

**Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin I  
(Direktor: Prof. Dr. med. Martin Schrappe)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel**

# **Die Inhibierung von Bcl-2 verbessert die Effizienz von therapeutischen Antikörpern in B-Zell-Neoplasien**

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

**vorgelegt von  
Julia Therese Heymann  
aus Bad Segeberg**

**Kiel, 2021**

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Denis Schewe, Universitätskinderklinik der Otto-von-Guerike-Universität Magdeburg

2. Berichterstatter/in: Priv.-Doz. Dr. med. Ilkse Oschlies, Institut für Pathologie

Tag der mündlichen Prüfung: 24.08.2022

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 02.05.2022

gez.: Priv.-Doz. Dr. med. Philipp von Bismarck  
(Vorsitender der Prüfungskommission)

---

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Bcl-2 in Lymphomen und Leukämien</b>	<b>1</b>
1.1.1 Bcl-2 und Venetoclax	1
1.1.2 B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome	4
1.1.3 Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom	6
1.1.4 Burkitt-Lymphom	8
1.1.5 Akute lymphatische Leukämie der B-Zell-Reihe	9
1.1.6 t(17;19)-ALL	12
<b>1.2 Antikörper in der Krebstherapie</b>	<b>14</b>
1.2.1 Antikörpertherapien bei hämatologischen Erkrankungen	14
1.2.2 Wirkmechanismen therapeutischer Antikörper	16
1.2.3 Mechanismen der Phagozytose	19
1.2.4 Modifikation von monoklonalen Antikörpern	22
<b>2 Fragestellung</b>	<b>24</b>
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>26</b>
<b>3.1 Material</b>	<b>26</b>
3.1.1 Verwendete Zelllinien	26
3.1.2 Mäuse	26
3.1.3 Puffer und Chemikalien	26
3.1.4 Verwendete Geräte	28
3.1.5 Verbrauchsmaterialien	29
3.1.6 Verwendete Kits und Reagenzien	30
3.1.7 Zusammensetzung der verwendeten Puffer	30
3.1.8 Antikörper für den Western Blot	32
3.1.9 Antikörper und Inhibitoren	32
3.1.10 Antikörper für die Durchflusszytometrie	33
3.1.11 Verwendete Software	33
<b>3.2 Methoden</b>	<b>34</b>
3.2.1 Zellbiologische Methoden	34
3.2.2 Biochemische Methoden	40

3.2.3	Durchflusszytometrische Methoden	42
3.2.4	Tierversuche	43
3.2.5	Einverständnis der Blutspender und Patienten, Ethikvotum	43
3.2.6	Graphische Darstellung und statistische Analysen	44
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>45</b>
4.1	Die Inhibition von Bcl-2 mit Venetoclax führt zu einer Reduktion der Zellviabilität in DHL-Zelllinien <i>in vitro</i>	45
4.2	Niedrig dosiertes Venetoclax induziert einen Zellzyklusarrest in DHL-Zelllinien und Bcl-2-exprimierenden PDX-Zellen	47
4.3	Die Oberflächenexpression von CD19, CD20 und CD38 bleibt auf DHL-Zelllinien und PDX-Zellen nach Behandlung mit Venetoclax unverändert	49
4.4	Indirekte Antikörpereffekte	50
4.4.1	Venetoclax in Kombination mit therapeutischen Antikörpern führt zu keiner Erhöhung der antikörperabhängigen Zellzytotoxizität in DHL-Zelllinien	51
4.4.2	Venetoclax in Kombination mit therapeutischen Antikörpern führt zu keiner Erhöhung der komplementabhängigen Zytotoxizität in DHL-Zelllinien	52
4.4.3	Venetoclax in Kombination mit therapeutischen Antikörpern erhöht die Phagozytose mit humanen Makrophagen in DHL-Zelllinien und BL- und t(17;19)-ALL-PDX-Zellen <i>in vitro</i>	53
4.4.4	Venetoclax in Kombination mit therapeutischen Antikörpern erhöht die Phagozytose mit murinen Makrophagen in DHL-Zelllinien und BL- und t(17;19)-ALL-PDX-Zellen <i>in vitro</i>	56
4.5	Venetoclax in Kombination mit therapeutischen Antikörpern führt zu einer verlängerten Lebenszeit <i>in vivo</i>	59
4.6	Die Verbesserung der Phagozytose durch die Kombination aus Venetoclax und therapeutischen Antikörpern ist abhängig von Makrophagen	61
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>64</b>
5.1	Die Inhibition von Bcl-2 mit Venetoclax induziert einen Zellzyklusarrest in DHL-Zelllinien	65
5.2	Die Kombination von Venetoclax mit therapeutischen Antikörpern führt zu einer Induktion der ADCP	68
5.3	Die Kombination aus Venetoclax und therapeutischen Antikörpern führt zu einer verlängerten Überlebenszeit der Mäuse <i>in vivo</i>	73

---

5.4	Ausblick	76
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>80</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>82</b>
<b>8</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>102</b>
<b>9</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>103</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung</b>	<b>104</b>
<b>11</b>	<b>Publikationen</b>	<b>105</b>

---

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC-DLBCL	Aktiviertes B-Zell-ähnliches diffus großzelliges B-Zell-Lymphom
ABL1	Abelsons murine Leukämie 1
ACTIP	Animal Cell Technology Industrial Platform
ADCC	Antikörperabhängige Zellzytotoxizität
ADCP	Antikörperabhängige Zellphagozytose
AK	Antikörper
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AM	Arzneimittel
BFM	Berlin-Frankfurt-Münster
AML	Akute myeloische Leukämie
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Bcl-2	B-cell-lymphoma 2
BCR	Breakpoint cluster region
BH	Bcl-2-Homologie-Domäne
B-NHL	B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of differentiation
CDC	Komplementabhängige Zytotoxizität
cHL	Klassisches Hodgkin-Lymphom
CHOP	Polychemotherapie aus <b>C</b> yclophosphamid, <b>H</b> ydroxydaunorubicin, Vincristin (Handelsname: <b>Oncovin</b> ), <b>P</b> rednisolon
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CLP	Gemeinsame lymphoide Vorläuferzelle
CML	Chronische myeloische Leukämie
CMP	Gemeinsame myeloide Vorläuferzelle
CODOX-M/IVAC	Polychemotherapie aus <b>C</b> yclophosphamid, Vincristin (Handelsname: <b>Oncovin</b> ), <b>D</b> oxorubicin, <b>M</b> ethotrexat, Ifosfamid, Etoposid und Cytarabin
cPARP	Cleaved Poly-ADP-Ribose-Polymerase
CRT	Calreticulin
CSFE	Carboxyfluoresceinsuccinimidylester
CTX	Cetuximab
Dara	Daratumumab
DC	Dendritische Zelle
DHL	Double-Hit-Lymphom

---

DIC	Disseminierte intravasale Koagulopathie
DLBCL	Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
EPO	Erythropoietin
EPOCH	Polychemotherapie aus <b>E</b> toposid, <b>P</b> rednison, Vincristin (Handelsname: <b>O</b> ncovin), <b>C</b> yclophosphamid und <b>H</b> ydroxydaunorubicin
ETV6	ETS translocation variant 6
Fab-Fragment	Antigen binding-Fragment
FACS	Durchflusszytometrie
Fc-Fragment	constant-Fragment
FcγR	Fcγ-Rezeptor
FCS	Fetales Kälberserum
FDA	Food and Drug Administration
FDC	Follikuläre dendritische Zelle
FL	Follikuläres Lymphom
Fv-Region	Variable Region des Fab-Fragments
g	g-Kraft
GC-DLBCL	Germinalzonen-Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom
GMALL	German multicenter study group for adult ALL
GMP	Granulozyten-Monozyten-Vorläuferzelle
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLF	Hepatischer Leukämiefaktor
HRP	Meerrettichperoxidase
HSC	Hämatopoetische Stammzelle
iAMP21	Intrachromosomale Amplifikation von Chromosom 21
IC50	Halbmaximale Inhibition
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
LC	Liposomales Clodronat
LDH	Laktatdehydrogenase
LRS	Leukozytenreduktionssystem
mA	Milliampere
MAK	Membran-Angriff-Komplex
MALT	Mukosa-assoziiertes Lymphgewebslymphom

---

MBR	Membranbindende Region
MCL	Mantelzelllymphom
M-CSF	Monozytenkolonie-stimulierender Faktor
MEP	Megakaryozyten-Erythrozyten-Vorläuferzelle
MFI	Mittlere Immunfluoreszenz
min	Minute
ml	Milliliter
MLL	Mixed lineage leukemia
mM	Millimolar
MM	Multiplres Myelom
MNC	Mononukleäre Zellen
MPP	Hämatopoetische multipotente Vorläuferzelle
MRD	Minimale Resterkrankung
MZL	Marginalzonenlymphom
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK-Zellen	Natürliche-Killerzellen
nM	Nanomolar
NSG	NOD.Cg-Prkdc <sup>scid</sup> Il2rg <sup>tm1Wjl</sup> /SzJ
PBS	Phosphat-gepufferte Salzsäure
PBX1	Prä-B-Zell-Leukämie-Transkriptionsfaktor 1
PCR	Polymerasekettenreaktion
PD1	Programmed cell death protein 1
PDX	Patient derived Xenograft
PMBCL	Primär mediastinales B-Zell-Lymphom
PMN	Polymorphkernige Granulozyten
PRR	Pattern recognition receptors
PS	Phosphatidylserin
PTHrP	Parathormon-related Peptide
PVDF	Polyvinylindendifluorid
R-CHOP	CHOP + Rituximab
R-EPOCH	EPOCH + Rituximab
RKI	Robert-Koch-Institut
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
RT	Raumtemperatur
RTX	Rituximab
RUNX1	Runt-related transcription factor 1



---

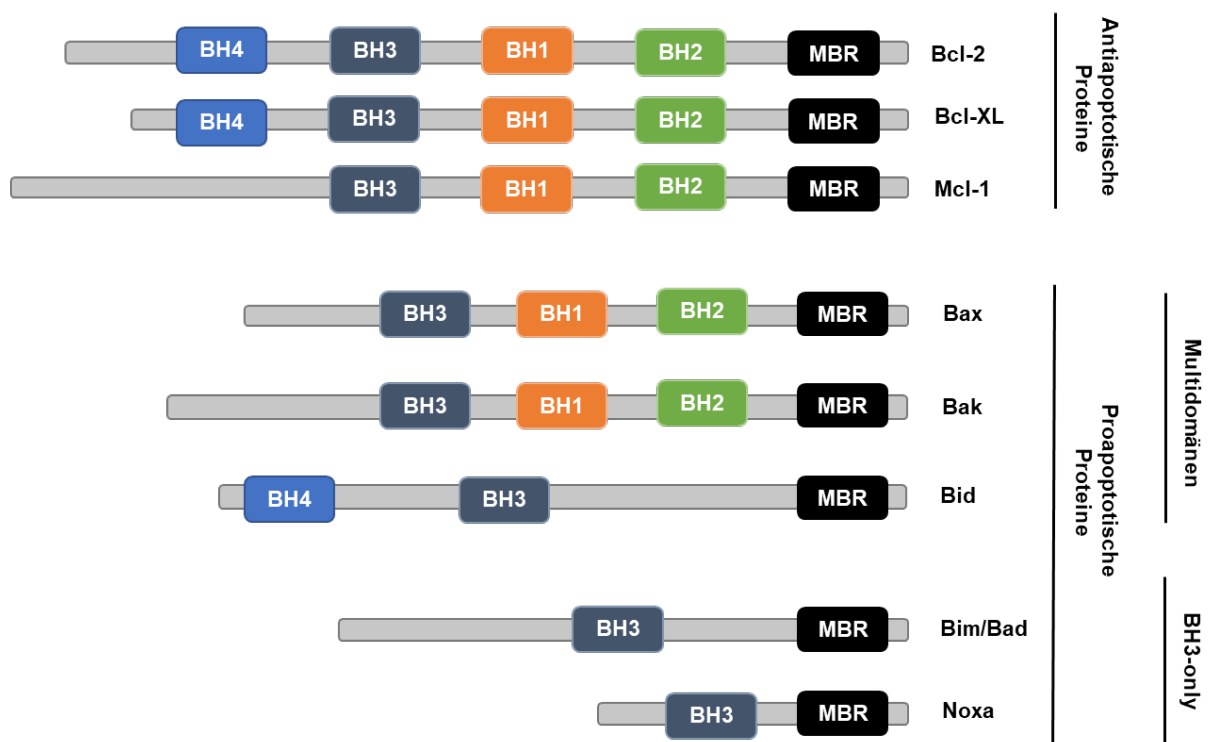
SDS-Page	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunde
SIRP $\alpha$	Signal-regulatory protein $\alpha$
TBS-T	Dreifach gepufferte Säure mit Tween20
TCF3	Transkriptionsfaktor 3
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Thf	Follikuläre T-Helferzelle
TM	Transmembran-Domäne
U	Einheit der Enzymaktivität
VTX	Venetoclax
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentrales Nervensystem

# 1 Einleitung

## 1.1 Bcl-2 in Lymphomen und Leukämien

### 1.1.1 Bcl-2 und Venetoclax

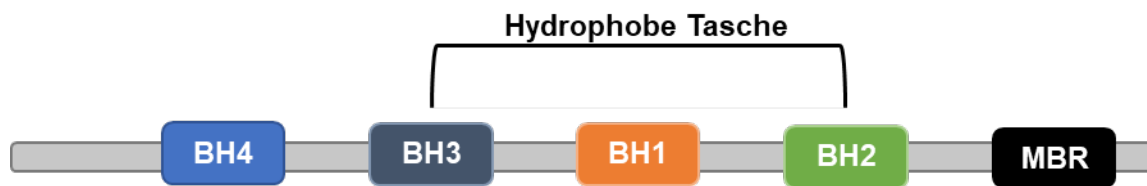
Die Proteine der *B-cell-lymphoma-2*(Bcl-2)-Familie regulieren die Apoptose in humanen Zellen und lassen sich in pro- und antiapoptotische Proteine unterteilen (1). Das gleichnamige Protein Bcl-2 wurde als erstes Protein der Bcl-2-Familie beim follikulären Lymphom des Menschen entdeckt, wobei mittlerweile an die 20 Proteine zur Bcl-2-Familie gezählt werden (2,3). Abgesehen von ihrer pro- oder antiapoptotischen Funktion lassen sich die Proteine ebenfalls anhand ihrer vier verschiedenen Bcl-2-Homologie(BH)-Domänen, BH1-4, unterteilen (4,5) (Abb. 1-1).



**Abbildung 1-1: Übersicht der prominentesten Proteine der Bcl-2-Familie.** Die Proteine der Bcl-2-Familie lassen sich in pro- und antiapoptotische Proteine unterteilen. Des Weiteren können die Proteine ebenfalls anhand ihrer Bcl-2-Homologie-Regionen 1-4 unterschieden werden. Sowohl pro- als auch antiapoptotische Proteine können eine sogenannte membranbindende Region zur Bindung der Mitochondrienmembran besitzen. MBR: membranbindende Region, BH: Bcl-2-Homologie. Abgewandelt nach Shamas-Din et al., 2017 und Gross et al., 2017.

Die antiapoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie verfügen mit Ausnahme von Mcl-1 über alle vier BH-Domänen. Die proapoptotischen Proteine lassen sich hingegen in Proteine mit mehreren Domänen, sogenannte Multidomänenproteine, und in BH3-only Proteine, die lediglich über eine BH3-Domäne verfügen, unterteilen (6,7).

Die strukturelle Anordnung der BH-Domänen spielt eine wichtige Rolle für die Funktion der Bcl-2-Proteine. Während die BH1-3-Domänen für die Ausbildung einer hydrophoben Tasche essenziell sind, sorgt die N-terminale BH4-Domäne für die Stabilisierung dieser Proteinkonfiguration (6,8) (Abb. 1-2).

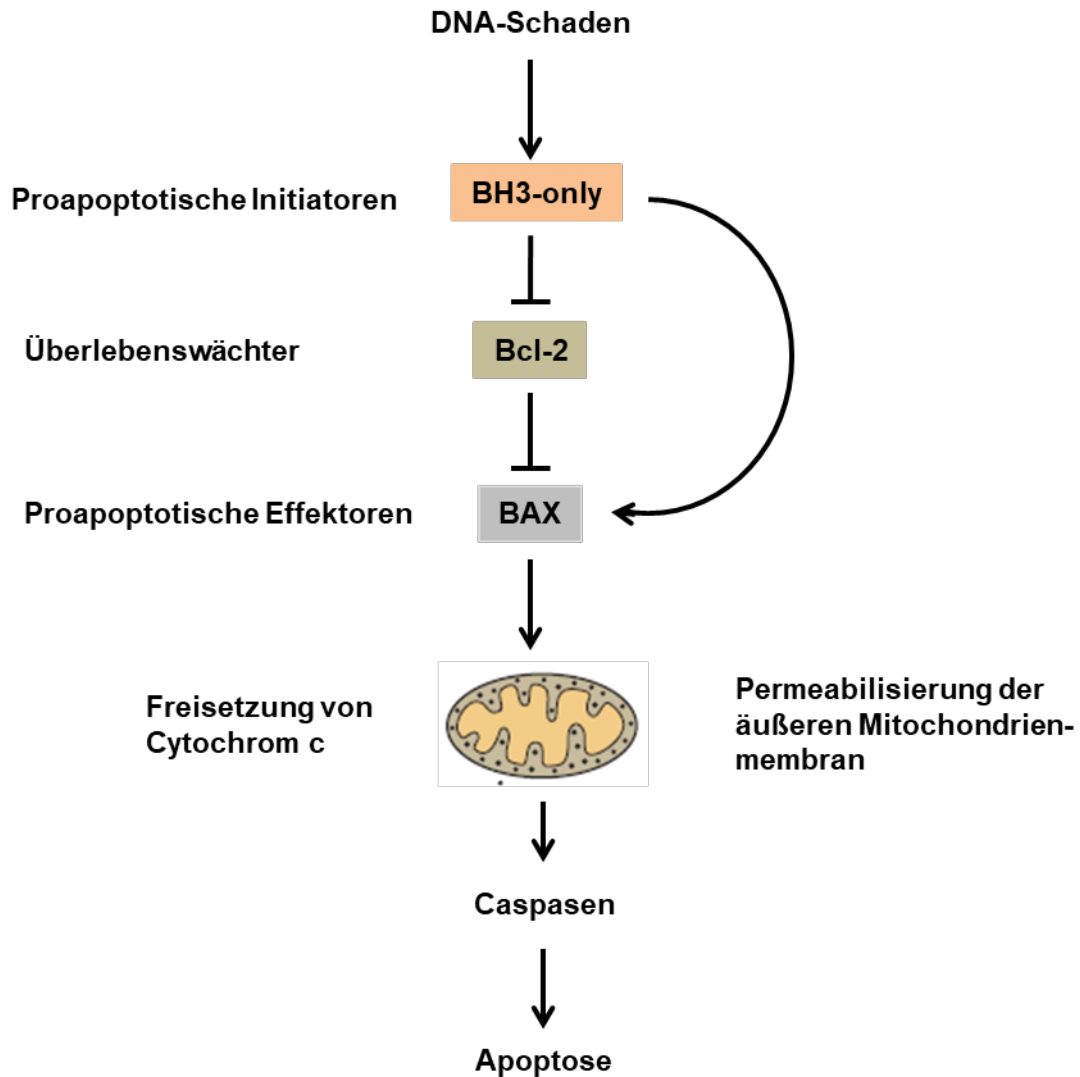


**Abbildung 1-2: Schematischer Aufbau des antiapoptotischen Proteins Bcl-2.** Die antiapoptotischen Proteine sowie die proapoptotischen Proteine Bax und Bak verfügen über eine dreidimensionale Faltstruktur. Die Domänen BH1-3 sind für die Ausbildung einer hydrophoben Tasche verantwortlich, welche essenziell ist für die Wirkungsvermittlung des Proteins. Währenddessen sorgt die BH4-Domäne für die Stabilisierung dieser Struktur. BH: Bcl-2-Homologie, MBR: membranbindende Region. Abgewandelt nach Adams und Cory, 2018.

Diese Proteinstruktur ist Voraussetzung für die Interaktion der unterschiedlichen Bcl-2-Proteine untereinander (9). Auf dieser Fähigkeit der Bcl-2-Proteine, untereinander zu interagieren, basiert das sogenannte Rheostat-Modell. Dieses Modell besagt, dass das Verhältnis von pro- und antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen innerhalb einer Zelle entscheidet, ob die Zelle überlebt oder in die Apoptose übergeht (10). Beispielsweise kann eine vermehrte Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 zu einer Inhibition der Apoptose maligner Zellen führen und ist in der Regel mit einer schlechteren Prognose assoziiert (11,12). Eine Bcl-2-Überexpression kann sowohl bei einigen hämatologischen Neoplasien als auch bei verschiedenen soliden Tumoren vorliegen, wie zum Beispiel dem kleinzelligen Lungenkarzinom, dem Androgen-unabhängigen Prostatakarzinom, dem Ovarialkarzinom und dem Mammakarzinom (13–15). Beispiele für eine Bcl-2-Überexpression in hämatologischen Erkrankungen stellen die chronische lymphatische Leukämie (CLL), das folliculäre Lymphom, das diffus großzellige B-Zell-Lymphom sowie das Burkitt-Lymphom dar (16–19).

Eine wichtige Regulationsstelle in der Vermittlung der Apoptose durch proapoptotische Bcl-2-Proteine ist die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (20). Durch intrinsische Signale bzw. zellulären Stress werden die proapoptotischen BH3-only Proteine in die Mitochondrienmembran eingebaut, wo diese Proteine die proapoptotischen Proteine Bak

und Bax aktivieren und die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran initiieren (8). Im Anschluss kommt es normalerweise zur Freisetzung von Cytochrom c und weiteren Mediatoren, die zur Caspase-Aktivierung und folglich zur Apoptose führen (21). Im Fall einer Überexpression bindet Bcl-2 hingegen vermehrt die proapoptotischen Proteine und inhibiert somit den Eintritt der Zellen in die Apoptose (8,22) (Abb. 1-3).



**Abbildung 1-3: Bcl-2-Proteine können über die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran die Apoptose hervorrufen.** Stresssignale aktivieren die BH3-only-Proteine, die wiederum Bcl-2 inhibieren und somit die proapoptotischen Bcl-2-Proteine aus deren inhibierenden Bindung entlassen. Zusätzlich können BH3-only-Proteine direkt proapoptotische Faktoren aktivieren. Es kommt durch das Überwiegen proapoptotischer Signale zur Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran und über die Aktivierung der Caspasen zur Initiierung der Apoptose. Abgewandelt nach Adams und Cory, 2018.

Im Jahr 2016 wurde der erste spezifische Bcl-2-Inhibitor Venetoclax für die Behandlung der therapierefraktären und rezidivierten CLL zugelassen (23). In Studien erreichte ein Großteil der Patienten unter der Monotherapie mit Venetoclax die Remission (24). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass durch die Kombination aus Venetoclax und Rituximab eine Steigerung der Therapieeffizienz und ein längeres progressionsfreies Intervall der Patienten erreicht

werden kann (25). Venetoclax verfügt über eine sehr hohe Affinität zu Bcl-2. Durch die Bindung des Bcl-2-Inhibitors an das Protein werden die proapoptotischen Proteine Bim und Bax aus ihrer Bindung entlassen, was bei einem Überwiegen der proapoptotischen Faktoren schließlich die Apoptose induziert (26). Studien deuten darauf hin, dass Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphomen, wie zum Beispiel dem diffus großzelligen B-Zell-Lymphom, ebenfalls durch eine Monotherapie mit Venetoclax profitieren könnten (27). Ob das Prinzip der Wirkungssteigerung durch die Kombination von Venetoclax mit Rituximab auch auf andere Antikörper und Krankheitsentitäten übertragen werden kann, ist bisher unbekannt und sollte somit im Verlauf untersucht werden.

### 1.1.2 B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome

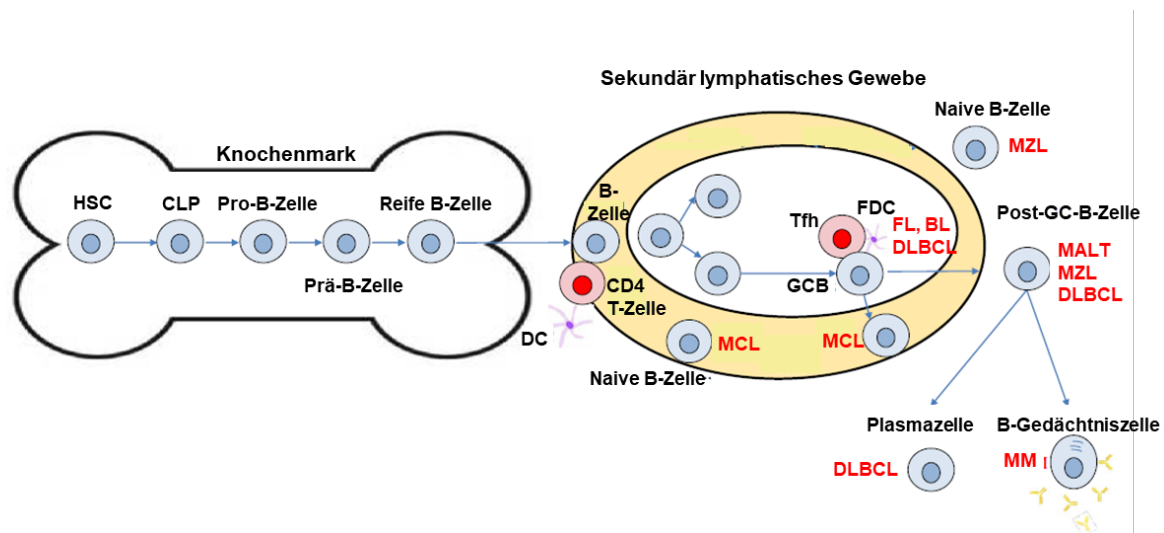
Histologisch lassen sich Lymphome in Hodgkin-Lymphome und Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) unterteilen. Die nach ihrem Erstbeschreiber benannten Hodgkin-Lymphome sind durch sogenannte multinukleäre Sternberg-Reed-Riesenzellen charakterisiert (28). Mit ca. 90% stellt die heterogene Gruppe der NHL im Vergleich zu den Hodgkin-Lymphomen den Großteil aller Lymphome dar (29). NHL stammen zu ca. 85% von den B-Zellen ab, während nur ca. 15% aus den T-Zellen entstehen (30). Nach ihrem klinischen Verlauf können NHL in aggressive und sogenannte indolente NHL unterteilt werden (31–33) (Tabelle 1-1).

<b>Aggressive NHL</b>	<b>Indolente NHL</b>
Lymphoblastisches Lymphom	Mantelzelllymphom
Prolymphozytenleukämie	Haarzelleukämie
Mediastinales B-Zell-Lymphom	Chronische lymphatische Leukämie
Burkitt-Lymphom	Follikuläres Lymphom
Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom	Marginalzonenlymphom
Plasmazelleukämie	Lymphoplasmazytisches Lymphom
Multiplles Myelom	

**Tabelle 1-1: Einteilung der B-NHL nach klinischem Verlauf.** Dargestellt wird die Einteilung der Non-Hodgkin-Lymphome in aggressive und indolente Lymphome. Abgewandelt nach Swerdlow et al., 2008 und Škunca, 2019.

Die aggressiven NHL sind hochmaligne und enden ohne Therapie schnell tödlich. Aufgrund ihrer hohen Zellteilungsrate sprechen sie jedoch meist gut auf die Therapie an (34). Die indolenten, niedrigmalignen NHL sprechen hingegen aufgrund ihrer niedrigen Zellteilungsrate eher schlecht auf die Therapie an und werden daher im fortgeschrittenen Stadium häufig in palliativer Intention behandelt (35–37).

Im Jahr 2016 erkrankten Erwachsene mit einer Inzidenz von ca. 15 Neuerkrankungen auf 100.000 Patienten und Kinder mit einer Inzidenz von 0,7 Neuerkrankungen auf 100.000 Patienten an NHL (38). Die Tendenz der Neuerkrankungen ist seit längerer Zeit steigend, wobei die Gründe hierfür weitestgehend unbekannt sind (39). NHL entstehen meist sporadisch auf der Grundlage von genetischen Mutationen, wie z.B. den t(14;18)- und t(8;14)-Translokationen (40,41). Weitere Risikofaktoren für die Entstehung sind außerdem angeborene oder erworbene Immunschwächen, radioaktive Strahlung, Chemotherapie oder einige virale Erkrankungen. Beispielsweise erhöht eine Infektion mit einem Epstein-Barr-Virus das Risiko, an einem Burkitt-Lymphom zu erkranken (42,43). Die verschiedenen Subtypen der NHL beziehen sich in der Regel auf die unterschiedlichen Reifegrade der B-Lymphozyten während ihrer Differenzierung (33) (Abb. 1-4). Entartete B-Zellen des Keimzentrums deuten somit z.B. auf die Diagnose eines Burkitt-Lymphoms hin (44).



**Abbildung 1-4: Die Entwicklung von der hämatopoetischen Stammzelle zur reifen B-Zelle findet im Knochenmark statt.** Die reife B-Zelle wird als naive, inaktive B-Zelle in die Peripherie entlassen. Die Aktivierung der B-Zelle nach passender Antigenstimulation findet in den sekundär lymphatischen Organen statt. Abhängig von der Art des Lymphoms entstehen NHL in unterschiedlichen Stadien der Zellreife und können so nach ihrer Ursprungszelle differenziert werden. Rot dargestellt sind die aus den jeweiligen Entwicklungsstadien hervorgehenden Lymphom-Subtypen. HSC: hämatopoetische Stammzelle, CLP: gemeinsame lymphoide Vorläuferzelle, DC: dendritische Zelle, MCL: Mantelzelllymphom, GCB: Keimzentren-B-Zelle, Tfh: follikuläre T-Helferzelle, FDC: follikuläre dendritische Zelle, MZL: Marginalzonenlymphom, FL: follikuläres Lymphom, BL: Burkitt-Lymphom, DLBCL: diffus großzelliges B-Zell-Lymphom, MALT: Mukosa-assoziiertes Lymphgewebslymphom, MM: Multiples Myelom. Abgewandelt nach Malcolm et al., 2016.

Klinisch beginnt die Erkrankung häufig mit einer meist schmerzlosen Lymphknotenschwellung sowie mit unspezifischen Allgemeinsymptomen, wie z.B. Leistungsabfall, Gewichtsverlust, Nachtschweiß, oder Fieberperioden (45). Im Gegensatz zu den Hodgkin-Lymphomen können die NHL einen leukämischen Verlauf annehmen (46).

Als Klassifikationssystem zur Ausbreitung maligner Lymphome im Erwachsenenalter hat sich die Ann-Arbor-Klassifikation als Einteilung für das Stadium der Erkrankung sowie für die

weitere klinische Prognose etabliert (47). In dieser Klassifikation werden unter anderem der Lymphknotenbefall als auch das Auftreten bzw. Nicht-Auftreten einer B-Symptomatik bewertet. Für das Staging eines NHL im Kindesalter konnte sich die Ann-Arbor-Klassifikation aufgrund des häufigen primär extranodalen Befalls nicht durchsetzen, sondern wird weitestgehend von der St.-Jude-Klassifikation ersetzt (48). Neben diesen Klassifikationen können auch bestimmte klinische Parameter für die Bestimmung der Prognose herangezogen werden, wie z.B. das Alter während der Diagnosestellung, die Erhöhung der Laktatdehydrogenase (LDH), die Anzahl an nodulären und extranodulären Manifestationen und die Tumorgroße (49).

Die Behandlung der NHL ist abhängig vom Subtyp und kann somit sehr unterschiedlich ausfallen (29). Während die indolenten NHL in lokalisierten Stadien vor allem kurativ mittels Radiatio behandelt werden, steht bei systemischer Ausbreitung die „watch and wait“-Strategie und eine eventuelle Polychemotherapie mit palliativer Zielsetzung im Fokus (50). Die aggressiven NHL werden hingegen mit einer Polychemotherapie mit kurativer Intention behandelt (51). Durch die Einführung von Rituximab, einem Antikörper gegen das auf B-Lymphozyten exprimierte Oberflächenprotein CD20 (CD: *Cluster of differentiation*), konnte zudem die Therapie der NHL revolutioniert und die Prognose in einigen Subtypen deutlich verbessert werden (52,53). Die Kombination aus Chemotherapie und Antikörpern stellt somit mittlerweile bei aggressiven Formen der NHL die Standardtherapie dar (50). Da es sich bei Lymphomen generell um eine systemische Erkrankung handelt, stellen Operationen in der Regel keine geeignete Behandlungsoption dar. Lediglich zur histologischen Aufarbeitung wird teilweise eine chirurgische Lymphknotenresektion durchgeführt (54).

### **1.1.3 Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom**

Das diffus großzellige B-Zell-Lymphom (DLBCL) wird zu den aggressiven Non-Hodgkin-Lymphomen gezählt und stellt mit 40% der NHL die häufigste Subgruppe im Erwachsenenalter dar (55). Eine Erkrankung im Kindesalter ist mit ca. 10% aller NHL eher selten (56). Meist entstehen DLBCL primär in den Lymphknoten, allerdings zeigen 40% der Patienten einen primär extranodalen Befall, der vor allem den Gastrointestinaltrakt, potentiell allerdings jedes Organ betreffen kann (57,58). Außerdem können Patienten im Verlauf einen sekundär extranodalen Befall als Zeichen der systemischen Ausbreitung der Erkrankung zeigen, was mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist (59).

Die Heterogenität der Erkrankung spiegelt sich in einer Vielzahl an genetischen Translokationen, Mutationen oder Deletionen wieder. Bei 5-10% der Erkrankten liegen simultan eine Translokation des *MYC*-Onkogens und eine *Bcl-2*-Überexpression vor, was auch als Double-Hit-Lymphom (DHL) bezeichnet wird und mit einer besonders schlechten Prognose einhergeht (60). Beim DLBCL im Kindesalter konnte man jeweils bei insgesamt 84% der Patienten eine *MYC*-Überexpression und bei 28% der Patienten einen erhöhten *Bcl-2*-Spiegel nachweisen (61,62). Eine zeitgleiche Translokation in *MYC* und *Bcl-2* im Rahmen eines DHL ist im Kindesalter extrem selten (63). So wurde dies bei Kindern zwischen 10-18 Jahren nur vereinzelt, bei Kindern unter 10 Jahren bisher gar nicht beschrieben (64).

DLBCL können anhand ihrer Ursprungszelle der Erkrankung in zwei große Subgruppen unterteilt werden: dem aktivierten B-Zell-ähnlichen DLBCL (ABC-DLBCL) und dem Germinalzonen-DLBCL (GC-DLBCL) (65). Patienten mit GC-DLBCL zeigten bisher ein signifikant höheres 5-Jahresüberleben als Patienten mit ABC-DLBCL, was mit der relativ vermehrten Expression von *Bcl-2* im ABC-DLBCL begründet werden konnte (66).

Seit der endgültigen Zulassung von Rituximab führte die herkömmliche Polychemotherapie aus Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin, Vincristin (Handelsname: Oncovin) und Prednisolon (CHOP) durch die Aufnahme des CD20-Antikörpers (R – CHOP) in die Therapieprotokolle zu einem verbesserten Therapieergebnis beim DLBCL und gilt seitdem als etablierte Therapie (52). Die Therapie des DLBCL im Erwachsenenalter stellt jedoch noch immer ein großes Problem dar, da Patienten zwar initial auf die Chemotherapie ansprechen, allerdings gehen weniger als die Hälfte der Patienten dauerhaft in Remission (67). DLBCL im Kindesalter sind hingegen mit einer deutlich besseren Prognose assoziiert und zeigen ein ereignisfreies Überleben von ca. 90% (62). Ursächlich hierfür mögen sowohl klinische, als auch phänotypische und biologische Unterschiede zwischen DLBCL im Kindes- und Erwachsenenalter sein (61). So erkrankten Kinder vor allem an einem GC-DLBCL, welches, wie oben bereits beschrieben, mit einer besseren Prognose einhergeht als das ABC-DLBCL (62). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass *Bcl-2*-negative GC-DLBCL im Kindesalter besonders gut auf die Therapie ansprechen (66). Sowohl im Kindesalter als auch im Erwachsenenalter stellt eine *Bcl-2*-Überexpression beim DLBCL jedoch einen negativen prognostischen Faktor mit einem geringeren progressionsfreien Überleben dar, was die Notwendigkeit neuer Therapieoptionen für *Bcl-2*-positive Patienten verdeutlicht (68).



### 1.1.4 Burkitt-Lymphom

Das Burkitt-Lymphom (BL) wird zu den aggressiven, reifen B-Zell-Lymphomen gezählt und gehört mit einem immunhistochemischen Proliferationsindex von knapp 100% zu den am schnellsten proliferierenden Tumoren (69). Es macht mit etwa 40-50% den Großteil der B-Zell-Lymphome im Kindesalter und mit weniger als 5% einen kleinen Anteil der Lymphome im Erwachsenenalter aus (70,71). Laut der Klassifikation der *World Health Organization* (WHO) lassen sich drei verschiedene Formen des Burkitt-Lymphoms mit unterschiedlichen klinischen, morphologischen und biologischen Merkmalen unterscheiden: eine sporadische Form, eine endemische und eine immundefiziente Form (72). In Deutschland tritt vor allem die sporadische Form in Erscheinung (73). Die endemische Form macht um die 50-70% aller kindlichen Tumore in Äquatorialafrika und Südamerika aus und betrifft dort insbesondere Kinder zwischen 4 und 7 Jahren, wobei vor allem eine Manifestation in Niere und Kiefer beobachtet werden kann (74,75). Es wird vermutet, dass die hohe geographische Inzidenz vor allem durch die Koinzidenz von Malaria und einem positiven Epstein-Barr-Virus-Status verursacht wird (76). Die immundefiziente Form ist in der Regel mit dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV) assoziiert (77).

Charakteristisch für alle drei Formen ist eine Translokation des *MYC*-Genes in der Region t(8;14)(q24.1;q32). Durch die Translokation wird der Transkriptionsfaktor *MYC* auf Chromosom 8 direkt neben einen Immunglobulin-Enhancer-Lokus auf Chromosom 14 transloziert und unterliegt dessen Transkriptionskontrolle (78). Infolgedessen kommt es zu einer vermehrten Aktivierung des Gens und zu einer ungehemmten Proliferation der entarteten B-Lymphozyten (79,80). Eine *MYC*-Überexpression ist essentiell, um die Diagnose des BL zu stellen. Sie tritt allerdings auch in anderen Entitäten, wie z.B. dem DLBCL, auf und ist somit nicht spezifisch für diese Erkrankung (81). Während zunächst eine Überexpression von Bcl-2 als Ausschlusskriterium für das Vorliegen eines BL galt, weiß man heutzutage, dass auch in einigen wenigen Fällen bei Patienten mit BL eine Bcl-2-Überexpression vorliegen kann (82). Im Vergleich zum DLBCL, in dem das simultane Vorliegen einer *MYC*-Translokation und der Bcl-2-Überexpression mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet ist, ist die Prognose einer Koexpression von *MYC* und Bcl-2 in BL-Zellen bis heute unklar (19).

Das BL im Erwachsenenalter geht bis heute mit einer deutlich schlechteren Prognose einher als das BL im Kindesalter. Während BL-Patienten bis zum 20. Lebensjahr ein mittleres 5-Jahresüberleben von 87% zeigten, konnte in erwachsenen BL-Patienten über dem 60. Lebensjahr ein 5-Jahresüberleben von nur 33% dargestellt werden (83). Aufgrund der schnellen Zellteilungsrate ist ein schneller Therapiebeginn in der Behandlung des BL essentiell

(84). Die Polychemotherapie mit Cyclophosphamid, Vincristin (Oncovin), Doxorubicin, Methotrexat, Ifosfamid, Etoposid und Cytarabin (CODOX-M/IVAC) plus Rituximab erzielte bei Kindern und bei Erwachsenen unter 60 Jahren eine Heilungsrate von über 80% (85). Bei älteren Patienten werden auch Therapien wie Rituximab plus Etoposid, Prednison, Vincristin, Cyclophosphamid und Hydroxydaunorubicin (R – EPOCH) erfolgreich eingesetzt (86). Bei Patienten ohne Metastasen im zentralen Nervensystem (ZNS) wird außerdem eine ZNS-Prophylaxe durchgeführt (87). Zwar konnte die Therapie des BL durch die Einführung von Rituximab in die herkömmliche Polychemotherapie deutlich verbessert werden, allerdings verfügen rezidivierende oder therapieresistente Patienten noch immer über keine effiziente Therapie (88). So verringert sich die Überlebensrate des BL im Kindesalter durch ein erstes Rezidiv von ursprünglich knapp 90% auf ca. 35% trotz zusätzlicher Therapie mit Rituximab (89–91). In retrospektiven Analysen zeigten erwachsene Patienten mit einem späteren Rezidiv mehr als sechs Monate nach Remission ein mittleres Gesamtüberleben von lediglich fünf Monaten. Währenddessen wurde in Patienten mit einem frühen Rezidiv von unter sechs Monaten nach Remission ein mittleres Gesamtüberleben von nur 1,4 Monaten beobachtet, was in beiden Fällen die Notwendigkeit neuer Therapieoptionen vor allem für rezidivierende Patienten verdeutlicht (92).

