al., 2017). Der beobachtete c-MYC-abhängige CD47-Expressionseffekt bei Jurkat-Zellen könnte mit der Verstärkung durch Superenhancer zusammenhängen.

Das P493-6-Zellmodell bildet wesentliche charakteristische Eigenschaften des Burkitt-Lymphoms ab, u.a. auch eine hohe c-MYC-Expression (Pajic et al., 2000; Blum et al., 2004). Diese geht mit einer hohen Zellproliferation und einer Apoptosehemmung einher. Die Pathophysiologie der hohen c-MYC-Expression unterscheidet sich beim Burkitt-Lymphom und der P493-6-Modellzelle. Die hohe c-MYC-Expression bei Burkitt-Lymphomen ist pathophysiologisch durch die Translokation des c-MYCs in die Nähe eines der Immunglobulingene begründet, z.B. bei t(8;14). Durch die hohe Expressionsrate der Immunglobuline wird so das translozierte c-MYC mit exprimiert und führt zu der charakteristisch hohen Zellteilung und Apoptosehemmung (Blum et al., 2004; van den Bosch, 2004; Brady et al., 2007; Epstein, 2012). Die kausale Ursache der hohen c-MYC-Expression

im P493-6-Zellmodell unterscheidet sich jedoch vom Burkitt-Lymphom. Die c-MYC-Überexpression der P493-6-Zellen beruht auf einer stabilen EBV-Transformation. Auf dem Vektor befindet sich ein c-MYC-Gen, welches durch einen tetracyclinabhängigen Promotor bei Abwesenheit von Tetracyclin die Expression des c-MYCs amplifiziert und bei dessen Anwesenheit die Expression inhibiert (Pajic et al., 2000). Dies erklärt auch die fehlende Inhibition der c-MYC-Proteinexpression in P493-6-Zellen durch den BET-Bromodomäneninhibitor JQ1.

5.2 Einfluss von c-MYC auf die Zytotoxizität von CD20-Antikörpern im P493-6-Modell

Monoklonale Antikörper können direkte und indirekte Effektormechanismen induzieren (Boross et al., 2012; Marshall et al., 2017; Meyer et al., 2018). Bei den direkten Effektormechanismen handelt es sich um Effekte, die allein auf der Antigenbindung beruhen. Indirekte Effektormechanismen können durch Komplementfaktoren oder durch Effektorzellen (PMN, T- und NK-Zellen, Makrophagen, etc.) ausgelöst werden.

5.2.1 Direkte Zytotoxizität durch homotypische Aggregation

Homotypische Aggregationen, welche zu Formationen von multizellulären malignen Zellaggregationen führen, sind typisch für CD20-Antikörper vom Typ-II wie z.B. Obinutuzumab, allerdings untypisch für Antikörper vom Typ-I (Alduaij et al., 2011). Interessanterweise löst Rituximab (Typ-I) bei P493-6-Zellen eine homotypische Aggregation aus. Auch hier sind die MYC^{low}-P493-6-Zellen wesentlich früher als die MYC^{high}-Zellen betroffen: schon nach zwei Stunden Inkubation konnten die charakteristischen Zellformationen festgestellt werden. Daher scheint c-MYC die Kinetik der homotypischen Aggregationen zu beeinflussen: niedrige c-MYC Konzentrationen beschleunigen die Zellagglomeration von P493-6-Zellen im Beisein von CD20-Antikörpern. Auch mit Obinutuzumab konnten schon nach kurzer Zeit in MYC^{low}-P493-6-Zellen die typischen Zelladhäsionen beobachtet werden. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Liu et al. (1998), wo über CD20-Antikörper induzierte beschleunigte Zelladhäsionseffekte durch erhöhte c-MYC-Konzentrationen berichtet wird. Hinsichtlich der Zellvitalität zeigten sich, außer bei Obinutuzumab, keine signifikanten Unterschiede zwischen den MYC^{low}- und MYC^{high}-P493-6 Zellen, die meisten Zellen waren vital. Mit Obinutuzumab behandelte MYC^{low}-P493-6-Zellen wiesen allerdings eine signifikant geringere Vitalität sowie eine höhere Nekrose und Apoptose auf als die MYC^{high}-P493-6-Zellen. Obinutuzumab ist ein Typ-II-Antikörper und hat die Eigenschaft, verglichen mit Typ-I-

Antikörpern, eine effizientere direkte Zytotoxizität auszulösen (Honeychurch et al., 2012). Eine c-MYC-Reduzierung verstärkt den Effekt der direkten Zytotoxizität mit Obinutuzumab bei P493-6-Zellen.

5.2.2 Indirekte Zytotoxizität in Abhängigkeit von c-MYC

Zu den antikörperabhängigen indirekten Effektormechanismen gehören die komplementabhängige Zytotoxizität (CDC) und die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) und Phagozytose (ADCP).