### **1.1.5 Akute lymphatische Leukämie der B-Zell-Reihe**

Je nach betroffener Zellreihe lassen sich Leukämien in myeloische und lymphatische Leukämien unterteilen. Außerdem unterscheidet man akute und chronische Verlaufsformen (93). Chronische Verlaufsformen sind eher im höheren Alter zu finden, bei Kindern spielen sie somit nur eine untergeordnete Rolle (94,95). Akute myeloische Leukämien (AML) treten vor allem im Erwachsenenalter auf und stellen mit nur 15% der Leukämien im Kindesalter einen kleinen Teil der Leukämieerkrankungen in dieser Altersgruppe dar (96). Mit 85% aller Leukämien tritt die akute lymphatische Leukämie (ALL) hingegen deutlich häufiger auf und stellt mit 25% aller Krebserkrankungen die häufigste maligne Erkrankung im Kindesalter dar (64). Betroffen sind vor allem Kinder zwischen dem 2. bis 5. Lebensjahr (96–98). Lymphatische Leukämien können ebenso wie die Lymphome in B-Zell- und T-Zell-Leukämien unterteilt werden (99). Sowohl im Kindes- als auch im Erwachsenenalter betreffen 75% der ALL die B-Zellen, während die T-Zellen mit ca. 25% seltener betroffen sind (100). Eine weitere Einteilung der unterschiedlichen Subtypen gelingt immunphänotypisch anhand der Untersuchung der verschiedenen CD-Marker, welche sowohl spezifisch für die jeweilige Zellreihe als auch für unterschiedliche Reifungsgrade sind (101,102) (Tabelle 1-2).

<b>B-Zell-ALL</b>		
<b>Subgruppe</b>	<b>Marker</b>	<b>Häufigkeit</b>
B-Linien-ALL	CD19+, CD79a+, CD22+	76%
Pro-B-ALL	CD10-	11%
Common ALL	CD10+	49%

**Tabelle 1-2: Einteilung und Häufigkeit der B-ALL-Subtypen.** Dargestellt sind die immunphänotypischen Charakterisierungsmerkmale der unterschiedlichen B-ALL-Subtypen mit der relativen Häufigkeit der Erkrankung. CD: cluster of differentiation, Ig: Immunglobulin. Basierend auf Gökbuget et al., 2018.

Die klinische Symptomatik der ALL ist vielseitig (103). Aufgrund der starken Proliferation der lymphatischen Vorläuferzellen im Knochenmark kann es im Verlauf zur Verdrängung der Hämatopoese weiterer Zellreihen kommen (104). Somit kann sich eine Leukämie, je nach betroffener Zellreihe, durch Anämien, Infektions- oder Blutungsneigungen bemerkbar machen (105). Häufig zeigen sich zu Beginn der Erkrankung Knochenschmerzen, die sich bei Kindern häufig als Gehverweigerung äußern (98). Durch eine extramedulläre Manifestation kann es außerdem zur Hepatosplenomegalie, Hodenvergrößerung, Lymphknotenschwellung oder einem Befall des ZNS mit neurologischen Symptomen wie Kopfschmerzen oder Hirnnervenausfällen kommen (106,107).

Das Auftreten einer B-ALL ist häufig mit denen in Tabelle 1-3 dargestellten chromosomalen Abnormalitäten und genetischen Alterationen assoziiert, welche die Differenzierung und Proliferation von lymphatischen Vorläuferzellen beeinflussen (108). Einige dieser Chromosomenveränderungen, die durch zytogenetische oder molekulargenetische Untersuchungen identifiziert werden können, sind sowohl von prognostischer Bedeutung als auch ausschlaggebend für die weitere Therapie in Bezug auf risikoadaptierte Therapiestrategien (109) (Tabelle 1-3).

Während die ALL vor einigen Jahrzehnten noch mit einer sehr schlechten Prognose assoziiert war und die Erkrankung schnell zum Tod führte, liegt die 5-Jahresüberlebensrate bei Kindern heutzutage bei über 80% (110). Ein Großteil der pädiatrischen ALL-Patienten in Deutschland wird nach den ALL-BFM(Berlin-Frankfurt-Münster)-Protokollen behandelt. Ein Fokus dieser Studie ist es, anhand klinischer und biologischer Risikofaktoren den Patienten eine risikoadaptierte Therapie zu gewährleisten und so die Therapie weiter zu optimieren (111).

Gen	Häufigkeit	Funktion	Prognose
iAMP21	2%	Transkriptionsfaktor	negativ
Hypodiploidie (≤ 45 Chromosomen)	3 bis 6%		negativ
TCF3/HLF [t(17;19)]	selten	Transkriptionsfaktor	negativ
BCR-ABL1 [t(9;22)]	25% bei Erwachsenen 2-4% bei Kindern	Tyrosinkinase	negativ
BCR-ABL1-ähnlich	10-20%	Unterschiedliche Funktionen, aber fast alle wirken als mitogene Signalwegsmoleküle	negativ
KMT2A(MLL)- Rearrangement [t(v;11q23.3)]	2 bis 10%, häufigste Leukämieform bei Kindern unter einem Jahr	Histonmethyltransferase	negativ
Hohe Hyperdiploidie (51-65 Chromosomen)	20-30% bei Kindern 5-10% bei Erwachsenen		positiv
ETV6-RUNX1 [t(12;21)]	25% bei Kindern	Transkriptionsfaktor	positiv
TCF3-PBX1 [t(1;19)]	2 bis 6%	Transkriptionsfaktor	positiv

**Tabelle 1-3: Genetische Veränderungen in der B-ALL mit prognostischem Wert.** Dargestellt sind die wichtigsten, prognostisch relevanten genetischen Abberationen der B-ALL. iAMP21: intrachromosomale Amplifikation von Chromosom 21, TCF3: Transkriptionsfaktor 3, HLF: hepatischer Leukämiefaktor, BCR: breakpoint cluster region, ABL1: Abelson murine leukemia 1, MLL: mixed lineage leukemia, ETV6: ETS translocation variant 6, RUNX1: Runt-related transcription factor 1, PBX1: Prä-B-Zell-Leukämie-Transkriptionsfaktor 1. Dargestellt nach Taylor et al., 2017.

Die Behandlung einer Leukämie lässt sich unterteilen in eine Induktionsphase zur Reduktion der Zellzahl mit dem Ziel einer Remission, eine Konsolidierungsphase, eine Reintensivierungsphase und eine Erhaltungstherapie (112). Zum Einsatz kommen in den verschiedenen Therapieabschnitten die Polychemotherapie, die intrathekale Gabe von Methotrexat und ggf. eine Schädelbestrahlung bei ZNS-Befall (111,113,114). Die Messung der minimalen Resterkrankung (MRD) stellt heutzutage den wichtigsten prognostischen Parameter dar (115). Durch dieses Verfahren lassen sich trotz morphologisch sichtbarer Remission im Knochenmark Leukämiezellen von unter 5% mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) nachweisen (116). Andersherum ist ein früher, fehlender

Nachweis der MRD im Knochenmark ein positiver prognostischer Faktor für das frühe Therapieansprechen und den weiteren Verlauf der Erkrankung (117). Bei Patienten mit einer Hochrisiko-Erkrankung kommt neben den oben genannten Therapiemöglichkeiten außerdem die allogene Stammzelltransplantation in Betracht (118).

Im Erwachsenenalter hingegen stellt die Therapie der ALL eine deutlich größere Herausforderung dar als im Kindesalter (119). In Anlehnung an das pädiatrische Modell einer risikostratifizierten Therapie mit Polychemotherapie wurden in den letzten 5 Jahren viele klinische Studien eingeleitet, um neuartige Therapien für die ALL im Erwachsenenalter zu untersuchen und zu optimieren (120). Der Standard in der Therapie der ALL wird durch die Studien und Expertenempfehlungen der *German multicenter study group for adult ALL* (GMALL) bestimmt. In den letzten Jahren konnten die Remissionsraten bei Erwachsenen so deutlich verbessert werden. Je nach Alters- und Risikogruppe liegen die Langzeitüberlebensraten bis zum Alter von 55 Jahren bei etwa 60-70%. (100,121). Ältere Patienten zeigen hingegen ein schlechteres Therapieansprechen, rezidivieren häufiger und haben eine geringere Überlebensrate im Vergleich zu jüngeren Patienten (122).

### 1.1.6 t(17;19)-ALL

Die ALL mit einer t(17;19)-Translokation betrifft weniger als 1% der B-Vorläufer-ALL im Kindesalter (123). Im Erwachsenenalter wurde sie bisher nur vereinzelt beschrieben (124). Sie ist mit einer besonders schlechten Prognose assoziiert und gilt bisher als unheilbar (125). Durch die Fusion des *Transkriptionsfaktors 3* (TCF3), einem Transkriptionsfaktor der Lymphozyten, und dem *hepatischen Leukämiefaktor* (HLF), einem Transkriptionsfaktor der hämatopoetischen Stammzellen, kommt es zur vermehrten Proliferation präleukämischer Zellen und somit zur Entstehung der Erkrankung (126). Bisher sind zwei verschiedene Aberrationen von TCF3-HLF bekannt, die durch unterschiedliche Fusionsarten der beiden Gene gekennzeichnet sind (127,128). Während eine der beiden Fusionsarten mit der vermehrten Entstehung einer disseminierten intravasalen Koagulopathie (DIC) assoziiert ist, entsteht bei der zweiten Fusionsart mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Hyperkalziämie durch die vermehrte Produktion des *Parathormon-related Peptide* (PTHrP), einem Hormon, was ähnlich wie das Parathormon der Nebenschilddrüsen den Kalziumspiegel im Blut erhöht (129,130). Beide Translokationen haben jedoch gemein, dass es durch einen Bruch im Transkriptionsfaktor TCF zu einer Veränderung der Lymphopoese und einer Hemmung der Apoptose kommt (125,131). Neben den allgemeinen Symptomen der ALL stellen aufgrund der oben genannten Translokationen darüber hinaus die Hyperkalziämie und die DIC vorherrschende Symptome der t(17;19)-ALL dar (132).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass das antiapoptotische Protein Bcl-2 in Leukämien mit einer t(17;19)-Translokation hochreguliert ist und somit eine erhöhte Sensitivität für spezifische Bcl-2-Inhibitoren vorweist, was einen therapeutischen Nutzen darstellen könnte (126,133). Gemäß einer Hochrisiko-ALL werden Patienten mit einer t(17;19)-Translokation derzeit protokollgerecht mit einer intensivierten Chemotherapie und gegebenenfalls einer allogenen Stammzelltransplantation behandelt, jedoch rezidivieren nach wie vor ein Großteil der Patienten oder sprechen gar nicht auf die Therapie an (125). Die Gründe für das geringe Therapieansprechen werden vielseitig vermutet. Zum einen konnte eine erhöhte Resistenz gegen herkömmliche ALL-Therapiesubstanzen der Induktionsphase, wie z.B. Vincristin, Daunorubicin und Glucocorticoide, nachgewiesen werden (123). Dies führt folglich zu einem schlechten Therapieansprechen auf die Induktionsphase des Therapieprotokolls. So konnte gezeigt werden, dass bei einem Großteil der Patienten mit einer t(17;19)-ALL nach der Induktionsphase weiterhin eine hohe MRD im Vergleich zu anderen ALL-Patienten im Kindesalter vorliegt (123,134). Die Verwendung monoklonaler Antikörper in der Behandlung der t(17;19)-ALL gehört derzeit nicht zur Standardtherapie. Es konnten jedoch erste Erfolge durch die zusätzliche Therapie mit dem bispezifischen Antikörper Blinatumomab gezeigt werden. So kam es durch die Hinzunahme des Antikörpers zur herkömmlichen Polychemotherapie mit anschließender Stammzelltransplantation zur vollständigen Remission in vier von neun in der Studie behandelten Patienten (135). Drei der vier Patienten zeigten auch nach drei Jahren weiterhin einen negativen MRD-Status, während Patienten in der Regel innerhalb von zwei Jahren nach Diagnosestellung ein Rezidiv erleiden und versterben (135,136). Aufgrund mangelnder Therapieoptionen für Patienten mit einer t(17;19)-ALL wird derzeit neben der Immuntherapie vermehrt Hoffnung auf die Verwendung spezifischer Signalweg-Inhibitoren gesetzt (137). Aufgrund der erhöhten Expression von Bcl-2 wird zudem eine hohe Wirksamkeit von Venetoclax in der t(17;19)-ALL vermutet, was im Verlauf in Studien untersucht werden sollte.

### 1.2 Antikörper in der Krebstherapie

Neben den herkömmlichen Behandlungsverfahren hämatologischer Neoplasien, wie z.B. der Chemotherapie und der Bestrahlung, haben zielgerichtete Therapieoptionen in den letzten Jahrzehnten stark an Bedeutung gewonnen (138). So konnte sich die antikörperbasierte Krebstherapie als großer Fortschritt in der Behandlung hämatologischer Neoplasien und solider Tumore etablieren (139). Der Vorteil der zielgerichteten Antikörpertherapie im Vergleich zur herkömmlichen Chemotherapie besteht darin, dass Antikörper Zielproteine binden, die sich in der Regel nicht ubiquitär auf einer Vielzahl an Zellen befinden, sondern spezifisch auf der Oberfläche einer bestimmten Zell- oder Gewebeart exprimiert werden (140). Dies verringert in der Regel die Nebenwirkungen im Vergleich zu den Zytostatika, die meist unspezifisch auf proliferierende Zellen oder proliferierendes Gewebe wirken (141). Aufgrund der zellspezifischen Zielstrukturen, wie z.B. den CD-Oberflächenmarkern, deren Expression häufig auf einen Zelltyp beschränkt ist, eignen sich eine Vielzahl an Antikörpern gezielt für die Behandlung von hämatologischen Erkrankungen (142).

#### 1.2.1 Antikörpertherapien bei hämatologischen Erkrankungen

Derzeit sind weit über 100 monoklonale Antikörper von der *Food and Drug Administration* (FDA), der Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelbehörde der Vereinigten Staaten von Amerika, für unterschiedliche Behandlungszwecke zugelassen. Bisher wurden 15 dieser Antikörper für die Behandlung hämatologischer Neoplasien zugelassen (Stand August 2021) (Tabelle 1-4).

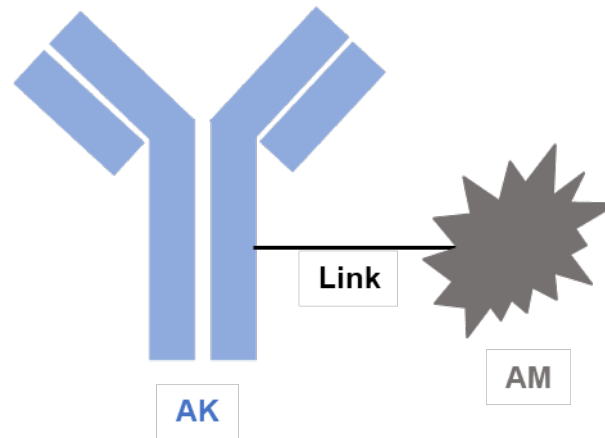
In der Immuntherapie der Krebserkrankungen kommen meistens IgG-Antikörper zum Einsatz, die als Homodimere aus jeweils zwei Heterodimeren mit einer leichten und einer schweren Kette bestehen (124). Man unterscheidet dabei zwischen dem *antigen binding*(Fab)-Fragment und dem *constant*(Fc)-Fragment, wobei das Fab-Fragment über variable Regionen verfügt, die Zielstrukturen oder Antigene binden können (125). Die variablen Regionen (Fv) des Fab-Fragments sind verantwortlich für die direkte Interaktion mit den jeweiligen Antigenen, während das Fc-Fragment die Interaktion mit Immunzellen übernimmt (126).

Antikörper	Produktname	Zielstruktur	Indikation	Zulassung
Tafasitamab	Monjuvi	CD19	DLBCL in Kombination mit Lenalidomid	2020
Daratumumab und Hyaluronidase	Darzalex Faspro	CD38	Multipl. Myelom	2020
Isatuximab	Sarclisa	CD38	Multipl. Myelom	2020
Mogamulizumab	Poteligeo	CD194	Kutane T-Zell-Lymphome	2018
Pembrolizumab	Keytruda	PD1-Rezeptor der T-Zellen	cHL, PMBCL	2017
Rituximab und Hyaluronidase	Rituxan Hycela	CD20	FL, DLBCL, CLL	2017
Nivolumab	Opdivo	PD1-Rezeptor	cHL	2016
Daratumumab	Darzalex	CD38	Multipl. Myelom	2015
Elotuzumab	Empliciti	CD319	Multipl. Myelom	2015
Blinatumumab	Blinicyto	CD19	Vorläufer-B-ALL	2014
Obinutuzumab	Gazyva	CD20	CLL	2013
Ofatumumab	Arzerra	CD20	CLL	2009
Tositumumab	Bexxar	CD20	NHL	2003
Alemtuzumab	Lemtrada	CD52	B-CLL	2001
Rituximab	Rituxan	CD20	B-NHL	1997

**Tabelle 1-4: Übersicht der von der FDA für die Therapie hämatologischer Neoplasien zugelassenen Antikörper (Stand August 2021).** Bis August 2021 wurden insgesamt 15 Antikörper für die Behandlung hämatologischer Erkrankungen zugelassen. DLBCL: diffus großzelliges B-Zell-Lymphom, cHL: klassisches Hodgkin-Lymphom, PMBCL: primär mediastinales B-Zell-Lymphom, FL: folliculäres Lymphom, CLL: chronische lymphatische Leukämie, NHL: Non-Hodgkin-Lymphome, PD1: programmed cell death protein 1. Basierend auf der Animal Cell Technology Industrial Plattform (ACTIP) und dem *Approved Drugs Report* der FDA.

Neben den oben benannten Antikörpern stellen sogenannte Antikörperkonjugate einen höchstpotenten, vielversprechenden Therapieansatz dar (143). Dabei handelt es sich um Biopharmazeutika, in denen ein funktionales Molekül, beispielsweise ein Zytostatikum oder ein Radionuklid, mittels einer kovalenten Bindung an einen Antikörper gekoppelt wird (144,145) (Abb. 1-5).





**Abbildung 1-5: Schematische Darstellung eines Antikörperkonjugats.** Ein monoklonaler, gegen ein spezifisches Tumorantigen gerichteter Antikörper wird an ein zytotoxisches Arzneimittel gekoppelt. Die Anzahl der verschiedenen Arzneimittel variiert je nach Konjugat. AK: Antikörper, Link: Verbindungsstück, AM: zytotoxisches Arzneimittel. Abgewandelt nach Caron et al., 2015.

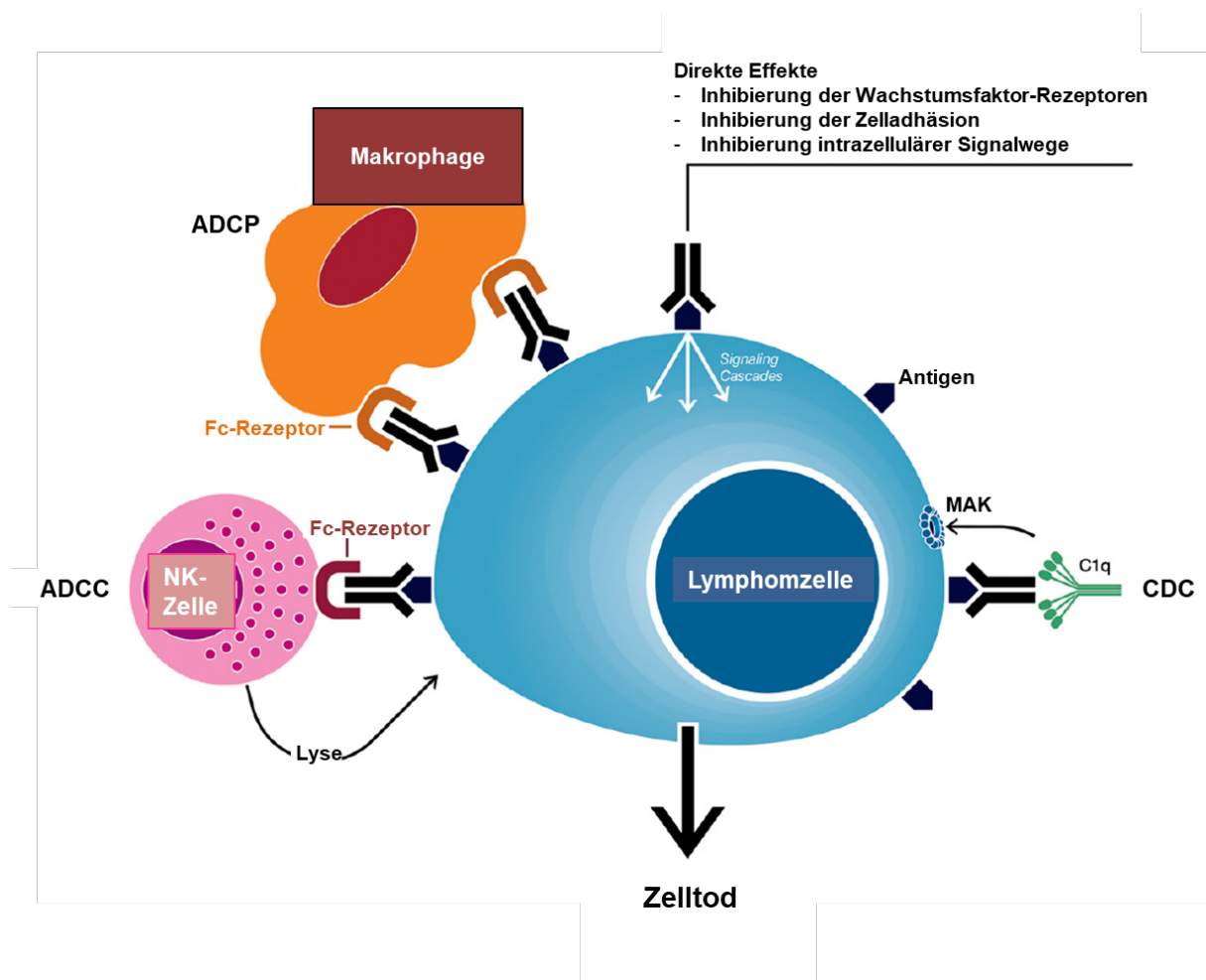
Im Jahr 2000 wurde mit Gemtuzumab-Ozogamicin erstmals ein Antikörperkonjugat für die Behandlung der akuten myeloischen Leukämie von der FDA zugelassen (146). Bis heute folgte die Zulassung von insgesamt acht weiteren Antikörperkonjugaten für die Behandlung hämatologischer Erkrankungen.

### 1.2.2 Wirkmechanismen therapeutischer Antikörper

Die Wirkmechanismen von Antikörpern sind vielseitig und lassen sich in direkte und indirekte Effekte unterteilen (123). Im Rahmen der direkten Effekte sind monoklonale Antikörper in der Lage, durch die direkte Bindung auf eine Zielzelle zu wirken. Diese Bindung ermöglicht beispielsweise eine Blockierung oder Verstärkung bestimmter intrazellulärer Signalwege. Durch eine Blockade des Rezeptors oder der Rezeptordimerisierung kann beispielsweise die Zellproliferation gestoppt und die Apoptose eingeleitet werden. So gelingt es dem Antikörper Cetuximab, der gegen den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) gerichtet ist und für die Brustkrebstherapie verwendet wird, durch die direkte Bindung an seinen Liganden mittels Blockade der Rezeptordimerisierung, intrazelluläre Signalwege zu inhibieren und das Tumorwachstum somit zu verlangsamen bzw. zu blockieren (147). Des Weiteren konnte unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers MoAb34, einem gegen den Erythropoietin(EPO)-Rezeptor der Erythrozyten gerichteten Antikörper, mittels Initiierung der Rezeptordimerisierung eine EPO-abhängige Aktivierung der Erythrozytenproliferation erzielt werden (148). Dies deutet darauf hin, dass monoklonale Antikörper neben der Blockade der Rezeptordimerisierung ebenfalls die gezielte Induktion der Dimerisierung vermitteln können.

Weitere direkte Effekte konnten bereits für den CD20-Antikörper Rituximab beschrieben werden. Beispiele hierfür sind die Inhibition der Zellproliferation, die Induktion von Apoptose und Autophagie und die Sensibilisierung der Zielzellen auf Chemotherapie und Bestrahlung mittels Herunterregulierung antiapoptotischer Proteine, wie z.B. Bcl-2 (149,150). Der CD38-Antikörper Daratumumab ist zudem in der Lage, mittels Kreuzvernetzung von Oberflächenantigenen die Apoptose zu induzieren (151).

Die indirekten Effekte werden über den Fc-Teil des Antikörpers vermittelt (152). Sie beruhen auf dem Prinzip, dass ein Antikörper mit Unterstützung von Effektorzellen, wie zum Beispiel mononukleären oder polymorphen Zellen, den Zelltod der Zielzelle herbeiführen kann (153). Die drei Kernmechanismen der Antikörperwirkung lassen sich unterteilen in die antikörperabhängige Zellzytotoxizität (ADCC), die komplementabhängige Zytotoxizität (CDC) und die antikörperabhängige Zellphagozytose (ADCP) (154) (Abb. 1-6).



**Abbildung 1-6: Schematische Darstellung der Antikörpermechanismen am Beispiel einer Lymphomzelle.** Die Wirkmechanismen therapeutischer Antikörper lassen sich in direkte und indirekte Effekte unterteilen. Monoklonale Antikörper können die Eliminierung von Lymphomzellen mittels antikörperabhängiger Zytotoxizität (ADCC), komplementabhängiger Zytotoxizität (CDC) und antikörperabhängiger Zellphagozytose (ADCP) initiieren. Abgewandelt nach Van De Donk et al., 2016.

Die Rekrutierung der Effektorzellen erfolgt über die Interaktion zwischen dem Fc-Teil des Antikörpers und dem Fc-Rezeptor der Effektorzellen. Je nach Effektorzelle besitzen diese unterschiedliche Fc-Rezeptoren mit unterschiedlicher Affinität zum Antikörper (155) (Tabelle 1-5). Diese Rekrutierung der Effektorzellen durch monoklonale Antikörper kann sowohl T-Zell-abhängig als auch T-Zell-unabhängig erfolgen. So sind die T-Zellen in der Lage, mittels Zytokinausschüttung die Effektorzellen zusätzlich zu aktivieren (156).

Rezeptor		Affinität für Ig-Subklassen	Zelltyp	Effektor-mechanismen
FcγRI (CD64)		Hoch	Monozyten, Makrophagen, aktivierte Neutrophile, dendritische Zellen	Phagozytose, ADCC
FcγRII (CD32)	FcγRIIa	niedrig	Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, Thrombozyten, Neutrophile	ADCP, Ausschüttung von zytotoxischen Granula
	FcγRIIb	niedrig	Monozyten, Makrophagen, B-Zellen, dendritische Zellen, Neutrophilen, Mastzellen	ADCP, Stimulationsinhibition
	FcγRIIc	niedrig	NK-Zellen	ADCP, Entfernung von Immunkomplexen
FcγRIII (CD16)	FcγRIIIa	niedrig	NK-Zellen, Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen	ADCC
	FcγRIIIb	niedrig	Neutrophile, Mastzellen, Eosinophile	Durch Immunkomplex-induzierte Sekretion von toxischen Substanzen

**Tabelle 1-5: Übersicht der humanen Fc-Rezeptoren als Zielmoleküle für IgG-Antikörper.** Der FcγRI stellt den einzigen Fc-Rezeptor mit einer hohen Affinität zu IgG-Antikörpern dar. CD: Cluster of differentiation, FcγR: Fcγ-Rezeptor. Basierend auf Li und Kimberly, 2014.

Im Rahmen der CDC kommt es durch die Aktivierung der Komplementkaskade zur Lyse der Zielzelle. Das Komplementsystem wird dem angeborenen Immunsystem zugeordnet und besteht aus einer Kaskade aus sich gegenseitig aktivierenden Proteinen mit dem Ziel, pathogene Zellen oder Erreger zu eliminieren. Zentraler Bestandteil der Endstrecke stellt die Bildung eines Membran-Angriff-Komplexes (MAK) dar, der durch eine Porenbildung in der Membran zur Zellyse führen kann (157). Des Weiteren haben Antikörper im Rahmen der ADCC die Möglichkeit, Zellen des angeborenen Immunsystems, wie zum Beispiel die natürlichen Killer(NK)-Zellen, zu rekrutieren und über die Freisetzung proteolytischer Enzyme oder reaktiver Sauerstoffmoleküle den Tod der Zielzelle herbeizurufen (158). Zu diesen zytotoxischen Proteinen zählen zum einen die Perforine, die zunächst in der Zellmembran der Zielzelle eine Pore bilden. Außerdem werden Granzyme freigesetzt, die durch diese Pore in das Innere der Zelle gelangen und dort die Apoptose auslösen können (159). Neben der Rekrutierung von NK-Zellen sind Antikörper auch in der Lage, vermehrt Makrophagen zu rekrutieren und somit im Rahmen der ADCP die Zielzellen zu phagozytieren (160). Durch die Bindung des Antikörpers an einen Fc-Rezeptor kommt es zur Bildung eines Phagosoms und somit zur Eliminierung des Pathogens (161).

Im Vergleich dazu bindet der Antikörper eines Antikörperkonjugats seine Zielstruktur in erster Linie dazu, um das von ihm gebundene Pharmakon in die Nähe der Zielzelle zu transportieren (162). Durch Bindung des Antikörpers an sein Antigen kann es zur Internalisierung des Konjugats kommen (163,164). Im Inneren der Zelle wird das Arzneimittel schließlich aus der Bindung entlassen und initiiert somit spezifischer als herkömmliche Zytostatika den Zelltod der Zielzelle (165).

### **1.2.3 Mechanismen der Phagozytose**

Die Phagozytose dient dazu, mittels professioneller Fresszellen, wie z.B. den Makrophagen, größere Pathogene mit einem Durchmesser von über 0,5 µm aufzunehmen und zu eliminieren (166). Definitionsgemäß bezeichnet die Phagozytose die Aufnahme von festen Partikeln mit anschließendem intrazellulären Abbau in einem mit einer Plasmamembran umgebenen Vesikel, welcher auch als Phagosom bezeichnet wird (167).

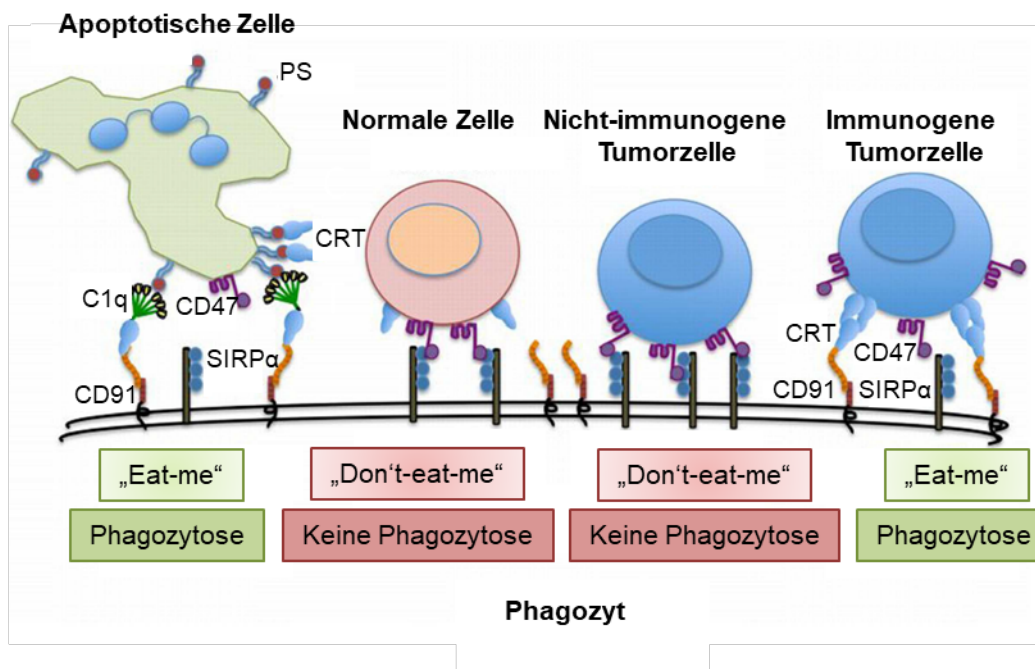
Phagozyten lassen sich in professionelle und nicht-professionelle Phagozyten unterteilen. Während zu den professionellen Phagozyten unter anderem Monozyten, Makrophagen, neutrophile Granulozyten und dendritische Zellen gezählt werden, werden Zellen des Gewebes, wie z.B. Epithelzellen und Fibroblasten, als nicht-professionelle Phagozyten eingeordnet (168). Neben der Abwehr von Pathogenen sind professionelle Phagozyten

außerdem in der Lage, apoptotische Zellen zu eliminieren und tragen somit elementar zu Gewebemöostase bei, indem sie täglich mehrere Millionen Zellen mit hoher Effizienz abbauen (169). Um eine Zelle zu phagozytieren, muss der Phagozyt diese zunächst erkennen und über Rezeptoren binden. Diese Erkennung wird anhand einer Vielzahl an unterschiedlichen Rezeptoren auf der Plasmamembran von Phagozyten vermittelt, die sich in opsinabhängige und opsinunabhängige Rezeptoren unterteilen lassen und spezifische Strukturen auf den Zielzellen binden (167).

Opsinunabhängige Rezeptoren können Merkmale bzw. Oberflächenstrukturen, wie z.B. die Lipoteichonsäure einer Bakterienzellwand, direkt auf den zu phagozytierenden Zielzellen mittels sogenannter *Pattern Recognition Receptors* (PRRs) erkennen (170). So ist der membranständige Mannose-Rezeptor auf der Oberfläche der Phagozyten beispielsweise in der Lage, endständige Mannose-Moleküle der Glykanketten auf pathogenen Mikroorganismen zu erkennen und somit die Phagozytose des Pathogens zu initiieren (171). Bei der opsinabhängigen Phagozytose werden Pathogene zunächst durch körpereigene Substanzen, wie z.B. Komplementfaktoren oder Immunglobuline, markiert und so erkannt (170). So können Partikel z.B. durch Immunglobulin G (IgG) opsoniert und erkennbar gemacht werden (172). Durch die Erkennung und Bindung des Zielmoleküls über die besagten Rezeptoren kommt es zur Aktinstrukturierung der Phagozyten und zur Ausbildung eines Phagosoms (173). Es folgt schließlich die Aufnahme der Pathogene in Phagosomen, die anschließend mit den Lysosomen der Zelle fusionieren und somit zerstört werden (174). Zelluläre Bestandteile, wie z.B. Aminosäuren, Nukleotide, Fettsäuren und Monosaccharide, werden aus den Lysosomen freigesetzt und wiederverwendet, um neue Makromoleküle herzustellen (175).

Die Phagozytoseaktivität der Phagozyten wird zudem durch aktivierende und inhibierende Signale gesteuert. Entscheidend ist dabei das Gleichgewicht von sogenannten „Eat-me“- und „Don't-eat-me“-Signalen. Dieses Gleichgewicht entscheidet darüber, ob Phagozytose stattfindet oder nicht (176) (Abb. 1-7). „Eat-me“-Signale lassen sich in membranverankerte und lösliche Moleküle unterteilen (177). Die Translokation des Phospholipids Phosphatidylserin (PS) an die Außenseite der Zellmembran stellt derzeit eines der am besten charakterisierten membrangebundenen „Eat-me“-Signale dar (178). Normalerweise befindet sich das PS auf der Membraninnenseite einer lebenden Zelle und wird durch das Enzym Flippase dort gehalten (179). Kommt es zur Apoptose der Zelle, katalysiert das Enzym Scramblase den Austausch zwischen der inneren und äußeren Zellmembran (180). An der äußeren Zellmembran dient das PS nun als Signal zur Phagozytose für die Makrophagen. Des Weiteren führen die bei der Opsonierung der Zielzelle verwendeten Immunglobuline und Komplementfaktoren über die Bindung durch den Fc-Rezeptor und den Komplementrezeptor

zur Aktivierung der Phagozytose und agieren somit als „Eat-me“-Signale (175).



**Abbildung 1-7: Unterbrechung des „Don't-eat-me“-Signals auf Tumorzellen.** Zellen exprimieren den „Don't-eat-me“-Oberflächenmarker CD47 auf ihrer Zelloberfläche, welcher das auf Phagozyten exprimierte SIRP $\alpha$  binden kann und somit die Apoptose verhindert. Während der Phagozytose exprimieren Zellen vermehrt das „Eat-me“-Protein Phosphatidylserin, welches mit dem Komplementfaktor C1q und dem Protein Calreticulin direkt interagieren kann. Calreticulin kann wiederum eine Überbrückung zwischen C1q und dem Oberflächenprotein CD91 auf den Phagozyten schaffen und somit die Aufnahme der Zielzelle in der Phagozytose verbessern. Nicht-immunogene Tumore haben erhöhte Mengen CD47 auf ihrer Zelloberfläche exprimiert, um so die Phagozytose zu verhindern. Immunogene Tumorzellen besitzen wiederum eine erhöhte Calreticulin-Expression auf ihrer Zelloberfläche, um so als „Eat-me“-Signal die Phagozytose zu erhöhen. CD: cluster of differentiation, CRT: Calreticulin, PS: Phosphatidylserin, SIRP $\alpha$ : signal-regulatory protein  $\alpha$ . Abgewandelt nach Wiersma et al., 2015.

Den Phagozytose-aktivierenden „Eat-me“-Signalen stehen die Phagozytose-hemmenden „Don't-eat-me“-Signale gegenüber (181). Einer der prominentesten Signalwege der Phagozytosehemmung stellt die CD47/Signal-regulatory protein(SIRP) $\alpha$ -Achse dar (182). Das CD47 der Zielzelle und das SIRP $\alpha$  auf den Makrophagen können mittels direkter Bindung interagieren und führen so zu einer Hemmung der Makrophagenaktivierung, vorausgesetzt ihr Signal überwiegt dem der aktivierenden Rezeptoren (183,184). Es konnte somit bereits *in vivo* gezeigt werden, dass Erythrozyten ohne CD47 deutlich schneller in der Milz abgebaut wurden als Erythrozyten mit CD47 auf der Zelloberfläche, was sich auf die Bindung mit SIRP $\alpha$  zurückführen lässt (185). So verhindert die CD47/SIRP $\alpha$ -Achse zum einen den vorzeitigen Abbau gesunder, körpereigener Zellen durch Makrophagen (186). Auf der anderen Seite kann CD47 jedoch auf Lymphom- und Leukämiezellen überexprimiert vorliegen und hindert somit fälschlicherweise die körpereigene Tumorabwehr am Abbau der entarteten Blutzellen (187). Aufgrund dieser Tatsache gewinnt die Identifizierung sogenannter Schlüsselmoleküle der Phagozytose zunehmend an Bedeutung (188). Die zielgerichtete Behandlung von

Kontrollpunkten der Phagozytose, wie z.B. der Blockade der CD47/SIRP $\alpha$ -Achse, stellt mittlerweile einen neuen, vielversprechenden Therapieansatz dar (189). So ist bereits bekannt, dass die Beseitigung von ALL-Blasten durch die Behandlung mit einem modifizierten CD19-Antikörper vor allem auf der Initiierung der Phagozytose basiert. Zudem konnte eine Verlängerung der Überlebenszeit im Mausmodell unter der Therapie mit dem modifizierten CD19-Antikörper im Vergleich zur Kontrollgruppe gezeigt werden. Im Rahmen der Studie konnte bestätigt werden, dass es durch die Behandlung mit dem Antikörper zu einer vermehrten Aktivierung von Makrophagen kommt, was die Phagozytose als relevanten Mechanismus sowohl *in vitro* als auch *in vivo* weiter bestätigen konnte (190).

### 1.2.4 Modifikation von monoklonalen Antikörpern

Zwar konnte in den letzten beiden Jahrzehnten die Krebstherapie durch die Zulassung neuer Antikörper signifikant verbessert werden, allerdings gibt es noch immer Patienten, die von den vorhandenen Therapieoptionen nicht ausreichend profitieren (190). Da der Großteil der Effektormechanismen monoklonaler Antikörper über den Fc-Rezeptor vermittelt wird und von diesem abhängig ist, stellt das sogenannte Fc-Engineering aktuell einen vielversprechenden Ansatz im Rahmen der Antikörperforschung dar (191). Hierbei soll mittels gezielter Modifikation der Zucker- und Proteinstrukturen eines Antikörpers, dem sogenannten Gluco- bzw. Proteinengineering, eine gesteigerte Effektivität der Antikörperwirkung erreicht werden (192).

Durch die Modifikation der Fc-Region bereits verfügbarer Antikörper kann die Induktion der indirekten Antikörpereffekte, wie z.B. ADCC oder CDC, gesteigert werden, indem so zum Beispiel die Bindungsstärke des Fc $\gamma$ -Rezeptors um ein Vielfaches verbessert werden kann (192,193). Als Beispiel des Glucoengineerings konnte der CD20-Antikörper Obinutuzumab (GA-101) als humanisierter IgG1-Antikörper durch die Defucosylierung seiner verzweigten Zuckerkette in der CH2-Domäne des Antikörpers zu einer stärkeren Bindung an den Fc $\gamma$ RIIIa-Rezeptor und somit sowohl zu einer vermehrten Vermittlung vom direkten Zelltod sowie von der ADCC und ADCP im Vergleich zu Rituximab führen (194). Bei der Defucosylierung handelt es sich um die Abspaltung einer Fucosegruppe, wodurch die Bindungsaffinität des Fc-Fragmentes zum Fc-Rezeptor in diesem Fall um das 50-fache gesteigert werden konnte (195). Durch die Behandlung mit Obinutuzumab konnte bei Patienten mit follikulärem Lymphom ein längeres progressionsfreies Intervall als durch Behandlung mit Rituximab erreicht werden (196). Der Antikörper wurde 2013 in Kombination mit Chlorambucil für die Behandlung der chronischen lymphatischen Leukämie und in Kombination mit Bendamustin für die Behandlung des follikulären Lymphoms zugelassen (197,198).

Als Beispiel des Proteinengineerings konnte an dem CD19-Antikörper MOR208 durch das Austauschen der hydrophilen Abschnitte der CH2- und CH3-Domäne des Antikörpers durch Alanin die Affinität zum Fc-Rezeptor und die Rekrutierung von NK-Zellen verbessert werden (74). So konnten durch die Applikation des Antikörpers *in vitro* eine Verbesserung der ADCC im Vergleich zum herkömmlichen CD19-Antikörper gezeigt werden (199). Vor allem in der Behandlung von therapierefraktären und rezidivierenden DLBCL zeigte sich der Antikörper als besonders wirksam und wurde 2020 in Kombination mit Lenalidomid für die Behandlung des DLBCL von der FDA zugelassen (200). Als weitere Möglichkeit der Antikörpermodifikation können die Verfahren außerdem kombiniert werden und somit Glyko- und Protein-modifizierte Antikörper hergestellt werden (193).

Nach wie vor stellen therapierefraktäre und rezidivierende Patienten sowie der Wirkungsverlust im Lauf der Antikörpertherapie eine große Herausforderung im Rahmen der antikörperbasierten Therapie dar. Die benannten Beispiele zeigen, dass es mittels Optimierung monoklonaler Antikörper möglich ist, Antikörpertherapien weiter zu verbessern. Aufgrund dieser Tatsache stellt die Weiterentwicklung bereits generierter Antikörper einen großen Meilenstein in der aktuellen Antikörperforschung dar und sollte im Verlauf weiter verfolgt werden.



## 2 Fragestellung

In den letzten Jahren konnte die antikörperbasierte Krebstherapie große Erfolge in der Behandlung hämatologischer Erkrankungen erzielen (139). Die zusätzliche Inhibition spezifischer Signalwegsmoleküle in Kombination mit monoklonalen Antikörpern stellt eine vielversprechende Therapieoption dar und konnte bereits bei einigen hämatologischen Erkrankungen etabliert werden (201). Einige Subgruppen hämatologischer Erkrankungen weisen klonale Chromosomenabberationen auf, die zum einen eine prognostische Relevanz haben, auf der anderen Seite allerdings auch Zielstrukturen für Signalweg-Inhibitoren darstellen und somit die Prognose durch die zielgerichtete Therapie langfristig verbessern können (202–204). Leukämie- und Lymphomentitäten, die mit einer Bcl-2-Überexpression vergesellschaftet sind, sind trotz Verbesserung der Therapieoptionen nach wie vor durch eine schlechte Prognose gekennzeichnet (205). So ist bereits bekannt, dass Patienten mit einem Bcl-2-positiven DLBCL eine deutlich schlechtere Prognose vorweisen als Patienten ohne Bcl-2-Überexpression (12). Vor allem ALL-Patienten mit einer t(17;19)-Translokation verfügen nach wie vor über eine infauste Prognose.

Das zentrale Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss des spezifischen Bcl-2-Inhibitors Venetoclax auf die Effektivität der therapeutischen Antikörper Rituximab (CD20), Daratumumab (CD38) und CD19-DE, einen im Fc-Teil durch Aminosäureaustausch modifizierten CD19-Antikörper, zu untersuchen. Wir stellten zunächst die Arbeitshypothese auf, dass die Kombination von niedrig dosiertem Venetoclax mit den genannten Antikörpern zu einer verbesserten Induktion der indirekten Antikörpermechanismen führen würde. Ein verbessertes Therapieoutcome durch die Kombination aus Venetoclax und Rituximab bei der Behandlung der CLL konnte bereits für therapierefraktäre und rezidierte Patienten gezeigt werden. Eine Übertragung dieser Therapieoption auf weitere Lymphom- und Leukämieentitäten mit Bcl-2-Überexpression wird zwar vermutet, wurde bisher allerdings nicht untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher die folgenden spezifischen Ziele verfolgt: Zunächst wurde die Wirksamkeit von Venetoclax auf die Zellviabilität und das Zellwachstum von DHL-Zellen sowie von Patienten stammende Xenotransplantate (PDX) des Burkitt-Lymphoms und der t(17;19)-ALL untersucht. In einem nächsten Schritt sollte die Wirksamkeit von Venetoclax auf die Wirksamkeit von Rituximab, Daratumumab und CD19-DE *in vitro* betrachtet werden. Hierfür erfolgte die Untersuchung des Einflusses von Venetoclax auf die antikörperabhängigen Immunmechanismen. Schließlich erfolgte die Untersuchung der Wirksamkeit von Venetoclax auf die Wirksamkeit von Rituximab und CD19-DE *in vivo* im NSG-Mausmodell.

## Fragestellung

---

Aufgrund der schlechten Prognose stellt die Identifizierung neuer Therapiestrategien einen wichtigen Grundsatz für die Behandlung Bcl-2-positiver Neoplasien dar. Die in dieser Promotionsarbeit erlangten Ergebnisse sollen dazu beitragen, effizientere antikörperbasierte Therapiestrategien für die Behandlung von Bcl-2-überexprimierenden B-Zell-Lymphomen und der t(17;19)-ALL zu erhalten.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Verwendete Zelllinien

Name	Beschreibung	Referenz
CARNAVAL	Humane Zelllinie aus dem Pleuraerguss eines Patienten mit DLBCL	DSMZ (ACC 724)
WILL-2	Humane Zelllinie aus der Aszites eines Rezidivs einer 63-jährigen Japanerin mit DLBCL	DSMZ (ACC 652)
t(17;19)-ALL-PDX	PDX-Zellen eines Patienten mit t(17;19)-ALL aus der ALL-BFM-Studiengruppe in Kiel	ALL-BFM-Studienregister
BL-PDX	PDX-Zellen einer Burkitt-Lymphom-Patientin aus Kiel	NHL-BFM-Studienregister

##### 3.1.2 Mäuse

Stamm	Hersteller
NOD.Cg-Prkdc <sup>scid</sup> Il2rgtm1Wjl/SzJ	Charles River Laboratories, Wilmington, USA

##### 3.1.3 Puffer und Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
<sup>51</sup> Natriumchromat, 185 Mbq/ml (5mCi/ml)	Hartmann Analytic, Braunschweig, D
Acrylamid	Altmann Analytik, München, D
Ammoniumperoxodisulfat	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Cell Dissociation Buffer	Gibco™/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Destilliertes Wasser	Gibco™/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Th. Geyer, Renningen, D
Dulbecco's MEM(DMEM)-Medium	Gibco™/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

## Material und Methoden

---

Dulbecco´s Phosphate Buffered Sialine (1x)	Gibco™/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Dulbecco´s Phosphate Buffered Sialine (10x)	Gibco™/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
EDTA	Carl Roth, Karlsruhe, D
Ethanol	Th. Geyer, Renningen, D
FACS-Puffer	Becton, Dickinson and Company (BD), Franklin Lakes, USA
Fetales Kälber Serum (FCS)	Life Technologies, Carlsbad, USA
Ficoll-Paque PLUS	Merck KGaA, Darmstadt, D
Glycin	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe, D
Magermilchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, D
M-CSF	PeproTech, Hamburg, D
Methanol	Th. Geyer, Renningen, D
Millipore (Wasser)	Merck Millipore, Darmstadt, D
Monocyte-Attachment-Medium	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, D
NP40	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Optiphase Supermix	Perkin Elmer, Waltham, USA
Penicillin und Streptomycin (PenStrep)	Biochrom, Cambridge, GB
Proteaseinhibitor	Roche, Basel, CH
RPMI1640-Medium	Biochrom, Cambridge, GB
SDS	Carl Roth, Karlsruhe, D
Tris	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Triton-X 100	Merck KGaA, Darmstadt, D
Trypan Blue Solution 100 ml	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Tween20	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
X-vivo-Medium	Lonza AG, Visp, CH

### 3.1.4 Verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller
1450 MicroBet TriLux. LSC & Luminescence Counter	Perkin Elmer, Waltham, USA
AF 206 Eismaschine	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, USA
Durchflusszytometer BD Accouri™ C6	Becton, Dickinson and Company (BD), Franklin Lakes, USA
Eppendorf Research ® Mehrkanal 300	Eppendorf, Hamburg, D
Eppendorf Multipette Plus	Eppendorf, Hamburg, D
Fluoreszenzmikroskop Eclipse 50i	Nikon GmbH, Düsseldorf, D
Galaxy Mino Zentrifuge	VWR, Darmstadt, D
Gel Doc™ XR+	System Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Heraeus Multifuge 3s+ Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Heraeus Megafuge 1.0R Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Heraeus Multifuge 4KR Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
IKA Magnetührer C-MAG MS 10	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau, D
IKA Vortex Genius 3	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau, D
Kipp-/Rollenmischer Stuart SRT 9	Stuart Scientific, Staffordshire, GB
Kühlzentrifuge Allegra™ X-22 R	Beckmann Coulter, Brea, USA
Lichtmikroskop Axioskop 40	Carl Zeiss AG, Oberkochen, D
Mini-PROTEAN Tetra Cell Casting Stand & Clamps	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Mini-PROTEAN ® Tetra Handcast System	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Neubauer-Zählkammer	Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim, D
Photometer BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg, D
Pipette Reference ® Pipette 0,1-2,5 µl	Eppendorf, Hamburg, D
Pipette Reference ® Pipette 0,5-10 µl	Eppendorf, Hamburg, D
Pipette Reference ® Pipette 2-20 µl	Eppendorf, Hamburg, D
Pipette Reference ® Pipette 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg, D
Pipettierhelfer accu-jet ® pro	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, D
PowerPac™ HC Universal Power Supply	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA

Sicherheitswerkbank für Mausearbeiten: Heraeus HERASafe® Sicherheitswerkbank	Heraeus, Hanau, D
Sicherheitswerkbank für Zellkulturen: Scanlaf Mars Safety Class 2	Labogene, Lyngø, Dänemark
Titramax 101 Orbitalschüttler	Heidolph Instruments, Schwabach, D
Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, USA
Wasserbad	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Wipptisch Rocker 25	Labnet International, Edison, USA
XB 120a Waage	Precisa Gravimetrics, Dietikon, CH
XB 2200C Waage	Precisa Gravimetrics, Dietikon, CH
Zellkultur Inkubator INCO 153	Memmert GmbH + Co KG, Schwabach, D
Zentrifuge Centrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge Centrifuge 5810	Eppendorf, Hamburg, D

### 3.1.5 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
6-well-Platte (flacher Boden)	Sarstedt, Nümbrecht, D
12-well-Platte (flacher Boden)	Sarstedt, Nümbrecht, D
96-well-Platte (v-förmiger Boden)	Sarstedt, Nümbrecht, D
96-well-sample-Platte (for 1450 MicroBeta™)	Perkin Elmer, Waltham, USA
20G/23G-Spritze	BD Bioscience, Heidelberg, D
Biosphere® Fil. Tips farblos (10/100/1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Cell Scraper	Sarstedt, Nümbrecht, D
EDTA-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, D
Eppendorf Combitips advanced ® 2,5 ml	Eppendorf, Hamburg, D
FACS-Röhrchen 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
Falcons 15 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
Falcons 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
Handschuhe nitril (nitra-tex)	Ansell Healthcare, Brüssel, Belgien
Kryoröhrchen 2 ml	Th. Geyer, Renningen, D
µ-Slide (8 wells)	ibidi GmbH, Martinsried, D
Micro-Schraubröhrchen 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA

Parafilm Verschlussfolie	Th. Geyer, Renningen, D
Pipettenspitzen filterlos (10/100/200/1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht, D
PVDF-Membran (Amershan Hybond™-P)	GE Healthcare, St. Giles, UK
Safe Seal micro tube (1,5/2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Safety-Multifly-Set	Sarstedt, Nümbrecht, D
Serologische Pipette (2/5/10/25/50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Serum-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, D
Spektrometerküvetten	Sarstedt, Nümbrecht, D
Top-Seal A	Perkin Elmer, Waltham, USA
Whatman-Papier Mini Trans-Blot® Filter Paper	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Zellkulturflaschen für Suspensionszellen mit Filter	Sarstedt, Nümbrecht, D
Zellkulturflaschen für adhärenente Zellen	Sarstedt, Nümbrecht, D
Zellkulturschalen für Suspensionszellen (6 cm/10 cm)	Sarstedt, Nümbrecht, D

### 3.1.6 Verwendete Kits und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
CFSE Cell Division Tracker Kit	Biolegend, San Diego, USA
Bradford-Reagenz	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Molekulargewichtsstandard	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Szintillisationsmix	Perkin Elmer, Waltham, USA
WesternBright ECL HRP-Substrat	Advansta, San Jose, USA

### 3.1.7 Zusammensetzung der verwendeten Puffer

#### 5x SDS-Laufpuffer

0,5% SDS

1,25 M Glycin

125 mM Tris

#### 10x Blotpuffer

1,94 M Glycin

250 mM Tris

### 10x TBS

50 mM Tris

150 mM Natriumchlorid

pH 7.6

### Einfriermedium

10% DMSO

in FCS

### NP40-Lysepuffer

50 mM Tris

150 mM Natriumchlorid

5mM EDTA

2% NP40

pH 8.0

### PFA-Fixierungspuffer

2% Perflouralkoxy-Polymere (PFA) in PBS

### RLT-Puffer

8,2 g Ammoniumchlorid

1g Potassium bicarb

40 µl ETA 0,5 M

pH 8.0

### Separationbuffer

1.5 M Tris

pH 8.8

### Stackingbuffer

1.5 Tris

pH 6.8

### TBST 0.2

0.2% Tween in TBS



### 3.1.8 Antikörper für den Western Blot

#### Primäre Antikörper

Name	Verdünnung	Herkunft	Hersteller
Anti-Bcl-2	1:1000	Maus	Cell Signaling Technology, Cambridge, GB
Anti-cPARP	1:1000	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Cambridge, GB
Anti-Tubulin	1:1000	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Cambridge, GB

#### Sekundäre Antikörper

Name	Verdünnung	Herkunft	Hersteller
Anti-Rabbit-IgG/HRP-linked Antibody	1:5000	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Cambridge, GB
Anti-Mouse-IgG/HRP-linked Antibody	1:5000	Maus	Cell Signaling Technology, Cambridge, GB

### 3.1.9 Antikörper und Inhibitoren

Antikörper/Inhibitor	Hersteller
Rituximab	UKSH Apotheke
Daratumumab	UKSH Apotheke
Cetuximab	UKSH Apotheke
CD19-DE (Fc-modifizierter MOR208)	AG Peipp, Kiel, D
HER2-DE (Fc-modifizierter HER2-Antikörper)	AG Peipp, Kiel, D
Venetoclax	LC Laboratories, Woburn, USA
Liposomales Clodronat	Liposoma, Amsterdam, Niederlande

### 3.1.10 Antikörper für die Durchflusszytometrie

<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>
CD20-FITC	eBioscience, Thermofisher, Waltham, USA
CD38-APC	eBioscience, Thermofisher, Waltham, USA
CD19-PE	eBioscience, Thermofisher, Waltham, USA
IgG1-FITC	eBioscience, Thermofisher, Waltham, USA

### 3.1.11 Verwendete Software

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
1450 MicroBeta Workstation Software	Perkin Elmer, Waltham, USA
BD CSampler™ Software	Becton, Dickinson and Company (BD), Franklin Lakes, USA
GraphPad Prism5	GraphPad Software Inc, La Jolla, USA

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Zellbiologische Methoden**

#### **3.2.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen**

Die für diese Arbeit verwendeten Zelllinien wurden nach den Empfehlungen des Leibniz-Institut Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH kultiviert. Die humanen Suspensionszelllinien CARNAVAL und WILL-2 wurden in Zellkulturschalen in einem Inkubator bei 37°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt kultiviert. Als Medium wurde Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640-Medium mit einem Zusatz von 10% fetalem Kälberserum (FCS) für CARNAVAL-Zellen bzw. 20% FCS für WILL-2-Zellen und 1% (v/v) Penicillin (10.000 U/ml) / Streptomycin (10 mg/ml) verwendet. Alle Zelllinien wurden unter sterilen Bedingungen mit steril verpackten Einmalartikeln oder autoklavierten Materialien behandelt.

#### **3.2.1.2 Passagieren, Einfrieren und Auftauen**

Die verwendeten Zelllinien wachsen in Suspension und wurden alle zwei bis drei Tage passagiert, um das alte Medium und die Zellfragmente zu entfernen. Hierfür wurden die Zellen in ein 15 ml-Falcon-Röhrchen überführt und für 5 Minuten bei 1300 g und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 2 ml frischem Medium resuspendiert, auf eine neue Zellkulturschale überführt und auf 10 ml Medium aufgefüllt. Zum Einfrieren der Zellen wurden diese für 5 Minuten bei 1300 g und RT zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in Einfriermedium aus 90% FCS und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgenommen und in ein Kryoröhrchen überführt. Diese wurden zunächst bei -80°C eingefroren und am nächsten Tag zur weiteren Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt. Die verwendeten PDX-Zellen wurden in Kryoröhrchen aliquotiert und im Stickstofftank eingefroren. Zum Auftauen wurden die Zellen aus dem Stickstofftank im Wasserbad bei 37°C angetaut, in FCS aufgenommen und zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen, die Zellen einmal mit Phosphat-gepufferter Salzsäure (PBS) gewaschen und auf einer 12-well-Platte ausgesät.

### 3.2.1.3 Generierung von *patient-derived xenografts*

Zur Generierung von PDX-Zellen wurden Zellen einer an einem Burkitt-Lymphom erkrankten Patientin bzw. einem an einer t(17;19)-ALL erkrankten Patienten in NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> Il2rgtm1Wjl/SzJ(NSG)-Mäuse injiziert. Bei Zeichen einer Manifestation der Erkrankung wurden die Mäuse im Verlauf mittels Kohlenstoffdioxid euthanasiert und die Milz, Leber und das Knochenmark der Tiere isoliert. Die Milz wurde auf eine 6 cm-Platte mit eiskaltem PBS überführt und die Größe wurde ausgemessen. Mittels eines Filters und einer 5 ml-Spritze wurden die Zellen isoliert, indem das Gewebe durch ein Sieb gedrückt und anschließend mit PBS gewaschen wurde. Für die Präparation der Zellen aus dem Knochenmark wurden Femur oder Tibia der NSG-Mäuse jeweils dreimal mit eiskaltem PBS ausgespült und die dabei erhaltenen Zellen gesammelt. Für die Präparation der Zellen aus der Leber wurde diese in eine 6 cm-Platte mit PBS überführt und gemessen. Das Gewebe wurde ebenfalls durch ein Sieb gedrückt und mit eiskaltem PBS gewaschen. Es erfolgte bei allen drei Methoden die Zentrifugation bei 1.300 Umdrehungen pro Minute (rpm). Im Anschluss wurde der Überstand entfernt und die Zellen in 20 ml RLT-Puffer zur Zelllyse resuspendiert. Es erfolgte die Inkubation auf Eis für sieben Minuten und anschließend wurden die Zellen erneut bei 1.300 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen, die Zellen in PBS resuspendiert und im Anschluss gezählt. Die Zellen konnten nun eingefroren werden wie oben beschrieben oder direkt für folgende Versuche ausgesät werden.

### 3.2.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Zur Zellzählung wurden 10 µl der in Medium gelösten Zellen mit 90 µl Trypanblau verdünnt und in einer Neubauer improved-Zählkammer mit Deckgläschen bei 10-facher Vergrößerung in allen vier Quadranten ausgezählt. Die endgültige Zellzahl pro ml ergab sich aus den gezählten Zellen in allen Quadranten, der Anzahl der Quadranten (4), dem Faktor der Zählkammer ( $10^4$ ) und dem Verdünnungsfaktor (10):

$$(\text{gezählte Zellmenge}/4) \times 10 \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml.}$$

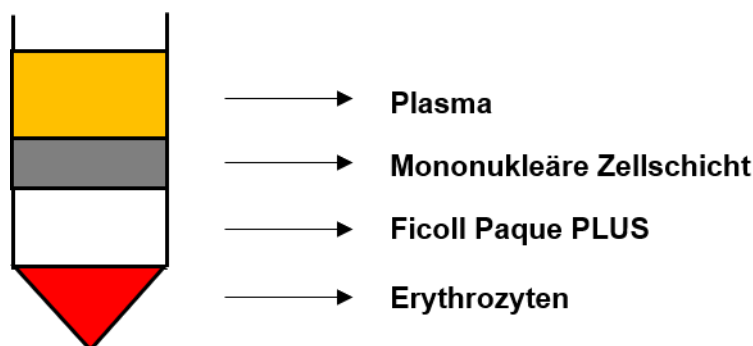
### 3.2.1.5 Zellviabilitätsassay

Die Bestimmung der Anzahl an lebenden bzw. toten Zellen ist mit einer Trypanblaufärbung möglich. Tote Zellen inkorporieren Trypanblau und werden so unter dem Mikroskop blau dargestellt. Hierfür wurden  $10^6$  Zellen auf einer 6-well-Platte in 2 ml Medium pro well auf zwei 6-well-Platten gegeben und anschließend mit unterschiedlichen Konzentrationen (1 nM, 5 nM,

10 nM, 100 nM und 1000 nM) Venetoclax sowie mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt. Die Anzahl an Zellen wurden nach 12, 24 und 48 Stunden in der Neubauer-Zählkammer unter dem Phasenkontrastmikroskop bestimmt. Die Zellzahlbestimmungen und die Bestimmung toter Zellen erfolgten drei Mal in Form von Duplikaten für jede Konzentration und wurden als Mittelwert dargestellt.

### 3.2.1.6 Präparation mononukleärer Zellen

Die Präparation mononukleärer Zellen (MNC, v.a. Monozyten und Lymphozyten) erfolgte aus dem Vollblut gesunder Spender. Es erfolgte zunächst die Auftrennung des Blutes über einen Dichtegradienten, der durch die Zugabe von Ficoll-Paque PLUS, einem Medium für die Fraktionierung humaner Blutzellen, und anschließender Zentrifugation erzeugt wurde. Durch die Zugabe von Ficoll-Paque PLUS reichern sich die MNCs aufgrund ihrer geringeren Dichte zwischen Plasma und Ficoll an, während das Ficoll die maximale Dichte von Erythrozyten und polymorphkernigen Granulozyten unterschreitet und sich diese folglich als Sediment unterhalb der Ficoll-Schicht ansammeln (Abb. 3-1). Es wurden 7,5 ml Ficoll-Paque PLUS in ein 15 ml-Falcon-Röhrchen gegeben und 7,5 ml Blut darauf geschichtet. Es erfolgte anschließend die Zentrifugation bei 2.000 rpm für 20 Minuten ohne Bremse um den Gradienten zu erzeugen.



**Abbildung 3-1: Schematische Darstellung des Gradienten nach Zentrifugation.** Durch die Zugabe von Ficoll-Paque PLUS teilen sich die Blutbestandteile anhand ihrer Dichte auf. Die MNCs wurden für die weiteren Versuche abpipettiert. Dargestellt nach Cechim und Chies, 2019

Im Anschluss wurde das Plasma verworfen und die Schicht aus MNCs in ein 50 ml-Falcon-Röhrchen überführt. Nun folgten zwei Waschschrte, in denen die Zellen für 5 Minuten bei 1300 g und RT zentrifugiert wurden. Nach jeder Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, das Pellet wieder in PBS resuspendiert und das Falcon wieder auf 50 ml mit PBS aufgefüllt. Im Anschluss an die drei Waschschrte wurde eine Erythrozyten-Lyse durchgeführt, indem 45 ml kaltes (4°C), destilliertes Wasser auf die Zellen gegeben und das Falcon für 30 Sekunden invertiert wurde. Anschließend wurden 5 ml 10x PBS hinzugefügt, um das PBS so auf 1x PBS

zu verdünnen. Nach erneuter Zentrifugation für 5 Minuten bei 1300 g wurde das Pellet je nach Größe in 5-10 ml Medium aufgenommen. Da für den Folgeversuch ein Verhältnis von Effektorzellen zu Zielzellen von 40:1 benötigt wurde, wurden die MNCs auf  $4 \times 10^6$  Zellen pro ml RPMI1640-Medium eingestellt.

### 3.2.1.7 Präparation von humanem Serum

Zur Gewinnung von humanem Serum erfolgte die Blutentnahme unter Verwendung von Serum-Monovetten. Die Monovetten enthielten einen Gerinnungsaktivator, sodass die festen Blutbestandteile nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten auf Eis ausfielen und sich durch die Zentrifugation bei 4°C und 2000 rpm für 20 Minuten am Boden absetzten. Im Anschluss konnte der Serumüberstand direkt verwendet oder bei - 80°C eingefroren werden.

### 3.2.1.8 <sup>51</sup>Chrom-Freisetzungstest

Der <sup>51</sup>Chrom-Freisetzungstest ist eine Möglichkeit, die Zytotoxizität von Antikörpern für die Zielzellen zu quantifizieren. <sup>51</sup>Chrom ist ein Radionuklid welches von Zellen aufgenommen wird. Die Freisetzung des radioaktiven <sup>51</sup>Chroms aus Zielzellen kann mittels Chemilumineszenz detektiert und als indirektes Maß für eine erfolgte Zellyse verwendet werden.

Im <sup>51</sup>Chrom-Freisetzungstest werden entsprechende Antikörper (AK) in fallender Konzentration (10, 2, 0,4, 0,8, 0,016 µg/ml für die Untersuchung der CDC und 2, 0,4, 0,8, 0,016, 0,0032, 0,00064 µg/ml für die Untersuchung der ADCC) auf einer 96-well-Mikrotiter-Platte aufgetragen, welche vorher mit 100 µl Zellmedium pro well befüllt wurde. Des Weiteren wurden 50 µl der in Medium gelösten MNCs ( $4 \times 10^6$  Zellen pro ml Medium) für die Messung der ADCC bzw. 50 µl Serum für die Messung der CDC vorgelegt.

Die Zielzellen wurden vor Versuchsbeginn für 12 Stunden mit 1 nM Venetoclax behandelt und am nächsten Tag mit PBS gewaschen und gezählt. Pro Probe wurden  $0,6 \times 10^6$  Zellen mit 50µl <sup>51</sup>Chrom versetzt und für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit RPMI1640-Medium wurden  $5 \times 10^3$  Zellen auf die mit Antikörpern vorpipettierten Platten überführt und für 3 Stunden (CDC) oder 4 Stunden (ADCC) inkubiert. Um die maximale Lyse, also die maximale Menge an Chrom, die durch die Zellen freigesetzt werden könnte, zu bestimmen, wurden 50 µl Medium mit 100 µl PBS mit 2% Triton-X in eine Reihe der Platten pipettiert. Durch das Triton-X wurden die chromierten Zellen vollständig lysiert und das aufgenommene Chrom vollständig freigesetzt. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung der basalen

Lyse, indem lediglich in Medium gelöste Zellen ohne Zusatz von Antikörpern oder Effektorzellen in einige wells der Platten pipettiert wurden.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Platten zentrifugiert und die Messung des freigesetzten <sup>51</sup>Chroms erfolgte indirekt über die durch Radioaktivität induzierte Szintillation in dem Mikrotiter-Platten-Szintillations- und Lumineszenzzähler 1450 MircoBetaTriLux. Hierfür wurden 150 µl Szintillationslösung auf eine 96-well-sample-Platte vorgelegt und 25 µl Chromüberstand von der 96-well-Platte hinzugefügt. Die Platte wurde mit einer optisch aktiven TopSeal-A-Folie verklebt, 15 Minuten auf einem Orbitalschüttler geschüttelt und die Szintillation anschließend im 1450 MircoBetaTriLux nach Protokoll 6, einem speziellen Geräteprogramm für die Auswertung der ADCC bzw. CDC, ausgelesen. Die Berechnung der spezifischen Lyse wurde wie folgt berechnet:

$$\% \text{ spez. Lyse} = ((\text{ausgezählte Szintillation} - \text{basale Szintillation}) / (\text{maximale Szintillation} - \text{basale Szintillation})) \times 100$$

### 3.2.1.9 M0-Makrophagen-Präparation

Die Präparation der Monozyten aus der Leukozytenreduktionssystem(LRS)-Kammer erfolgte aus Apherese-Spindeln, die von der Transfusionsmedizin der Universitätsklinik zu Kiel bereitgestellt wurden.

Zunächst wurden die 10 ml Blut aus der Spindel unter sterilen Bedingungen in ein 50 ml-Falcon-Röhrchen überführt und mit 40 ml PBS verdünnt. Anschließend wurde 20 ml Ficoll-Paque PLUS in mehrere Falcons vorgelegt, das verdünnte Blut darauf geschichtet und schließlich für 20 Minuten bei 2.500 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Erneut wurde der MNC-Ring wie in 3.2.1.6 beschrieben abgenommen und in ein neues 50 ml-Falcon-Röhrchen überführt. Die MNC-Fraktion wurde dreimalig mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Im Anschluss folgte eine Erythrozyten-Lyse wie oben beschrieben. Nach zwei weiteren Zentrifugationen wurde das Pellet in PBS aufgenommen und die Anzahl an Monozyten mittels Trypanblaufärbung in der Zählkammer bestimmt. Es wurden  $30 \times 10^6$  Monozyten in 3 ml Monocyte-Attachment-Medium plus 5 ml RPMI1640-Medium aufgenommen und für 30-60 Minuten bei 37°C in Zellkulturflaschen für adhärente Zellen inkubiert bis sich die Zellen am Boden festgesetzt hatten. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit 5 ml X-vivo-Medium, einem Medium speziell für Monozyten, über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen. Zur Differenzierung der

Monozyten zu M0-Makrophagen wurde 50 ng/ml Monozytenkolonie-stimulierender Faktor (M-CSF) in X-vivo-Medium für sechs Tage hinzugefügt. An Tag 3 erfolgte ein Medium- und Zytokinwechsel. Nach 6 Tagen waren die Zellen vollständig zu M0-Makrophagen differenziert und waren bereit für das Folgeexperiment (206).

### 3.2.1.10 Präparation muriner Makrophagen

Zur Präparation muriner, intraperitonealer Makrophagen wurden männliche, unbehandelte NSG-Mäuse aus dem Zuchtüberstand euthanasiert und die Bauchdecke mit 70% Alkohol desinfiziert. Unter sterilen Bedingungen wurde die Bauchdecke unter bleibendem Verschluss des Peritoneums eröffnet. Mit einer 20G-Spritze wurde 5 ml PBS mit 3% FCS als Zusatz in das Peritoneum appliziert. Nach kurzer Massage der Bauchdecke wurde das PBS mit einer 23G-Nadel entnommen und in einem gekühlten 50 ml-Falcon-Röhrchen gesammelt. Diese Schritte wurden bei zwei weiteren Mäusen wiederholt. Die Zellen wurden für 5 Minuten bei 1300 g und RT zentrifugiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Makrophagen in 1 ml Dulbecco's *Modified Eagle's Medium* (DMEM) resuspendiert und waren nun bereit für das Folgeexperiment.

### 3.2.1.11 Phagozytose-Versuch

Der Phagozytose-Versuch ermöglicht eine Quantifizierung der Fähigkeit verschiedener Antikörper, antikörperabhängige Zellphagozytose (ADCP) zu induzieren. Für die Bestimmung der Phagozytoseraten werden die Zielzellen mit einem pH-sensitiven Farbstoff gefärbt, der unter dem Mikroskop in reifen Phagosomen leuchtet. So können die phagozytierenden Makrophagen mikroskopisch anhand der internalisierten Zielzelle unter den verschiedenen Bedingungen ausgezählt werden. Zunächst wurden die M0-Makrophagen in der Kulturflasche zweimal mit PBS gewaschen und mit *Cell-Dissociation-Buffer* für 15-20 Minuten versetzt, um sie von der Platte zu lösen. Die verbliebenden adhärennten Zellen wurden mit Zellmedium versehen, mit einem CellScraper gelöst und schließlich ebenfalls in das Falcon-Röhrchen überführt. Nach der Zentrifugation wurden  $20 \times 10^6$  Makrophagen auf iBidi-Slides (2 x 4 wells) ausplattiert und vier Stunden bei 37°C inkubiert, sodass sich diese absetzen konnten. Die mit DMSO oder Venetoclax vorbehandelten Zielzellen wurden zur Darstellung der Phagozytose unter dem Mikroskop mit einem Carboxyfluorescein-Succinimidylester (CFSE)-Farbstoff, einem grün fluoreszierenden Farbstoff, gefärbt. Hierfür wurden die Zellen mit PBS gewaschen, gezählt und  $1,5 \times 10^6$  Zellen wurden pro Behandlung mit 1,5 nM CFSE-Farbstoff in 1 ml PBS für 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Färbung mit CFSE durch die Zugabe von RPMI1640-Medium gestoppt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Zellen



erneut gezählt und  $40 \times 10^6$  Zellen auf die vorbereiteten, mit Makrophagen versetzten iBidi-Slides überführt, sodass ein Effektorzell-Zielzell-Verhältnis von 1:2 vorlag. Je nach Zelllinie bzw. PDX-Zellen wurden die jeweiligen Antikörper in einer Konzentration von 10 µg/ml hinzugefügt und die iBidi-Slides für 2,5 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Medium ausgetauscht, um die weitere Phagozytose zu stoppen. Die Phagozytose in Prozent wurde bestimmt aus dem Verhältnis von CSFE-positiven Makrophagen zu der Gesamtzahl der Makrophagen. Es wurden insgesamt 100 Makrophagen unter dem Phasenkontrastmikroskop gezählt.

### **3.2.2 Biochemische Methoden**

#### **3.2.2.1 Herstellung von Proteinlysaten**

Zur Herstellung von Proteinlysaten wurden  $10^6$  Zellen in 6-well-Platten ausgesät und mit 1 nM, 5 nM und 10 nM Venetoclax sowie DMSO als Kontrolle für 12 Stunden und 24 Stunden behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Die Zellpellets wurden in NP40-Puffer mit zugesetztem Proteaseinhibitor resuspendiert und für 45 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend folgte die Zentrifugation für 15 Minuten bei 14.000 rpm und 4°C. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfröhrchen überführt und die gewonnenen Lysate bei -20°C gelagert.

#### **3.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford. Zur Konzentrationsbestimmung wurden zunächst destilliertes Wasser und Bradford-Reagenz im Verhältnis 5:1 vermischt und je 1 ml in eine Küvette überführt. Pro Probe wurde hier eine Küvette benötigt, außerdem wurde noch ein Proteinstandard mit Hilfe einer Verdünnungsreihe aus BSA (1 mg/ml) erstellt. Für die Messung wurden jeweils 1 µl Lysat in die vorgelegte Bradford-Lösung gegeben. Die Extinktion der Proben bei 595 nm wurden in einem Multiplaterereader gemessen. Anhand des gemessenen Proteinstandards konnte die Konzentration des Lysats bestimmt werden. Pro Probe von 30 µl wurde 50 µg Proteinlysate mit Lysepuffer auf 22,5 µl Volumen aufgefüllt und 7,5 µl 4x Ladepuffer hinzugegeben. Anschließend wurden die Proteine bei 95°C im Heizblock für 10 Minuten denaturiert.

### 3.2.2.3 Western Blot

Durch das *Western Blot*-Verfahren können spezifische Proteine mittels Antikörperdetektion nachgewiesen werden. Zunächst wurden die Proteine mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) ihrer Größe nach aufgetrennt und anschließend auf eine Membran transferiert. Die Proteinbanden auf der Membran können schließlich mit Antikörperkonjugaten, die z.B. mit Fluoreszenzfarbstoffen oder Enzymen markiert sind und somit eine nachfolgende Farbreaktion ergeben, nachgewiesen werden.

### 3.2.2.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Bei der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) handelt es sich um ein denaturierendes Verfahren, wodurch die Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt werden können. Durch Hinzugabe von anionischem Natriumdodecylsulfat (SDS) im Laufpuffer verlieren die Proteine zum einen ihre Sekundär- und Tertiärstruktur, außerdem verlieren sie ebenfalls ihre Eigenladung durch Anlagerung des SDS. Die nun aufgefalteten Proteine können nun fast ausschließlich nach ihrem Molekulargewicht in Banden aufgetrennt werden. Je geringer das Gewicht des Proteins, desto schneller wandert es im elektrischen Feld. Die Trennung der Proteine erfolgte auf einem Polyacrylamid-Gel, welches sich aus einem Sammel- und einem Trenngel zusammensetzt. Im Sammelgel wurden die Proben zunächst beladen, im Trenngel anschließend ihrer Größe nach aufgetrennt. Zunächst wurde das Trenngel (10%) pro Gel aus 3 ml destilliertem Wasser, 2 ml Separation Buffer und 2,7 ml Acrylamid gegossen. Durch Hinzugabe von 75 µl Ammoniumperoxodisulfat (APS) und 1,5 µl Tetramethylethyldiamin (TEMED) erfolgte die Polymerisierung des Gels. Damit das Gel gleichmäßig polymerisieren konnte und um eine Blasenbildung zu verhindern, wurde das Gel vorübergehend mit Isopropanol beschichtet. Anschließend wurde das Sammelgel (4%) pro Gel aus 1,8 ml destilliertem Wasser, 0,9 ml Stacking Buffer, 0,4 ml Acrylamide, 30 µl APS und 3 µl TEMED hergestellt, nach Entfernung des Isopropanols auf das Trenngel gegeben und ein 10-Kammern-Kamm zur Ausformung der Probenaschen eingesteckt. Dieser wurde nach Erhärtung des Gels zum Beladen der Geltaschen entfernt.

Das Gel wurde in eine Elektrophoresekammer gesetzt, welche mit 1x SDS-Laufpuffer befüllt und mit den Proben beladen wurde. Zunächst wurde eine Spannung von 80 V für 20 Minuten angelegt, um die Proben im Sammelgel zu konzentrieren. Für die Auftrennung im Trenngel wurde die Spannung auf 100 V erhöht.

### 3.2.2.5 Transfer

Beim Transfer werden die Proteine, die zuvor in dem Gel aufgetrennt wurden, mittels der *Wet Blot*-Methode auf eine Polyvinylidendifluorid(PVDF)-Membran übertragen. Zur Aktivierung der Membran wurde diese zunächst eine Minute lang in Methanol eingelegt und im Anschluss daran für zwei Minuten in destilliertem Wasser gewaschen. Nun wurde die Membran zusammen mit dem Gel für fünf Minuten in eine Wanne mit Blotpuffer gelegt. Der Blot wurde wie folgt zusammengebaut: Anode – Fasermatte – Whatman-Filterpapier – Membran – Gel – Whatman-Filterpapier – Fasermatte – Kathode. Im Kälteraum folgte der Transfer auf Eis für 2 Stunden bei einer konstanten Stromstärke von 0,4 mA.