Das Vollblut enthält sowohl die Komplementfaktoren für die CDC als auch die Effektoren der zellvermittelten Zytotoxizität (Gelderman et al., 2004). Im Zytotoxizitätsversuch mit Vollblut waren MYC^{low}-P493-6-Zellen weitaus sensitiver als MYC^{high}-P493-6-Zellen gegenüber einer Lyse in Gegenwart der CD20-Antikörper Rituximab, Obinutuzumab und Ofatumumab. Eine mögliche Ursache für die erhöhte Zytotoxizität bei niedriger c-MYC-Konzentration kann die unterschiedliche CD20-Moleküldichte sein. Eine niedrige c-MYC-Expression korreliert mit erhöhter CD20-Moleküldichte (siehe Kapitel 4.1.2 und (Yu et al., 2005)). Aufgrund der höheren Dichte steigt die Wahrscheinlichkeit, Antikörper zu binden (van Meerten et al., 2006; Smida et al., 2016; Meyer et al., 2018). Um den Einfluss des Komplementsystems auf das zytotoxische Potential im Vollblut quantifizieren zu können, wurde unter Verwendung von Eculizumab die Spaltung von C5 innerhalb der Experimente unterbunden. Eine fehlende C5-Spaltung verhindert die Bildung des potenten Anaphylatoxins C5a und im Folgenden die Ausbildung des Membranangriffkomplexes. In Anwesenheit von Eculizumab konnten weder bei den MYC^{low}- noch bei den MYC^{high}-P493-6-Zellen zytotoxische Effekte beobachtet werden. Die Zytotoxizität durch die CD20-Antikörper mit Vollblut bedarf daher wohl in der Hauptsache der Aktivierung der Komplementkaskade. Dieses Ergebnis steht im ersten Augenschein im Widerspruch zu den Ergebnissen aus dem ADCC-Versuch, welcher unabhängig vom Komplementsystem ist. Reff et al. (1994) konnten zeigen, dass CD20-Antikörper sowohl komplementabhängige Zelllysen als auch antikörperabhängige zellvermittelte zytotoxische Effekte *in vitro* verursachen. Eine mögliche Erklärung für den Verlust des zytotoxischen Effekts im Vollblut durch Eculizumab könnte die im Vollblut geringere Anzahl an Effektorzellen sein, im Gegensatz zu den im ADCC verwendeten konzentrierten und aufgereinigten Zellen. Im Gegensatz zu Vollblut hat c-MYC keinen Effekt auf die Zytotoxizität beim ADCC. Welche der beiden zytotoxischen Mechanismen, CDC und ADCC, *in vivo* bei der Behandlung von malignen B-Zelltumoren eine übergeordnete Rolle spielt, ist derzeit nicht bekannt (Mathas et al., 2000; Rogers et al., 2014).

Mit den granulozytären Effektorzellen (PMN) ließen sich trotz GM-CSF-Zugabe keine zytotoxischen Effekte nachweisen. Eine mögliche Erklärung ist die fehlende Bindung der CD20-Antikörper an die Fc γ -Rezeptoren auf den PMN (van der Kolk et al., 2002). Die mangelnde Fähigkeit der Granulozyten zur Lyse von B-Zellen wurde auch in Zusammenhang mit murinen CD20-Antikörpern beschrieben (Elsässer et al., 1996).

Makrophagen sind ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Sie haben einen dichotomen Charakter und können Tumorzellen, bzw. xenogene Zellen durch Phagozytose sowohl verdauen, aber auch das Tumorzellwachstum fördern (Weiskopf et al., 2015). Makrophagen exprimieren viele verschiedene Fc γ -Rezeptoren und haben ein hohes Potential, Tumorzellen durch antikörperabhängige Phagozytose zu zerstören. Viele Studien zeigen, dass die Phagozytose durch Makrophagen eine wesentliche Rolle in der Tumorthherapie mit monoklonalen Antikörpern spielt (Weiskopf et al., 2015). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die c-MYC-Expression auch auf die Phagozytose einen signifikanten Einfluss hat. Es zeigte sich bei P493-6-Zellen mit niedriger c-MYC-Expression im Beisein von Rituximab eine erhöhte Phagozytose. Auch hier ist eine mögliche Erklärung die erhöhte CD20-Expression, durch die es an der Zelloberfläche zu einer quantitativ höheren Bindung von CD20-Antikörpern und somit auch zu einer vermehrten Rekrutierung von Makrophagen kommt.

Unwahrscheinlich scheint es, dass das signalregulierende Protein SIRP α eine Rolle spielt. Makrophagen exprimieren an ihrer Zelloberfläche das SIRP α -Protein, welches mit dem CD47-Molekül auf den Zielzellen interagiert. Durch diese Interaktion wird ein „don't eat me“-Signal ausgelöst und die Wahrscheinlichkeit der Phagozytose durch Makrophagen sinkt (Liu et al., 2015). Blockaden des CD47-Moleküls, sog. Immuncheckpoint-Blockaden, werden seit kurzem in der Therapie für maligne Tumoren erfolgreich eingesetzt (Vonderheide, 2015). Die durchflusszytometrischen Expressionsanalysen dieser Arbeit zeigen allerdings, dass CD47 auf den c-MYC inhibierten und nativen P493-6-Zellen in ähnlich hohen Mengen exprimiert wird. Zu einem anderen Ergebnis kamen Casey et al. (2016), die durch eine Blockade von c-MYC eine Reduktion von CD47 beobachtet hatten.

5.3 BET-Bromodomänen-Inhibition

Die Untersuchungen mit dem BET-Bromodomänen-Inhibitor JQ1 sollten einen Einblick verschaffen, welchen Effekt man durch die c-MYC-Reduktion auf Burkitt-Lymphome erwarten kann. JQ1 kann die Expression von c-MYC in malignen B-Zellen reduzieren (Delmore et al., 2011; Emadali et al., 2013; Trabucco et al., 2015).

Der Einsatz von JQ1 auf die P493-6-Zellen zeigte im Western Blot keine Reduktion des c-MYC-Proteins. Der Grund hierfür liegt kausal im Design der c-MYC-Expression in P493-6-Zellen. Die Überexpression wird durch einen Vektor erreicht, auf dem das c-MYC-Gen lokalisiert ist und dessen Expression über einen Tetracyclin-abhängigen Promotor gesteuert wird (Pajic et al., 2000). Zwar tragen P493-6-Zellen vermutlich an sich das c-MYC-Gen, allerdings ist die Expression dann wohl vergleichsweise niedrig. JQ1 inhibiert BRD4 und kann somit nur die Expression des intrinsischen Gens, aber nicht die des durch den Vektor eingebrachten c-MYC-Gens reduzieren.

In dieser Arbeit wurden zwei Burkitt-Lymphom-Zelllinien, DAUDI und RAJI, auf deren Wachstum unter JQ1 Behandlung hin untersucht. Dabei wirkte JQ1 in höheren Konzentrationen wachstumshemmend. Der Rückgang der Zellzahlen könnte durch eine Induktion von Apoptose hervorgerufen sein. Indizien für einen solchen Prozess zeigten Tinsley et al. (2015) bei DAUDI-Zellen: nur ca. 40% der Zellen waren bei einer JQ1-Konzentration von 0.5 μM noch vital. In der Durchführung der vorliegenden Dissertation fehlt allerdings der Nachweis einer c-MYC-Reduktion durch Western Blot oder quantitativen PCR, so lässt sich nicht sicher ausschließen, dass die Zellen doch noch gewisse Mengen an c-MYC exprimieren. In anderen Arbeiten wurden jedoch c-MYC-Reduktionen in RAJI bei einer JQ1-Konzentration von 1 μM schon nach zwei Stunden beobachtet (Fowler et al., 2014).