### 3.2.2.6 Detektion

Nach Beenden des Transfers wurde die Membran für mindestens eine Stunde in dreifach gepufferter Säure mit Tween20 (TBS-T) mit 5% BSA geblockt. Hierdurch wurde die Membran unzugänglich für unspezifische Proteinbindungen. Danach wurde der primäre Antikörper in 5% BSA in TBS-T in entsprechender Verdünnung zugegeben und über Nacht im Kälteraum inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für 10 Minuten in 0,1% TBS-T gewaschen, anschließend wurde der mit einer Meerrettichperoxidase(HRP)-gekoppelte Sekundärantikörper in 5% BSA zugegeben und ca. eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurde die Membran erneut dreimal für jeweils 10 Minuten mit TBS-T gewaschen. Zuletzt wurde die Membran eine Minute lang in WesternBright ECL HRP-Substrat inkubiert. Durch die HRP des Sekundärantikörpers wurde das in der Entwicklerlösung enthaltene Luminol oxidiert und die Chemilumineszenz konnte so im Entwickler detektiert werden.

## 3.2.3 Durchflusszytometrische Methoden

### 3.2.3.1 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (*Flourescence-activated cell sorting* = FACS) ist ein Verfahren, mit dessen Hilfe zum einen der Zelltyp (Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten) bestimmt werden kann, zum anderen kann die Expression bestimmter Moleküle auf der Oberfläche einer Zelle gemessen werden. Zur Analyse werden die zu untersuchenden Zellen in einer Suspension an einem Laserstrahl vorbeigeleitet. Je nach Eigenschaften der Zelle wird das Licht unterschiedlich gestreut. Man unterscheidet hierbei zum einen das Vorwärtsstreulicht, welches mit der Größe der Zelle korreliert, als auch das Seitwärtsstreulicht als Maß für die Granularität. So kann anhand des Streulichts zwischen Granulozyten, Monozyten und

Lymphozyten entschieden werden. Des Weiteren können anhand des Fluoreszenzlichts bestimmte Merkmale von Zellen mittels mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern untersucht werden. Die Antikörper können sich zum Beispiel gegen CD20 (B-Lymphozyten) oder CD3 (T-Lymphozyten) richten und so unterschieden werden.

### **3.2.4 Tierversuche**

Um den Einfluss von Venetoclax auf therapeutische Antikörper zu testen, wurden CARNAVAL-Zellen und t(17;19)-ALL-PDX-Zellen intravenös in die Schwanzvene von NSG-Mäusen injiziert. Es wurden jeweils  $10^5$  CARNAVAL- und  $10^6$  t(17;19)-ALL-PDX-Zellen injiziert. Anschließend folgte eine Engraftmentzeit von 10 Tagen (CARNAVAL) bzw. 14 Tage (t(17;19)-ALL-PDX). Es wurde jeweils 100 mg Venetoclax pro kg Mausgewicht mittels oraler Gavage appliziert. Die Antikörper Rituximab und CD19-DE wurden in einer Konzentration von 10 µg/mg einmal wöchentlich intraperitoneal verabreicht. Die Mäuse wurden schließlich bei Anzeichen einer lymphatischen bzw. leukämischen Manifestation mittels Kohlenstoffdioxidapplikation euthanasiert. Die Präparation der Mäuse erfolgte stets unter sterilen Bedingungen. Die Überlebenszeiten wurden mittels Kaplan-Meier log-rank Statistiken verglichen. Die Tierversuche wurden von Frau Dr. Fotini Vogiatzi durchgeführt.

Die Haltung der Mäuse erfolgte in der zentralen Tierhaltung des UKSH Kiels unter sterilen, standardisierten Umweltbedingungen ( $22 \pm 1$  °C,  $50 \pm 10\%$  relative Luftfeuchtigkeit, 12 h Tag-Nacht Rhythmus). Die Mäuse erhielten autoklaviertes Einstreu, Futter und Trinkwasser nach Belieben. Die Experimente wurden unter Einhaltung des Tierschutzgesetzes sowie unter der Genehmigung des Ministeriums für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt, Natur und Digitalisierung des Landes Schleswig-Holstein unter dem Aktenzeichen V 242-16747/2019 (39-4/19) durchgeführt.

### **3.2.5 Einverständnis der Blutspender und Patienten, Ethikvotum**

Die Durchführung der experimentellen Versuche dieser Promotionsarbeit erfolgte gemäß der Deklaration von Helsinki. Für die Untersuchung der ADCC und CDC erfolgte die Blutentnahme von gesunden, zufällig ausgewählten Probanden. Die Spender wurden vor der Venenpunktion über den Zweck der Blutentnahme aufgeklärt. Die Entnahme erfolgte ausschließlich mit dem schriftlichen Einverständnis der Spender. Die Untersuchung der ADCC, CDC und ADCP erfolgte unter einem genehmigten Ethikantrag unter dem Aktenzeichen D 557/16. Die für die Transplantation verwendeten Primärzellen stammten aus kryokonservierten Knochenmarkspalten eines Patienten mit einer t(17;19)-ALL sowie einer Patientin mit Burkitt-

Lymphom zum Erstdiagnosezeitpunkt. Die Probenentnahme erfolgte nach entsprechender Aufklärung und Zustimmung der Patienten bzw. deren gesetzlichen Vertreter. Die beiden Patienten wurden nach dem Protokoll der ALL-BFM 2009 Studie bzw. der B-NHL-BFM 2004 Studie behandelt.

### **3.2.6 Graphische Darstellung und statistische Analysen**

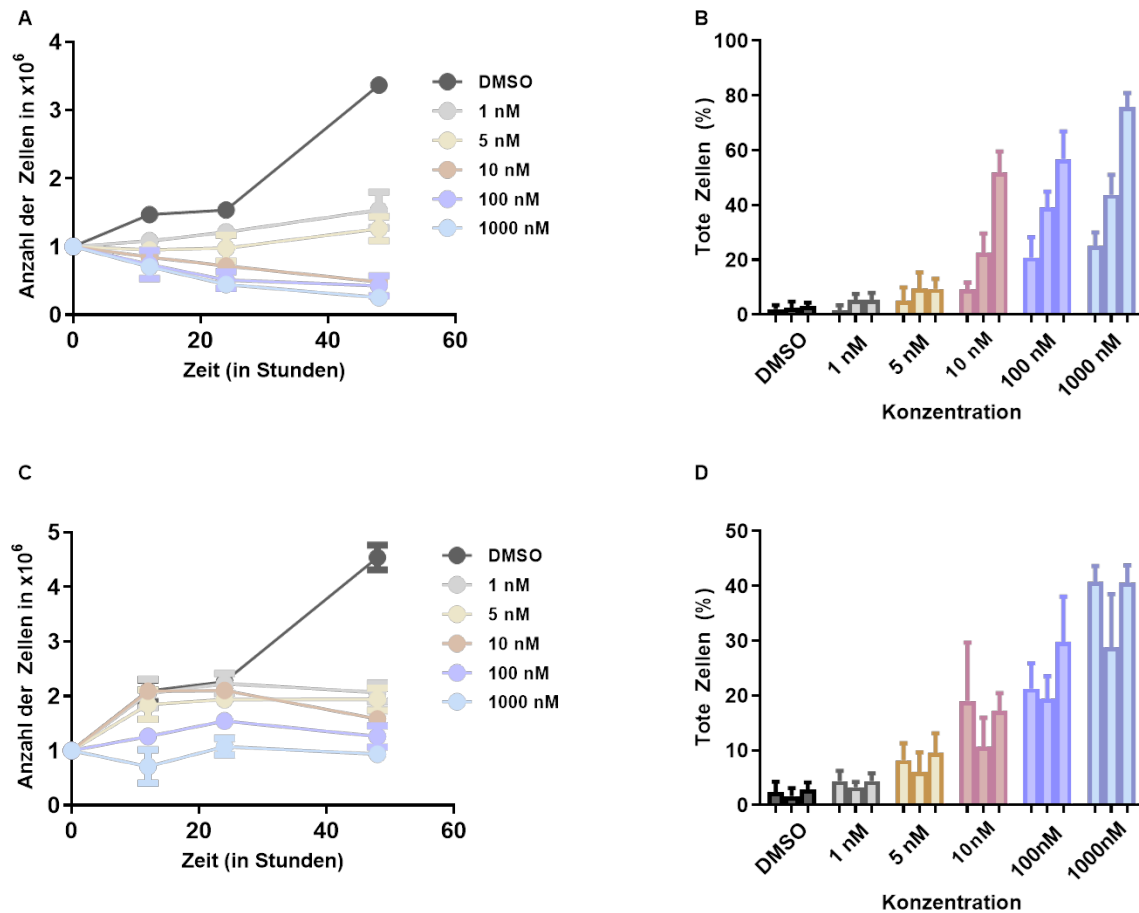
Für jedes Experiment wurden mehrere unabhängige Versuche durchgeführt, die anschließend graphisch und statistisch mit der Software *GraphPad Prism 4.0* (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) ausgewertet wurden. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes (standard error of the mean, SEM) dargestellt. Unterschiede zwischen zwei Datensätzen wurden mittels zweiseitigem Mann-Whitney-U-Test analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit  $p \leq 0,05$  akzeptiert und sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Hochsignifikante Unterschiede wurden mit  $p \leq 0,01$  akzeptiert und sind mit zwei Sternen (\*\*) gekennzeichnet. Für die Untersuchung der ADCC und CDC wurden jeweils nur zwei Versuche durchgeführt, sodass hier keine Statistik vorliegt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Die Inhibition von Bcl-2 mit Venetoclax führt zu einer Reduktion der Zellviabilität in DHL-Zelllinien *in vitro*

Das Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob durch die Behandlung mit dem Bcl-2-Inhibitor Venetoclax eine Steigerung der Effizienz therapeutischer Antikörper in ausgewählten B-Zell-Lymphomen und der t(17;19)-ALL erzielt werden kann. Zunächst wurde der alleinige Effekt von Venetoclax in den beiden Bcl-2-exprimierenden DHL-Zelllinien CARNAVAL und WILL-2 untersucht. Es folgte in beiden Zelllinien die Behandlung mit 1 nM, 5 nM, 10 nM, 100 nM und 1000 nM Venetoclax sowie mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle. Das Ziel war es zunächst eine Konzentration zu ermitteln, in der die Zellen zwar einen Wachstumsarrest zeigen, sie jedoch nicht sterben. So sollte im Verlauf evaluiert werden, ob die Zellen durch eine zusätzliche Behandlung mit einem monoklonalen Antikörper schließlich in die Apoptose übergehen. Um zu untersuchen, ob durch die Inhibition von Bcl-2 in DHL-Zelllinien die Zellviabilität reduziert werden kann, wurden CARNAVAL- und WILL-2-Zellen mit den oben genannten Konzentrationen Venetoclax behandelt. Es folgte schließlich die Bestimmung der Zellzahl sowie die des Anteils an toten Zellen nach 12, 24 und 48 Stunden mittels Trypanblau-Exklusionstest unter dem Mikroskop.

Unter der Behandlung mit DMSO als Lösungskontrolle zeigte sich keine Inhibition der Zellproliferation in CARNAVAL-Zellen. Des Weiteren wurden zu allen drei Zeitpunkten keine toten Zellen gezählt. Die Behandlung mit 1 nM Venetoclax führte bereits nach 12 Stunden zu einem Wachstumsarrest in CARNAVAL-Zellen. Im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zeigte sich in dieser Konzentration keine Zunahme der toten Zellen. Durch die Behandlung mit 5 nM Venetoclax kam es ebenfalls nach 12 Stunden zu einem Wachstumsarrest der CARNAVAL-Zellen, jedoch wurden hier vermehrt tote Zellen im Vergleich zur Kontrolle mit DMSO und zur Behandlung mit 1 nM Venetoclax gezählt. Die Zugabe von 10 nM, 100 nM und 1000 nM Venetoclax führte bereits nach 12 Stunden zu einer Abnahme der Zellzahl. Folglich wurde hier mit steigenden Konzentrationen an Venetoclax und mit Zunahme der Behandlungsdauer eine deutliche Zunahme der toten Zellen beobachtet (Abb. 4-1 A und B).



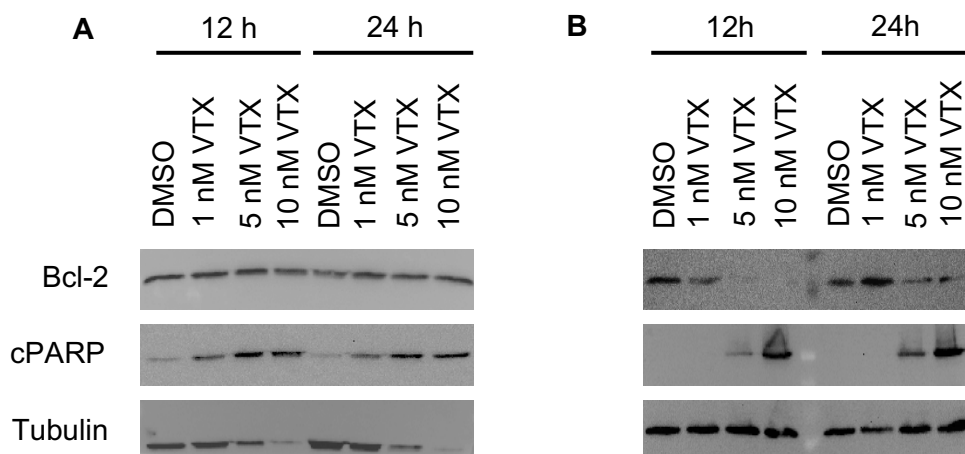
**Abbildung 4-1: Niedrig dosiertes Venetoclax induziert einen Wachstumsarrest in DHL-Zelllinien.** Trypanblau-Exklusionstest zur Bestimmung der Zellviabilität in CARNAVAL- und WILL-2-Zellen nach Behandlung mit steigenden Konzentrationen an Venetoclax für bis zu 48 Stunden. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Experimenten mit Duplikaten (n=3, SD). **A)** Anzahl der vitalen Zellen in CARNAVAL-Zellen. **B)** Prozentualer Anteil der toten CARNAVAL-Zellen. **C)** Anzahl der vitalen Zellen in WILL-2-Zellen. **D)** Prozentualer Anteil der toten WILL-2-Zellen. Der 1. Balken stellt den Zeitpunkt nach 12 Stunden, der 2. den nach 24 Stunden und der 3. Balken den Zeitpunkt nach 48 Stunden dar.

In WILL-2-Zellen zeigte sich unter der Behandlung mit DMSO ebenfalls keine Inhibition der Zellproliferation. Es wurden zudem keine toten Zellen durch die Behandlung mit der Lösungsmittelkontrolle beobachtet. Die Behandlung mit 1 nM und 5 nM Venetoclax führte nach 12 bis 24 Stunden zu einem Wachstumsarrest, ohne dass die Zellen starben. Es wurde somit keine Zunahme der toten Zellen im Vergleich zur Kontrolle beobachtet. Die Behandlung mit 10 nM Venetoclax zeigte zu diesem Zeitpunkt ebenfalls einen Wachstumsarrest, allerdings konnte hier eine deutliche Zunahme der toten Zellen im Vergleich zur Kontrolle und den Behandlungen mit 1 nM und 5 nM Venetoclax beobachtet werden. Nach der Zugabe von 100 nM und 1000 nM Venetoclax kam es hingegen schon nach 12 Stunden Behandlung zu einem Wachstumsarrest, allerdings wurden hier deutlich mehr tote Zellen gezählt als in den niedrigeren Konzentrationen (Abb. 4-1 C und D).

Zusammenfassend konnte durch die Behandlung mit 1 nM Venetoclax für 12 Stunden in CARNAVAL-Zellen und WILL-2-Zellen ein Wachstumsarrest erzielt werden, ohne dass vermehrt tote Zellen unter dem Mikroskop dargestellt wurden. Im weiteren Verlauf wurden die beiden Zelllinien daher mit 1 nM Venetoclax für 12 Stunden behandelt.

### 4.2 Niedrig dosiertes Venetoclax induziert einen Zellzyklusarrest in DHL-Zelllinien und Bcl-2-exprimierenden PDX-Zellen

Um zu untersuchen, ob die Behandlung mit Venetoclax die Proteinexpression von Bcl-2 beeinflusst, wurden CARNAVAL- und WILL-2-Zellen im nächsten Schritt mit DMSO, 1 nM, 5 nM und 10 nM Venetoclax für 12 Stunden und 24 Stunden behandelt. Mittels *Western Blot*-Analyse wurde der Bcl-2-Spiegel zu den unterschiedlichen Zeitpunkten detektiert. Zusätzlich wurden die Proteinspiegel der gespaltenen Poly-ADP-Ribose-Polymerase (*cleaved PARP*; cPARP) als Apoptosemarker untersucht (207).



**Abbildung 4-2: Die Behandlung mit 1 nM Venetoclax führt in steigenden Konzentrationen zu einer Induktion der Apoptose in CARNAVAL- und WILL-2-Zellen.** CARNAVAL- und WILL-2 Zellen wurden mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle oder 1 nM, 5 nM und 10 nM Venetoclax (VTX) für 12 oder 24 Stunden behandelt. Die Proteinspiegel von Bcl-2, cPARP sowie Tubulin als Ladekontrolle wurden mittels *Western Blot*-Verfahren in (A) CARNAVAL-Zellen und (B) WILL-2-Zellen analysiert.

In CARNAVAL-Zellen kam es weder nach 12 Stunden noch nach 24 Stunden Behandlung mit 1 nM, 5 nM oder 10 nM Venetoclax zu einer Abnahme des Bcl-2-Spiegels im Vergleich zur Kontrolle mit DMSO. Durch die Behandlung mit 1 nM Venetoclax zeigte sich nach 12 Stunden und 24 Stunden eine Zunahme des Apoptosemarkers cPARP im Vergleich zur Kontrolle. Die Zugabe von 5 nM und 10 nM Venetoclax führte in beiden Zeitpunkten zu einer weiteren Steigerung der cPARP-Expression (Abb. 4-2 A).

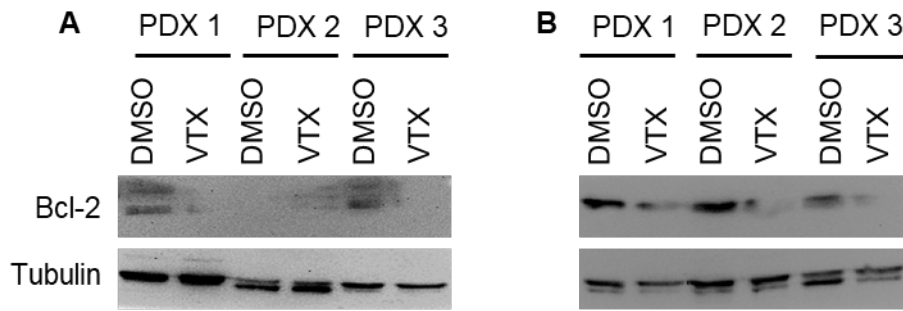


In WILL-2-Zellen konnte nach 12 Stunden Behandlung mit 1 nM Venetoclax eine leichte Abnahme des Bcl-2-Spiegels im Vergleich zur DMSO-Kontrolle beobachtet werden, während nach 24 Stunden in dieser Konzentration keine Veränderung der Bcl-2-Expression beobachtet werden konnte. Die Behandlung mit 5 nM Venetoclax führte sowohl nach 12 Stunden als auch nach 24 Stunden zu einer deutlichen Reduktion der Bcl-2-Expression. Nach 12 Stunden konnte durch die Zugabe von 10 nM Venetoclax kein Bcl-2 mehr detektiert werden. Nach 24 Stunden Behandlung mit 10 nM Venetoclax zeigte sich hingegen weiterhin eine leichte Expression des Proteins. In der DMSO-Kontrolle und in der mit 1 nM Venetoclax behandelten Probe konnte weder nach 12 Stunden noch nach 24 Stunden ein cPARP-Spiegel detektiert werden. Durch die Behandlung mit 5 nM Venetoclax kam es nach 12 und 24 Stunden Behandlung zu einem Anstieg des cPARP-Spiegels. Zu beiden Zeitpunkten konnte durch die Zugabe von 10 nM Venetoclax eine weitere Steigerung der cPARP-Expression beobachtet werden (Abb. 4-2 B).

Zusammenfassend kam es in CARNAVAL-Zellen zu keiner Abnahme des Bcl-2-Spiegels, während in WILL-2-Zellen bereits durch die Behandlung mit 1 nM Venetoclax für 12 Stunden eine Abnahme der Bcl-2-Expression beobachtet werden konnte. Zusätzlich konnten wir beobachten, dass mit steigenden Konzentrationen an Venetoclax der cPARP-Spiegel zunahm und somit die Apoptose induziert wurde.

Neben den beiden DHL-Zelllinien sollte der Effekt durch Venetoclax ebenfalls beim Bcl-2-exprimierenden Burkitt-Lymphom und bei der t(17;19)-ALL untersucht werden. Hierfür verwendeten wir in NSG-Mäusen amplifizierte Xenotransplantat-Zellen (*Patient-derived xenograft*; PDX). PDX-Zellen proliferieren häufig sehr langsam und stellen im Verlauf die Proliferation meist gänzlich ein, indem sie in die Seneszenz übergehen, sodass hier von Zellviabilitätsversuchen abgesehen wurde (208). Es wurden je drei BL-PDX- und t(17;19)-ALL-PDX-Proben (PDX 1-3) für 12 Stunden mit 1 nM Venetoclax behandelt und die Bcl-2-Spiegel bestimmt.

Beim Burkitt-Lymphom zeigte sich in PDX 1 und PDX 3 eine deutliche Bcl-2-Expression. Das PDX 2 exprimierte kein Bcl-2 und wurde somit für die folgenden Versuche nicht verwendet. Die Zugabe von Venetoclax führte in den Bcl-2-exprimierenden BL-PDX 1 und 3 zur Abnahme des Bcl-2-Proteinspiegels im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 4-3 A).



**Abbildung 4-3: Die Behandlung mit 1 nM Venetoclax führt zu einer Reduktion des Bcl-2-Spiegels in BL-PDX- und t(17;19)-ALL-PDX-Zellen.** Expression von Bcl-2 sowie Tubulin als Ladekontrolle in (A) BL-PDX-Zellen und (B) t(17;19)-ALL-PDX-Zellen nach Behandlung mit DMSO und 1 nM Venetoclax.

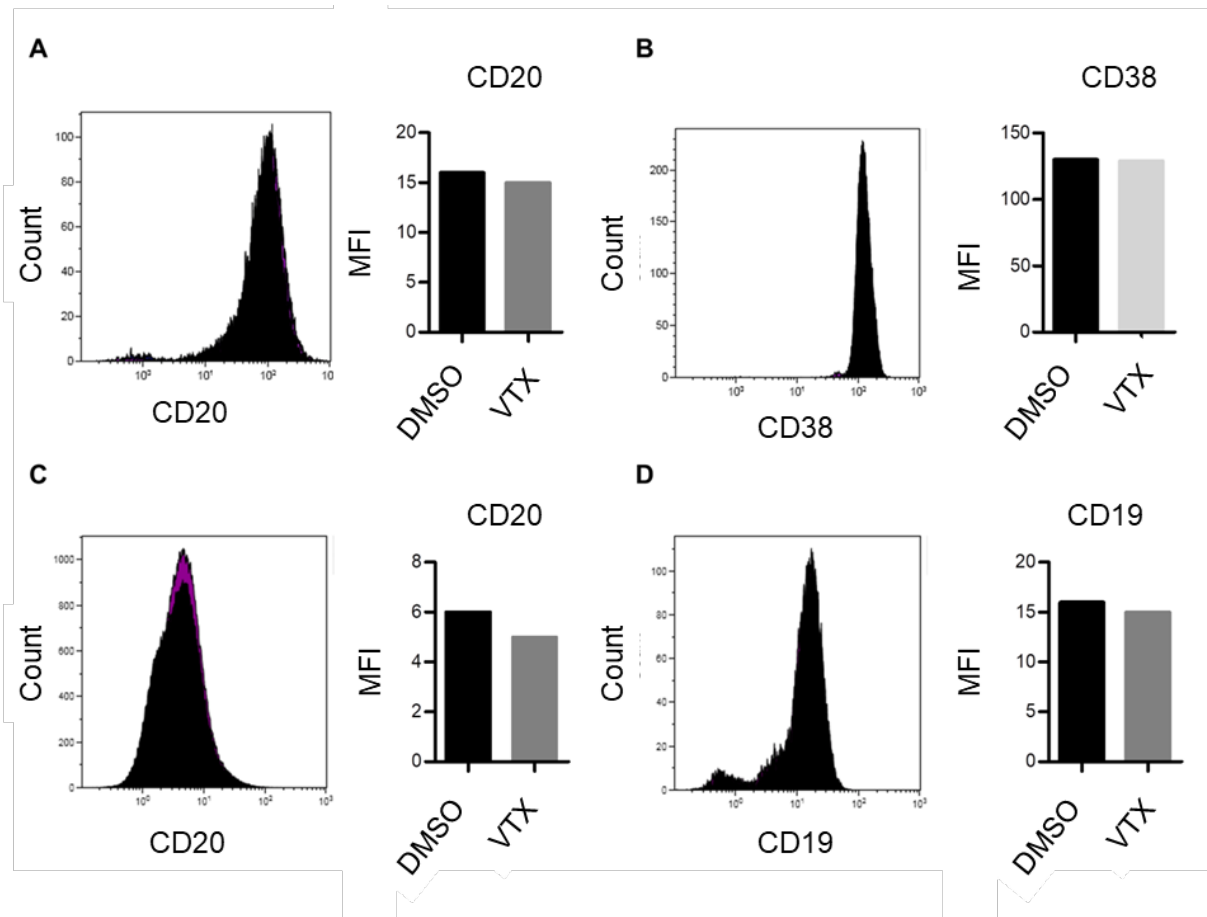
Bei der (17;19)-ALL konnte in PDX 1-3 jeweils eine deutliche Bcl-2-Expression dargestellt werden. Auch hier führte die Behandlung mit 1 nM Venetoclax zu einer Reduktion der Bcl-2 Spiegel verglichen mit der DMSO-Kontrolle (Abb. 4-3 B).

Insgesamt konnte in den Bcl-2-exprimierenden BL- und t(17;19)-ALL-PDX-Zellen eine Abnahme des Bcl-2-Spiegels durch die Behandlung mit Venetoclax erzielt werden. Da bereits durch die Behandlung mit 1 nM Venetoclax nach 12 Stunden ein Effekt auf Proteinebene mittels *Western Blot* dargestellt werden konnte, erfolgte im Verlauf die Behandlung von BL-PDX 1 und t(17;19)-ALL-PDX 1 in der benannten Konzentration.

### 4.3 Die Oberflächenexpression von CD19, CD20 und CD38 bleibt auf DHL-Zelllinien und PDX-Zellen nach Behandlung mit Venetoclax unverändert

Die CD-Oberflächenmarker dienen als Angriffspunkte für die von uns im Verlauf verwendeten Antikörper und stellen somit essenzielle Zielstrukturen dar. Um zu untersuchen, ob die Behandlung mit Venetoclax einen Einfluss auf die CD-Expression der von uns verwendeten Zielzellen hat, wurden CARNAVAL-, WILL-2, BL-PDX- und t(17;19)-ALL-PDX-Zellen für 12 Stunden mit DMSO als Kontrolle und 1 nM Venetoclax behandelt. Anschließend wurde die Oberflächenexpression von CD20 auf CARNAVAL- und BL-PDX-Zellen, von CD38 auf WILL-2-Zellen und die Expression von CD19 auf t(17;19)-ALL-PDX-Zellen durchflusszytometrisch untersucht.

Im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Zellen zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der CD20-Expression auf CARNAVAL- und BL-PDX-Zellen durch die Behandlung mit Venetoclax (Abb. 4-4 A und C).



**Abbildung 4-4: Die Oberflächenexpression von CD19, CD20 und CD38 bleibt nach Behandlung mit 1 nM Venetoclax unverändert.** Die Oberflächenexpression von CD19, CD20 und CD38 wurde in den beiden DHL-Zelllinien sowie BL-PDX- und t(17;19)-ALL-PDX-Zellen nach Zugabe von Venetoclax durchflusszytometrisch untersucht. **A)** CD20-Expression auf CARNAVAL-Zellen. **B)** CD38-Expression auf WILL-2-Zellen. **C)** CD20-Expression auf BL-PDX-Zellen. **D)** CD19-Expression auf t(17;19)-ALL-PDX-Zellen. MFI = Mittlere Fluoreszenz.

Darüber hinaus konnten auf WILL-2-Zellen sowie t(17;19)-ALL-PDX-Zellen keine Veränderungen der CD38- bzw. CD19-Expression nach Behandlung mit Venetoclax beobachtet werden (Abb. 4-4 B und D). Unsere Ergebnisse deuten darauf, dass die Behandlung mit Venetoclax keinen signifikanten Einfluss auf die Expression der von uns untersuchten Oberflächenmarker hat und diese somit weiterhin ausreichend als Zielstrukturen für unsere therapeutischen Antikörper zur Verfügung stehen.

#### 4.4 Indirekte Antikörpereffekte

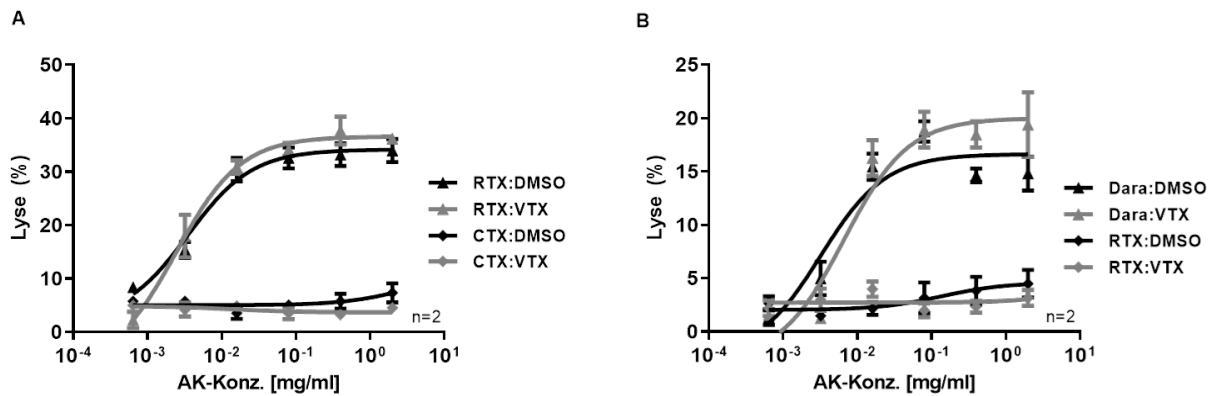
Monoklonale Antikörper sind in der Lage, ihre Wirkung über direkte und indirekte Antikörpermechanismen zu vermitteln (209). Im Fokus der indirekten Antikörpermechanismen stehen die antikörperabhängige Zellzytotoxizität (ADCC), die komplementabhängige Zytotoxizität (CDC) und die antikörperabhängige Zellphagozytose (ADCP) (154). Im Folgenden wurde der Einfluss von Venetoclax auf die Vermittlung der indirekten

Antikörpereffekte untersucht. Zur Testung aller drei Mechanismen wurden Effektorzellen, Zielzellen und die jeweiligen Antikörper benötigt. Die Testung der ADCC erfolgte mit Hilfe von mononukleären Zellen (MNCs), die der CDC mit humanem Serum und die Testung der ADCP erfolgte mit humanen und murinen Makrophagen. Die drei Kernmechanismen wurden zunächst in DHL-Zelllinien untersucht. In den PDX-Zellen wurden die indirekten Antikörpereffekte nur untersucht, wenn eine signifikante Verbesserung der Antikörpereffizienz in Kombination mit Venetoclax in den Zelllinien CARNAVAL und WILL-2 gezeigt werden konnte.

### **4.4.1 Venetoclax in Kombination mit therapeutischen Antikörpern führt zu keiner Erhöhung der antikörperabhängigen Zellzytotoxizität in DHL-Zelllinien**

Zunächst wurde die ADCC in den DHL-Zelllinien CARNAVAL und WILL-2 mittels  $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungstest untersucht. Die Freisetzung des radioaktiven  $^{51}\text{Chroms}$  aus den Zielzellen diente hier als indirektes Maß für eine Zelllyse und wurde mittels Chemilumineszenz detektiert. So sollte untersucht werden, ob durch die Vorbehandlung der Zellen mit 1 nM Venetoclax für 12 Stunden die Fähigkeit therapeutischer Antikörper zur Induktion der ADCC verbessert werden kann. In CARNAVAL-Zellen wurde neben dem CD20-Antikörper Rituximab der EGFR-Antikörper Cetuximab als Kontrollantikörper verwendet. Aufgrund der fehlenden CD20-Expression auf WILL-2-Zellen diente Rituximab in dieser Zelllinie als Kontrollantikörper, während hier die Induktion der ADCC durch den CD38-Antikörper Daratumumab untersucht werden sollte.

In CARNAVAL-Zellen führte die Behandlung mit Cetuximab auch in steigenden Konzentrationen zu keiner Erhöhung der Zelllyse unabhängig davon, ob die Zellen mit DMSO oder Venetoclax vorbehandelt wurden. In den mit DMSO vorbehandelten Zellen führte die Zugabe von Rituximab in ansteigenden Konzentrationen zu einer Steigerung der Zelllyse im Vergleich zur Behandlung mit Cetuximab. Durch die Vorbehandlung mit Venetoclax konnte nach Zugabe von Rituximab keine weitere Steigerung der Zelllyse erzielt werden. Die Kombination aus Venetoclax und Rituximab führte somit zu keiner Steigerung der ADCC in CARNAVAL-Zellen (Abb. 4-5 A).



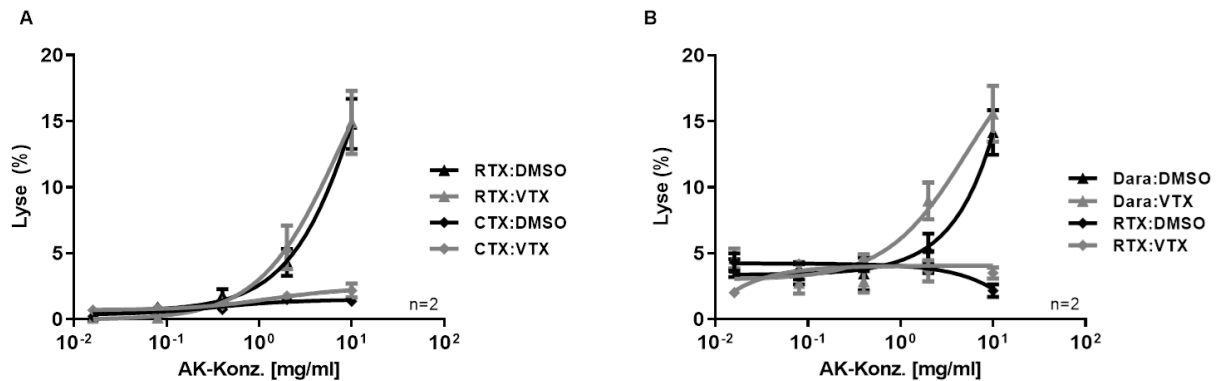
**Abbildung 4-5: Die Kombination aus Venetoclax mit therapeutischen Antikörpern führt zu keiner Steigerung der ADCC.** Die durch mononukleäre Zellen-vermittelte ADCC wurde mittels <sup>51</sup>Chrom-Freisetzungstest in den DHL-Zelllinien CARNAVAL und WILL-2 nach Zugabe von Venetoclax (VTX) und entsprechenden Antikörpern untersucht. **A)** CARNAVAL-Zellen wurden mit DMSO und 1 nM VTX für 12 Stunden vorbehandelt und mit Cetuximab (CTX) oder Rituximab (RTX) kombiniert. **B)** WILL-2-Zellen wurden mit DMSO und 1 nM VTX für 12 Stunden vorbehandelt und mit RTX oder Daratumumab (Dara) kombiniert. Gezeigt werden die Ergebnisse von zwei unabhängigen Versuchen aus zwei unterschiedlichen Spendern. Diese werden als Mittelwert und SEM der spezifischen Lyse (%) dargestellt.

Ein ähnlicher Effekt wurde auch in WILL-2-Zellen beobachtet. Die Zugabe von Rituximab als Kontrolle führte zu einer leichten Zellyse, die durch die Vorbehandlung mit Venetoclax auch hier nicht gesteigert werden konnte. Die Zugabe von Daratumumab führte zu einer Steigerung der Zellyse im Vergleich zum Kontrollantikörper. In diesem Fall konnte durch die Zugabe von Venetoclax lediglich eine geringe, nicht signifikante Zunahme der Zellyse beobachtet werden (Abb. 4-5 B). Zusammenfassend kam es zu keiner signifikanten Verbesserung der Induktion der MNC-vermittelten ADCC in CARNAVAL- und WILL-2-Zellen durch die Kombination therapeutischer Antikörper mit Venetoclax.

#### 4.4.2 Venetoclax in Kombination mit therapeutischen Antikörpern führt zu keiner Erhöhung der komplementabhängigen Zytotoxizität in DHL-Zelllinien

Im Anschluss wurde die CDC in CARNAVAL- und WILL-2-Zellen untersucht. Die Zielzellen wurden zunächst mit DMSO und 1 nM Venetoclax behandelt. Wie bereits in 4.4.1 wurden in CARNAVAL-Zellen die Antikörper Cetuximab als Kontrolle und Rituximab, sowie in WILL-2-Zellen Rituximab als Kontrollantikörper und Daratumumab verwendet.

In CARNAVAL-Zellen führte die Zugabe von Cetuximab weder nach Vorbehandlung mit DMSO noch mit Venetoclax zu einer Erhöhung der CDC. Durch die Zugabe von Rituximab konnte die Zellyse in steigenden Konzentrationen erhöht werden. Dennoch konnte auch hier keine erhöhte Lyse gezeigt werden, wenn Zellen zuvor Venetoclax ausgesetzt waren verglichen zur DMSO-Kontrolle (Abb. 4-6 A).



**Abbildung 4-6: Die Kombination von Venetoclax mit therapeutischen Antikörpern führt zu keiner Steigerung der CDC.** Die komplementvermittelte Zytotoxizität wurde mittels  $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungstest in den DHL-Zelllinien CARNAVAL und WILL-2 nach Zugabe von Venetoclax (VTX) und therapeutischen Antikörpern untersucht. **A)** CARNAVAL-Zellen wurden mit DMSO und 1 nM VTX für 12 Stunden vorbehandelt und mit Cetuximab (CTX) oder Rituximab (RTX) kombiniert. **B)** WILL-2-Zellen wurden mit DMSO und 1 nM VTX für 12 Stunden vorbehandelt und mit RTX oder Daratumumab (Dara) kombiniert. Gezeigt werden die Ergebnisse von zwei unabhängigen Versuchen aus zwei unterschiedlichen Spendern. Diese werden als Mittelwert und SEM der spezifischen Lyse (%) dargestellt.

In WILL-2-Zellen kam es durch die Zugabe von Daratumumab zu einer deutlichen Steigerung der Zelllyse im Vergleich zum Kontrollantikörper Rituximab. Die Zugabe von 1 nM Venetoclax führte in WILL-2-Zellen zu keiner signifikanten Steigerung der CDC in Kombination mit Rituximab oder Daratumumab (Abb. 4-6 B). Insgesamt konnte durch die Kombination aus Venetoclax und therapeutischen Antikörpern keine signifikante Steigerung der CDC gezeigt werden.

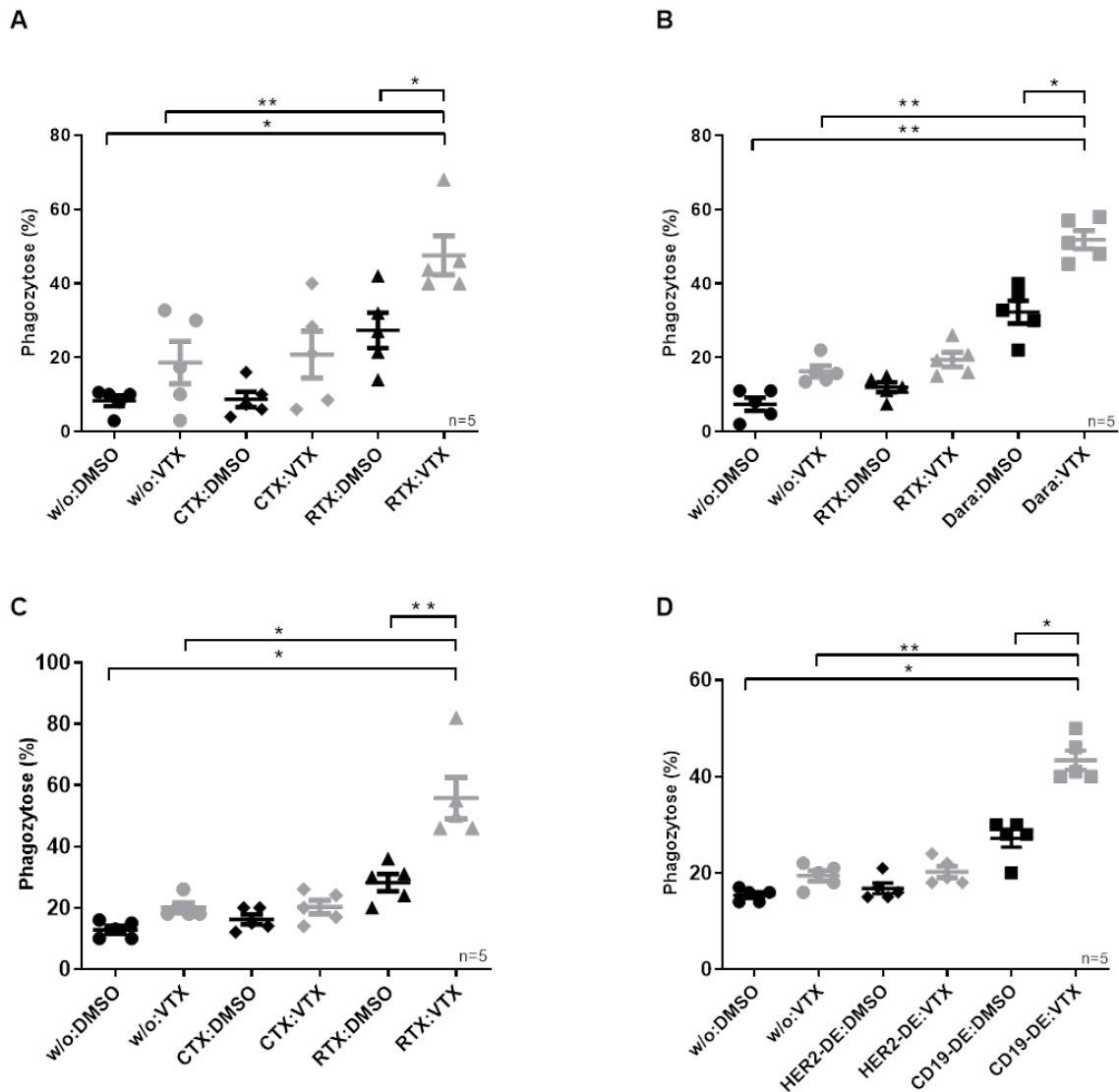
#### 4.4.3 Venetoclax in Kombination mit therapeutischen Antikörpern erhöht die Phagozytose mit humanen Makrophagen in DHL-Zelllinien und BL- und t(17;19)-ALL-PDX-Zellen *in vitro*

Im weiteren Verlauf wurde untersucht, ob die ADCP durch die Kombination aus Venetoclax und Antikörpern in DHL-Zelllinien und BL- bzw. t(17;19)-ALL-PDX-Zellen gesteigert werden kann. Die Zellen wurden jeweils mit DMSO als Kontrolle oder 1 nM Venetoclax für 12 Stunden vorbehandelt. Es wurden die folgenden Bedingungen miteinander verglichen: vorbehandelte Zielzellen ohne Antikörperzusatz als Negativkontrolle (w/o:DMSO, w/o:VTX), vorbehandelte Zellen nach Zugabe eines Kontrollantikörpers (Kontroll-AK:DMSO, Kontroll-AK:VTX) und vorbehandelte Zellen nach Zugabe des zu untersuchenden Antikörpers (AK:DMSO, AK:VTX). Es erfolgte außerdem die Zugabe von humanen Makrophagen. Alle Versuche wurden je fünfmal mit frisch isolierten humanen Makrophagen von fünf gesunden Spendern durchgeführt. Die Phagozytoserate wurde unter dem Mikroskop als Anteil der mit Carboxyfluoresceinsuccinimidylester(CSFE)-positiv gefärbten Zellen, die von 100

Makrophagen phagozytiert wurden, bestimmt. In CARNAVAL-Zellen und BL-PDX-Zellen wurde der Einfluss von Rituximab auf die Vermittlung der ADCP untersucht. Der EGFR-Antikörper Cetuximab diente hierbei als Kontrollantikörper. In WILL-2-Zellen wurde die ADCP nach Hinzugabe von Daratumumab untersucht. In diesem Fall diente Rituximab als Kontrollantikörper. In t(17;19)-ALL-PDX-Zellen wurde HER2-DE, eine Fc-modifizierte Version eines gegen den humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (HER2)-gerichteten Antikörpers, als Kontrollantikörper verwendet, während der Einfluss von CD19-DE, einer Fc-modifizierten Variante des CD19-Antikörpers MOR208, auf die ADCP untersucht wurde.

In CARNAVAL-Zellen zeigte sich durch die alleinige Behandlung mit DMSO ohne Antikörperzugabe nur eine geringe Phagozytoserate von durchschnittlich 8,3%. Durch die Vorbehandlung mit Venetoclax konnte die Phagozytoserate auf 18,6% gesteigert werden. Nach der Zugabe von Cetuximab konnte im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit DMSO ohne Antikörperzugabe die Phagozytose nicht weiter gesteigert werden. Jedoch konnte durch die Vorbehandlung mit Venetoclax ebenfalls eine Steigerung der Phagozytose von 8,3% auf 20,8% beobachtet werden. Unter der Kombination aus DMSO und Venetoclax zeigte sich im Vergleich zu den bisherigen Behandlungen eine gesteigerte Phagozytose von 27,3%. Außerdem konnte in diesem Fall durch die Kombination aus Venetoclax und Rituximab eine weitere Steigerung der Phagozytose auf 47,5% erzielt werden. So zeigte sich eine signifikante Steigerung der Phagozytose im Vergleich zur den alleinigen Behandlungen mit DMSO und mit Rituximab sowie eine doppelt signifikante Steigerung im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Venetoclax (Abb. 4-7 A).

In WILL-2-Zellen wurde durch die alleinige Vorbehandlung mit DMSO ohne Antikörperzugabe ebenfalls eine geringe Phagozytoserate von 7,3% dargestellt, die durch die Vorbehandlung mit Venetoclax bereits verdoppelt werden konnte auf 16,2%. Die Zugabe von Rituximab als Kontrollantikörper konnte in diesem Fall eine leichte Steigerung der Phagozytose im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit DMSO auf 11,9% erzielen. Durch die Vorbehandlung mit Venetoclax konnte hier ebenfalls eine Steigerung der Phagozytose auf 19,4% dargestellt werden. Die Behandlung der mit DMSO vorbehandelten Zellen mit Daratumumab führte zu einer deutlichen Steigerung der Phagozytose auf 32,2%, wobei die Kombination aus Daratumumab und Venetoclax die Phagozytoseraten erneut weiter steigern konnten auf durchschnittlich 52%. Es zeigte sich somit eine signifikante Steigerung der Phagozytose durch die Kombination von Venetoclax und Daratumumab im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Daratumumab. Des Weiteren konnte durch die Kombinationsbehandlung die Phagozytose doppelt signifikant gesteigert werden im Vergleich zu den alleinigen Behandlungen mit DMSO und mit Venetoclax (Abb. 4-7 B).



**Abbildung 4-7: Die Kombination von Venetoclax und therapeutischen Antikörpern verbessert die ADCP mit humanen Makrophagen in DHL-Zelllinien und BL- und t(17;19)-ALL-PDX-Zellen.** Die DHL-Zelllinien CARNAVAL und WILL-2 sowie BL-PDX- und t(17;19)-ALL-PDX-Zellen wurden mit DMSO oder Venetoclax vorbehandelt und anschließend ohne Antikörper (w/o), mit Kontrollantikörpern oder mit den zu untersuchenden Antikörpern und humanen Makrophagen für 2,5 Stunden inkubiert. Dargestellt sind die durch humane Makrophagen phagozytierten Zielzellen in Prozent von fünf unabhängigen Experimenten mit fünf verschiedenen Spendern (n=5). Jeder Punkt präsentiert ein unabhängiges Experiment. Jedes Experiment wurde dabei von mindestens zwei unabhängigen Beobachtern ausgezählt. Statistische Analysen: Mann-Whitney-U-Test, nicht-parametrisch. Ein p-Wert von <math><0.05</math> wurde als statistisch signifikant angenommen (\*A) CARNAVAL-Zellen wurden mit DMSO und Venetoclax (VTX) für 12 Stunden vorbehandelt und mit Cetuximab (CTX) oder Rituximab (RTX) kombiniert. **B**) WILL-2-Zellen wurden mit DMSO und VTX für 12 Stunden vorbehandelt und mit RTX oder Daratumumab (Dara) kombiniert. **C**) BL-PDX-Zellen wurden mit DMSO und VTX für 12 Stunden vorbehandelt und mit CTX oder RTX kombiniert. **D**) t(17;19)-ALL-PDX-Zellen wurden mit DMSO oder 1 nM VTX für 12 Stunden vorbehandelt und mit HER2-DE oder CD19-DE kombiniert.

Auch im BL-PDX wurden nach der Vorbehandlung mit DMSO ohne Antikörperzugabe geringe Phagozytoseraten von durchschnittlich 12,8% erzielt. Die Vorbehandlung mit Venetoclax führte zu einer Zunahme der Phagozytose auf 20%. Durch die Zugabe von Cetuximab auf die mit DMSO vorbehandelten Zellen konnte eine Phagozytose von 13,6% dargestellt werden, die



durch die Vorbehandlung mit Venetoclax ebenfalls gesteigert werden konnte auf 20,2%. Die alleine Zugabe von Rituximab führte zu einer weiteren Steigerung der Phagozytose auf 28,2%. Durch die Kombination von Venetoclax und Rituximab konnte die Phagozytoserate nahezu verdoppelt werden auf 55,2%. So zeigte sich eine signifikante Steigerung der Phagozytose durch die Kombination aus Venetoclax und Rituximab im Vergleich zu den alleinigen Behandlungen mit DMSO und Venetoclax sowie eine doppelt signifikante Steigerung im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Rituximab (Abb. 4-7 C).

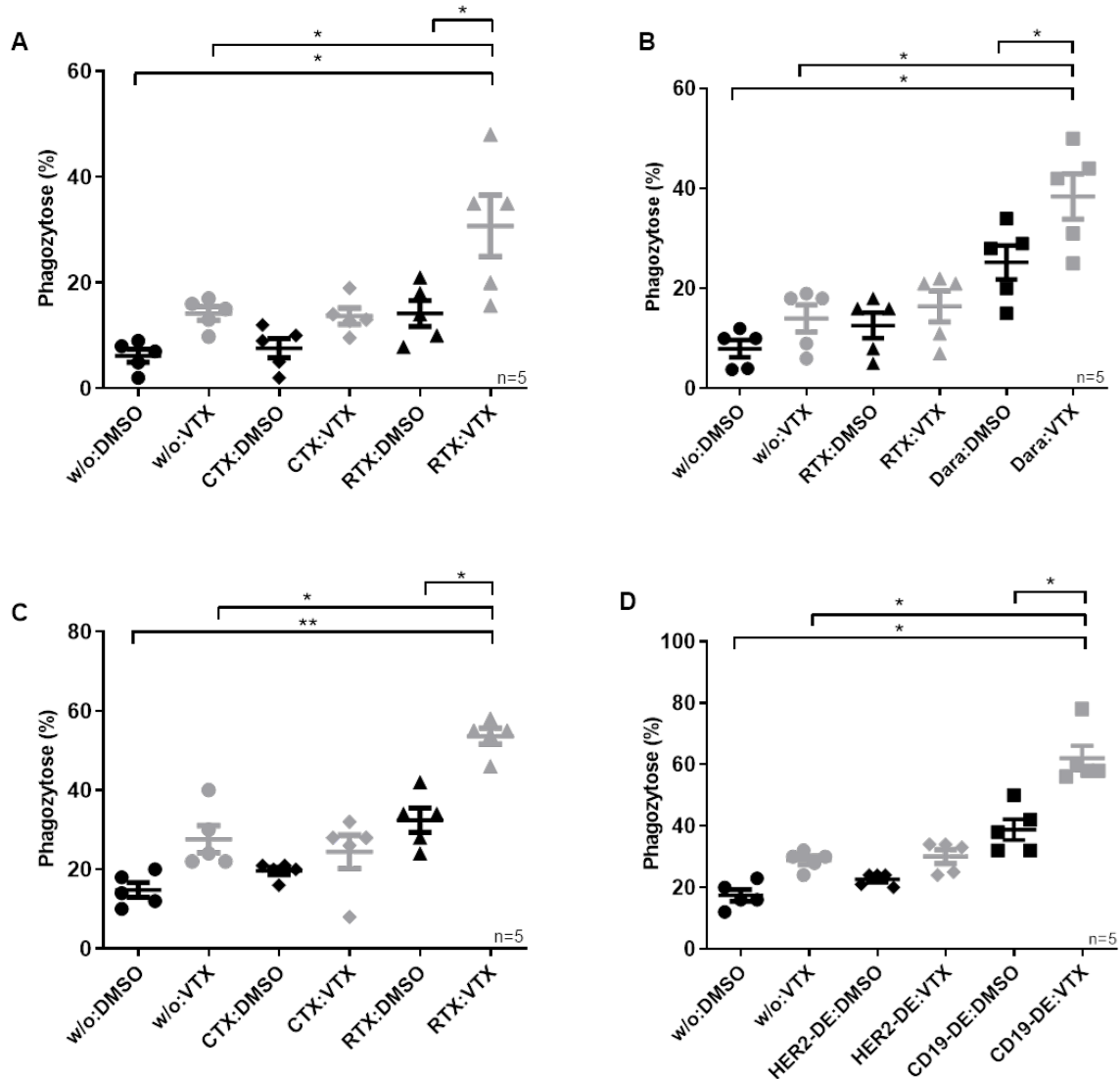
In den mit DMSO vorbehandelten t(17;19)-ALL-PDX-Zellen ohne Zugabe eines Antikörpers zeigte sich eine niedrige Phagozytoserate von 13,2%, wobei durch Vorbehandlung mit Venetoclax eine Steigerung auf 19,4% erzielt wurde. Die Zugabe von HER2-DE nach Vorbehandlung mit DMSO führte zu einer Phagozytoserate von durchschnittlich 16,8%. Die Kombination von Venetoclax mit HER2-DE führte zu einer geringen Zunahme der Phagozytose auf 20,2%. Die Behandlung mit CD19-DE führte zu einer deutlichen Steigerung der Phagozytose auf 27,2%, die in Kombination mit Venetoclax weiter gesteigert werden konnte auf 43,84%. Es zeigte sich eine signifikante Steigerung der Phagozytose im Vergleich zu den alleinigen Behandlungen mit DMSO und CD19-DE sowie eine doppelt signifikante Steigerung im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit HER2-DE (Abb. 4-7 D).

Zusammenfassend konnte eine signifikante Steigerung der Phagozytose in allen von uns untersuchten Zellen durch die Kombination aus therapeutischem Antikörper und Venetoclax gezeigt werden.

#### **4.4.4 Venetoclax in Kombination mit therapeutischen Antikörpern erhöht die Phagozytose mit murinen Makrophagen in DHL-Zelllinien und BL- und t(17;19)-ALL-PDX-Zellen *in vitro***

Da humane Makrophagen je nach Spender unterschiedliche Aktivitäten aufweisen, wurden für den folgenden Versuch Makrophagen aus *NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>Il2rgtm1Wjl/SzJ*(NSG)-Mäusen präpariert, um so die Heterogenität der Spender zu minimieren. Es wurden im Verlauf dieselben Therapieoptionen getestet wie in 4.4.3. In allen Versuchen wurden durch die alleinige Behandlung mit DMSO oder der alleinigen Behandlung mit dem Kontrollantikörper nur geringe Phagozytoseraten erzielt. Durch die Vorbehandlung mit Venetoclax konnte in CARNAVAL-Zellen auch unter Verwendung muriner Makrophagen eine Verdopplung der Phagozytose von 6,2% auf 14,2% gezeigt werden. Durch die Behandlung mit Cetuximab konnte keine eindeutige Steigerung der Phagozytose im Vergleich zur Probe ohne

Antikörperzugabe beobachtet werden. Jedoch zeigte sich auch hier durch die Vorbehandlung mit Venetoclax eine Steigerung der Phagozytose von 7,6% auf 13,7%. Durch die alleinige Behandlung mit Rituximab zeigte sich eine Phagozytoserate von 14,2%, die durch die Vorbehandlung mit Venetoclax verdoppelt werden konnte auf 30,7% (Abb. 4-8 A).



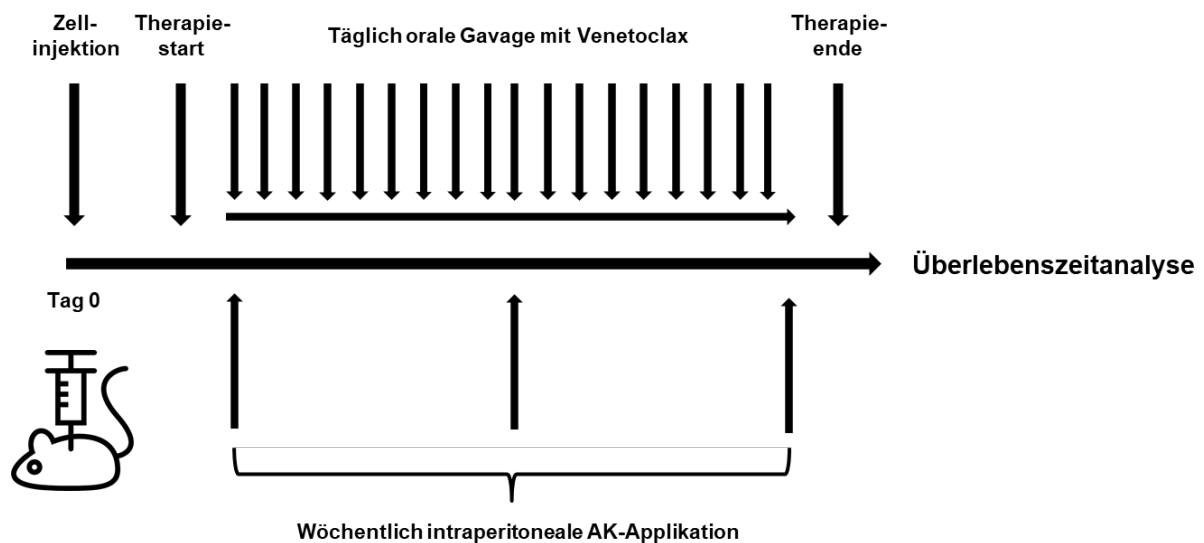
**Abbildung 4-8: Die Kombination von Venetoclax und therapeutischen Antikörpern verbessert die ADCP mit murinen Makrophagen in DHL-Zelllinien und BL- und t(17;19)-ALL-PDX-Zellen.** Die DHL-Zelllinien CARNAVAL und WILL-2 und PDX-Zellen eines BL und eines Patienten mit t(17;19)-ALL wurden mit Venetoclax oder DMSO behandelt und anschließend ohne Antikörper (w/o), mit Kontrollantikörpern oder mit den zu untersuchenden Antikörpern und murinen Makrophagen für 2,5 Stunden inkubiert. Dargestellt sind die durch murine Makrophagen phagozytierten Zielzellen in Prozent von fünf unabhängigen Experimenten mit fünf verschiedenen Spendern (n=5). Jeder Punkt präsentiert ein unabhängiges Experiment. Jedes Experiment wurde dabei von mindestens zwei unabhängigen Beobachtern ausgezählt. Statistische Analysen: Mann-Whitney-U-Test, nicht-parametrisch. Ein p-Wert von <math><0.05</math> wurde als statistisch signifikant angenommen (\*A) CARNAVAL-Zellen wurden mit DMSO und Venetoclax (VTX) für 12 Stunden vorbehandelt und mit Cetuximab (CTX) oder Rituximab (RTX) kombiniert. **B)** WILL-2-Zellen wurden mit DMSO und VTX für 12 Stunden vorbehandelt und mit RTX oder Daratumumab (Dara) kombiniert. **C)** BL-PDX-Zellen wurden mit DMSO und VTX für 12 Stunden vorbehandelt und mit CTX oder RTX kombiniert. **D)** t(17;19)-ALL-PDX-Zellen wurden mit DMSO oder 1 nM VTX für 12 Stunden vorbehandelt und mit HER2-DE oder CD19-DE kombiniert.

In WILL-2-Zellen zeigte sich in der Probe ohne Antikörperzugabe eine niedrige Phagozytoserate von 8%, wobei durch die Vorbehandlung mit Venetoclax die Phagozytose auf 14% gesteigert werden konnte. Nach Zugabe des Kontrollantikörpers Rituximab wurde eine Phagozytoserate von durchschnittlich 12,6% erzielt, welche durch die Vorbehandlung mit Venetoclax auf 16,4% gesteigert wurde. Durch die alleinige Behandlung mit Daratumumab konnte eine Phagozytoserate von 19,6% erzielt werden, die durch die Vorbehandlung mit Venetoclax nahezu verdoppelt werden konnte auf 38,4%. (Abb. 4-8 B). In BL-PDX-Zellen zeigte sich ohne Antikörperzusatz eine Phagozytoserate von 14,8%, die durch die Vorbehandlung mit Venetoclax bereits deutlich gesteigert werden konnte auf 27,6%. Durch die alleinige Zugabe von Cetuximab konnte eine leichte Zunahme der Phagozytose gezeigt werden. Auch hier zeigte sich durch die Vorbehandlung mit Venetoclax eine Steigerung der Phagozytose von 19,6% auf 24,4%. Durch die alleinige Behandlung mit Rituximab konnte eine deutlich gesteigerte Phagozytose von 32,4% im Vergleich zur Kontrolle dargestellt werden. Durch die Vorbehandlung mit Venetoclax zeigte sich auch hier eine signifikant gesteigerte Phagozytose von durchschnittlich 53,6% (Abb. 4-8 C). In t(17;19)-ALL-PDX-Zellen konnte in der Probe ohne Antikörperzusatz eine Phagozytose von 17,4% erzielt werden. Auch in diesem Fall konnte die Phagozytose durch die Vorbehandlung mit Venetoclax gesteigert werden auf 28,8%. Nach Zugabe des Kontrollantikörpers HER2-DE zeigte sich eine Phagozytose von 22,6%, die auch in diesem Fall durch die Vorbehandlung mit Venetoclax gesteigert werden konnte auf 30%. Nach alleiniger Zugabe des CD19-DE-Antikörpers wurde eine Phagozytose von 38,8% dargestellt, die durch die Vorbehandlung mit Venetoclax auf 62% gesteigert werden konnte (Abb. 4-8 D).

Entsprechend unserer Ergebnisse in 4.4.3 konnte eine Steigerung der Phagozytose ebenfalls unter Verwendung muriner Makrophagen beobachtet werden. Dies bestätigte ebenfalls, dass durch die Kombination aus Venetoclax und verschiedenen therapeutischen Antikörpern eine signifikante Steigerung der Phagozytose in DHL-Zelllinien sowie BL- und t(17;19)-ALL-PDX erzielt werden kann. Es lässt sich somit vermuten, dass die von uns untersuchten Therapieoptionen ebenfalls zu einer Aktivierung muriner Makrophagen führen. Um zu untersuchen, ob sich der von uns dargestellte Effekt ebenfalls auf den lebenden Organismus übertragen lässt, erfolgte im Verlauf die Untersuchung dieser Therapieoptionen im Rahmen von präklinischen *in vivo*-Studien.

#### 4.5 Venetoclax in Kombination mit therapeutischen Antikörpern führt zu einer verlängerten Lebenszeit *in vivo*

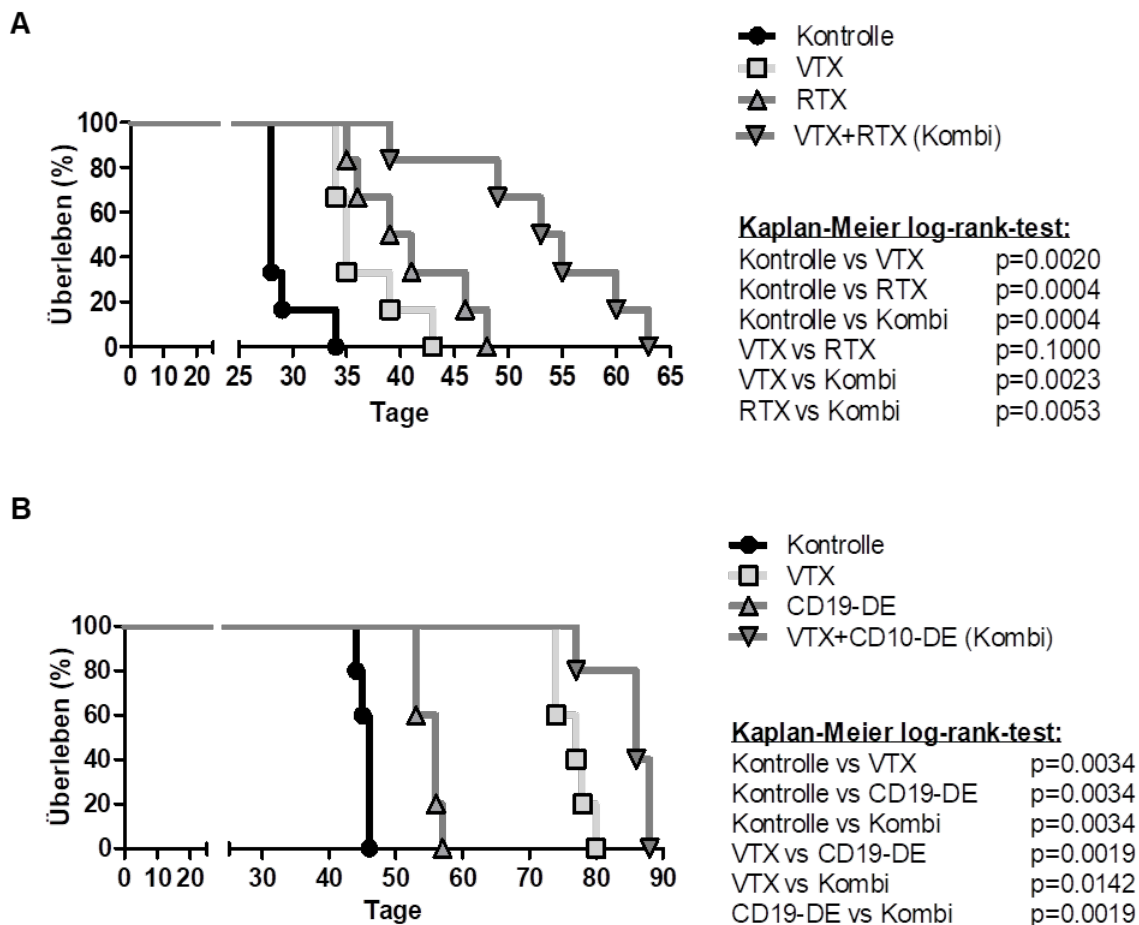
Final wurde der Einfluss der Kombination aus therapeutischem Antikörper und Venetoclax *in vivo* in NSG-Mäusen getestet. Hierfür wurden zunächst die Tumorzellen in NSG-Mäuse injiziert und nach 10 (CARNAVAL) bzw. 14 Tagen (t(17;19)-ALL-PDX) mit der Therapie gestartet. Die Kontrollgruppe verblieb ohne Behandlung. Des Weiteren wurden Mausgruppen mit Venetoclax allein, dem Antikörper (Rituximab oder CD19-DE) alleine und der Kombinationstherapie aus beiden Substanzen behandelt. Die Mäuse erhielten täglich 100 mg/kg Venetoclax mittels oraler Gavage sowie wöchentlich 10 µg/kg des Antikörpers per intraperitonealer Applikation (Abb. 4-9). Die Mäuse wurden geopfert, wenn klinische Zeichen einer Leukämie- oder Lymphommanifestation, wie z.B. neurologische Defizite oder eine Hepatosplenomegalie, oder ein Anteil von über 75% Blasten im peripheren Blut vorlagen.



**Abbildung 4-9: Schematische Darstellung der *in vivo* Versuche.** CARNAVAL- oder t(17;19)-ALL-PDX-Zellen wurden intravenös in NSG-Mäuse injiziert. Venetoclax (VTX; 100 mg/kg) wurde täglich mittels oraler Gavage verabreicht. Therapeutische Antikörper (10 µg/kg) wurden wöchentlich intraperitoneal injiziert.

In der Kontrollgruppe der mit CARNAVAL-Zellen injizierten Mäuse zeigte sich eine mediane Überlebenszeit von 29 Tagen. Durch die alleinige Behandlung mit Venetoclax zeigte sich bereits eine Verlängerung der Überlebenszeit der Mäuse auf durchschnittlich 37 Tage. Mäuse, welche einer Monotherapie mit Rituximab unterzogen wurden, zeigten weiterhin eine verlängerte Überlebenszeit von durchschnittlich 41 Tagen. Eine deutliche Verlängerung der Überlebenszeit konnte hingegen durch die Kombinationstherapie aus Rituximab und

Venetoclax gezeigt werden. Hier zeigte sich ein medianes Überleben von durchschnittlich 53 Tagen (Abb. 4-10 A).



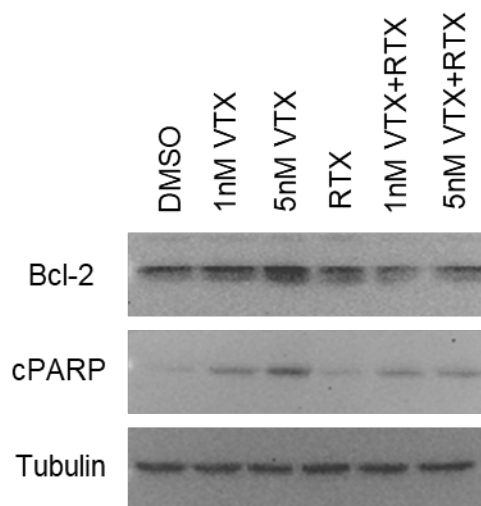
**Abbildung 4-10: Die Kombination aus Venetoclax und therapeutischen Antikörpern verlängert das Überleben von Mäusen *in vivo*.** **A)** CARNAVAL-Zellen wurden in NSG-Mäuse (n=6/Gruppe) injiziert. Die Mäuse blieben unbehandelt (Kontrolle), wurden mit Venetoclax (VTX), Rituximab (RTX) oder der Kombination beider Substanzen (Kombi) behandelt. **B)** t(17;19)-ALL-PDX-Zellen wurden in NSG-Mäuse injiziert (n=5/Gruppe). Die Mäuse blieben unbehandelt oder wurden mit VTX, CD19-DE oder der Kombination beider Substanzen (Kombi) behandelt. Die Überlebenszeit wurde mittels Kaplan-Meier-Kurven und log-rank-Statistiken analysiert. Ein p-Wert von < 0.05 wurde als statistisch signifikant angenommen.

Ein ähnlicher Effekt konnte auch in einem zweiten *in vivo* Versuch beobachtet werden. Nach Applikation von t(17;19)-ALL-PDX-Zellen und anschließender Engraftmentzeit zeigte sich in der Kontrollgruppe ein medianes Überleben von 45 Tagen. Durch die alleinige Behandlung mit CD19-DE konnte in diesem Fall die Überlebenszeit der Mäuse bereits deutlich verlängert werden. Es zeigte sich hier eine mediane Überlebenszeit von 55 Tagen. Es konnte jedoch durch die alleinige Behandlung mit Venetoclax eine Verlängerung der Überlebenszeit auf durchschnittlich 77 Tage erzielt werden. Durch die Kombination aus Venetoclax und CD19-DE zeigte sich hingegen weiterhin eine Verlängerung des medianen Überlebens auf 85 Tage. (Abb. 4-10 B). Es zeigte sich somit in unseren *in vivo* Versuchen eine signifikante Verlängerung

des medianen Überlebenszeit der NSG-Mäuse durch die Kombination aus Venetoclax und Rituximab bzw. Venetoclax und CD19-DE. Wir konnten somit einen deutlichen Überlebensvorteil durch die von uns untersuchten Kombinationstherapien darstellen.

#### 4.6 Die Verbesserung der Phagozytose durch die Kombination aus Venetoclax und therapeutischen Antikörpern ist abhängig von Makrophagen

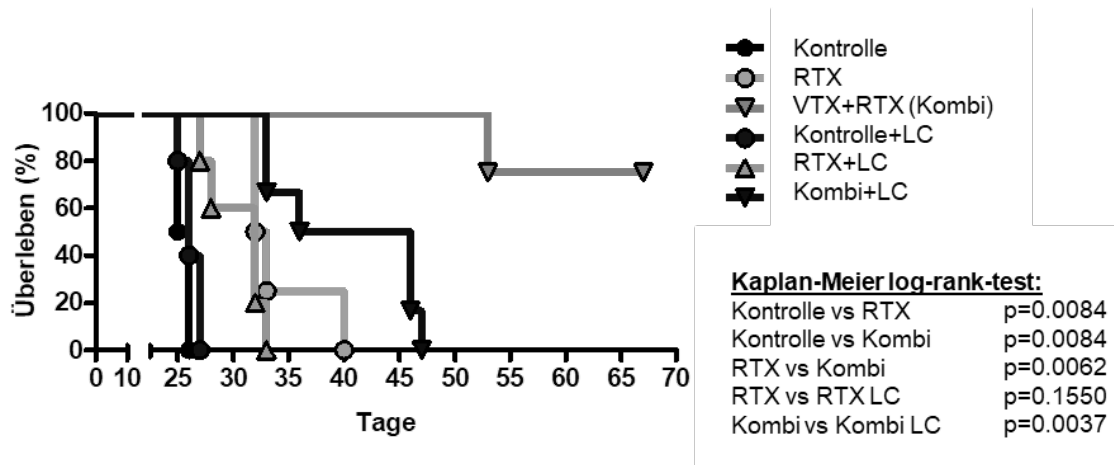
Um zu untersuchen, ob die gesteigerte Effizienz der Kombination aus Venetoclax und Antikörpern auf einer synergistischen Steigerung der Apoptose beruht, wurden CARNAVAL-Zellen mit DMSO, 1 nM oder 5 nM Venetoclax alleine, mit Rituximab alleine oder der Kombination mit 1 nM und 5 nM Venetoclax für 12 Stunden behandelt und die Proteinspiegel von Bcl-2 und cPARP untersucht.



**Abbildung 4-11: Der Effekt der Kombination aus Rituximab und Venetoclax basiert nicht auf einer Steigerung der Apoptose.** Die Proteinspiegel von Bcl-2 und cPARP wurden mittels *Western Blot* in CARNAVAL-Zellen nach Zugabe von Venetoclax (VTX; 1 nM, 5 nM), Rituximab (RTX; 10 µg/mg) oder der Kombination (VTX+RTX) nach 12 Stunden Behandlung analysiert. Tubulin diente als Ladekontrolle.

Wir konnten hier unsere Ergebnisse bestätigen, dass die Behandlung mit 1 nM Venetoclax zu keiner Reduktion des Bcl-2-Spiegels in CARNAVAL-Zellen verglichen zur DMSO-Kontrolle führt. Auch die Behandlung mit Rituximab alleine oder in Kombination mit Venetoclax veränderte die Bcl-2-Spiegel nicht. Mit steigenden Konzentrationen an Venetoclax konnte eine vermehrte Expression von cPARP beobachtet werden, wobei es durch die zusätzliche Kombination mit Rituximab zu keiner zusätzlichen Steigerung des Apoptosemarkers cPARP kam (Abb. 4-11). Somit konnte gezeigt werden, dass der Effekt der Kombination aus Rituximab und Venetoclax nicht von einer Steigerung der Apoptose per se abhängt. So scheint der gesteigerten Phagozytose ein Zusammenspiel aus Effektorzellen, therapeutischem Antikörper und Venetoclax zu Grunde zu liegen. Um zu untersuchen, ob die von uns gezeigten Effekte

abhängig von Makrophagen sind, wurden im nächsten Schritt erneut CARNAVAL-Zellen in NSG-Mäuse injiziert. Zehn Tage nach der Injektion wurden die Mäuse erneut behandelt, wobei eine Mausgruppe unbehandelt blieb, während zwei weitere Mausgruppen jeweils mit Rituximab alleine oder der Kombination aus Rituximab und Venetoclax behandelt wurden. Um Makrophagen *in vivo* zu depletieren wurden die Mäuse zusätzlich noch mit liposomalem Chlodronat (LC) behandelt.



**Abbildung 4-12: Die Steigerung der Phagozytose durch die Kombination aus Venetoclax und Rituximab ist abhängig von Makrophagen.** CARNAVAL-Zellen wurden intravenös in die Schwanzvenen von NSG-Mäusen injiziert. Die Therapie wurde 10 Tage nach der Injektion gestartet, wobei die Mäuse entweder unbehandelt blieben (n=6), mit Rituximab (RTX; 10 µg/mg) oder der Kombination beider Substanzen (Kombi) behandelt wurden. Zusätzlich erhielten die Mäuse wöchentlich liposomales Clodronat zur Makrophagendepletion (LC; 100 µl intraperitoneal). Das Überleben wurde mittels Kaplan-Meier-Kurven und log-rank-Statistiken analysiert. Ein p-Wert < 0.05 wurde als statistisch signifikant angenommen.

Im Verlauf zeigte die Kontrollgruppe erneut das kürzeste Überleben bei einer medianen Überlebenszeit von 26 Tagen, wobei die zusätzliche Makrophagendepletion keinen Einfluss auf die Lymphomentwicklung und somit keinen Vor- oder Nachteil auf die Überlebenszeit der Mäuse hatte. Die Behandlung mit Rituximab führte, wie in Abb. 4-10, erneut zu einem Überlebensvorteil, wobei dieser durch die zusätzliche Behandlung mit LC geringer ausfiel als ohne Makrophagendepletion. Während durch die alleinige Behandlung mit Rituximab eine mediane Überlebenszeit von 35 Tagen erzielt wurde, zeigte sich durch die Makrophagendepletion eine mediane Überlebenszeit der Mäuse von nur 28 Tagen. Die Kombination aus Venetoclax und Rituximab zeigte erneut eine verlängerte Überlebenszeit der Mäuse im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Rituximab oder der Kontrollgruppe. In diesem Fall war bis zur Terminierung des Versuchs an Tag 69 lediglich eine Maus verstorben. Die weiteren Mäuse zeigten bis zum Versuchabbruch keine klinischen Anzeichen einer Lymphommanifestation. Die Makrophagendepletion mit LC führte jedoch zu einer kürzeren Überlebenszeit bei einem Median von 40 Tagen im Vergleich zur Kombinationsbehandlung ohne LC-Behandlung, was auf eine Aufhebung des positiven

Effekts durch die Kombination aus Venetoclax und Rituximab nach Injektion von CARNAVAL-Zellen in NSG-Mäuse hindeutete (Abb. 4-12).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Makrophagendepletion den Überlebensvorteil bedingt durch die Kombinationstherapie aus Venetoclax und Rituximab umkehrt und Makrophagen somit essenziell für den Therapieeffekt von Venetoclax und therapeutischen Antikörpern *in vivo* sind.



## 5 Diskussion

Die Einführung monoklonaler Antikörper in die Behandlung onkologischer Erkrankungen stellt einen bedeutenden Meilenstein in der Krebstherapie dar (210). Bei einigen hämatologischen Erkrankungen wurden monoklonale Antikörper bereits fest in bestehende Therapieprotokolle integriert (211). Eine weitere Möglichkeit zur Steigerung der Therapieeffizienz ist der Einsatz von Signalweg-Inhibitoren (212). Diese Inhibitoren binden an Proteine, die entscheidend an dem Wachstum und dem Überleben von Tumorzellen beteiligt sind (213). Je nach Entität können verschiedene dieser Proteine über- oder unterexprimiert sein und so zur Entstehung der Neoplasie beitragen (214–216).

Eine vielversprechende Strategie in der Behandlung hämatologischer Erkrankungen stellen Kombinationen aus Antikörpern und Signalweg-Inhibitoren dar, welche durch synergistische oder additive Effekte das Therapieergebnis verbessern können (217). So konnte bereits eine gesteigerte Wirksamkeit der Kombination des Tyrosinkinase-Inhibitors Ibrutinib mit dem CD20-Antikörper Rituximab bei der Behandlung der CLL gezeigt werden. In Studien wurde eine Verbesserung des Langzeitüberlebens von 62,5% auf 90,7% durch die Kombination aus Ibrutinib und Rituximab im Vergleich zur herkömmlichen Chemotherapie aus Fludarabin, Cyclophosphamid und Rituximab beschrieben (218). Die kombinierte Therapie aus dem Phosphoinositid-3-Kinase-Inhibitor Idelalisib und Rituximab wurde bereits in die Behandlung der CLL integriert (219).