Es wurden CDC-Zytotoxizitätsversuche mit JQ1-behandelten RAJI-Zellen und den drei CD20-Antikörpern Rituximab, Ofatumumab und Obinutuzumab durchgeführt. Mit Rituximab und Ofatumumab konnten Zelllysen erzielt werden, wobei die Lyseraten unter Ofatumumab wesentlich höher lagen als die unter Rituximab. Einen signifikanten Unterschied konnte man bei höheren JQ1-Konzentrationen unter Ofatumumab beobachten. Interessanterweise waren hier die Lyseraten unter JQ1-Behandlung im Vergleich zu der Negativkontrolle geringer, die Ursache für dieses Phänomen ist nicht bekannt. Weiterführende Versuche im Hinblick auf die CD20- und CD55-Rezeptordichte und mit weiteren Zelllinien könnten bei der möglichen Erklärung helfen.

5.4 c-MYC als therapeutischer Angriffspunkt

Aufgrund des Potentials der BET-Bromodomänen-Inhibitoren zur Hemmung von c-MYC und anderen Onkogenen laufen derzeit verschiedene klinische Studien. Neben hämatologischen Tumorentitäten wie dem Multiplen Myelom und dem refraktären diffusen großzelligen B-Zelllymphom (DLBCL) sind auch solide Tumoren, wie z.B. das Ovarialkarzinom, Gegenstand derzeitiger klinischer Studien. Neben der BET-Bromodomänen-Inhibition wurden in den letzten Jahren weitere Ansätze zur Inhibition von c-MYC entwickelt. Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) sind Enzyme, die in vielen zellulären Funktionen involviert sind, wie z.B. der

Zellproliferation, dem Zellwachstum, der Differenzierung, und der Motilität. Eine Inhibition der PI3K bewirkt auch eine Suppression der c-MYC-Expression (Tsai et al., 2012). Demnach könnten Inhibitoren der PI3K vielversprechende Kandidaten für eine Therapie zur c-MYC-Reduktion sein. Eine andere Möglichkeit zur Inhibition von c-MYC zeigt sich durch die Inhibition von Enzymen, welche die Acetylgruppen von Histonen entfernen, sog. Histon-Deacetylasen (HDAC). Eine Deacetylierung der Histone bewirkt eine Erniedrigung der DNA-Transkription. So konnte mit Inhibitoren von HDAC die c-MYC-Expression in Zellen der akuten myeloischen Leukämie (AML) reduziert werden (Nebbioso et al., 2017). Auch in Kombination mit PI3K-Inhibitoren wurden bereits vielversprechende Ergebnisse erzielt (Pei et al., 2016). Die Inhibition von c-MYC ist derzeit Gegenstand der Forschung zur Behandlung vieler verschiedener refraktärer hämato-onkologischen Erkrankungen. Mit Dinaciclib, einem cyclinabhängigen Kinase(CDK)-Inhibitor, konnte c-MYC in T-ALL-Zellen und DLBCL reduziert und Apoptosen induziert werden. Dinaciclib hat derzeit die Phase III der klinischen Studie für die Behandlung von Patienten mit refraktärer CLL abgeschlossen (Gregory et al., 2015; Moharram et al., 2017). Auch bei Double-Hit-Lymphomen (DHL) ist die Inhibition von c-MYC ein therapeutisches Ziel. In DHL-Zellen verstärkt die *polo-like kinase-1* (PLK1) die Expression von c-MYC. Die Inhibition von PLK1 führt somit auch zu einer Inhibition der Expression von c-MYC und zu erhöhter Zytotoxizität (Ren et al., 2018).

6 Zusammenfassung

Burkitt-Lymphome gehören zu den Non-Hodgkin-Lymphomen und werden in endemische (afrikanische), sporadische und Immundefizienz-assoziierte Lymphome eingeteilt. Ein typisches Charakteristikum von Burkitt-Lymphomen ist eine erhöhte Expression des c-MYC-Onkogens. Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von c-MYC auf die immunologische Zytotoxizität von CD20-gerichteten monoklonalen Antikörpern, welche bereits therapeutisch angewendet werden, zu untersuchen.

Die Burkitt-Lymphom-ähnliche humane Zelllinie P493-6 diente aufgrund der Möglichkeit, die c-MYC-Expression von außen steuern zu können, als Modellsystem. Die hohe c-MYC-Expression in den nativen Zellen lässt sich mit Doxycyclin, einem Tetracyclin, unterbinden. Die P493-6-Zellen zeigten unter verschiedenen hohen c-MYC-Expressionen Unterschiede hinsichtlich ihrer phänotypischen Merkmale, der Wachstumskinetik und der homotypischen Aggregation. So waren unter niedriger c-MYC-Expression die Dichte der Oberflächenantigene CD20 und CD55 erhöht und das Zellwachstum unter Erhöhung der Zellzahl im Zellzyklusarrest gemindert. Im Beisein von CD20-Antikörpern war die homotypische Zellaggregation erhöht. Auch konnten sowohl bei der komplement- als auch bei der zellvermittelten Zytotoxizität gegenüber P493-6-Zellen in Gegenwart von CD20-Antikörpern signifikante Differenzen beobachtet werden. Das Burkitt-Zellmodell P493-6 zeigte durch Inhibition von c-MYC eine erhöhte Zytotoxizität im Beisein von monoklonalen CD20-Antikörpern. Ebenso war die antikörperabhängige Phagozytose von Makrophagen signifikant gesteigert.