Trotz dieser Erfolge in den letzten Jahren stellt die Therapie bestimmter Subtypen hämatologischer Erkrankungen nach wie vor eine Herausforderung dar. So haben Leukämie- und Lymphomentitäten mit einer Bcl-2-Überexpression aufgrund des schlechten Therapieansprechens und hoher Rezidivraten noch immer eine schlechte Prognose (220). Bcl-2 ist entscheidend an der Regulation der Apoptose beteiligt, sodass es im Fall einer erhöhten Bcl-2-Expression zu einer Persistenz der Tumorzellen ohne Eintritt in die Apoptose kommen kann (221). Subgruppen des DLBCL, die mit einer Bcl-2-Überexpression einhergehen, zeigten in der Vergangenheit trotz Kombinationsbehandlung aus Rituximab und Polychemotherapie nach wie vor ein deutlich schlechteres Therapieergebnis als Patienten mit einem negativen Bcl-2-Status (66). Dies verdeutlicht die Notwendigkeit neuer Therapieoptionen für hämatologische Neoplasien mit Bcl-2-Überexpression. So wurde im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss des Bcl-2-Inhibitors Venetoclax auf die Effizienz monoklonaler Antikörper in Bcl-2-positiven DHL-Zelllinien sowie BL- und t(17;19)-ALL-PDX-Zellen untersucht.

### 5.1 Die Inhibition von Bcl-2 mit Venetoclax induziert einen Zellzyklusarrest in DHL-Zelllinien

In unseren Versuchen konnte *in vitro* eine dosisabhängige Reduktion der Zellviabilität in CARNAVAL- und WILL-2-Zellen gezeigt werden. Bereits unter Verwendung niedriger Konzentrationen an Venetoclax kam es in den beiden untersuchten Bcl-2-exprimierenden DHL-Zelllinien zu einer deutlichen Reduktion der Zellviabilität. Es konnte beobachtet werden, dass Venetoclax in niedriger Dosis einen Wachstumsarrest verursachte, in höheren Dosen allerdings eine zytotoxische Wirkung zeigte und die Zellen starben (Abb. 4-1). Eine hohe Sensitivität auf den Bcl-2-Inhibitor Venetoclax wurde bereits in verschiedenen DLBCL-Zelllinien nachgewiesen, wobei vor allem DHL-Zelllinien besonders sensitiv auf Venetoclax reagierten (222). In einer Studie wurde die Wirksamkeit von Venetoclax auf 26 DLBCL-Zelllinien, darunter drei DHL-Zelllinien, untersucht. Eine hohe Sensitivität auf Venetoclax konnte in allen drei DHL-Zelllinien gezeigt werden, indem Zellen mit steigenden Konzentrationen an Venetoclax behandelt wurden und jeweils die Konzentration der halbmaximalen Inhibition (IC<sub>50</sub>) des Zellwachstums ermittelt wurde. So kam es in diesen drei DHL-Zelllinien bereits durch Dosierungen von unter 25 nM zur halbmaximalen Inhibition des Zellwachstums. Von den restlichen 23 DLBCL-Zelllinien wurde in elf Zelllinien eine hohe Sensitivität auf Venetoclax nachgewiesen. Weitere zwölf Zelllinien wurden mit einer IC<sub>50</sub>-Konzentration von über 100 nM als resistent gegenüber der Substanz angesehen (222). Eine positive Korrelation zwischen Bcl-2-Expression und Sensitivität der verschiedenen Zelllinien auf Venetoclax konnte bereits bestätigt werden, sodass Zellen mit hohem Bcl-2-Spiegel stärker auf die Inhibition durch Venetoclax ansprechen als Zellen mit niedrigeren oder fehlenden Bcl-2-Spiegeln (14,134,223). Die Resistenz der restlichen zwölf Zelllinien in der zuvor genannten Studie könnte somit einem fehlenden Bcl-2-Spiegel zugrunde liegen. In unseren Versuchen wurden ebenfalls zwei Bcl-2-positive DHL-Zelllinien verwendet. Unter der Annahme, dass ein hoher Bcl-2-Spiegel mit einer hohen Sensitivität auf Venetoclax einhergeht, wurde im Voraus ebenfalls eine hohe Sensitivität der Zielzellen auf den Bcl-2-Inhibitor vermutet. Tatsächlich konnte in unseren Versuchen bereits durch die Behandlung mit 1 nM Venetoclax ein Wachstumsarrest gezeigt werden, was eine hohe Wirksamkeit der Substanz in unseren Zielzellen bestätigte.

PDX-Zellen weisen in der Regel keine exponentielle Zellproliferation auf. Während sie zunächst meist nur sehr langsam proliferieren, stellen die Zellen das Wachstum häufig im Verlauf vollständig ein. Da der Einfluss von Venetoclax auf die Proliferation somit schwer zu beurteilen war, wurde im Rahmen dieser Arbeit von Zellviabilitätsversuchen mit BL- und t(17;19)-ALL-PDX-Zellen abgesehen. In t(17;19)-positiven ALL-Zellen wurde bereits eine hohe

Sensitivität auf Venetoclax beschrieben. So konnte gezeigt werden, dass NSG-Mäuse, welche mit t(17;19)-ALL-PDX-Zellen injiziert und einer Monotherapie mit Venetoclax unterzogen wurden, einen verzögerten leukämischen Verlauf im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten (134). Die hohe Wirksamkeit von Venetoclax auf die Zellen hängt mit der verhältnismäßig hohen Expression von Bcl-2 in der t(17;19)-ALL zusammen, während PDX-Zellen einer t(1;19)-ALL mit einer geringeren Bcl-2-Expression ein geringeres Ansprechen auf Venetoclax zeigten (134). Dies bestätigte ebenfalls eine positive Korrelation zwischen Bcl-2-Expression und Sensitivität auf Venetoclax. Eine weitere Studie von Seyfried et al. konnte ebenfalls zeigen, dass die Sensitivität auf Venetoclax mit der Höhe des Bcl-2-Spiegels in B-Vorläufer-ALL-Zellen korreliert (224). Passend dazu wurde von uns ebenfalls eine hohe Sensitivität auf Venetoclax in unseren Bcl-2-positiven t(17;19)-ALL-PDX-Zellen erwartet, die durch unsere Ergebnisse im Verlauf bestätigt werden konnte. In Bcl-2-exprimierenden Burkitt-Lymphomen wurde die Wirksamkeit von Venetoclax bisher nicht untersucht. Zwar konnte in einer Studie von Choi et al. gezeigt werden, dass die Behandlung mit Venetoclax in Daudi- und Raji-Zellen keine Inhibition des Zellwachstums hervorruft, allerdings wurde im Rahmen dieser Studie der Bcl-2-Spiegel der Zellen nicht untersucht, sodass sich das fehlende Ansprechen auf die Behandlung eventuell auf eine geringe bzw. fehlende Bcl-2-Expression zurückführen lässt (225). So konnte angenommen werden, dass sich Bcl-2-positive BL-PDX-Zellen ebenfalls sensibel auf eine Behandlung mit Venetoclax zeigen würden, was im Verlauf durch unsere Ergebnisse bestätigt werden konnte.

Venetoclax bindet direkt an das Protein Bcl-2 und induziert so die Apoptose, indem zum einen proapoptische Proteine freisetzt und zum anderen die für die Apoptose notwendigen Caspasen aktiviert werden (226). Im Verlauf wurde die Expression von Bcl-2 nach Behandlung mit niedrig dosiertem Venetoclax auf Proteinebene mittels *Western Blot*-Analyse untersucht. Trotz sichtbarer Reduktion der Zellviabilität durch die Substanz im Zellviabilitätsassay kam es zu keiner Abnahme von Bcl-2 in CARNAVAL-Zellen (Abb. 4-2 A). Ein gleichbleibender Bcl-2-Spiegel nach Behandlung mit Venetoclax wurde zuvor bereits beschrieben (14). Es konnte durch Uchida et al. bereits gezeigt werden, dass es in DHL-Zelllinien nach Zugabe von Venetoclax zwar zu keiner Abnahme des Bcl-2-Spiegels in der DHL-Zelllinie OCI-Ly8 kam, jedoch kam es durch die Behandlung zu einer Abnahme des phosphorylierten Bcl-2 und Zunahme des dephosphorylierten Bcl-2 (227). Es wird vermutet, dass es durch die Dephosphorylierung von Bcl-2 zu einer Freisetzung der antiapoptischen Proteine und somit zum Eintritt der Zielzellen in die Apoptose kommt (228). Durch die Behandlung mit Venetoclax kann es zu einer vermehrten Expression von PP2A B56 $\alpha$  kommen. Dabei handelt es sich um eine Tumorsuppressor-Phosphatase, die für die Dephosphorylierung von Bcl-2 verantwortlich ist (229). Um zu bestätigen, dass es durch die Dephosphorylierung von Bcl-2 zu einer

vermehrten Freisetzung der proapoptotischen Proteine kommt, wurde in der Studie von Uchida et al. der Bim-Spiegel nach Behandlung mit Venetoclax ebenfalls untersucht. Mittels *Western Blot* konnte eine gesteigerte Expression von Bim im Anschluss an die Behandlung dargestellt werden, was die Freisetzung proapoptotischer Proteine durch die Dephosphorylierung und somit Inaktivierung von Bcl-2 unterstützt. Durch die vermehrte Freisetzung der proapoptotischen Proteine könnte es somit nach dem Rheostat-Modell zum Wiedereintritt der Zellen in die Apoptose kommen.

In WILL-2-Zellen und den PDX-Zellen konnte durch die Behandlung mit Venetoclax hingegen eine verminderte Expression von Bcl-2 beobachtet werden, was auf einen zellspezifischen Einfluss von Venetoclax auf den Bcl-2-Spiegel schließen lässt (Abb. 4-2 B u. 4-3). So kam es durch die Behandlung mit 1 nM Venetoclax zu einer leichten Abnahme von Bcl-2 im Vergleich zur Kontrolle, während durch die Behandlung mit 5 nM für 12 Stunden nahezu kein Bcl-2 mehr in WILL-2-Zellen exprimiert wurde (Abb. 4-2 B). In BL- und t(17;19)-ALL-PDX-Zellen konnte bereits nach Zugabe von 1 nM Venetoclax kein Bcl-2 mehr detektiert werden (Abb. 4-3). Neben der Induktion der Apoptose durch Freisetzung der proapoptotischen Proteine ist Venetoclax ebenfalls in der Lage, im Rahmen einer DNA-Schädigung eine *DNA-damage-response* auszulösen (222). Nach der Behandlung mit Venetoclax konnte eine vermehrte Expression von  $\gamma$ H2AX, einem Marker für *DNA-damage*, gezeigt werden (230). In der Vergangenheit wurde bereits deutlich, dass ein hoher Bcl-2-Spiegel die DNA-Reparaturmechanismen nach DNA-Schädigung inhibiert (222). Im Rahmen dieser *DNA-damage-response* können die DNA-Reparaturmechanismen mittels Phosphorylierung von Bcl-2 wieder hergestellt werden (231). Eine Möglichkeit zur Phosphorylierung von Bcl-2 stellt die Proteinkinase c dar (228). Es lässt sich somit vermuten, dass in WILL-2-, BL- und t(17;19)-ALL-PDX-Zellen durch die Behandlung eine *DNA-damage-response* ausgelöst wurde. Der verminderte Bcl-2-Spiegel lässt sich aus diesem Grund mit einer Umwandlung des nicht-phosphorylierten Bcl-2 in die phosphorylierte Form begründen (227).

Es konnte bereits bestätigt werden, dass die Wirkung von Venetoclax sowohl durch die Initiierung der Apoptose über Freisetzung proapoptotischer Proteine als auch durch die Induktion einer *DNA-damage-response* vermittelt werden kann, was eine zellspezifische Wirkung ebenfalls bestätigt. So wird Bcl-2 je nach Zielzelle entweder vermehrt phosphoryliert oder dephosphoryliert (222). Daraus lässt sich schließen, dass Venetoclax in CARNAVAL-Zellen mittels Dephosphorylierung eine Freisetzung proapoptotischer Proteine bewirkt, in den WILL-2- sowie BL- und t(17;19)-ALL-PDX-Zellen jedoch über eine *DNA-damage-response* zu einer vermehrten Phosphorylierung und somit Abnahme des Bcl-2-Spiegels führt.

Mit steigender Konzentration an Venetoclax wurde in CARNAVAL- und WILL-2-Zellen

vermehrt Apoptose, gemessen am Anstieg der cPARP-Spiegel, beobachtet. (Abb. 4-2). Die Aktivierung der Apoptose durch die Behandlung mit steigenden Dosen an Venetoclax wurde in der Vergangenheit bereits beschrieben (14). Da es in der verwendeten Konzentration von 1 nM Venetoclax zwar zu einer Reduktion der Zellviabilität kam, trotz leichter Steigung des cPARP-Spiegels allerdings keine toten Zellen unter dem Mikroskop gezeigt werden konnten, lässt sich vermuten, dass die Reduktion des Zellwachstums in niedrigen Dosierungen nicht ausschließlich auf einer Induktion der Apoptose beruht. Wie zuvor beschrieben, kann die Behandlung mit Venetoclax zu einer *DNA-damage-response* führen, was mit einer vermehrten Expression von  $\gamma$ H2AX einhergeht (232). Ein erhöhter Spiegel von  $\gamma$ H2AX konnte in der Vergangenheit bereits als Indikator für die Seneszenz beschrieben werden (233). Man könnte somit vermuten, dass durch die Behandlung mit 1 nM Venetoclax mittels *DNA-damage-response* die verwendeten DHL-Zelllinien in eine Stress-induzierte zelluläre Seneszenz übergehen. Passend dazu kann in den Zellviabilitätsassays ein Zellzyklusarrest beobachtet werden, ohne dass Zellen in die Apoptose übergehen (Abb. 4-1). Auch im *Western Blot* konnte nach Behandlung mit 1 nM Venetoclax in den DHL-Zelllinien nur ein leichter Anstieg von cPARP gezeigt werden, was die alleinige Induktion der Apoptose als Ursache für die Reduktion der Zellproliferation eher unwahrscheinlich macht (Abb. 4-2).

Zusammenfassend konnte in einem ersten Schritt die Wirksamkeit von Venetoclax aufgrund einer erhöhten Bcl-2-Expression bestätigt werden. Wir konnten zudem zeigen, dass es durch die Behandlung mit Venetoclax zu einem Zellzyklusarrest ohne Eintritt der Zellen in die Apoptose kommt.

### **5.2 Die Kombination von Venetoclax mit therapeutischen Antikörpern führt zu einer Induktion der ADCP**

Je nach Ursprungszelle der jeweiligen Entität werden in der Regel unterschiedliche CD-Oberflächenmarker exprimiert, die durch die verschiedenen Antikörper therapeutisch angegriffen werden können (234). So ergab sich abhängig von den verwendeten Zelllinien bzw. den verwendeten PDX-Zellen und der auf deren Oberfläche exprimierten Markern die Möglichkeit, in dieser Arbeit unterschiedliche Antikörper in Kombination mit Venetoclax zu testen. Die CD19-positiven t(17;19)-ALL-PDX-Zellen eigneten sich für die Testung der Kombination aus Venetoclax und dem Antikörper CD19-DE. Die CD20-positive DHL-Zelllinie CARNAVAL sowie das BL-PDX eigneten sich besonders für die Testung der Kombination aus Venetoclax mit dem CD20-Antikörper Rituximab. Da die DHL-Zelllinie WILL-2 nur eine niedrige CD20-Expression vorweist, jedoch eine hohe CD38-Expression, eignete sich diese Zelllinie besonders gut für die Untersuchung der Kombination aus Venetoclax und dem CD38-

Antikörper Daratumumab. Interessanterweise handelt es sich bei WILL-2-Zellen um Zellen eines zuvor mit Rituximab behandelten CD20-positivem DHL (235). Der Verlust von CD20 auf NHL-Zellen nach einer Therapie mit Rituximab ist ein Phänomen, wodurch es zum Wirkungsverlust der Therapie kommen kann (236). Studien deuten darauf hin, dass 16% der Patienten nach einer Therapie mit Rituximab ein CD20-negatives Rezidiv erleiden und sich somit resistent gegen eine erneute Therapie mit dem Antikörper zeigen (237). Dies weist ebenfalls die Notwendigkeit der Untersuchung unterschiedlicher Antikörper in Kombination mit Venetoclax auf, um eine Vielfalt an Kombinationsmöglichkeiten je nach Oberflächenexpression und somit je nach Lymphom- oder Leukämieentität zu erhalten.

Die Behandlung mit Venetoclax führte in den verwendeten Zielzellen weder zu einer Steigerung noch zu einer Reduktion der CD19-, CD20- und CD38-Expression (Abb. 4-4). Durch eine Reduktion der CD-Expression würde eine geringere Anzahl an Zielproteinen für unsere Antikörper zur Verfügung stehen. So führte die Behandlung von CD20-positiven BL- und DLBCL-Zelllinien mit Signalweg-Inhibitoren des B-Zell-Rezeptor-Signalweges, wie z.B. dem Brutontyrosinkinase-Inhibitor Ibrutinib, zu einer verminderten Expression von CD20, was eine verminderte Vermittlung von ADCC und CDC zur Folge hatte (238). Wir konnten hingegen zeigen, dass Venetoclax keinen Einfluss auf die Expression von CD-Oberflächenmarkern hat und es somit zu keiner verringerten Expression kommt. Auf der anderen Seite sind bestimmte Substanzen in der Lage, die CD-Expression auf Zielzellen zu steigern, was gegebenenfalls ein stärkeres Ansprechen der Zielzellen auf die von uns verwendeten Antikörper zur Folge gehabt hätte. In der Vergangenheit konnte bereits eine Steigerung der Expression von CD38 durch die Behandlung mit DNA-Methyltransferase-Inhibitoren beim Multiplen Myelom beschrieben werden (239). In der Studie konnte somit durch die Inhibition der DNA-Methyltransferase mittels der beiden Inhibitoren Azacitidin und Decitabin und anschließender Behandlung mit dem CD38-Antikörper Daratumumab eine deutlich gesteigerte ADCC beobachtet werden. Begründet werden konnte die Steigerung der ADCC mit einer verbesserten Induktion durch eine erhöhte CD38-Oberflächenexpression (239). Durch die Behandlung mit dem DNA-Methyltransferase-Inhibitor Azacitidin konnte zudem eine Steigerung der Expression von CD22 und CD47 auf AML-Zellen gezeigt werden (240). Die Kombination von Azacitidin mit dem CD47-Antikörper Magrolimab führte in AML-Zellen zu einer signifikanten Steigerung der ADCP *in vitro* (241). Auch *in vivo* konnte die Wirksamkeit dieser Kombinationstherapie im Rahmen einer Phase-1b-Studie bestätigt werden (242). Durch die Behandlung mit Venetoclax konnte in unseren Versuchen jedoch keine Steigerung der CD-Expression beobachtet werden, sodass eine Verbesserung der antikörperabhängigen Effekte durch eine vermehrte Oberflächenexpression unwahrscheinlich war. Unsere Ergebnisse bestätigen jedoch insgesamt einen gleichbleibenden CD-Oberflächenspiegel auf den

verschiedenen Zelllinien, sodass weiterhin genügend Angriffspunkte für therapeutische Antikörper zur Verfügung standen (Abb. 4-4).

In unseren Versuchen konnte in den beiden DHL-Zelllinien CARNAVAL und WILL-2 keine Verbesserung der ADCC und CDC durch die Kombination aus Venetoclax mit Rituximab bzw. Daratumumab im Vergleich zu den Monotherapien gezeigt werden (Abb. 4-5 u. 4-6). Die ausbleibende Steigerung der ADCC durch die Kombination aus Venetoclax und Rituximab in DLBCL-Zelllinien wurde bereits beschrieben und lässt auf eine fehlende zusätzliche Aktivierung von NK-Zellen durch die Kombinationstherapie im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Rituximab schließen (243). Wichtige Faktoren zur Aktivierung von NK-Zellen sind beispielsweise Zytokine, vor allem Interleukin-2 (IL-2), -12 und -15 (244,245). Eine vermehrte Freisetzung von Zytokinen hätte eine vermehrte Rekrutierung von NK-Zellen zur Folge. Passend zu unseren Ergebnissen konnte bisher jedoch nur ein geringer Einfluss von Venetoclax auf die Freisetzung von Zytokinen, wie z.B. IL-2 und TNF $\alpha$ , beschrieben werden (246). Somit wäre eine vermehrte Rekrutierung der NK-Zellen über die Aktivierung von Zytokinen durch Venetoclax unwahrscheinlich. In Kolonkarzinomzelllinien konnte zudem gezeigt werden, dass ein erhöhter Bcl-2-Spiegel die Sensitivität der Zielzellen auf die Induktion der Apoptose durch NK-Zellen reduziert und somit weniger Zellen lysiert werden (247). In CARNAVAL-Zellen wurde auch nach Behandlung mit Venetoclax weiterhin eine Überexpression von Bcl-2 beobachtet, sodass die Zellen vermutlich weiterhin wenig sensibel auf die Induktion der Apoptose durch NK-Zellen reagieren (Abb. 4-2 u. 4-5). In WILL-2-Zellen kam es hingegen durch die von uns verwendeten Konzentrationen zu einer Abnahme des Bcl-2-Spiegels (Abb. 4-2). Passend dazu zeigte sich hier eine leichte, wenn auch nicht signifikante Verbesserung der ADCC durch die Kombination aus Venetoclax und Daratumumab (Abb. 4-5). Daher könnte eine verminderte Expression von Bcl-2 nach Behandlung mit Venetoclax eine stärkere Induktion der ADCC zur Folge haben, was durch eine vermehrte Sensitivität der Zielzellen auf die Induktion der Apoptose erklärbar wäre. Insgesamt würde diese Hypothese bedeuten, dass eine verminderte Expression von Bcl-2 durch die Inhibition mit Venetoclax für die Induktion der ADCC relevant zu sein scheint. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass CD38-Antikörper in hohen Dosierungen ebenfalls die auf NK-Zellen exprimierten CD38-Rezeptoren binden und damit die Funktion der für die ADCC benötigten Effektorzellen hemmen. So resultierte eine Behandlung mit Daratumumab in einer verminderten Verfügbarkeit von Effektorzellen und folglich in einer geringeren Induktion der ADCC (248). Da in unseren Versuchen jedoch verhältnismäßig niedrige Dosierungen des CD38-Antikörpers verwendet wurden, war eine direkte Hemmung der Effektorzellen eher unwahrscheinlich.

Auch eine signifikante Verbesserung der CDC durch die Kombination aus Venetoclax und Rituximab bzw. Daratumumab konnte in den beiden DHL-Zelllinien nicht beobachtet werden

(Abb. 4-6). Eine ausbleibende Verbesserung der CDC könnte beispielsweise mit einer fehlenden Freisetzung proapoptotischer Proteine aus der Bindung mit Bcl-2 durch die Behandlung mit Venetoclax begründet werden. Im Fall einer erhöhten Bcl-2-Expression sind ein Großteil der proapoptotischen Proteine, wie oben beschrieben, an Bcl-2 gebunden und folglich inaktiviert (5). Durch die Inhibierung von Bcl-2 durch Venetoclax werden jedoch proapoptotische Proteine aus ihrer Bindung freigesetzt und somit die Apoptose erneut initiiert (249). In den von uns verwendeten Konzentrationen fand hingegen keine Apoptose statt, sodass proapoptotische Proteine, wie z.B. Bid oder Bim, vermutlich kaum oder gar nicht aus ihrer Bindung entlassen werden und somit weiterhin inhibiert werden. Das Protein Bid ist jedoch entscheidend an der Freisetzung von Cytochrom c beteiligt (250). Eine erhöhte Resistenz von Zielzellen auf die komplementvermittelte Zellyse aufgrund von niedrigen Bid-Spiegeln konnte bereits gezeigt werden (251). So kommt es durch den verminderten Bid-Spiegel nicht zur Bildung des Membran-assoziierten Komplexes, der jedoch essenziell ist für die Lyse der Zielzelle (251). Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine inverse Korrelation zwischen Bcl-2-Spiegeln und komplementabhängiger Lyse besteht (252). Es ist bekannt, dass ein hoher Bcl-2-Spiegel die Zellen vor einer komplementvermittelten Zellyse schützt. Da die Bcl-2-Spiegel in CARNAVAL-Zellen sich nach Venetoclaxgabe nicht ändern, könnte dies eine Erklärung für den fehlenden Anstieg der CDC sein. In WILL-2-Zellen konnte eine Abnahme des Bcl-2-Spiegels beobachtet werden (Abb. 4-2 B). Dies mag im Umkehrschluss erklären, warum es in der CDC zu einer geringen, wenn auch nicht signifikanten Zunahme der CDC im Vergleich zur Kontrolle kam. Man könnte daher annehmen, dass eine Verbesserung der CDC nur bei Abnahme der Bcl-2-Spiegel und vermehrter Freisetzung des proapoptotischen Proteins Bid zu erwarten wäre.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Kombination aus Venetoclax und therapeutischen Antikörpern unter der Verwendung von humanen Makrophagen die antikörperabhängige zelluläre Phagozytose in DHL-Zelllinien sowie BL- und t(17;19)-ALL-PDX-Zellen steigert (Abb. 4-7). Es könnte verschiedene mechanistische Gründe für die observierten Synergieeffekte geben: Beispielsweise könnte eine Herunterregulierung von CD47 durch die Zugabe von Venetoclax eine vermehrte Induktion der Phagozytose zur Folge haben. Eine verminderte Expression des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B, einem Regulator von CD47, wurde bereits beim hepatozellulären Karzinom beschrieben (253). Darüber hinaus führte die Depletion von NF- $\kappa$ B zu einer Reduktion des CD47-Spiegels in Mammakarzinom-Zelllinien und folglich zu einer starken Induktion der Phagozytose. Eine Übertragbarkeit dieser Regulation von CD47 auf andere Zellmodelle, wie z.B. T-ALL-Zellen, wurde im Rahmen dieser Studie ebenfalls vermutet (254). Die Behandlung mit Venetoclax könnte folglich in Lymphom- bzw. Leukämiezellen über die Herunterregulierung von NF- $\kappa$ B zur verminderten Expression von CD47 führen, was



ebenfalls eine verbesserte Induktion der Phagozytose zur Folge hätte, von uns im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht untersucht wurde. Ein weiterer Grund für die Steigerung der Phagozytose könnte die vermehrte Externalisierung von Phosphatidylserinen (PS) an der Zellmembran sein. Es konnte bereits gezeigt werden, dass nach einer Einzeldosis Venetoclax der Anteil an CLL-Zellen mit nachweisbarer PS-Exposition ansteigt (255). So ist bekannt, dass im Rahmen der Apoptose die Externalisierung von Phosphatidylserinen als sogenanntes ‚Eat-me‘-Signal gesteigert und somit die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Makrophagen induziert wird (256). In diesem Fall wäre ein Zusammenspiel aus Apoptose und anschließender Phagozytose der apoptotischen Zellen wahrscheinlich. In den von uns verwendeten Konzentrationen an Venetoclax wurde jedoch per se keine Apoptose induziert, sodass eine Steigerung der Phagozytose über eine Zunahme der PS an der Membran eher unwahrscheinlich ist (Abb. 4-2). Es ist ebenfalls bekannt, dass es zur vermehrten Externalisierung von Phosphatidylserinen ohne die Induktion der Apoptose kommen kann (257). Vor diesem Hintergrund könnte man annehmen, dass es durch die Behandlung mit Venetoclax zu einer Externalisierung von Phosphatidylserinen und durch die damit verbundene isolierte Stimulierung der Makrophagen zur Phagozytose kommt. Dadurch würden die Zellen angreifbarer für die ADCP durch Makrophagen werden. Im Verlauf könnte man somit die Expression von CD47 sowie von Phosphatidylserinen an der äußeren Zellmembran nach Behandlung mit Venetoclax testen, um zu untersuchen, ob durch die Behandlung mit Venetoclax Veränderungen induziert werden.

Zusammenfassend konnte in unseren *in vitro* Experimenten gezeigt werden, dass es durch die Kombination aus Venetoclax mit Rituximab oder Daratumumab weder zu einer Steigerung der ADCC und CDC kommt, jedoch eine deutliche Induktion der Phagozytose erzielt werden kann. Eine Induktion der Phagozytose konnte in beiden DHL-Zelllinien sowie in BL- und t(17;19)-ALL-PDX-Zellen beobachtet werden. Diese Induktion der Phagozytose könnte am ehesten einer isolierten Rekrutierung von Makrophagen mittels Steigerung sogenannter „Eat-me“-Signalwege zugrunde liegen.

### **5.3 Die Kombination aus Venetoclax und therapeutischen Antikörpern führt zu einer verlängerten Überlebenszeit der Mäuse *in vivo***

Als Vorversuche für potentielle *in vivo* Versuche wurde im Verlauf getestet, ob durch die Kombination aus Venetoclax und monoklonalen Antikörpern auch murine Makrophagen vermehrt rekrutiert werden. Für die Generierung der murinen Makrophagen verwendeten wir NSG-Mäuse. Dabei handelt es sich um einen immundefizienten Mausstamm, der zwar über neutrophile Granulozyten und Makrophagen, jedoch nicht über reife B-, T- oder NK-Zellen als Effektorzellen verfügt, sodass diese Mausgattung besonders gut für die Isolierung von Makrophagen geeignet war (258). Ein großer Vorteil in der Verwendung von murinen Makrophagen besteht darin, dass sie im Vergleich zu humanen Makrophagen eine homogenere Population darstellen und somit eine geringere Streuung der Phagozytoseraten als unter der Verwendung von humanen Makrophagen zu erwarten war (259–261). In unserem Fall erfolgte die Verwendung von murinen Makrophagen aus dem Peritoneum. Die Herstellung peritonealer Makrophagen bietet zudem den Vorteil, dass diese relativ schnell zu generieren sind (262). Dies liegt vor allem daran, dass die aus dem Peritoneum entnommenen Zellen bereits zu reifen Makrophagen differenziert sind. Im Vergleich dazu müssen humane Makrophagen oder murine Makrophagen aus dem Knochenmarkskompartiment vor ihrer Verwendung über mehrere Tage mittels M-CSF von Monozyten zu Makrophagen differenziert werden (263,264). Während murine peritoneale Makrophagen somit bereits am Tag der Präparierung für Folgeexperimente verwendet werden können, bedarf es für die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen aus dem Blut oder Knochenmark insgesamt sieben Tage zur Differenzierung und somit bis zur Einsetzbarkeit (265).

Unsere Versuche zeigen, dass es auch unter Verwendung von murinen Makrophagen zu einer Steigerung der Phagozytose durch die Kombination aus Venetoclax und Rituximab kommt (Abb. 4-8). Studien konnten bereits zeigen, dass sich die Verwendung muriner Makrophagen ebenfalls für die Testung der ADCP *in vitro* eignet. So untersuchten Barbarino et al. bereits die ADCP in CLL-Zellen nach Behandlung mit der Kombination aus Ibrutinib und dem CD52-Antikörper Alemtuzumab. Die von ihnen zuvor gezeigten *in vitro* Ergebnisse unter Verwendung humaner Makrophagen konnten auch hier unter Verwendung muriner Makrophagen reproduziert werden. Es konnte somit gezeigt werden, dass es durch die Kombination von Ibrutinib und Alemtuzumab zu einer Steigerung der Phagozytose im Vergleich zur alleinigen Therapie mit Ibrutinib oder Alemtuzumab kommt (266). Insgesamt eigneten sich die von uns verwendeten Makrophagen gut zur Reproduktion unserer ADCP-Versuche und stellten vielversprechende Daten für folgende *in vivo* Experimente dar.

Im Verlauf wurden die von uns evaluierten Therapieoptionen *in vivo* im NSG-Mausmodell

untersucht. Wie bereits beschrieben verfügen NSG-Mäuse vor allem über Makrophagen und neutrophile Granulozyten. Die antitumoralen Mechanismen werden somit vor allem durch Makrophagen vermittelt und eignen sich folglich besonders zur Untersuchung der antikörpervermittelten Phagozytose (266). In CARNAVAL-Zellen konnte eine Verlängerung der Überlebenszeit durch die Kombination aus Venetoclax und Rituximab gezeigt werden (Abb. 4-10 A). Der Einfluss der Kombination aus Venetoclax und Rituximab wurde bisher in NSG-Mäusen nach Injektion und Engraftment von CARNAVAL-Zellen nicht untersucht. Passend zu unseren Daten konnte jedoch ein positiver Effekt der Kombinationstherapie in NSG-Mäusen nach Injektion von PDX-Zellen eines CD20-positiven folliculären Lymphoms gezeigt werden. Es konnte auch in diesem Fall durch die Kombination aus Rituximab und Venetoclax eine deutliche Verlängerung der Überlebenszeit der NSG-Mäuse im Vergleich zur Monotherapie erreicht werden, was einen synergistischen Effekt der beiden Substanzen in NSG-Mäusen nach Injektion von CD20-positiven Zellen mit Bcl-2-Überexpression bestätigte (223). Die Kombination aus Venetoclax und Rituximab wurde zudem nach Injektion der Bcl-2-positiven DHL-Zelllinie SU-DHL-6 in CD1-Mäusen, einem immungeschwächten Mausstamm ohne T-Zellen, untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass es unter der Kombination aus Venetoclax und Rituximab zu keinem Progress des Tumorwachstums kam, während unter der alleinigen Behandlung der beiden Substanzen eine deutliche Zunahme des Tumolvolumens beobachtet wurde. Im Vergleich dazu wurde nach Injektion der Bcl-2-negativen DHL-Zelllinie OCI-Ly7 ein deutlicher Progress des Tumorwachstums unter der Therapie mit der Kombination aus Rituximab und Venetoclax beobachtet, was erneut die Bedeutung von Bcl-2 für die Sensitivität von Venetoclax unterstreicht (267). Zusammenfassend konnte in verschiedenen Studien eine verlängerte Überlebenszeit der Mäuse unter der Therapie mit Venetoclax und Rituximab in CD20-positiven Zelllinien gezeigt werden, vorausgesetzt es lag eine Bcl-2-Überexpression vor, was unsere Ergebnisse weiter bestätigte.

Auch nach Injektion von t(17;19)-ALL-PDX-Zellen konnte eine verlängerte Überlebenszeit der Mäuse durch die Kombination aus Venetoclax und Antikörper gezeigt werden (Abb. 4-10 B). Die Kombination aus Venetoclax und dem CD19-DE-Antikörper wurde bisher *in vivo* nicht untersucht. Es konnte jedoch bereits eine hohe Wirksamkeit von CD19-DE als Monotherapie in NSG-Mäusen nach Injektion von Zellen einer B-Vorläufer-ALL bestätigt werden (192). Es konnte somit gezeigt werden, dass die Überlebenszeit der NSG-Mäuse durch die Behandlung mit CD19-DE im Vergleich zur Kontrolle verlängert werden konnte (268). Das CD19-Antigen gehört zu den wichtigsten Zielstrukturen der antikörperbasierten Therapie in B-Zell-Neoplasien (269). CD19-Antikörper konnten in den letzten Jahren mittels Fc-Engineering optimiert werden, um so die therapeutische Wirksamkeit zu verbessern (192). Es konnte bereits gezeigt werden, dass der von uns verwendete modifizierte CD19-DE-Antikörper eine deutliche

Steigerung der Phagozytose erzielen konnte (190). Die hohe Wirksamkeit von Venetoclax als Monotherapie in der Behandlung von t(17;19)-ALL-PDX-Zellen wurde ebenfalls bereits beschrieben. In einer Studie konnte eine deutliche Reduktion der Tumorlast durch die Behandlung mit Venetoclax gezeigt werden (134). So konnte bereits durch die alleinige Therapie mit Venetoclax ein besseres Therapieoutcome erreicht werden, welches in unseren Versuchen durch die Kombinationstherapie noch weiter verstärkt werden konnte. Es konnte zudem bereits gezeigt werden, dass es durch die Kombination von Venetoclax mit CD19-CAR-T-Zellen zu einer gesteigerten Zytotoxizität im Vergleich zur Monotherapie kommt. Es wird vermutet, dass die Steigerung der Zytotoxizität auf einer vermehrten Sensibilisierung der Zellen auf die CAR-T-Zell-Therapie durch die Vorbehandlung mit Venetoclax beruht. Ursächlich hierfür mag zum einen die Steigerung der Sensibilität von Tumorzellen auf Bcl-2-Inhibitoren durch eine Steigerung der Expression von Bcl-2 und Mcl-1 sein. Zum anderen wird eine Steigerung der Apoptoseeigung durch vermehrte Expression des proapoptischen Proteins Bak in Betracht gezogen (270). Diese Therapiekombination wurde bisher ausschließlich *in vitro* untersucht, eine hohe Wirksamkeit *in vivo* wird jedoch ebenfalls vermutet (270). Diese Daten lassen ebenfalls eine Steigerung der Therapieeffizienz durch die Kombination aus Venetoclax und CD19-DE vermuten, die von uns im Verlauf bestätigt werden konnte. In unserem Versuch zeigte sich eine verlängerte Überlebenszeit durch die alleinige Therapie mit Venetoclax im Vergleich zur alleinigen Therapie mit CD19-DE. Nach Injektion von CARNAVAL-Zellen zeigte sich hingegen eine verlängerte Überlebenszeit durch die alleinige Behandlung mit Rituximab im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Venetoclax, was auf eine bessere Wirksamkeit des CD20-Antikörpers als der des Bcl-2-Inhibitors nach Injektion von CARNAVAL-Zellen hindeutet und ebenfalls eine zellspezifische Wirkung des Bcl-2-Inhibitors vermuten lässt.

Im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Rituximab oder Venetoclax wurde durch die Kombination aus Venetoclax und Rituximab in CARNAVAL-Zellen keine Steigerung des cPARP-Spiegels beobachtet (Abb. 4-11). Es lässt sich somit vermuten, dass unsere Beobachtungen nicht auf einem additiven proapoptischen Effekt der beiden Substanzen beruhen und die Apoptose alleine daher nicht ursächlich für unsere Ergebnisse war. Um zu untersuchen, ob Makrophagen essenziell sind für die von uns beobachteten Effekte der Kombination aus Venetoclax und therapeutischen Antikörpern, erfolgte die Depletion der Makrophagen mit liposomalem Clodronat. Es wurden dieselben Therapiekombinationen nach Injektion von CARNAVAL-Zellen jeweils mit und ohne Clodronat getestet und erneut Überlebenszeiten verglichen. Die Depletion von Makrophagen *in vivo* mittels Clodronat führte zu einer Aufhebung der Steigerung der Phagozytose und somit zu einer kürzeren Überlebenszeit der Mäuse im Vergleich zur Kombinationstherapie aus Venetoclax und

Rituximab ohne Clodronat (Abb. 4-12). Bisher wurde die Kombination aus Venetoclax und Rituximab in NSG-Mäusen unter Makrophagendepletion noch nicht untersucht. Jedoch zeigen unsere Daten, dass unter Ausschaltung der Makrophagen keine Verlängerung der Überlebenszeit im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden kann. Dies deutet auf eine Notwendigkeit von Makrophagen zum Erreichen der positiven Effekte durch die Kombination aus Venetoclax und Rituximab hin. Der Effekt einer Makrophagendepletion unter der Therapie mit CD19-DE und Venetoclax wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. In einer Studie von Schewe et al. konnte jedoch gezeigt werden, dass es nach Depletion der Makrophagen mit Clodronat zu einer verminderten Phagozytose nach Behandlung mit CD19-DE im Vergleich zur alleinigen Therapie mit CD19-DE ohne Hinzunahme von Clodronat kam. Es konnte somit in der Studie ebenfalls gezeigt werden, dass die Wirkungsvermittlung von CD19-DE vor allem auf der Aktivierung von Makrophagen beruht (190). Dies lässt vermuten, dass es durch die Makrophagendepletion unter der Kombinationstherapie ebenfalls zur Aufhebung der gesteigerten Phagozytose kommen würde. Zusammenfassend konnten wir somit zeigen, dass die therapeutischen Effekte einer Kombination aus Venetoclax und therapeutischen Antikörpern abhängig von Makrophagen sind.

### 5.4 Ausblick

Die gezielte Therapie von Strukturen, die an der Vermittlung der Phagozytose beteiligt sind, hat in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen. So stellen CD47- und SIRP $\alpha$ -Antikörper eine vielversprechende Therapieoption bei der Behandlung von hämatologischen Erkrankungen dar und werden aktuell in präklinischen Studien untersucht (188). Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Kombination aus dem CD47-Antikörper 5F9 und dem Zytostatikum Azacitidin die Phagozytose von AML-Zellen signifikant steigerte und somit zu einer verlängerten Überlebenszeit der NSG-Mäuse im Vergleich zur jeweiligen Monotherapie führte (271). In CLL-Zellen, die mit Venetoclax und Rituximab behandelt wurden, konnte eine Steigerung der Phagozytose *in vitro* beobachtet werden, was die von uns gezeigten Daten unterstützt (272). Zur Behandlung der CLL wurde die Kombination aus Rituximab und Venetoclax im Oktober 2018 als Zweitlinientherapie zugelassen (25). Unsere Daten lassen vermuten, dass die Kombinationstherapie aus Venetoclax mit therapeutischen Antikörpern in den jeweiligen Entitäten ebenfalls über eine hohe Wirksamkeit verfügen könnte und somit im Verlauf in klinischen Studien getestet werden sollte. Eine besondere Wirksamkeit bei therapierefraktären Patienten wäre bei Patienten mit DHL, BL und t(17;19)-ALL denkbar und sollte in der Zukunft evaluiert werden.

Die Therapie aus Venetoclax und Rituximab wurde in der Vergangenheit von Patienten mit rezidivierender oder therapierefraktärer CLL gut vertragen (25). Die häufigsten Nebenwirkungen

waren Infektionen des Respirationstrakts (57% der Patienten), Diarrhoe (55%) und Übelkeit (51%). Außerdem wurden Blutbildveränderungen beobachtet, wie z.B. Neutropenie (53%), Thrombozytopenie (16%) und Anämie (14%). Bei 12% der Patienten trat Fieber in Neutropenie auf. Ein Tumorlysesyndrom zeigte sich in einer Phase-1b-Studie laborchemisch bei 4% der Patienten. Unter entsprechender Therapie zeigten sich die Laborparameter jedoch rückläufig (25). Als Monotherapie des DLBCL wurde Venetoclax ebenfalls gut vertragen. Es zeigte sich hier ein ähnliches Nebenwirkungsprofil wie unter der Kombinationstherapie bei CLL-Patienten (27). Da die Kombination aus Venetoclax und CD19-DE in Patienten mit t(17;19)-ALL bisher nicht untersucht wurde, liegen bisher keine Daten zum Nebenwirkungsprofil dieser Kombination vor. Eine Behandlung mit dem CD19-Antikörper MOR208, der eine starke Ähnlichkeit zu CD19-DE aufweist, in Kombination mit Lenalidomid wurde von Patienten mit rezidiviertem oder therapierefraktärem DLBCL gut toleriert (74). Auch die Kombination aus Venetoclax und Daratumumab zeigte in Kombination mit Dexamethason nur geringe Nebenwirkungen (273). Insgesamt kann aufgrund der vorliegenden Daten ein relativ günstiges Nebenwirkungsprofil der Kombination aus Venetoclax und therapeutischen Antikörpern vermutet werden. Zum Ausschluss eines Tumorlysesyndroms könnten regelmäßige Laborkontrollen sowie die Überwachung des Blutbildes evaluiert werden.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass ein hoher Bcl-2-Spiegel mit einer vermehrten Sensitivität auf Venetoclax einhergeht, sodass Bcl-2 als prädiktiver Marker bei Erwachsenen und Kindern vor Beginn einer Therapie mit Venetoclax evaluiert werden sollte. Es konnten jedoch auch Ausnahmen beobachtet werden, in denen trotz Bcl-2-Überexpression die Zellen nicht ausreichend auf die Therapie ansprachen. Bei einigen Lymphomentitäten, wie z.B. dem folliculären Lymphom, wird vermutet, dass eine Venetoclaxresistenz auf erworbenen Mutationen in Bcl-2 oder posttranslationaler Modifikation beruht (222). Zudem konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression der antiapoptotischen Proteine Mcl-1- oder Bcl-xL mit einer Resistenz auf Venetoclax einhergeht (274). Eine erhöhte Expression von Mcl-1 ist beispielsweise die bekannteste Ursache für eine Resistenz von AML-Zellen gegenüber Venetoclax (275). Dies lässt darauf schließen, dass neben einem Nachweis der Bcl-2-Expression weitere prädiktive Marker für das Therapieansprechen herangezogen werden sollten, wie beispielsweise Mcl-1- oder Bcl-xL-mRNA mittels *real-time PCR* (RT-PCR), was in der Zukunft einen therapeutischen Nutzen darstellen könnte (222). Neben der zusätzlichen Behandlung mit Mcl-1-Inhibitoren könnte im Rahmen einer vermehrten Bcl-xL-Expression die Behandlung mit dem nicht-selektiven Bcl-2-Inhibitor Navitoclax anstelle von Venetoclax in Erwägung gezogen werden (275,276). Im Vergleich zu Venetoclax inhibiert Navitoclax neben Bcl-2 ebenfalls das antiapoptotische Protein Bcl-xL (277). Es konnte eine höhere Wirksamkeit von Navitoclax in Mcl-1- und Bcl-xL-abhängigen NHL-Entitäten beschrieben werden, die, wie

bereits beschrieben, mit einer vermehrten Resistenz auf Venetoclax einhergehen (278). Ein verlängertes ereignisfreies Überleben der Kombination aus Navitoclax und Rituximab konnte bei CLL-Patienten im Vergleich zur alleinigen Therapie mit Rituximab gezeigt werden (279). In weiteren NHL-Entitäten wurde die Kombinationstherapie der beiden Substanzen bisher nicht untersucht. Generell konnte jedoch ein positiver Effekt des nicht-selektiven Bcl-2-Inhibitors in Entitäten mit Bcl-2-Überexpression gezeigt werden (280). Durch die Monotherapie mit Navitoclax wurden allerdings ausgeprägte Thrombozytopenien und Neutropenien beobachtet, welche durch die alleinige Therapie mit Venetoclax deutlich milder ausfielen (281). Die zusätzliche Inhibition von Bcl-xL stellt vermutlich die Ursache für die ausgeprägten Blutbildveränderungen dar (282). Im Vergleich zu Navitoclax sind somit durch die Inhibition mit Venetoclax deutlich weniger Nebenwirkungen zu erwarten. Insgesamt wäre es jedoch denkbar, neben der Kombination mit Venetoclax ebenfalls Navitoclax als möglichen Kombinationspartner für Antikörpertherapien zu evaluieren.

Perspektivisch wäre die Kombination von Venetoclax mit Fc-modifizierten Antikörpern ebenfalls eine vielversprechende Therapieoption. In unserer Arbeit wurde mit CD19-DE bereits ein Fc-modifizierter Antikörper verwendet, der nachweislich zu einer Steigerung der Phagozytose im Vergleich zum ursprünglichen CD19-Antikörper führte (192). In den CD20-positiven CARNAVAL- und BL-PDX-Zellen wurde mit Rituximab ein CD20-Antikörper der ersten Generation verwendet. In 2020 wurde die Kombination aus Venetoclax und dem modifizierten CD20-Antikörper Obinutuzumab als Erstlinientherapie für Patienten mit therapienaiver CLL zugelassen. (283). Ein direkter Vergleich der Kombinationen aus Venetoclax und Rituximab zu Venetoclax und Obinutuzumab in CLL-Patienten besteht aktuell nicht, da die Kombination aus Venetoclax und Rituximab bisher als Zweitlinientherapie zugelassen und bei therapienaiven Patienten nicht untersucht wurde (25,283). Es ist jedoch bereits bekannt, dass Obinutuzumab im Vergleich zu Rituximab weniger effektiv Makrophagen aktiviert und somit eine Steigerung der Phagozytose durch die zusätzliche Behandlung mit Venetoclax im Vergleich zur Kombination mit Rituximab nicht zu erwarten wäre (284). In einer Studie von Rafiq et al. wurde ebenfalls beschrieben, dass der modifizierte CD20-Antikörper Ofatumumab im Vergleich zu Rituximab und Obinutuzumab vermehrt Makrophagen aktivierte (285,286). Eine Steigerung der Phagozytose durch eine vermehrte Aktivierung von Makrophagen im Rahmen einer Kombinationstherapie aus Venetoclax und Ofatumumab wäre somit denkbar und sollte im Verlauf untersucht werden. Der CD38-Antikörper Daratumumab wurde in 2019 von der FDA zugelassen und führt zu einer vermehrten Induktion der ADCP (287). Eine Steigerung der CDC und ADCC im Vergleich zu Daratumumab konnte bereits durch den Einsatz der beiden Fc-modifizierten Antikörper HexaBody-CD38 sowie SIFbody gezeigt werden. Daten zu Fc-modifizierten CD38-Antikörpern, die vermehrt

Makrophagen rekrutieren und somit die ADCP steigern, liegen bisher nicht vor (288). Eine weitere Steigerung der Phagozytose durch Fc-modifizierte CD38-Antikörper wäre für die Zukunft jedoch denkbar.

Aufgrund unserer vielversprechenden Daten sollte die Kombination aus Venetoclax und Rituximab ebenfalls in weiteren hämatologischen Entitäten in präklinischen Studien untersucht werden. So könnten neben der Verwendung von Fc-modifizierten Antikörpern auch Antikörper, die auf weitere Oberflächenproteine abzielen, mit Venetoclax kombiniert und der Effekt untersucht werden. Die Hinzunahme von Venetoclax könnte somit ebenfalls in weiteren hämatologischen Erkrankungen, die mit einer Bcl-2-Überexpression einhergehen, Verwendung finden. Eine erhöhte Bcl-2-Expression kann beispielsweise in Zellen des Multiplen Myeloms vorliegen und ebenfalls mit einer schlechteren Prognose assoziiert sein (289). Da auf Zellen des Multiplen Myeloms häufig eine CD38-Expression vorliegt, stellt die Kombination aus Daratumumab und Venetoclax ebenfalls eine potentielle Therapiemöglichkeit für Zellen dieser Entität dar. Während über die alleinige Kombination von Venetoclax und Daratumumab im Multiplen Myelom bisher keine Daten vorliegen, konnte bereits eine verringerte Tumorlast in Patienten mit therapierefraktärem Multiplen Myelom durch die Kombination aus Venetoclax, Daratumumab und Dexamethason im Vergleich zur Therapie mit Daratumumab und Dexamethason beobachtet werden (290,291). Dies unterstützt die Vermutung, dass es durch die zusätzliche Behandlung mit Venetoclax zu einem verbesserten Therapieoutcome in Patienten mit Multiplem Myelom mit vermehrter Bcl-2-Expression führen könnte. Insgesamt sollte die Kombination von Venetoclax mit therapeutischen Antikörpern ebenfalls in weiteren Bcl-2-exprimierenden Entitäten evaluiert werden, um somit auch in diesen Entitäten langfristig eine verbesserte Prognose gewährleisten zu können.

Aggressive, therapierefraktäre B-Zell-Neoplasien gehen weltweit mit einer hohen Mortalität und somit schlechten Prognose einher. Die Identifizierung neuer Therapiestrategien stellt daher einen wichtigen Grundsatz der zielgerichteten Therapie dar. Substanzen, die eine vermehrte Initiierung der Phagozytose bewirken, bieten folglich einen neuen Weg, um effektivere Therapien zu entwickeln, die das angeborene und adaptive Immunsystem zum Vorteil von Krebspatienten nutzen. Zusammenfassend zeigen unsere Experimente synergistische Effekte der Kombination aus Venetoclax und therapeutischen Antikörpern durch die isolierte Aktivierung von Makrophagen, die zu einer Steigerung der Phagozytose führen. Die von uns getesteten Therapieoptionen stellen potentielle Kandidaten für eventuelle klinische Studien in der Therapie der B-Zell-Neoplasien dar und sollten somit im Verlauf in klinischen Studien evaluiert werden.



### 6 Zusammenfassung

Die Anwendung monoklonaler Antikörper ist eine vielversprechende Therapieoption in der Behandlung von B-Zell-Neoplasien, wie beispielsweise der akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL) und den B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen (B-NHL). Obwohl die Behandlungsergebnisse durch Kombinationstherapien aus herkömmlicher Chemotherapie und Antikörpern in den vergangenen Jahren bereits deutlich verbessert werden konnten, haben manche Patienten mit einer Überexpression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 bis heute weiterhin eine schlechte Prognose. Hierzu zählen erwachsene B-NHL-Patienten mit sogenannten „Double-Hit-Lymphomen“ und pädiatrische ALL-Patienten mit einer t(17;19)-Translokation. Darüber hinaus liegt eine vermehrte Bcl-2-Expression ebenfalls bei einer beträchtlichen Anzahl an Burkitt-Lymphom-Patienten vor, wobei die Auswirkung dieser Überexpression auf die Prognose bisher noch unklar ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss des spezifischen Bcl-2-Inhibitors Venetoclax auf die Effizienz der therapeutischen Antikörper Rituximab, Daratumumab und CD19-DE, einer modifizierten Version des CD19-Antikörpers MOR208, untersucht. Es wurden die durch natürliche Killerzellen(NK-Zellen)-vermittelte antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC), die komplementabhängige Zytotoxizität (CDC) und die antikörperabhängige zelluläre Phagozytose (ADCP) untersucht. Als Zielzellen für Rituximab wurden die CD20-exprimierende Double-Hit-Lymphom-Zelllinie CARNAVAL und von Burkitt-Lymphom-Patienten stammende Xenotransplantat-Zellen verwendet. Die CD20-negative, aber CD38-positive Double-Hit-Lymphom-Zelllinie WILL-2 wurde mit Daratumumab behandelt. Xenotransplantat-Zellen von einem t(17;19)-positiven ALL-Patienten dienten als Zielzellen für den CD19-DE-Antikörper.

Die NK-Zell-vermittelte ADCC und die CDC wurden in keinem unserer Modelle durch die Kombination aus Venetoclax und therapeutischen Antikörpern verbessert. Zur Beurteilung der ADCP wurden von humanen Monozyten abgeleitete Makrophagen mit markierten Zielzellen inkubiert. Die Phagozytoserate wurde unter dem Mikroskop aus dem Anteil der phagozytierenden Makrophagen unter insgesamt 100 ausgezählten Makrophagen bestimmt. Durch die Kombination von Venetoclax mit Rituximab konnte eine signifikante Steigerung der Phagozytose sowohl in CARNAVAL-Zellen als auch in Burkitt-Lymphom-Xenotransplantat-Zellen festgestellt werden. Ebenfalls konnte dieser Effekt durch die Kombination aus Venetoclax und Daratumumab in WILL-2-Zellen erzielt werden. Weiter konnte eine Steigerung der Phagozytoserate auch in t(17;19)-ALL-Xenotransplantat-Zellen durch die Kombination aus Venetoclax und CD19-DE gezeigt werden.

Um die Heterogenität in ADCP-Assays mit humanen Makrophagen zu minimieren, wurde die

Phagozytose als nächstes unter Verwendung von aus NOD.Cg-PrkdcscidII2rgtm1Wjl/SzJ(NSG)-Mäusen expandierten peritonealen Makrophagen untersucht. Unabhängig von der Zielzelle und dem verwendeten Antikörper führte die Kombination mit Venetoclax zu einer verstärkten Phagozytose durch Mausmakrophagen, was unsere zuvor gezeigten Ergebnisse bestätigte. Die Auswirkungen von Venetoclax auf die Wirksamkeit von Rituximab wurden schließlich *in vivo* untersucht. CARNAVAL-Zellen wurden in NSG-Mäuse injiziert und neben einer Kontrollgruppe ohne Behandlung entweder mit Venetoclax alleine, Rituximab alleine oder der Kombination beider Substanzen behandelt. Die Mäuse wurden getötet, wenn diese klinische Anzeichen einer Lymphom- oder Leukämie manifestierten. Im Vergleich zur Kontrolle zeigten die mit Venetoclax behandelten Mäuse einen leichten Überlebensvorteil, der bei den mit Rituximab alleine behandelten Mäusen noch ausgeprägter war, was auf eine bessere Wirksamkeit von Rituximab im Vergleich zu Venetoclax als Monotherapie in diesem Modell schließen lässt. Mäuse, die mit der Kombination aus Rituximab und Venetoclax behandelt wurden, zeigten im Vergleich zur Behandlung mit Venetoclax oder Rituximab alleine ein signifikant verlängertes Überleben, was auf synergistische Effekte der Substanzen *in vivo* hindeutete. Es erfolgte ebenfalls die Injektion von t(17;19)-ALL-Xenotransplantat-Zellen in NSG-Mäuse. Auch hier konnte durch die Kombinationstherapie aus Venetoclax und CD19-DE eine signifikant verlängerte Überlebenszeit der Mäuse dargestellt werden. Insgesamt konnten wir somit zeigen, dass Venetoclax die Wirksamkeit von therapeutischen Antikörpern in Modellen von B-Zell-Neoplasien, einschließlich Xenotransplantat-Zellen, verbessert.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Edlich F. BCL-2 proteins and apoptosis: Recent insights and unknowns. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;
2. Levine B, Sinha S, Kroemer G. Bcl-2 family members: Dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy.* 2008.
3. Reed JC. Bcl-2 - Family proteins and hematologic malignancies: History and future prospects. *Blood.* 2008.
4. Tsujimoto Y. Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: Apoptosomes or mitochondria? *Genes to Cells.* 1998.
5. Shamas-Din A, Kale J, Leber B, Andrews DW. Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;
6. Moroy G, Martin E, Dejaegere A, Stote RH. Molecular basis for Bcl-2 homology 3 domain recognition in the Bcl-2 protein family: Identification of conserved hot spot interactions. *J Biol Chem.* 2009;
7. Gross A, Katz SG. Non-apoptotic functions of BCL-2 family proteins. *Cell Death and Differentiation.* 2017.
8. Adams JM, Cory S. The BCL-2 arbiters of apoptosis and their growing role as cancer targets. *Cell Death Differ.* 2018;
9. Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research.* 2004.
10. Korsmeyer SJ, Shutter JR, Veis DJ, Merry DE, Oltvai ZN. Bcl-2/Bax: A rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Semin Cancer Biol.* 1993;
11. Jäger R, Herzer U, Schenkel J, Weiher H. Overexpression of Bcl-2 inhibits alveolar cell apoptosis during involution and accelerates c-myc-induced tumorigenesis of the mammary gland in transgenic mice. *Oncogene.* 1997;
12. Roh J, Cho H, Yoon DH, Hong JY, Lee AN, Eom HS, et al. Quantitative analysis of tumor-specific BCL2 expression in DLBCL: refinement of prognostic relevance of BCL2. *Sci Rep.* 2020;
13. Ashkenazi A, Fairbrother WJ, Levenson JD, Souers AJ. From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery.* 2017.
14. Lochmann TL, Floros K V., Naseri M, Powell KM, Cook W, March RJ, et al. Venetoclax is effective in small-cell lung cancers with high BCL-2 expression. *Clin Cancer Res.* 2018;
15. Vogler M. Targeting BCL2-Proteins for the Treatment of Solid Tumours. *Adv Med.* 2014;
16. Perini GF, Ribeiro GN, Pinto Neto JV, Campos LT, Hamerschlak N. BCL-2 as therapeutic

- target for hematological malignancies. *Journal of Hematology and Oncology*. 2018.
17. Correia C, Schneider PA, Dai H, Dogan A, Maurer MJ, Church AK, et al. BCL2 mutations are associated with increased risk of transformation and shortened survival in follicular lymphoma. *Blood*. 2015;
  18. Schuetz JM, Johnson NA, Morin RD, Scott DW, Tan K, Ben-Nierah S, et al. BCL2 mutations in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*. 2012;
  19. Masqué-Soler N, Szczepanowski M, Kohler CW, Aukema SM, Nagel I, Richter J, et al. Clinical and pathological features of Burkitt lymphoma showing expression of BCL2 - an analysis including gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Br J Haematol*. 2015;
  20. García-Sáez AJ. The secrets of the Bcl-2 family. *Cell Death and Differentiation*. 2012.
  21. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: Release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* (80- ). 1997;
  22. Rooswinkel RW, Van De Kooij B, De Vries E, Paauwe M, Braster R, Verheij M, et al. Antiapoptotic potency of Bcl-2 proteins primarily relies on their stability, not binding selectivity. *Blood*. 2014;
  23. Deeks ED. Venetoclax: First Global Approval. *Drugs*. 2016;
  24. Wierda WG, Tambaro FP. How I manage CLL with venetoclax-based treatments. *Blood*. 2020;
  25. Seymour JF, Ma S, Brander DM, Choi MY, Barrientos J, Davids MS, et al. Venetoclax plus rituximab in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia: a phase 1b study. *Lancet Oncol*. 2017;
  26. Roberts AW, Stilgenbauer S, Seymour JF, Huang DCS. Venetoclax in patients with previously treated chronic lymphocytic leukemia. *Clinical Cancer Research*. 2017.
  27. Davids MS, Roberts AW, Seymour JF, Pagel JM, Kahl BS, Wierda WG, et al. Phase I first-in-human study of venetoclax in patients with relapsed or refractory non-hodgkin lymphoma. In: *Journal of Clinical Oncology*. 2017.
  28. Ansell SM. Hodgkin lymphoma: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. 2016;
  29. Shankland KR, Armitage JO, Hancock BW. Non-Hodgkin lymphoma. *The Lancet*. 2012.
  30. Hill M, Kyle F. NHL (diffuse large B-cell lymphoma). *BMJ clinical evidence*. 2010.
  31. Blaes AH, Ma L, Zhang Y, Peterson BA. Quality of life appears similar between survivors of indolent and aggressive non-Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2011;
  32. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Lee Harris N, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016.
  33. Škunca Ž. B Cell Lymphomagenesis. In: *Normal and Malignant B-Cell*. 2020.

34. Cheson BD, Leonard JP. Monoclonal Antibody Therapy for B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med*. 2008;
35. Zinzani PL, Flinn IW, Miller CB, Tetreault SA, Ardeshtna KM, Le N, et al. Prognostic and Immune-Related Factors for Response to Duvelisib in the Phase 2 DYNAMOTM Clinical Trial in iNHL. *Blood*. 2018;
36. Ciobanu A, Stanca O, Triantafyllidis I, Lupu A. Indolent lymphoma: diagnosis and prognosis in medical practice. *Maedica (Buchar)*. 2013;
37. Herold G. *Innere Medizin 2020*. Innere Medizin 2020. 2020.
38. Kaatsch P, Spix C. *Krebs in Deutschland für 2015 / 2016*. Robert Koch Inst. 2019;
39. Bosetti C, Levi F, Ferlay J, Lucchini F, Negri E, La Vecchia C. Incidence and mortality from non-Hodgkin lymphoma in Europe: The end of an epidemic? *Int J Cancer*. 2008;
40. Morin RD, Mendez-Lago M, Mungall AJ, Goya R, Mungall KL, Corbett RD, et al. Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature*. 2011;
41. Nguyen L, Papenhausen P, Shao H. The Role of c-MYC in B-Cell Lymphomas: Diagnostic and molecular aspects. *Genes (Basel)*. 2017;
42. Zhang Y, Dai Y, Zheng T, Ma S. Risk factors of non-Hodgkin's lymphoma. *Expert Opinion on Medical Diagnostics*. 2011.
43. Pannone G, Zamparese R, Pace M, Pedicillo M, Cagiano S, Somma P, et al. The role of EBV in the pathogenesis of Burkitt's Lymphoma: an Italian hospital based survey. *Infect Agent Cancer*. 2014;
44. Malcolm TIM, Hodson DJ, Macintyre EA, Turner SD. Challenging perspectives on the cellular origins of lymphoma. *Open Biol*. 2016;
45. Ansell SM. Non-Hodgkin Lymphoma: Diagnosis and Treatment. In: *Mayo Clinic Proceedings*. 2015.
46. Come SE, Jaffe ES, Andersen JC, Mann RB, Johnson BL, DeVita VT, et al. Non-Hodgkin's lymphomas in leukemic phase: Clinicopathologic correlations. *Am J Med*. 1980;
47. Armitage JO. Staging Non-Hodgkin Lymphoma. *CA Cancer J Clin*. 2005;
48. Minard-Colin V, Brugières L, Reiter A, Cairo MS, Gross TG, Woessmann W, et al. Non-hodgkin lymphoma in children and adolescents: Progress through effective collaboration, current knowledge, and challenges ahead. *Journal of Clinical Oncology*. 2015.
49. A Predictive Model for Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med*. 1993;
50. Non-hodgkin A, Treatment L, About GI, Lymphoma N, Adult R, Option T, et al. Adult Non-Hodgkin Lymphoma Treatment ( PDQ ® ). *Clin Trials*. 2011;
51. Sehn LH, Connors JM. Treatment of aggressive non-Hodgkin's lymphoma: a north American perspective. *Oncology (Williston Park, N.Y.)*. 2005.

52. Salles G, Barrett M, Foà R, Maurer J, O'Brien S, Valente N, et al. Rituximab in B-Cell Hematologic Malignancies: A Review of 20 Years of Clinical Experience. *Advances in Therapy*. 2017.
53. Sehn LH, Donaldson J, Chhanabhai M, Fitzgerald C, Gill K, Klasa R, et al. Introduction of combined CHOP plus rituximab therapy dramatically improved outcome of diffuse large B-cell lymphoma in British Columbia. *J Clin Oncol*. 2005;
54. Schwock J, Geddie WR. Diagnosis of B-cell non-hodgkin lymphomas with small-/intermediate-sized cells in cytopathology. *Pathology Research International*. 2012.
55. Li S, Young KH, Medeiros LJ. Diffuse large B-cell lymphoma. *Pathology*. 2018.
56. Gualco G, Weiss LM, Harrington WJ, Bacchi CE. Nodal diffuse large B-cell lymphomas in children and adolescents: Immunohistochemical expression patterns and c-MYC translocation in relation to clinical outcome. *Am J Surg Pathol*. 2009;
57. Vitolo U, Seymour JF, Martelli M, Illerhaus G, Illidge T, Zucca E, et al. Extranodal diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) and primary mediastinal B-cell lymphoma: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2016;
58. Shen H, Wei Z, Zhou D, Zhang Y, Han X, Wang W, et al. Primary extra-nodal diffuse large b-cell lymphoma: A prognostic analysis of 141 patients. *Oncol Lett*. 2018;
59. Vannata B, Zucca E. Primary extranodal B-cell lymphoma: Current concepts and treatment strategies. *Chinese Clinical Oncology*. 2015.
60. Li S, Lin P, Young KH, Kanagal-Shamanna R, Yin CC, Medeiros LJ. MYC/BCL2 Double-Hit High-Grade B-Cell Lymphoma. *Adv Anat Pathol*. 2013;
61. Miles RR, Raphael M, McCarthy K, Wotherspoon A, Lones MA, Terrier-Lacombe MJ, et al. Pediatric diffuse large B-cell lymphoma demonstrates a high proliferation index, frequent c-Myc protein expression, and a high incidence of germinal center subtype: Report of the French-American-British (FAB) International Study Group. *Pediatr Blood Cancer*. 2008;
62. Oschlies I, Klapper W, Zimmermann M, Krams M, Wacker HH, Burkhardt B, et al. Diffuse large B-cell lymphoma in pediatric patients belongs predominantly to the germinal-center type B-cell lymphomas: A clinicopathologic analysis of cases included in the German BFM (Berlin-Frankfurt-Münster) Multicenter Trial. *Blood*. 2006;
63. Uemura S, Hasegawa D, Yokoi T, Nino N, Tahara T, Tamura A, et al. Refractory double-hit lymphoma/leukemia in childhood mimicking B-precursor acute lymphoblastic leukemia at initial presentation. *Rinsho Ketsueki*. 2017;
64. MZ M, PK R, JB K, K N, Sheik Gafoor MH. AIDS-Associated Pediatric High Grade B-cell Lymphoma with MYC and BCL2 Translocations. *J AIDS Clin Res*. 2017;
65. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma CL, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000;

66. Iqbal J, Meyer PN, Smith LM, Johnson NA, Vose JM, Greiner TC, et al. BCL2 predicts survival in germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma treated with CHOP-like therapy and rituximab. *Clin Cancer Res.* 2011;
67. Landsburg DJ. Advancing the management of double hit lymphoma. *Oncotarget.* 2017.
68. Punnoose E, Peale F V., Szafer-Glusman E, Lei G, Bourgon R, Do AD, et al. BCL2 Expression in First-Line Diffuse Large B-Cell Lymphoma Identifies a Patient Population With Poor Prognosis. *Clin Lymphoma, Myeloma Leuk.* 2021;
69. Chuang SS, Ye H, Du MQ, Lu CL, Dogan A, Hsieh PP, et al. Histopathology and immunohistochemistry in distinguishing Burkitt lymphoma from diffuse large B-cell lymphoma with very high proliferation index and with or without a starry-sky pattern: A comparative study with EBER and FISH. *Am J Clin Pathol.* 2007;
70. Pagano L, Caira M, Valentini CG, Fianchi L. CLINICAL ASPECTS AND THERAPY OF SPORADIC BURKITT LYMPHOMA. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2009;
71. Hochberg J, Waxman IM, Kelly KM, Morris E, Cairo MS. Adolescent non-Hodgkin lymphoma and Hodgkin lymphoma: State of the science. *British Journal of Haematology.* 2009.
72. Casulo C, Friedberg J. Treating Burkitt Lymphoma in Adults. *Current Hematologic Malignancy Reports.* 2015.
73. Ferry JA. Burkitt's Lymphoma: Clinicopathologic Features and Differential Diagnosis. *Oncologist.* 2006;
74. Jurczak W, Zinzani PL, Gaidano G, Goy A, Provencio M, Nagy Z, et al. Phase IIa study of the CD19 antibody MOR208 in patients with relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol.* 2018;
75. Aka P, Vila MC, Jariwala A, Nkrumah F, Emmanuel B, Yagi M, et al. Endemic Burkitt lymphoma is associated with strength and diversity of Plasmodium falciparum malaria stage-specific antigen antibody response. *Blood.* 2013;
76. Mawson AR, Majumdar S. Malaria, Epstein–Barr virus infection and the pathogenesis of Burkitt's lymphoma. *Int J Cancer.* 2017;
77. Johnson DH, Reske TM, Twase H, Ruiz M, Jetly-Shridhar R. HIV-Associated Burkitt Lymphoma: Case Report and Literature Review. *Blood.* 2013;
78. Taub R, Kirsch I, Morton C, Lenoir G, Swan D, Tronick S, et al. Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982;
79. Scholtysik R, Kreuz M, Klapper W, Burkhardt B, Feller AC, Hummel M, et al. Detection of genomic aberrations in molecularly defined burkitt's lymphoma by array-based, high resolution, single nucleotide polymorphism analysis. *Haematologica.* 2010;
80. Miles RR, Arnold S, Cairo MS. Risk factors and treatment of childhood and adolescent

- Burkitt lymphoma/leukaemia. *British Journal of Haematology*. 2012.
81. Hummel M, Bentink S, Berger H, Klapper W, Wessendorf S, Barth TFE, et al. A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling. *N Engl J Med*. 2006;
  82. Pervez S, Qasim Raza M, Mirza A, Pal A. Strong BCL2 expression in Burkitt lymphoma is not uncommon in adults. *Indian J Pathol Microbiol*. 2011;
  83. Mukhtar F, Boffetta P, Risch HA, Park JY, Bubu OM, Womack L, et al. Survival predictors of Burkitt's lymphoma in children, adults and elderly in the United States during 2000–2013. *Int J Cancer*. 2017;
  84. Gregory Bociek R. Burkitt's lymphoma: Challenges and practical considerations for modern therapy. *Journal of Oncology Practice*. 2018.
  85. Maruyama D, Watanabe T, Maeshima AM, Nomoto J, Taniguchi H, Azuma T, et al. Modified cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin, and methotrexate (CODOX-M)/ifosfamide, etoposide, and cytarabine (IVAC) therapy with or without rituximab in Japanese adult patients with Burkitt lymphoma (BL) and B cell lymphoma, unclassifiable, with . *Int J Hematol*. 2010;
  86. Roschewski M, Dunleavy K, Abramson JS, Powell BL, Link BK, Patel P, et al. Multicenter Study of Risk-Adapted Therapy with Dose-Adjusted EPOCH-R in Adults with Untreated Burkitt Lymphoma. *J Clin Oncol*. 2020;
  87. Hill QA, Owen RG. CNS prophylaxis in lymphoma: Who to target and what therapy to use. *Blood Rev*. 2006;
  88. Woessmann W, Zimmermann M, Lenhard M, Burkhardt B, Rossig C, Kremens B, et al. Relapsed or refractory anaplastic large-cell lymphoma in children and adolescents after Berlin-Frankfurt-Muenster (BFM)-type first-line therapy: A BFM-Group study. *J Clin Oncol*. 2011;
  89. Woessmann W, Zimmermann M, Meinhardt A, Müller S, Hauch H, Knörr F, et al. Progressive or relapsed Burkitt lymphoma or leukemia in children and adolescents after BFM-type first-line therapy. *Blood*. 2020;
  90. Jourdain A, Auperin A, Minard-Colin V, Aladjidi N, Zsiros J, Coze C, et al. Outcome of and prognostic factors for relapse in children and adolescents with mature B-cell lymphoma and leukemia treated in three consecutive prospective "Lymphomes Malins B" protocols. A Société Française des Cancers de l'Enfant study. *Haematologica*. 2015;
  91. Rigaud C, Auperin A, Jourdain A, Haouy S, Couec ML, Aladjidi N, et al. Outcome of relapse in children and adolescents with B-cell non-Hodgkin lymphoma and mature acute leukemia: A report from the French LMB study. *Pediatr Blood Cancer*. 2019;
  92. Short NJ, Kantarjian HM, Ko H, Khoury JD, Ravandi F, Thomas DA, et al. Outcomes of adults with relapsed or refractory Burkitt and high-grade B-cell leukemia/lymphoma.



- American Journal of Hematology. 2017.
93. Seth R, Singh A. Leukemias in Children. Indian Journal of Pediatrics. 2015.
  94. Demir HA, Bayhan T, Üner A, Kurtulan O, Karakuş E, Emir S, et al. Chronic lymphocytic leukemia in a child: A challenging diagnosis in pediatric oncology practice. *Pediatr Blood Cancer*. 2014;
  95. Hijjiya N, Van Der Sluis IM. Asparaginase-Associated toxicity in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia and Lymphoma*. 2016.
  96. de Rooij J, Zwaan C, van den Heuvel-Eibrink M. Pediatric AML: From Biology to Clinical Management. *J Clin Med*. 2015;
  97. Marks DI, Rowntree C. Management of adults with T-cell lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2017.
  98. Faderl S, O'Brien S, Pui CH, Stock W, Wetzler M, Hoelzer D, et al. Adult acute lymphoblastic leukemia: Concepts and strategies. *Cancer*. 2010.
  99. Jiang M, Bennani NN, Feldman AL. Lymphoma classification update: T-cell lymphomas, Hodgkin lymphomas, and histiocytic/dendritic cell neoplasms. *Expert Review of Hematology*. 2017.
  100. Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J*. 2017;
  101. Pui CH, Behm FG, Crist WM. Clinical and biologic relevance of immunologic marker studies in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1993.
  102. Hoelzer D, Gökbuget N. Akute lymphatische Leukämie des Erwachsenen Acute lymphoblastic leukemia in adults. *Der Onkol*. 2006;
  103. Puckett Y, Chan O. Cancer, Leukemia, Lymphocytic, Acute (ALL). *StatPearls*. 2019.
  104. Davis AS, Viera AJ, Mead MD. Leukemia: An overview for primary care. *Am Fam Physician*. 2014;
  105. Faderl S, Jeha S, Kantarjian HM. The biology and therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 2003.
  106. Jensen IM, Jensen PD, Ellegård J, Bastrup-Madsen P, Hokland P. Extramedullary manifestations among adult patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Ugeskr Laeger*. 1991;
  107. SULLIVAN MP. Intracranial complications of leukemia in children. *Pediatrics*. 1957;
  108. Mwirigi A, Dillon R, Raj K. Acute leukaemia. *Medicine (United Kingdom)*. 2017.
  109. Taylor J, Xiao W, Abdel-Wahab O. Diagnosis and classification of hematologic malignancies on the basis of genetics. *Blood*. 2017.
  110. Ma H, Sun H, Sun X. Survival improvement by decade of patients aged 0-14 years with acute lymphoblastic leukemia: A SEER analysis. *Sci Rep*. 2014;
  111. Schrappe M, Reiter A, Zimmermann M, Harbott J, Ludwig WD, Henze G, et al. Long-

- term results of four consecutive trials in childhood ALL performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 1995. *Leukemia*. 2000;
112. Möricke A, Reiter A, Zimmermann M, Gadner H, Stanulla M, Dördelmann M, et al. Risk-adjusted therapy of acute lymphoblastic leukemia can decrease treatment burden and improve survival: Treatment results of 2169 unselected pediatric and adolescent patients enrolled in the trial ALL-BFM 95. *Blood*. 2008;
  113. Schrappe M, Reiter A, Henze G, Niemeyer C, Bode U, Köhl J, et al. Prevention of CNS recurrence in childhood ALL: Results with reduced radiotherapy combined with CNS-directed chemotherapy in four consecutive ALL- BFM trials. *Klin Padiatr*. 1998;
  114. Koka A, Saygin C, Uzunaslán D, Ozdemir N, Apak H, Celkan T. A 17-year experience with ALL-BFM protocol in acute lymphoblastic leukemia: Prognostic predictors and interruptions during protocol. *Leuk Res*. 2014;
  115. Chen X, Wood BL. How do we measure MRD in ALL and how should measurements affect decisions. Re: Treatment and prognosis? *Best Practice and Research: Clinical Haematology*. 2017.
  116. Borowitz MJ, Devidas M, Hunger SP, Bowman WP, Carroll AJ, Carroll WL, et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: A Children's Oncology Group study. *Blood*. 2008;
  117. Jeremias I, Schewe DM. Characteristics and therapeutic targeting of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2018.
  118. Pulsipher MA, Peters C, Pui CH. High-Risk Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia: To Transplant or Not to Transplant? *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011;
  119. Paul S, Kantarjian H, Jabbour EJ. Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Mayo Clinic Proceedings*. 2016.
  120. Samra B, Jabbour E, Ravandi F, Kantarjian H, Short NJ. Evolving therapy of adult acute lymphoblastic leukemia: State-of-the-art treatment and future directions. *Journal of Hematology and Oncology*. 2020.
  121. Abbasi S, Maleha F, Shobaki M. Acute lymphoblastic leukemia experience: Epidemiology and outcome of two different regimens. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2013;
  122. Gökbuğet N. How I treat older patients with ALL. *Blood*. 2013;
  123. Watanabe A, Inukai T, Kagami K, Abe M, Takagi M, Fukushima T, et al. Resistance of t(17;19)-acute lymphoblastic leukemia cell lines to multiagents in induction therapy. *Cancer Med*. 2019;
  124. Chow R, Shabsovich D, Schiller G, Kallen M, Tirado CA. A t(17;19)(q22;p13.3) Involving

- TCF3, a t(1;9)(p13;p13), and a 5' IGH Deletion in a Case of Adult B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Assoc Genet Technol.* 2016;
125. Minson KA, Prasad P, Vear S, Borinstein S, Ho R, Domm J, et al. t(17;19) in Children with Acute Lymphocytic Leukemia: A Report of 3 Cases and a Review of the Literature. *Case Rep Hematol.* 2013;
126. De Boer J, Yeung J, Ellu J, Ramanujachar R, Bornhauser B, Solarska O, et al. The E2A-HLF oncogenic fusion protein acts through Lmo2 and Bcl-2 to immortalize hematopoietic progenitors. *Leukemia.* 2011;
127. Hunger SP, Devaraj PE, Foroni L, Secker-Walker LM, Cleary ML. Two types of genomic rearrangements create alternative E2A-HLF fusion proteins in t(17;19)-ALL. *Blood.* 1994;
128. Glover JM, Loriaux M, Tyner JW, Druker BJ, Chang BH. In vitro sensitivity to dasatinib in lymphoblasts from a patient with t(17;19)(q22;p13) gene rearrangement pre-B acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer.* 2012;
129. Inukai TT, Hirose K, Inaba T, Kurosawa H, Hama A, Inada H, et al. Hypercalcemia in childhood acute lymphoblastic leukemia: Frequent implication of parathyroid hormone-related peptide and E2A-HLF from translocation 17;19. *Leukemia.* 2007;
130. Dahéron L, Brizard F, Millot F, Cividin M, Lacotte L, Guilhot F, et al. E2A/HLF fusion gene in an acute lymphoblastic leukemia patient with disseminated intravascular coagulation and a normal karyotype. *Hematol J.* 2002;
131. Takahashi H, Goto H, Funabiki T, Fujii H, Yamazaki S, Fujioka K, et al. Expression of two types of E2A-HLF fusion proteins in YCUB-2, a novel cell line established from B-lineage leukemia with t(17:19) [6]. *Leukemia.* 2001.
132. Safavi M, Safaei A, Lotfi M. A rare variant of t(17;19) in a case of Philadelphia positive adult acute lymphoblastic leukemia presenting with disseminated intravascular coagulation. *Blood Res.* 2018;
133. Frismantas V, Dobay MP, Rinaldi A, Tchinda J, Dunn SH, Kunz J, et al. Ex vivo drug response profiling detects recurrent sensitivity patterns in drug-resistant acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2017;
134. Fischer U, Forster M, Rinaldi A, Risch T, Sungalee S, Warnatz HJ, et al. Genomics and drug profiling of fatal TCF3-HLF<sup>+</sup> positive acute lymphoblastic leukemia identifies recurrent mutation patterns and therapeutic options. *Nat Genet.* 2015;
135. Mouttet B, Vinti L, Ancliff P, Bodmer N, Brethon B, Cario G, et al. Durable remissions in TCF3-HLF positive acute lymphoblastic leukemia with blinatumomab and stem cell transplantation. *Haematologica.* 2019.
136. Zhang X, Inukai T, Hirose K, Akahane K, Kuroda I, Honna-Oshiro H, et al. Oncogenic fusion E2A-HLF sensitizes t(17;19)-positive acute lymphoblastic leukemia to TRAIL-