Als eine Möglichkeit zur Herunterregulation der c-MYC-Expression wurde in der vorliegenden Arbeit weiterhin die Hemmung von BET-Bromodomänen in ihrer Eigenschaft als Genregulatoren untersucht. Unter der Behandlung mit dem Inhibitor JQ1 waren die humanen Burkitt-Lymphomlinien DAUDI und RAJI in ihrem Wachstum dosisabhängig gehemmt, was mit einer reduzierten c-MYC-Expression zusammenhängen könnte. Überraschend war der Befund, dass konträr zu den Ergebnissen aus den P493-6-Versuchen, die komplementvermittelte Zytotoxizität mit dem CD20-Antikörper Ofatumumab unter JQ1-Behandlung nicht erhöht, sondern sogar erniedrigt war. An dieser Stelle wären neben der Bestimmung der c-MYC-Expression und Vitalitätstests weiterführende Untersuchungen sinnvoll, um die kausale Ursache für die geringere Zytotoxizität bei niedrigen c-MYC Konzentrationen erklären zu können.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Reduktion von c-MYC in Burkitt-ähnlichen Lymphomzellen in Kombination mit monoklonalen CD20-Antikörpern in vitro zu einer erhöhten immunologischen Zytotoxizität durch Komplement und Effektorzellen führt. Die Reduktion von c-MYC bietet demnach vielversprechende Ansätze für weiterführende In vivo-Studien und für neue oder verbesserte Therapien nicht nur beim Burkitt-Lymphom, sondern auch anderen Tumorentitäten.

7 Literaturverzeichnis

Alduaij, W., Ivanov, A., Honeychurch, J., Cheadle, E. J., Potluri, S., Lim, S. H., Shimada, K., Chan, C. H., Tutt, A., Beers, S. A., Glennie, M. J., Cragg, M. S. and Illidge, T. M. Novel type II anti-CD20 monoclonal antibody (GA101) evokes homotypic adhesion and actin-dependent, lysosome-mediated cell death in B-cell malignancies. *Blood*. **2011**. **117**(17): 4519-4529.

Bartlett, J. M. and Stirling, D. A short history of the polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol*. **2003**. **226**: 3-6.

Baselga, J. The EGFR as a target for anticancer therapy--focus on cetuximab. *Eur J Cancer*. **2001**. **37 Suppl 4**: S16-22.

Beers, S. A., Chan, C. H., French, R. R., Cragg, M. S. and Glennie, M. J. CD20 as a target for therapeutic type I and II monoclonal antibodies. *Semin Hematol*. **2010**. **47**(2): 107-114.

Betancur, P. A., Abraham, B. J., Yiu, Y. Y., Willingham, S. B., Khameneh, F., Zarnegar, M., Kuo, A. H., McKenna, K., Kojima, Y., Leeper, N. J., Ho, P., Gip, P., Swigut, T., Sherwood, R. I., Clarke, M. F., Somlo, G., Young, R. A. and Weissman, I. L. A CD47-associated super-enhancer links pro-inflammatory signalling to CD47 upregulation in breast cancer. *Nat Commun*. **2017**. **8**: 14802.

Blum, K. A., Lozanski, G. and Byrd, J. C. Adult Burkitt leukemia and lymphoma. *Blood*. **2004**. **104**(10): 3009-3020.

Boerma, E. G., van Imhoff, G. W., Appel, I. M., Veeger, N. J. G. M., Kluin, P. M. and Kluin-Nelemans, J. C. Gender and age-related differences in Burkitt lymphoma--epidemiological and clinical data from The Netherlands. *Eur J Cancer*. **2004**. **40**(18): 2781-2787.

Boross, P. and Leusen, J. H. W. Mechanisms of action of CD20 antibodies. *Am J Cancer Res*. **2012**. **2**(6): 676-690.

Brady, G., MacArthur, G. J. and Farrell, P. J. Epstein-Barr virus and Burkitt lymphoma. *J Clin Pathol*. **2007**. **60**(12): 1397-1402.

Bruhns, P., Iannascoli, B., England, P., Mancardi, D. A., Fernandez, N., Jorieux, S. and Daeron, M. Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood*. **2009**. **113**(16): 3716-3725.

Burkitt, D. A sarcoma involving the jaws in African children. *Br J Surg*. **1958**. **46**(197): 218-223.

Burkitt, D. P. The discovery of Burkitt's lymphoma. *Cancer*. **1983**. **51**(10): 1777-1786.

Burmeister, T., Schwartz, S., Horst, H. A., Rieder, H., Gokbuget, N., Hoelzer, D. and Thiel, E. Molecular heterogeneity of sporadic adult Burkitt-type leukemia/lymphoma as revealed by PCR and cytogenetics: correlation with morphology, immunology and clinical features. *Leukemia*. **2005**. **19**(8): 1391-1398.

Bustin, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*. **2000**. **25**(2): 169-193.

Cardarelli, P. M., Quinn, M., Buckman, D., Fang, Y., Colcher, D., King, D. J., Bebbington, C. and Yarranton, G. Binding to CD20 by anti-B1 antibody or F(ab')₂ is sufficient for induction of apoptosis in B-cell lines. *Cancer Immunol Immunother*. **2002**. **51**(1): 15-24.

Casey, S. C., Tong, L., Li, Y., Do, R., Walz, S., Fitzgerald, K. N., Gouw, A. M., Baylot, V., Gutgemann, I., Eilers, M. and Felsher, D. W. MYC regulates the antitumor immune response through CD47 and PD-L1. *Science*. **2016**. **352**(6282): 227-231.

Couzin-Frankel, J. Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. *Science*. **2013**. **342**(6165): 1432-1433.

Cragg, M. S., Walshe, C. A., Ivanov, A. O. and Glennie, M. J. The biology of CD20 and its potential as a target for mAb therapy. *Curr Dir Autoimmun*. **2005**. **8**: 140-174.

de Alboran, I. M., O'Hagan, R. C., Gartner, F., Malynn, B., Davidson, L., Rickert, R., Rajewsky, K., DePinho, R. A. and Alt, F. W. Analysis of C-MYC function in normal cells via conditional gene-targeted mutation. *Immunity*. **2001**. **14**(1): 45-55.