- mediated apoptosis by upregulating the expression of death receptors. *Leukemia*. 2012;
137. K. L, S. T, N. AG, J. H, D.H. LT, B.J. D, et al. Dasatinib shows therapeutic potential in the murine xenograft model for TCF3 rearranged acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2014;
  138. Baudino T. Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment. *Curr Drug Discov Technol*. 2015;
  139. Scott AM, Wolchok JD, Old LJ. Antibody therapy of cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2012.
  140. Weidanz JA, Hildebrand WH. Expanding the targets available to therapeutic antibodies via novel disease-specific markers. *Int Rev Immunol*. 2011;
  141. Coulson A, Levy A, Gossell-Williams M. Monoclonal antibodies in cancer therapy: Mechanisms, successes and limitations. *West Indian Med J*. 2014;
  142. Mathur R, Weiner GJ. Picking the Optimal Target for Antibody-Drug Conjugates. *Am Soc Clin Oncol Educ B*. 2013;
  143. Yao H, Jiang F, Lu A, Zhang G. Methods to design and synthesize antibody-drug conjugates (ADCs). *International Journal of Molecular Sciences*. 2016.
  144. Zhao P, Zhang Y, Li W, Jeanty C, Xiang G, Dong Y. Recent advances of antibody drug conjugates for clinical applications. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2020.
  145. Caron A, Lelong C, Pascual MH, Benning V. Miniaturized blood sampling techniques to benefit reduction in mice and refinement in nonhuman primates: Applications to bioanalysis in toxicity studies with antibody-drug conjugates. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2015;
  146. Godwin CD, Gale RP, Walter RB. Gemtuzumab ozogamicin in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2017.
  147. De Pauw I, Lardon F, Van den Bossche J, Baysal H, Fransen E, Deschoolmeester V, et al. Simultaneous targeting of EGFR, HER2, and HER4 by afatinib overcomes intrinsic and acquired cetuximab resistance in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Mol Oncol*. 2018;
  148. Schneider H, Chaovapong W, Matthews DJ, Karkaria C, Cass RT, Zhan H, et al. Homodimerization of erythropoietin receptor by a bivalent monoclonal antibody triggers cell proliferation and differentiation of erythroid precursors. *Blood*. 1997;
  149. Bezombes C, Fournié JJ, Laurent G. Direct effect of rituximab in B-cell-derived lymphoid neoplasias: Mechanism, regulation, and perspectives. *Molecular Cancer Research*. 2011.
  150. Vega MI, Huerta-Yeppez S, Martinez-Paniagua M, Martinez-Miguel B, Hernandez-Pando R, González-Bonilla CR, et al. Rituximab-mediated cell signaling and chemo/immunosensitization of drug-resistant B-NHL is independent of its Fc functions. *Clin Cancer*

- Res. 2009;
151. Van De Donk NWCJ, Usmani SZ. CD38 antibodies in multiple myeloma: Mechanisms of action and modes of resistance. *Frontiers in Immunology*. 2018.
  152. Bakema JE, Van Egmond M. Fc receptor-dependent mechanisms of monoclonal antibody therapy of cancer. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 2014.
  153. Bournazos S, Gupta A, Ravetch J V. The role of IgG Fc receptors in antibody-dependent enhancement. *Nature Reviews Immunology*. 2020.
  154. Kellner C, Otte A, Cappuzzello E, Klausz K, Peipp M. Modulating Cytotoxic Effector Functions by Fc Engineering to Improve Cancer Therapy. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2017.
  155. Boero S, Morabito A, Banelli B, Cardinali B, Dozin B, Lunardi G, et al. Analysis of in vitro ADCC and clinical response to trastuzumab: Possible relevance of FcγRIIIA/FcγRIIA gene polymorphisms and HER-2 expression levels on breast cancer cell lines. *J Transl Med*. 2015;
  156. Kohno S, Kadota JI, Hara K, Kawakami K, Tohyama M, Teruya K, et al. T Cell-Dependent Activation of Macrophages and Enhancement of Their Phagocytic Activity in the Lungs of Mice Inoculated with Heat-Killed *Cryptococcus neoformans*: Involvement of IFN-γ and Its Protective Effect against Cryptococcal Infection. *Microbiol Immunol*. 1995;
  157. Van Erp EA, Luytjes W, Ferwerda G, Van Kasteren PB. Fc-mediated antibody effector functions during respiratory syncytial virus infection and disease. *Frontiers in Immunology*. 2019.
  158. Kristensen AB, Kent SJ, Parsons MS. Contribution of NK Cell Education to both Direct and Anti-HIV-1 Antibody-Dependent NK Cell Functions. *J Virol*. 2018;
  159. Zahavi D, AlDeghaither D, O'Connell A, Weiner LM. Enhancing antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity: a strategy for improving antibody-based immunotherapy. *Antib Ther*. 2018;
  160. Gül N, Van Egmond M. Antibody-dependent phagocytosis of tumor cells by Macrophages: A Potent effector mechanism of monoclonal antibody therapy of cancer. *Cancer Research*. 2015.
  161. García-García E, Rosales C. Signal transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J Leukoc Biol*. 2002;
  162. Vezina HE, Cotreau M, Han TH, Gupta M. Antibody–Drug Conjugates as Cancer Therapeutics: Past, Present, and Future. *J Clin Pharmacol*. 2017;
  163. Chau CH, Steeg PS, Figg WD. Antibody–drug conjugates for cancer. *The Lancet*. 2019.
  164. Staudacher AH, Brown MP. Antibody drug conjugates and bystander killing: is antigen-dependent internalisation required. *British Journal of Cancer*. 2017.

165. Marcucci F, Caserta CA, Romeo E, Rumio C. Antibody-drug conjugates (ADC) against cancer stem-like cells (CSC) - Is there still room for optimism? *Frontiers in Oncology*. 2019.
166. Levin R, Grinstein S, Canton J. The life cycle of phagosomes: formation, maturation, and resolution. *Immunological Reviews*. 2016.
167. Uribe-Quero E, Rosales C. Control of phagocytosis by microbial pathogens. *Frontiers in Immunology*. 2017.
168. Colucci-Guyon E, Tinevez JY, Renshaw SA, Herbomel P. Strategies of professional phagocytes in vivo: Unlike macrophages, neutrophils engulf only surface-associated microbes. *J Cell Sci*. 2011;
169. Arandjelovic S, Ravichandran KS. Phagocytosis of apoptotic cells in homeostasis. *Nature Immunology*. 2015.
170. Su Z, Fortin A, Gros P, Stevenson MM. Opsonin-Independent Phagocytosis: An Effector Mechanism against Acute Blood-Stage Plasmodium chabaudi AS Infection . *J Infect Dis*. 2002;
171. Azad AK, Rajaram MVS, Schlesinger LS. Exploitation of the Macrophage Mannose Receptor (CD206) in Infectious Disease Diagnostics and Therapeutics. *J Cytol Mol Biol*. 2014;
172. Mantovani B. Different roles of IgG and complement receptors in phagocytosis by polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol*. 1975;
173. May RC, Machesky LM. Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *Journal of Cell Science*. 2001.
174. Zimmerli S, Majeed M, Gustavsson M, Stendahl O, Sanan DA, Ernst JD. Phagosome-lysosome fusion is a calcium-independent event in macrophages. *J Cell Biol*. 1996;
175. Ravichandran KS, Lorenz U. Engulfment of apoptotic cells: Signals for a good meal. *Nature Reviews Immunology*. 2007.
176. Fu R, Shen Q, Xu P, Luo JJ, Tang Y. Phagocytosis of microglia in the central nervous system diseases. *Mol Neurobiol*. 2014;
177. Li W. Eat-me signals: Keys to molecular phagocyte biology and “Appetite” control. *Journal of Cellular Physiology*. 2012.
178. Segawa K, Nagata S. An Apoptotic “Eat Me” Signal: Phosphatidylserine Exposure. *Trends in Cell Biology*. 2015.
179. Takeda M, Yamagami K, Tanaka K. Role of phosphatidylserine in phospholipid flippase-mediated vesicle transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*. 2014;
180. Hankins HM, Baldrige RD, Xu P, Graham TR. Role of Flippases, Scramblases and Transfer Proteins in Phosphatidylserine Subcellular Distribution. *Traffic*. 2015.
181. Gardai SJ, Bratton DL, Ogden CA, Henson PM. Recognition ligands on apoptotic cells:

- a perspective. *J Leukoc Biol.* 2006;
182. Russ A, Hua AB, Montfort WR, Rahman B, Riaz I Bin, Khalid MU, et al. Blocking “don’t eat me” signal of CD47-SIRP $\alpha$  in hematological malignancies, an in-depth review. *Blood Reviews.* 2018.
  183. Métaayer LE, Vilalta A, Amos Burke GA, Brown GC. Anti-CD47 antibodies induce phagocytosis of live, malignant B cells by macrophages via the Fc domain, resulting in cell death by phagoptosis. *Oncotarget.* 2017;
  184. Wiersma VR, Michalak M, Abdullah TM, Bremer E, Eggleton P. Mechanisms of translocation of ER chaperones to the cell surface and immunomodulatory roles in cancer and autoimmunity. *Front Oncol.* 2015;
  185. Oldenburg PA, Zheleznyak A, Fang YF, Lagenaur CF, Gresham HD, Lindberg FP. Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science* (80- ). 2000;
  186. Burger P, Hilarius-Stokman P, De Korte D, Van Den Berg TK, Van Bruggen R. CD47 functions as a molecular switch for erythrocyte phagocytosis. *Blood.* 2012;
  187. Pietsch EC, Dong J, Cardoso R, Zhang X, Chin D, Hawkins R, et al. Anti-leukemic activity and tolerability of anti-human CD47 monoclonal antibodies. *Blood Cancer J.* 2017;
  188. Feng M, Jiang W, Kim BYS, Zhang CC, Fu YX, Weissman IL. Phagocytosis checkpoints as new targets for cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer.* 2019.
  189. Weiskopf K. Cancer immunotherapy targeting the CD47/SIRP $\alpha$  axis. *European Journal of Cancer.* 2017.
  190. Schewe DM, Alsadeq A, Sattler C, Lenk L, Vogiatzi F, Cario G, et al. An Fc-engineered CD19 antibody eradicates MRD in patient-derived MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemia xenografts. *Blood.* 2017;
  191. Monnet C, Jorieux S, Souyris N, Zaki O, Jacquet A, Fournier N, et al. Combined glyco- and protein-Fc engineering simultaneously enhance cytotoxicity and half-life of a therapeutic antibody. *MAbs.* 2014;
  192. Kellner C, Peipp M, Gramatzki M, Schrappe M, Schewe DM. Perspectives of Fc engineered antibodies in CD19 targeting immunotherapies in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Oncoimmunology.* 2018;
  193. Repp R, Kellner C, Muskulus A, Staudinger M, Mohseni Nodehi S, Glorius P, et al. Combined Fc-protein- and Fc-glyco-engineering of scFv-Fc fusion proteins synergistically enhances CD16a binding but does not further enhance NK-cell mediated ADCC. *J Immunol Methods.* 2011;
  194. Tobinai K, Klein C, Oya N, Fingerle-Rowson G. A Review of Obinutuzumab (GA101), a Novel Type II Anti-CD20 Monoclonal Antibody, for the Treatment of Patients with B-Cell Malignancies. *Advances in Therapy.* 2017.

195. Jia L, Zhang J, Ma T, Guo Y, Yu Y, Cui J. The function of fucosylation in progression of lung cancer. *Frontiers in Oncology*. 2018.
196. Marcus R, Davies A, Ando K, Klapper W, Opat S, Owen C, et al. Obinutuzumab for the First-Line Treatment of Follicular Lymphoma. *N Engl J Med*. 2017;
197. Goede V, Fischer K, Busch R, Engelke A, Eichhorst B, Wendtner CM, et al. Obinutuzumab plus Chlorambucil in Patients with CLL and Coexisting Conditions. *N Engl J Med*. 2014;
198. Sehn LH, Chua N, Mayer J, Dueck G, Trněný M, Bouabdallah K, et al. Obinutuzumab plus bendamustine versus bendamustine monotherapy in patients with rituximab-refractory indolent non-Hodgkin lymphoma (GADOLIN): a randomised, controlled, open-label, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2016;
199. Kellner C, Zhukovsky EA, Brüggemann M, Kneba M, Schrauder A, Schrappe M, et al. The CD19 Antibody MOR208 Efficiently Triggers Natural Killer Cell-Mediated Cytotoxicity Against Acute Lymphoblastic Leukemia Cells From Pediatric and Adult Patients. *Blood*. 2012;
200. Hoy SM. Tafasitamab: First Approval. *Drugs*. 2020;
201. Wang X, Mathieu M, Brezski RJ. IgG Fc engineering to modulate antibody effector functions. *Protein and Cell*. 2018.
202. Johansson B, Mertens F, Mitelman F. Secondary chromosomal abnormalities in acute leukemias. *Leukemia*. 1994;
203. Humbert O, Davis L, Maizels N. Targeted gene therapies: Tools, applications, optimization. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2012.
204. Chiarini F, Paganelli F, Martelli AM, Evangelisti C. The role played by wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in acute lymphoblastic leukemia. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020.
205. Makino K, Nakamura H, Shinojima N, Kuroda J ichiro, Yano S, Mikami Y, et al. BCL2 expression is associated with a poor prognosis independent of cellular origin in primary central nervous system diffuse large B-cell lymphoma. *J Neurooncol*. 2018;
206. Podaru MN, Fields L, Kainuma S, Ichihara Y, Hussain M, Ito T, et al. Reparative macrophage transplantation for myocardial repair: a refinement of bone marrow mononuclear cell-based therapy. *Basic Res Cardiol*. 2019;
207. Casao A, Mata-Campuzano M, Ordás L, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T, Martínez-Pastor F. Cleaved PARP-1, an Apoptotic Marker, can be Detected in Ram Spermatozoa. *Reprod Domest Anim*. 2015;
208. Borodovsky A, McQuiston TJ, Stetson D, Ahmed A, Whitston D, Zhang J, et al. Generation of stable PDX derived cell lines using conditional reprogramming. *Molecular cancer*. 2017.



209. Simpson A, Caballero O. Monoclonal antibodies for the therapy of cancer. *BMC Proc.* 2014;
210. Weiner LM, Surana R, Wang S. Monoclonal antibodies: Versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nature Reviews Immunology.* 2010.
211. Cuesta-Mateos C, Alcaraz-Serna A, Somovilla-Crespo B, Muñoz-Calleja C. Monoclonal antibody therapies for hematological malignancies: Not just lineage-specific targets. *Frontiers in Immunology.* 2018.
212. Akinleye A, Chen Y, Mukhi N, Song Y, Liu D. Ibrutinib and novel BTK inhibitors in clinical development. *Journal of Hematology and Oncology.* 2013.
213. Chen H, Liu H, Qing G. Targeting oncogenic Myc as a strategy for cancer treatment. *Signal Transduction and Targeted Therapy.* 2018.
214. Beà S, Tort F, Pinyol M, Puig X, Hernández L, Hernández S, et al. BMI-1 gene amplification and overexpression in hematological malignancies occur mainly in mantle cell lymphomas. *Cancer Res.* 2001;
215. Small S, Keerthivasan G, Huang Z, Gurbuxani S, Crispino JD. Overexpression of survivin initiates hematologic malignancies in vivo. *Leukemia.* 2010;
216. Koníková E, Kusenda J. Altered expression of p53 and MDM2 proteins in hematological malignancies. *Neoplasma.* 2003;
217. Corraliza-Gorjón I, Somovilla-Crespo B, Santamaria S, Garcia-Sanz JA, Kremer L. New strategies using antibody combinations to increase cancer treatment effectiveness. *Frontiers in Immunology.* 2017.
218. Shanafelt TD, Wang X V., Kay NE, Hanson CA, O'Brien S, Barrientos J, et al. Ibrutinib–rituximab or chemoimmunotherapy for chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2019;
219. Pongas G, Cheson BD. PI3K signaling pathway in normal B cells and indolent B-cell malignancies. *Seminars in Oncology.* 2016.
220. Kim S, Nam SJ, Kwon D, Kim H, Lee E, Kim TM, et al. MYC and BCL2 overexpression is associated with a higher class of Memorial Sloan-Kettering Cancer Center prognostic model and poor clinical outcome in primary diffuse large B-cell lymphoma of the central nervous system. *BMC Cancer.* 2016;
221. Langenau DM, Jette C, Berghmans S, Palomero T, Kanki JP, Kutok JL, et al. Suppression of apoptosis by bcl-2 overexpression in lymphoid cells of transgenic zebrafish. *Blood.* 2005;
222. Pham L V., Huang S, Zhang H, Zhang J, Bell T, Zhou S, et al. Strategic therapeutic targeting to overcome venetoclax resistance in aggressive B-cell lymphomas. *Clin Cancer Res.* 2018;
223. Bodo J, Zhao X, Durkin L, Souers AJ, Phillips DC, Smith MR, et al. Acquired resistance

- to venetoclax (ABT-199) in t(14;18) positive lymphoma cells. *Oncotarget*. 2016;
224. Seyfried F, Demir S, Hörl RL, Stirnweiß FU, Ryan J, Scheffold A, et al. Prediction of venetoclax activity in precursor B-ALL by functional assessment of apoptosis signaling. *Cell Death Dis*. 2019;
225. Choi YJ, Kim DH, Yoon DH, Suh C, Choi CM, Lee JC, et al. Efficacy of the novel CDK7 inhibitor QS1189 in mantle cell lymphoma. *Sci Rep*. 2019;
226. Juárez-Salcedo LM, Desai V, Dalia S. Venetoclax: Evidence to date and clinical potential. *Drugs Context*. 2019;
227. Ruvolo PP, Deng X, May WS. Phosphorylation of Bcl2 and regulation of apoptosis. *Leukemia*. 2001.
228. Deng X, Kornblau SM, Ruvolo PP, May WS. Regulation of Bcl2 Phosphorylation and Potential Significance for Leukemic Cell Chemoresistance. *JNCI Monogr*. 2000;
229. Uchida A, Isobe Y, Asano J, Uemura Y, Hoshikawa M, Takagi M, et al. Targeting BCL2 with venetoclax is a promising therapeutic strategy for “double-proteinexpression” lymphoma with MYC and BCL2 rearrangements. *Haematologica*. 2019;
230. Valdiglesias V, Giunta S, Fenech M, Neri M, Bonassi S.  $\gamma$ H2AX as a marker of DNA double strand breaks and genomic instability in human population studies. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*. 2013.
231. Jin Z, May WS, Gao F, Flagg T, Deng X. Bcl2 suppresses DNA repair by enhancing c-Myc transcriptional activity. *J Biol Chem*. 2006;
232. Podhorecka M, Skladanowski A, Bozko P. H2AX phosphorylation: Its role in DNA damage response and cancer therapy. *Journal of Nucleic Acids*. 2010.
233. Pospelova T V., Demidenko ZN, Bukreeva EI, Pospelov VA, Gudkov A V., Blagosklonny M V. Pseudo-DNA damage response in senescent cells. *Cell Cycle*. 2009.
234. Wilkerson MJ, Dolce K, Koopman T, Shuman W, Chun R, Garrett L, et al. Lineage differentiation of canine lymphoma/leukemias and aberrant expression of CD molecules. *Vet Immunol Immunopathol*. 2005;
235. Sonoki T, Li Y, Miyanishi S, Nakamine H, Hanaoka N, Matsuoka H, et al. Establishment of a novel CD20 negative mature B-cell line, WILL2, from a CD20 positive diffuse large B-cell lymphoma patient treated with rituximab. *International Journal of Hematology*. 2009.
236. Davis TA, Czerwinski DK, Levy R. Therapy of B-cell lymphoma with anti-CD20 antibodies can result in the loss of CD20 antigen expression. *Clin Cancer Res*. 1999;
237. Michot J-M, Buet-Elfassy A, Annereau M, Lazarovici J, Danu A, Sarkozy C, et al. Clinical significance of the loss of CD20 antigen on tumor cells in patients with relapsed or refractory follicular lymphoma. *Cancer Drug Resist*. 2021;
238. Bojarczuk K, Siernicka M, Dwojak M, Bobrowicz M, Pyrzynska B, Gaj P, et al. B-cell

- receptor pathway inhibitors affect CD20 levels and impair antitumor activity of anti-CD20 monoclonal antibodies. *Leukemia*. 2014.
239. Choudhry P, Mariano MC, Geng H, Martin TG, Wolf JL, Wong SW, et al. DNA methyltransferase inhibitors upregulate CD38 protein expression and enhance daratumumab efficacy in multiple myeloma. *Leukemia*. 2020.
240. Leung KK, Nguyen A, Shi T, Tang L, Ni X, Escoubet L, et al. Multiomics of azacitidine-treated AML cells reveals variable and convergent targets that remodel the cell-surface proteome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;
241. Chao MP, Takimoto CH, Feng DD, McKenna K, Gip P, Liu J, et al. Therapeutic Targeting of the Macrophage Immune Checkpoint CD47 in Myeloid Malignancies. *Frontiers in Oncology*. 2020.
242. Sallman DA, Asch AS, Al Malki MM, Lee DJ, Donnellan WB, Marcucci G, et al. The First-in-Class Anti-CD47 Antibody Magrolimab (5F9) in Combination with Azacitidine Is Effective in MDS and AML Patients: Ongoing Phase 1b Results. *Blood*. 2019;
243. VanDerMeid KR, Elliott MR, Baran AM, Barr PM, Chu CC, Zent CS. Cellular cytotoxicity of next-generation CD20 monoclonal antibodies. *Cancer Immunol Res*. 2018;
244. Zwirner NW, Domaica CI. Cytokine regulation of natural killer cell effector functions. *BioFactors*. 2010;
245. Almishri W, Santodomingo-Garzon T, Le T, Stack D, Mody CH, Swain MG. TNF $\alpha$  Augments Cytokine-Induced NK Cell IFN $\gamma$  Production through TNFR2. *J Innate Immun*. 2016;
246. Lasater EA, Do AD, Burton L, Li Y, Williams E, Oeh J, et al. Resistance of Natural Killer and T Cells to Venetoclax Allows for Combination Treatment with Cancer Immunotherapy Agents. *Blood*. 2018;
247. Velthuis JHL, de Bont HJGM, Medema JP, Kuppen PJK, Mulder GJ, Nagelkerke JF. Interleukin-2 activated NK cells do not use the CD95L- and TRAIL-pathways in the rapid induction of apoptosis of rat colon carcinoma CC531s cells. *Immunobiology*. 2003.
248. Zambello R, Barilà G, Manni S, Piazza F, Semenzato G. NK cells and CD38: Implication for (Immuno)Therapy in Plasma Cell Dyscrasias. *Cells*. 2020;
249. McBride A, Houtmann S, Wilde L, Vigil C, Eischen CM, Kasner M, et al. The role of inhibition of apoptosis in acute leukemias and myelodysplastic syndrome. *Frontiers in Oncology*. 2019.
250. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*. 1998;
251. Ziporen L, Donin N, Shmushkovich T, Gross A, Fishelson Z. Programmed Necrotic Cell Death Induced by Complement Involves a Bid-Dependent Pathway. *J Immunol*. 2009;

252. Attali G, Gancz D, Fishelson Z. Increased sensitivity of early apoptotic cells to complement-mediated lysis. *Eur J Immunol.* 2004;
253. Lo J, Lau EYT, Ching RHH, Cheng BYL, Ma MKF, Ng IOL, et al. Nuclear factor kappa B-mediated CD47 up-regulation promotes sorafenib resistance and its blockade synergizes the effect of sorafenib in hepatocellular carcinoma in mice. *Hepatology.* 2015;
254. Betancur PA, Abraham BJ, Yiu YY, Willingham SB, Khameneh F, Zarnegar M, et al. A CD47-associated super-enhancer links pro-inflammatory signalling to CD47 upregulation in breast cancer. *Nat Commun.* 2017;
255. Anderson MA, Deng J, Seymour JF, Tam C, Kim SY, Fein J, et al. The BCL2 selective inhibitor venetoclax induces rapid onset apoptosis of CLL cells in patients via a TP53-independent mechanism. *Blood.* 2016;
256. Borisenko GG, Matsura T, Liu SX, Tyurin VA, Jianfei J, Serinkan FB, et al. Macrophage recognition of externalized phosphatidylserine and phagocytosis of apoptotic Jurkat cells - Existence of a threshold. *Arch Biochem Biophys.* 2003;
257. Rysavy NM, Shimoda LMN, Dixon AM, Speck M, Stokes AJ, Turner H, et al. Beyond apoptosis: the mechanism and function of phosphatidylserine asymmetry in the membrane of activating mast cells. *Bioarchitecture.* 2014.
258. Shultz LD, Lyons BL, Burzenski LM, Gott B, Chen X, Chaleff S, et al. Human Lymphoid and Myeloid Cell Development in NOD/LtSz- scid IL2R  $\gamma$  null Mice Engrafted with Mobilized Human Hemopoietic Stem Cells . *J Immunol.* 2005;
259. Gordon S, Plüddemann A. Tissue macrophages: Heterogeneity and functions. *BMC Biology.* 2017.
260. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews Immunology.* 2005.
261. Hoffmann P, Jiménez-Díaz M, Weckesser J, Bessler WG. Murine bone marrow-derived macrophages constitute feeder cells for human B cell hybridomas. *J Immunol Methods.* 1996;
262. Layoun A, Samba M, Santos MM. Isolation of murine peritoneal macrophages to carry out gene expression analysis upon toll-like receptors stimulation. *J Vis Exp.* 2015;
263. Jin X, Kruth HS. Culture of macrophage colony-stimulating factor differentiated human monocyte-derived macrophages. *J Vis Exp.* 2016;
264. Wang C, Yu X, Cao Q, Wang Y, Zheng G, Tan TK, et al. Characterization of murine macrophages from bone marrow, spleen and peritoneum. *BMC Immunol.* 2013;
265. Zhang X, Goncalves R, Mosser DM. The isolation and characterization of murine macrophages. *Current Protocols in Immunology.* 2008.
266. Barbarino V, Henschke S, Blakemore SJ, Izquierdo E, Michalik M, Nickel N, et al.

- Macrophage-mediated antibody dependent effector function in aggressive B-cell lymphoma treatment is enhanced by ibrutinib via inhibition of JAK2. *Cancers (Basel)*. 2020;
267. Ravà M, D'Andrea A, Nicoli P, Gritti I, Donati G, Doni M, et al. Therapeutic synergy between tigecycline and venetoclax in a preclinical model of MYC/BCL2 double-hit B cell lymphoma. *Sci Transl Med*. 2018;
268. Schewe DM, Alsadeq A, Sattler C, Lenk L, Vogiatzi F, Cario G, et al. An Fc-engineered CD19 antibody eradicates MRD in patient-derived MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemia xenografts. *Blood*. 2017;130(13):1543–52.
269. Scheuermann RH, Racila E. CD19 antigen in leukemia and lymphoma diagnosis and immunotherapy. *Leuk Lymphoma*. 1995;
270. Yang M, Wang L, Ni M, Neuber B, Wang S, Gong W, et al. Pre-sensitization of Malignant B Cells Through Venetoclax Significantly Improves the Cytotoxic Efficacy of CD19.CAR-T Cells. *Front Immunol*. 2020;
271. Feng D, Gip P, McKenna KM, Zhao F, Mata O, Choi TS, et al. Combination Treatment with 5F9 and Azacitidine Enhances Phagocytic Elimination of Acute Myeloid Leukemia. *Blood*. 2018;
272. Elías EE, Almejún MB, Colado A, Cordini G, Vergara-Rubio M, Podaza E, et al. Autologous t-cell activation fosters ABT-199 resistance in chronic lymphocytic leukemia: Rationale for a combined therapy with SYK inhibitors and anti-CD20 monoclonal antibodies. *Haematologica*. 2018;
273. Kaufman JL, Baz RC, Harrison SJ, Quach H, Ho S-J, Vangsted AJ, et al. Updated analysis of a phase I/II study of venetoclax in combination with daratumumab and dexamethasone, +/- bortezomib, in patients with relapsed/refractory multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2020;
274. Wei Y, Cao Y, Sun R, Cheng L, Xiong X, Jin X, et al. Targeting Bcl-2 Proteins in Acute Myeloid Leukemia. *Frontiers in Oncology*. 2020.
275. Ramsey HE, Fischer MA, Lee T, Gorska AE, Arrate MP, Fuller L, et al. A novel MCL1 inhibitor combined with venetoclax rescues venetoclax-resistant acute myelogenous Leukemia. *Cancer Discov*. 2018;
276. Hormi M, Birsén R, Belhadj M, Huynh T, Cantero Aguilar L, Grignano E, et al. Pairing MCL-1 inhibition with venetoclax improves therapeutic efficiency of BH3-mimetics in AML. *Eur J Haematol*. 2020;
277. Wilson WH, O'Connor OA, Czuczman MS, LaCasce AS, Gerecitano JF, Leonard JP, et al. Navitoclax, a targeted high-affinity inhibitor of BCL-2, in lymphoid malignancies: A phase 1 dose-escalation study of safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and antitumour activity. *Lancet Oncol*. 2010;

278. Choudhary GS, Al-Harbi S, Mazumder S, Hill BT, Smith MR, Bodo J, et al. MCL-1 and BCL-xL-dependent resistance to the BCL-2 inhibitor ABT-199 can be overcome by preventing PI3K/AKT/mTOR activation in lymphoid malignancies. *Cell Death Dis.* 2015;
279. Kipps TJ, Eradat H, Grosicki S, Catalano J, Cosolo W, Dyagil IS, et al. A phase 2 study of the BH3 mimetic BCL2 inhibitor navitoclax (ABT-263) with or without rituximab, in previously untreated B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2015;
280. Roberts AW, Davids MS, Pagel JM, Kahl BS, Puvvada SD, Gerecitano JF, et al. Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med.* 2016;
281. de Vos S, Leonard JP, Friedberg JW, Zain J, Dunleavy K, Humerickhouse R, et al. Safety and efficacy of navitoclax, a BCL-2 and BCL-XL inhibitor, in patients with relapsed or refractory lymphoid malignancies: results from a phase 2a study. *Leuk Lymphoma.* 2021;
282. Schoenwaelder SM, Jarman KE, Gardiner EE, Hua M, Qiao J, White MJ, et al. Bcl-xL-inhibitory BH3 mimetics can induce a transient thrombocytopenia that undermines the hemostatic function of platelets. *Blood.* 2011;
283. Fischer K, Al-Sawaf O, Bahlo J, Fink A-M, Tandon M, Dixon M, et al. Venetoclax and Obinutuzumab in Patients with CLL and Coexisting Conditions. *N Engl J Med.* 2019;
284. Rafiq S, Cheney C, Mo X, Jarjoura D, Muthusamy N, Byrd JC. XmAb-5574 antibody demonstrates superior antibody-dependent cellular cytotoxicity as compared with CD52- and CD20-targeted antibodies in adult acute lymphoblastic leukemia cells. *Leukemia.* 2012.
285. Rafiq S, Butchar JP, Cheney C, Mo X, Trotta R, Caligiuri M, et al. Comparative Assessment of Clinically Utilized CD20-Directed Antibodies in Chronic Lymphocytic Leukemia Cells Reveals Divergent NK Cell, Monocyte, and Macrophage Properties. *J Immunol.* 2013;
286. Rafiq S, Butchar JP, Cheney C, Mo X, Jarjoura D, Tridandapani S, et al. Comparative Assessment of Different Clinically Utilized CD20 Directed Antibodies in Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) Cells Reveals Divergent NK-Cell, Monocyte and Macrophage Properties. *Blood.* 2011;
287. Sanchez L, Wang Y, Siegel DS, Wang ML. Daratumumab: A first-in-class CD38 monoclonal antibody for the treatment of multiple myeloma. *Journal of Hematology and Oncology.* 2016.
288. van der Horst HJ, Nijhof IS, Mutis T, Chamuleau MED. Fc-engineered antibodies with enhanced fc-effector function for the treatment of B-cell malignancies. *Cancers.* 2020.
289. Touzeau C, Maciag P, Amiot M, Moreau P. Targeting Bcl-2 for the treatment of multiple myeloma. *Leukemia.* 2018.

290. Bahlis N, Baz R, Harrison S, Quach H, Ho S-J, Vangsted AJ, et al. First Analysis from a Phase 1/2 Study of Venetoclax in Combination with Daratumumab and Dexamethasone, +/- Bortezomib, in Patients with Relapsed/Refractory Multiple Myeloma. *Blood*. 2019;
291. Nalghranyan S, Singh AP, Schinke C. The combination of venetoclax, daratumumab and dexamethasone for the treatment of refractory primary plasma cell leukemia. *American Journal of Hematology*. 2020.

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Einteilung der B-NHL nach klinischem Verlauf. ....	4
Tabelle 1-2: Einteilung und Häufigkeit der B-ALL-Subtypen. ....	10
Tabelle 1-3: Genetische Veränderungen in der B-ALL mit prognostischem Wert. ....	11
Tabelle 1-4: Übersicht der von der FDA für die Therapie hämatologischer Neoplasien zugelassene Antikörper (Stand August 2021). ....	15
Tabelle 1-5: Übersicht der humanen Fc-Rezeptoren als Zielmoleküle für IgG-Antikörper. ....	18

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Übersicht der prominentesten Proteine der Bcl-2-Familie. ....	1
Abbildung 1-2: Schematischer Aufbau des antiapoptotischen Proteins Bcl-2.....	2
Abbildung 1-3: Bcl-2-Proteine können über die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran die Apoptose hervorrufen. ....	3
Abbildung 1-4: Die Entwicklung von der hämatopoetischen Stammzelle zur reifen B-Zelle findet im Knochenmark statt.....	5
Abbildung 1-5: Schematische Darstellung eines Antikörperkonjugats. ....	16
Abbildung 1-6: Schematische Darstellung der Antikörpermechanismen am Beispiel einer Lymphomzelle. ....	17
Abbildung 1-7: Unterbrechung des „Don’t-eat-me“-Signals auf Tumorzellen. ....	21
Abbildung 3-1: Schematische Darstellung des Gradienten nach Zentrifugation.....	36
Abbildung 4-1: Niedrig dosiertes Venetoclax induziert einen Wachstumsarrest in DHL- Zelllinien. ....	46
Abbildung 4-2: Die Behandlung mit 1 nM Venetoclax führt in steigenden Konzentrationen zu einer Induktion der Apoptose in CARNAVAL- und WILL-2-Zellen. ....	47
Abbildung 4-3: Die Behandlung mit 1 nM Venetoclax führt zu einer Reduktion des Bcl-2- Spiegels in BL-PDX- und t(17;19)-ALL-PDX-Zellen. ....	49
Abbildung 4-4: Die Oberflächenexpression von CD19, CD20 und CD38 bleibt nach Behandlung mit 1 nM Venetoclax unverändert. ....	50
Abbildung 4-5: Die Kombination aus Venetoclax mit therapeutischen Antikörpern führt zu keiner Steigerung der ADCC. ....	52
Abbildung 4-6: Die Kombination von Venetoclax mit therapeutischen Antikörpern führt zu keiner Steigerung der CDC. ....	53
Abbildung 4-7: Die Kombination von Venetoclax und therapeutischen Antikörpern verbessert die ADCP mit humanen Makrophagen in DHL-Zelllinien und BL- und PDX-Zellen.....	55
Abbildung 4-8: Die Kombination von Venetoclax und therapeutischen Antikörpern verbessert die ADCP mit murinen Makrophagen in DHL-Zelllinien und PDX-Zellen. ....	57
Abbildung 4-9: Schematische Darstellung der <i>in vivo</i> Versuche.....	59
Abbildung 4-10: Die Kombination aus Venetoclax und therapeutischen Antikörpern verlängert das Überleben von Mäusen <i>in vivo</i> . ....	60
Abbildung 4-11: Der Effekt der Kombination aus Rituximab und Venetoclax basiert nicht auf einer Steigerung der Apoptose. ....	61
Abbildung 4-12: Die Steigerung der Phagozytose durch die Kombination aus Venetoclax und Rituximab ist abhängig von Makrophagen. ....	62



## 10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen Menschen bedanken, die mich bei meiner Promotion unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Denis Schewe für die Überlassung dieses interessanten Themas sowie für die exzellente Betreuung. Des Weiteren möchte ich Herrn Prof. Schewe für die bisherige Unterstützung auf meinem wissenschaftlichen und beruflichen Werdegang danken. Meiner Betreuerin Frau Dr. Fotini Vogiatzi möchte ich ebenfalls ganz herzlich für die hervorragende Betreuung und die Unterstützung während dieser Arbeit danken.

Ebenfalls möchte ich Herrn Prof. Dr. Schrappe für die Möglichkeit danken, meine Arbeit in seinem Institut abzuhalten.

Ich bedanke mich zudem bei meiner Arbeitsgruppe in der Kinderklinik für die freundliche Unterstützung und die nette Atmosphäre. Mein Dank gilt dabei insbesondere Herrn Dr. Lennart Lenk, Dorothee Winterberg, Lea Spory, Katrin Timm-Richert und Katrin Neumann.

Weiterhin danke ich dem Team im Mildred-Scheel-Haus, insbesondere Herrn Dr. Thies Rösner, für die ständigen Bemühungen und die vielen Ratschläge während dieser Arbeit.

Des Weiteren danke ich der medizinischen Fakultät für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Promotionsstipendiums.

Zudem danke ich meiner Mutter und meinem Vater, ohne die das gesamte Studium sowie diese Promotionsarbeit gar nicht möglich gewesen wäre, für ihre liebevolle Unterstützung in all den Jahren. Mein weiterer Dank gilt meiner Schwester Philina. Ich danke meinem Freund Felix ebenfalls für die tolle Unterstützung und den Zuspruch in all den Jahren. Zu guter Letzt möchte ich meinen lieben Freunden für die ständige Begleitung und die Ermutigungen danken.

## 11 Publikationen

Vogiatzi F, **Heymann J**, Rösner T, Lenk L, Cario G, Schrappe M, Claviez A, Bornhauser B, Bourquin JP, Bomken S, Valerius T, Peipp M, Kellner C, Schewe DM. Venetoclax erhöht die Effizienz von therapeutischen Antikörpern in B-Zell-Neoplasien. *Monatsschrift Kinderheilkunde* (2019) Volume 11.: 1111.

(Präsentation durch Frau Dr. Vogiatzi im Rahmen der 93. Wissenschaftlichen Tagung der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) in Frankfurt)

<https://doi.org/10.1007/s00112-019-00786-x>.

**Heymann J**, Vogiatzi F, Rösner T, Lenk L, Cario G, Schrappe M, Valerius T, Peipp M, Kellner C, Schewe DM. Venetoclax enhances the efficacy of therapeutic antibodies in B-cell malignancies. *Klinische Pädiatrie* (2019) Volume 231 (03): 164-165.

(Präsentation im Rahmen des Kind-Philipp-Meetings in Wilsede)

<https://doi.org/10.1055/s-0039-1687156>.

Vogiatzi F, **Heymann J**, Rösner T, Lenk L, Cario G, Schrappe M, Bornhauser B, Bourquin JP, Bomken S, Valerius T, Peipp M, Kellner C, Schewe DM. Venetoclax Enhances the Efficacy of Therapeutic Antibodies in B-Cell Malignancies. *Blood* (2018) Volume 132, Supplement 1: 4177.

(Posterpräsentation durch Frau Dr. Vogiatzi im Rahmen der jährlichen Konferenz der American Society of Hematology in San Diego, USA)

<https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-114677>

**Heymann J**, Vogiatzi F, Rösner T, Lenk L, Cario G, Schrappe M, Bornhauser B, Bourquin JP, Valerius T, Peipp M, Kellner C, Schewe DM. Venetoclax Enhances the Efficacy of Therapeutic Antibodies in B-Cell Malignancies.

(Posterpräsentation im Rahmen der Kiel Life Science Conference der Universität zu Kiel)