Delmore, J. E., Issa, G. C., Lemieux, M. E., Rahl, P. B., Shi, J., Jacobs, H. M., Kastritis, E., Gilpatrick, T., Paranal, R. M., Qi, J., Chesi, M., Schinzel, A. C., McKeown, M. R., Heffernan, T. P., Vakoc, C. R., Bergsagel, P. L., Ghobrial, I. M., Richardson, P. G., Young, R. A., Hahn, W. C., Anderson, K. C., Kung, A. L., Bradner, J. E. and Mitsiades, C. S. BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. *Cell*. **2011**. **146**(6): 904-917.

Dho, S. H., Kim, S. Y., Chung, C., Cho, E. H., Lee, S. Y., Kim, J. Y., Kim, L. K., Min, S. W., Lee, J., Jung, S. H. and Lim, J. C. Development of a radionuclide-labeled monoclonal anti-CD55 antibody with theranostic potential in pleural metastatic lung cancer. *Sci Rep*. **2018**. **8**(1): 8960.

Duncan, A. R. and Winter, G. The binding site for C1q on IgG. *Nature*. **1988**. **332**(6166): 738-740.

Edwards, J. C. W. and Cambridge, G. B-cell targeting in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol*. **2006**. **6**(5): 394-403.

Elsässer, D., Valerius, T., Repp, R., Weiner, G. J., Deo, Y., Kalden, J. R., van de Winkel, J. G., Stevenson, G. T., Glennie, M. J. and Gramatzki, M. HLA class II as potential target antigen on malignant B cells for therapy with bispecific antibodies in combination with granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*. **1996**. **87**(9): 3803-3812.

Emadali, A., Rousseaux, S., Bruder-Costa, J., Rome, C., Duley, S., Hamaidia, S., Betton, P., Debernardi, A., Leroux, D., Bernay, B., Kieffer-Jaquinod, S., Combes, F., Ferri, E., McKenna, C. E., Petosa, C., Bruley, C., Garin, J., Ferro, M., Gressin, R., Callanan, M. B. and Khochbin, S. Identification of a novel BET bromodomain inhibitor-sensitive, gene regulatory circuit that controls Rituximab response and tumour growth in aggressive lymphoid cancers. *EMBO Mol Med*. **2013**. **5**(8): 1180-1195.

Epstein, A. Burkitt lymphoma and the discovery of Epstein-Barr virus. *Br J Haematol*. **2012**. **156**(6): 777-779.

Filippakopoulos, P., Qi, J., Picaud, S., Shen, Y., Smith, W. B., Fedorov, O., Morse, E. M., Keates, T., Hickman, T. T., Felletar, I., Philpott, M., Munro, S., McKeown, M. R., Wang, Y., Christie, A. L., West, N., Cameron, M. J., Schwartz, B., Heightman, T. D., La Thangue, N., French, C. A., Wiest, O., Kung, A. L., Knapp, S. and Bradner, J. E. Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature*. **2010**. **468**(7327): 1067-1073.

Fowler, T., Ghatk, P., Price, D. H., Conaway, R., Conaway, J., Chiang, C. M., Bradner, J. E., Shilatifard, A. and Roy, A. L. Regulation of MYC expression and differential JQ1 sensitivity in cancer cells. *PLoS One*. **2014**. **9**(1): e87003.

- Freeman, C. L. and Sehn, L. H. A tale of two antibodies: obinutuzumab versus rituximab. *Br J Haematol.* **2018.** **182**(1): 29-45.
- Gelderman, K. A., Tomlinson, S., Ross, G. D. and Gorter, A. Complement function in mAb-mediated cancer immunotherapy. *Trends Immunol.* **2004.** **25**(3): 158-164.
- Gomez-Martinez, M., Schmitz, D. and Hergovich, A. Generation of stable human cell lines with Tetracycline-inducible (Tet-on) shRNA or cDNA expression. *J Vis Exp.* **2013.** (73): e50171.
- Gregory, G. P., Hogg, S. J., Kats, L. M., Vidacs, E., Baker, A. J., Gilan, O., Lefebure, M., Martin, B. P., Dawson, M. A., Johnstone, R. W. and Shortt, J. CDK9 inhibition by dinaciclib potently suppresses Mcl-1 to induce durable apoptotic responses in aggressive MYC-driven B-cell lymphoma in vivo. *Leukemia.* **2015.** **29**(6): 1437-1441.
- Heemskerk, N. and van Egmond, M. Monoclonal antibody-mediated killing of tumour cells by neutrophils. *Eur J Clin Invest.* **2018.** **48 Suppl 2:** e12962.
- Hiraga, J., Tomita, A., Sugimoto, T., Shimada, K., Ito, M., Nakamura, S., Kiyoi, H., Kinoshita, T. and Naoe, T. Down-regulation of CD20 expression in B-cell lymphoma cells after treatment with rituximab-containing combination chemotherapies: its prevalence and clinical significance. *Blood.* **2009.** **113**(20): 4885-4893.
- Hleyhel, M., Hleyhel, M., Bouvier, A. M., Belot, A., Tattevin, P., Pacanowski, J., Genet, P., De Castro, N., Berger, J. L., Dupont, C., Lavole, A., Pradier, C., Salmon, D., Simon, A., Martinez, V., Spano, J. P., Costagliola, D. and Grabar, S. Risk of non-AIDS-defining cancers among HIV-1-infected individuals in France between 1997 and 2009: results from a French cohort. *AIDS.* **2014.** **28**(14): 2109-2118.
- Honeychurch, J., Alduaij, W., Azizyan, M., Cheadle, E. J., Pelicano, H., Ivanov, A., Huang, P., Cragg, M. S. and Illidge, T. M. Antibody-induced nonapoptotic cell death in human lymphoma and leukemia cells is mediated through a novel reactive oxygen species-dependent pathway. *Blood.* **2012.** **119**(15): 3523-3533.
- Jacobson, C. and LaCasce, A. How I treat Burkitt lymphoma in adults. *Blood.* **2014.** **124**(19): 2913-2920.
- Jang, M. K., Mochizuki, K., Zhou, M., Jeong, H. S., Brady, J. N. and Ozato, K. The bromodomain protein Brd4 is a positive regulatory component of P-TEFb and stimulates RNA polymerase II-dependent transcription. *Mol Cell.* **2005.** **19**(4): 523-534.
- Kamen, L., Myneni, S., Langsdorf, C., Kho, E., Ordonia, B., Thakurta, T., Zheng, K., Song, A. and Chung, S. A novel method for determining antibody-dependent cellular phagocytosis. *J Immunol Methods.* **2019.** **468:** 55-60.
- Kretschmer, A., Schwanbeck, R., Valerius, T. and Rösner, T. Antibody isotypes for tumor immunotherapy. *Transfus Med Hemother.* **2017.** **44**(5): 320-326.
- Liu, X., Pu, Y., Cron, K., Deng, L., Kline, J., Frazier, W. A., Xu, H., Peng, H., Fu, Y. X. and Xu, M. M. CD47 blockade triggers T cell-mediated destruction of immunogenic tumors. *Nat Med.* **2015.** **21**(10): 1209-1215.
- Liu, Z. J., Tanaka, Y., Mine, S., Morinobu, A., Yagita, H., Okumura, K., Taniguchi, T., Yamamura, H. and Minami, Y. Functional cooperation of cyclin C and c-Myc in mediating homotypic cell adhesion via very late antigen-4 activation and vascular cell adhesion molecule-1 induction. *Blood.* **1998.** **92**(12): 4700-4711.

- Loven, J., Hoke, H. A., Lin, C. Y., Lau, A., Orlando, D. A., Vakoc, C. R., Bradner, J. E., Lee, T. I. and Young, R. A. Selective inhibition of tumor oncogenes by disruption of super-enhancers. *Cell*. **2013**. **153**(2): 320-334.
- Lu, L. L., Suscovich, T. J., Fortune, S. M. and Alter, G. Beyond binding: antibody effector functions in infectious diseases. *Nat Rev Immunol*. **2018**. **18**(1): 46-61.
- Magrath, I. Epidemiology: clues to the pathogenesis of Burkitt lymphoma. *Br J Haematol*. **2012**. **156**(6): 744-756.
- Marshall, M. J. E., Stopforth, R. J. and Cragg, M. S. Therapeutic antibodies: what have we learnt from targeting CD20 and where are we going? *Front Immunol*. **2017**. **8**: 1245.
- Mathas, S., Rickers, A., Bommert, K., Dörken, B. and Mapara, M. Y. Anti-CD20- and B-cell receptor-mediated apoptosis: evidence for shared intracellular signaling pathways. *Cancer Res*. **2000**. **60**(24): 7170-7176.
- Merle, N. S., Church, S. E., Fremeaux-Bacchi, V. and Roumenina, L. T. Complement system part I - molecular mechanisms of activation and regulation. *Front Immunol*. **2015**. **6**: 262.
- Merle, N. S., Noe, R., Halbwachs-Mecarelli, L., Fremeaux-Bacchi, V. and Roumenina, L. T. Complement system part II: role in immunity. *Front Immunol*. **2015**. **6**: 257.
- Meyer, S., Evers, M., Jansen, J. H. M., Buijs, J., Broek, B., Reitsma, S. E., Moerer, P., Amini, M., Kretschmer, A., Ten Broeke, T., den Hartog, M. T., Rijke, M., Klein, C., Valerius, T., Boross, P. and Leusen, J. H. W. New insights in Type I and II CD20 antibody mechanisms-of-action with a panel of novel CD20 antibodies. *Br J Haematol*. **2018**. **180**(6): 808-820.
- Moharram, S. A., Shah, K., Khanum, F., Marhall, A., Gazi, M. and Kazi, J. U. Efficacy of the CDK inhibitor dinaciclib in vitro and in vivo in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Lett*. **2017**. **405**: 73-78.
- Mossner, E., Brunker, P., Moser, S., Puntener, U., Schmidt, C., Herter, S., Grau, R., Gerdes, C., Nopora, A., van Puijenbroek, E., Ferrara, C., Sondermann, P., Jager, C., Strein, P., Fertig, G., Friess, T., Schull, C., Bauer, S., Dal Porto, J., Del Nagro, C., Dabbagh, K., Dyer, M. J. S., Poppema, S., Klein, C. and Umana, P. Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. *Blood*. **2010**. **115**(22): 4393-4402.
- Murphy, K. M., Travers, P., Walport, M., Janeway, C. A., Seidler, L., Ehrenstein, M. Janeway Immunologie. **2009**. Spektrum Akad. Verl., Heidelberg.
- Nebbioso, A., Carafa, V., Conte, M., Tambaro, F. P., Abbondanza, C., Martens, J., Nees, M., Benedetti, R., Pallavicini, I., Minucci, S., Garcia-Manero, G., Iovino, F., Lania, G., Ingenito, C., Belsito Petrizzi, V., Stunnenberg, H. G. and Altucci, L. c-Myc modulation and acetylation is a key HDAC inhibitor target in cancer. *Clin Cancer Res*. **2017**. **23**(10): 2542-2555.
- Nesbit, C. E., Tersak, J. M. and Prochownik, E. V. MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene*. **1999**. **18**(19): 3004-3016.
- Nguyen, L., Papenhausen, P. and Shao, H. The role of c-MYC in B-cell lymphomas: diagnostic and molecular aspects. *Genes*. **2017**. **8**(4).
- Nimmerjahn, F. and Ravetch, J. V. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol*. **2008**. **8**(1): 34-47.

Okroj, M., Osterborg, A. and Blom, A. M. Effector mechanisms of anti-CD20 monoclonal antibodies in B cell malignancies. *Cancer Treat Rev.* **2013.** **39**(6): 632-639.

Ott, G. Impact of MYC on malignant behavior. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* **2014.** **2014**(1): 100-106.

Pajic, A., Spitkovsky, D., Christoph, B., Kempkes, B., Schuhmacher, M., Staeger, M. S., Brielmeier, M., Ellwart, J., Kohlhuber, F., Bornkamm, G. W., Polack, A. and Eick, D. Cell cycle activation by c-myc in a Burkitt lymphoma model cell line. *Int J Cancer.* **2000.** **87**(6): 787-793.

Pardoll, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* **2012.** **12**(4): 252-264.

Pattle, S. B. and Farrell, P. J. The role of Epstein-Barr virus in cancer. *Expert Opin Biol Ther.* **2006.** **6**(11): 1193-1205.

Paul-Ehrlich-Institut. Monoklonale Antikörper. Link: <https://www.pei.de/DE/Arzneimittel/immunglobuline-monoklonale-antikoerper/monoklonale-antikoerper/monoklonale-antikoerper-node.html>. Letzter Zugriff am 18.02.2021: PEI-Bekanntmachung Nr. 476 im BAnz AT 11.01.2021 B5.

Pawluczko, A. W., Beurskens, F. J., Beum, P. V., Lindorfer, M. A., van de Winkel, J. G. J., Parren, P. W. H. I. and Taylor, R. P. Binding of submaximal C1q promotes complement-dependent cytotoxicity (CDC) of B cells opsonized with anti-CD20 mAbs ofatumumab (OFA) or rituximab (RTX): considerably higher levels of CDC are induced by OFA than by RTX. *J Immunol.* **2009.** **183**(1): 749-758.

Pei, Y., Liu, K. W., Wang, J., Garancher, A., Tao, R., Esparza, L. A., Maier, D. L., Udaka, Y. T., Murad, N., Morrissy, S., Seker-Cin, H., Brabetz, S., Qi, L., Kogiso, M., Schubert, S., Olson, J. M., Cho, Y. J., Li, X. N., Crawford, J. R., Levy, M. L., Kool, M., Pfister, S. M., Taylor, M. D. and Wechsler-Reya, R. J. HDAC and PI3K antagonists cooperate to inhibit growth of MYC-driven medulloblastoma. *Cancer Cell.* **2016.** **29**(3): 311-323.

Peipp, M., Dechant, M. and Valerius, T. Effector mechanisms of therapeutic antibodies against ErbB receptors. *Curr Opin Immunol.* **2008.** **20**(4): 436-443.

Perna, D., Faga, G., Verrecchia, A., Gorski, M. M., Barozzi, I., Narang, V., Khng, J., Lim, K. C., Sung, W. K., Sanges, R., Stupka, E., Oskarsson, T., Trumpp, A., Wei, C. L., Muller, H. and Amati, B. Genome-wide mapping of Myc binding and gene regulation in serum-stimulated fibroblasts. *Oncogene.* **2012.** **31**(13): 1695-1709.

Pincetic, A., Bournazos, S., DiLillo, D. J., Maamary, J., Wang, T. T., Dahan, R., Fiebiger, B. M. and Ravetch, J. V. Type I and type II Fc receptors regulate innate and adaptive immunity. *Nat Immunol.* **2014.** **15**(8): 707-716.

Putney, J. W., Jr. TRP, inositol 1,4,5-trisphosphate receptors, and capacitative calcium entry. *Proc Natl Acad Sci.* **1999.** **96**(26): 14669-14671.

Reff, M. E., Carner, K., Chambers, K. S., Chinn, P. C., Leonard, J. E., Raab, R., Newman, R. A., Hanna, N. and Anderson, D. R. Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood.* **1994.** **83**(2): 435-445.

Ren, Y., Bi, C., Zhao, X., Lwin, T., Wang, C., Yuan, J., Silva, A. S., Shah, B. D., Fang, B., Li, T., Koomen, J. M., Jiang, H., Chavez, J. C., Pham, L., Sudalagunta, P. R., Wan, L., Wang, X., Dalton, W. S., Moscinski, L. C., Shain, K. H., Vose, J., Cleveland, J. L., Sotomayor, E. M., Fu,

- K. and Tao, J. PLK1 stabilizes a MYC-dependent kinase network in aggressive B cell lymphomas. *J Clin Invest.* **2018.**
- Ricklin, D. Manipulating the mediator: modulation of the alternative complement pathway C3 convertase in health, disease and therapy. *Immunobiology.* **2012.** **217**(11): 1057-1066.
- Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K. and Lambris, J. D. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol.* **2010.** **11**(9): 785-797.
- Ricklin, D. and Lambris, J. D. Complement in immune and inflammatory disorders: pathophysiological mechanisms. *J Immunol.* **2013.** **190**(8): 3831-3838.
- Rogers, L. M., Veeramani, S. and Weiner, G. J. Complement in monoclonal antibody therapy of cancer. *Immunol Res.* **2014.** **59**(1-3): 203-210.
- Sant, M., Allemani, C., Tereanu, C., De Angelis, R., Capocaccia, R., Visser, O., Marcos-Gragera, R., Maynadie, M., Simonetti, A., Lutz, J. M., Berrino, F. and Group, H. W. Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood.* **2010.** **116**(19): 3724-3734.
- Scott, A. M., Allison, J. P. and Wolchok, J. D. Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Cancer Immun.* **2012.** **12**: 14.
- Seidel, U. J., Schlegel, P. and Lang, P. Natural killer cell mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in tumor immunotherapy with therapeutic antibodies. *Front Immunol.* **2013.** **4**: 76.
- Sesques, P. and Johnson, N. A. Approach to the diagnosis and treatment of high-grade B-cell lymphomas with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangements. *Blood.* **2017.** **129**(3): 280-288.
- Sheiness, D., Fanshier, L. and Bishop, J. M. Identification of nucleotide sequences which may encode the oncogenic capacity of avian retrovirus MC29. *J Virol.* **1978.** **28**(2): 600-610.
- Smida, M., Kozlova, V., Vakulova, V., Ledererova, A., Doubek, M., Mayer, J. and Pospisilova, S. Cellular mechanisms regulating CD20 as a target of monoclonal antibody therapy in B-lymphoid malignancies. *Blood.* **2016.** **128**(22): 3968-3968.
- Sopp, J. and Cragg, M. S. Deleting malignant B cells with second-generation anti-CD20 antibodies. *J Clin Oncol.* **2018.**
- Swerdlow, S. H., Campo, E., Pileri, S. A., Harris, N. L., Stein, H., Siebert, R., Advani, R., Ghielmini, M., Salles, G. A., Zelenetz, A. D. and Jaffe, E. S. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood.* **2016.** **127**(20): 2375-2390.
- Teeling, J. L., French, R. R., Cragg, M. S., van den Brakel, J., Pluyter, M., Huang, H., Chan, C., Parren, P. W. H. I., Hack, C. E., Dechant, M., Valerius, T., van de Winkel, J. G. J. and Glennie, M. J. Characterization of new human CD20 monoclonal antibodies with potent cytolytic activity against non-Hodgkin lymphomas. *Blood.* **2004.** **104**(6): 1793-1800.
- Tinsley, S., Meja, K., Shepherd, C. and Khwaja, A. Synergistic induction of cell death in haematological malignancies by combined phosphoinositide-3-kinase and BET bromodomain inhibition. *Br J Haematol.* **2015.** **170**(2): 275-278.
- Trabucco, S. E., Gerstein, R. M., Evens, A. M., Bradner, J. E., Shultz, L. D., Greiner, D. L. and Zhang, H. Inhibition of bromodomain proteins for the treatment of human diffuse large B-cell lymphoma. *Clin Cancer Res.* **2015.** **21**(1): 113-122.

Tsai, W. B., Aiba, I., Long, Y., Lin, H. K., Feun, L., Savaraj, N. and Kuo, M. T. Activation of Ras/PI3K/ERK pathway induces c-Myc stabilization to upregulate argininosuccinate synthetase, leading to arginine deiminase resistance in melanoma cells. *Cancer Res.* **2012**. **72**(10): 2622-2633.

Ugurlar, D., Howes, S. C., de Kreuk, B. J., Koning, R. I., de Jong, R. N., Beurskens, F. J., Schuurman, J., Koster, A. J., Sharp, T. H., Parren, P. and Gros, P. Structures of C1-IgG1 provide insights into how danger pattern recognition activates complement. *Science.* **2018**. **359**(6377): 794-797.

Valerius, T., Stockmeyer, B., van Spriël, A. B., Graziano, R. F., van den Herik-Oudijk, I. E., Repp, R., Deo, Y. M., Lund, J., Kalden, J. R., Gramatzki, M. and van de Winkel, J. G. Fc α RI (CD89) as a novel trigger molecule for bispecific antibody therapy. *Blood.* **1997**. **90**(11): 4485-4492.

van den Bosch, C. A. Is endemic Burkitt's lymphoma an alliance between three infections and a tumour promoter? *Lancet Oncol.* **2004**. **5**(12): 738-746.

van der Kolk, L. E., de Haas, M., Grillo-Lopez, A. J., Baars, J. W. and van Oers, M. H. Analysis of CD20-dependent cellular cytotoxicity by G-CSF-stimulated neutrophils. *Leukemia.* **2002**. **16**(4): 693-699.

van Meerten, T., van Rijn, R. S., Hol, S., Hagenbeek, A. and Ebeling, S. B. Complement-induced cell death by rituximab depends on CD20 expression level and acts complementary to antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Clin Cancer Res.* **2006**. **12**(13): 4027-4035.

Vidarsson, G., Dekkers, G. and Rispens, T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol.* **2014**. **5**: 520.

Vonderheide, R. H. CD47 blockade as another immune checkpoint therapy for cancer. *Nat Med.* **2015**. **21**(10): 1122-1123.

Wang, W., Erbe, A. K., Hank, J. A., Morris, Z. S. and Sondel, P. M. NK cell-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in cancer immunotherapy. *Front Immunol.* **2015**. **6**: 368.

Weiner, G. J. Building better monoclonal antibody-based therapeutics. *Nat Rev Cancer.* **2015**. **15**(6): 361-370.

Weiskopf, K. and Weissman, I. L. Macrophages are critical effectors of antibody therapies for cancer. *MAbs.* **2015**. **7**(2): 303-310.

Yu, D., Dews, M., Park, A., Tobias, J. W. and Thomas-Tikhonenko, A. Inactivation of Myc in murine two-hit B lymphomas causes dormancy with elevated levels of interleukin 10 receptor and CD20: implications for adjuvant therapies. *Cancer Res.* **2005**. **65**(12): 5454-5461.

8 Eigene Veröffentlichungen

Scherzler, A., Sattler, C., Rösner, T., Kretschmer, A., Schewe, D., Valerius, T. Effect of c-Myc inhibition on antibody mediated effector functions.
6. Kieler Studierendentagung zu den Life Sciences in Kiel, 2017.

9 Erklärung

Hiermit erkläre ich, Andreas Scherzler, 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. Ferner erkläre ich, dass ich noch keine früheren Promotionsversuche unternommen habe.

Kiel, den _____ (Andreas Scherzler)

10 Curriculum vitae

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird auf einen Lebenslauf verzichtet.

11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank nachstehenden Personen entgegenbringen, ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Promotionsschrift nicht zustande gekommen wäre.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Martin Gramatzki und Frau Prof. Dr. Claudia Baldus für die Chance, im Dr. Mildred-Scheel-Haus die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht zu haben.

Ich möchte mich hiermit bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Thomas Valerius, bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen.

Mein Dank gilt besonders Herrn Dr. Thies Rösner für die hervorragende Betreuung, die freundliche Hilfe, die wertvollen Inspirationen und die aufgebrachte Geduld, die wesentlich zum Gelingen beigetragen haben. Auch für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens möchte ich mich herzlich bei ihm bedanken.

Ebenso gilt mein Dank Herrn PD Dr. Ralf Schwanbeck für seine hervorragende Betreuung, Hilfsbereitschaft, die Diskussionen und das Korrekturlesen, was diese Arbeit vorangebracht haben.

Frau PD Dr. Renate Burger danke ich besonders für die freundschaftlichen Ratschläge, die konstruktiven Verbesserungsvorschläge und das intensive Korrekturlesen.

Besonderer Dank gilt auch der gesamten Arbeitsgruppe für die stete Hilfsbereitschaft und wertvollen Anregungen.

Tiefverbunden und dankbar bin ich insbesondere Jessica Lennartz für ihre unendliche Geduld, ihr Verständnis bei der Anfertigung, sowie das Korrekturlesen dieser Doktorarbeit.

Bei meinen Eltern möchte ich mich ganz besonders herzlich für ihre uneingeschränkte, liebevolle und vielseitige Unterstützung bedanken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.