

Aus der  
Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik  
Klinische Kooperationseinheit  
Translationale Immunologie (UKT/MFT/DKFZ)

**Neutralisation von B cell activating factor (BAFF) mit  
Belimumab zur Verbesserung der therapeutischen  
Wirkung von Ibrutinib und Idelalisib bei der  
chronisch lymphatischen Leukämie**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Schmidt, Moritz**

**2020**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. med. H. R. Salih

2. Berichterstatter: Professorin Dr. K. Schilbach-Stückle

Tag der Disputation: 24.09.2020

*Meinen Eltern*

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>4</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>5</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>6</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>7</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>9</b>
1.1 <i>Chronisch Lymphatische Leukämie (CLL)</i> .....	9
1.2 <i>Tumornekrosefaktor-Familie (TNF-Familie)</i> .....	23
1.3 <i>Zielsetzung der Doktorarbeit</i> .....	32
<b>2. Materialien und Methoden</b> .....	<b>33</b>
2.1 <i>Materialien</i> .....	33
2.2 <i>Methoden</i> .....	38
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>45</b>
3.1 <i>Einfluss von Ibrutinib und Idelalisib auf zelluläre ATP-Level als Surrogatparameter für die Viabilität von CLL-Zellen in vitro</i> .....	45
3.2 <i>Einfluss von BAFF auf zelluläre ATP-Level, mitochondriales Membranpotential und Caspase-3-Aktivierung von CLL-Zellen in Gegenwart der TKIs Ibrutinib und Idelalisib</i> .....	50
3.3 <i>Einfluss von Belimumab auf die durch BAFF beeinflusste zelluläre Aktivität von CLL-Zellen unter Behandlung mit Ibrutinib und Idelalisib</i> .....	54
3.4 <i>Einfluss von Belimumab auf die Suszeptibilität von CLL-Zellen gegenüber Ibrutinib und Idelalisib in einem Kokultur-Setting</i> .....	60
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>62</b>
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	<b>73</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>75</b>
<b>7. Erklärung zum Eigenanteil</b> .....	<b>90</b>
<b>8. Publikationen</b> .....	<b>91</b>

**Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Dosistitration von Ibrutinib und Idelalisib mit primären CLL-Zellen.	46
Abbildung 2: Dosistitration von Idelalisib in An- und Abwesenheit von Rituximab mit primären CLL-Zellen.	47
Abbildung 3: Einfluss von Ibrutinib und Idelalisib auf das mitochondriale Membranpotential und die Caspase-3-Aktivität von primären CLL-Zellen.	49
Abbildung 4: Einfluss von BAFF auf die Suszeptibilität von CLL-Zellen gegenüber den TKIs Ibrutinib und Idelalisib.	51
Abbildung 5: Einfluss von BAFF auf die Intaktheit des mitochondrialen Membranpotentials und die Caspase-3-Aktivität von primären CLL-Zellen in Gegenwart von Ibrutinib und Idelalisib.	53
Abbildung 6: Einfluss der BAFF-Neutralisation durch Belimumab auf das Ansprechen von CLL-Zellen auf Behandlung mit Ibrutinib bzw. Idelalisib.	55
Abbildung 7: Einfluss der BAFF-Neutralisation durch Belimumab auf die Intaktheit des mitochondrialen Membranpotentials von CLL-Zellen unter Behandlung mit Ibrutinib bzw. Idelalisib.	57
Abbildung 8: Einfluss der BAFF-Neutralisation durch Belimumab auf die Caspase-3-Aktivität von CLL-Zellen unter Behandlung mit Ibrutinib bzw. Idelalisib.	59
Abbildung 9: Einfluss von Belimumab auf die Suszeptibilität von CLL-Zellen unter Behandlung mit Ibrutinib bzw. Idelalisib in einem Kokultur-Setting.	61

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Stadieneinteilung der CLL nach Binet, 1981<sup>1</sup> 16

Tabelle 2: Stadieneinteilung der CLL nach Rai, 1975<sup>2</sup> 17

**Abkürzungsverzeichnis**

ADCC	Antibody dependent cellular cytotoxicity
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APCeF780	Allophycocyanin-eFluor 780
APRIL	A proliferation-inducing ligand
BAFF	B cell-activating factor
BAFFR	B cell-activating factor receptor
Bcl-2	B cell lymphoma 2
BCMA	B cell maturation antigen
BLyS	B lymphocyte stimulator
BTK	Bruton-Tyrosinkinase
CD	Cluster of differentiation
CDC	Complement dependent cytotoxicity
CLL	Chronisch Lymphatische Leukämie
CML	Chronisch Myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalievirus
CRD	Cystein-reiche Domäne
DD	Death domain
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	Fluorescence-activated cell scanning
FCS	Fetal Calf Serum
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluoresceinisothyocyanat
FSC	Forward scatter
Ig	Immunglobulin
IgVH	Immunglobulin Variable Region Heavy Chain
MBL	Monoklonale B Lymphozytose
Mcl-1	Myeloid cell leukemia 1

min	Minute
NLC	Nurse-like cell
PB	Pacific Blue
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PJP	Pneumocystis jirovecii-Pneumonie
PKC $\delta$	Serin/Threonin-Proteinkinase C $\delta$
PLC	Phospholipase C
PLL	Prolymphozytenleukämie
PPL	Plasma peak level
P/S	Penicillin/Streptomycin
rpm	rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SLE	Systemischer Lupus Erythematoses
SLL	Small lymphocytic lymphoma
SSC	Side scatter
TACI	Transmembrane activator and calcium modulating ligand interactor
THD	TNF homology domain
TIM	TRAF-interagierende Motive
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
TMRE	Tetramethylrhodaminethylester
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF	TNF-receptor associated factor
7-AAD	7-Aminoactinomycin D



## **1. Einleitung**

### **1.1 Chronisch Lymphatische Leukämie (CLL)**

#### **1.1.1 Definition und Epidemiologie**

Die Chronisch Lymphatische Leukämie (CLL) wird von der Weltgesundheitsorganisation als indolentes Lymphom vom Non-Hodgkin-Typ bezeichnet, bei welchem die Krebszellen hauptsächlich im peripheren Blut, aber auch im Knochenmark sowie weiteren sekundären lymphatischen Organen akkumulieren. Definitionsgemäß handelt es sich bei dieser Krankheitsentität um eine Erkrankung, die auf B Zellen beschränkt ist, wohingegen der früher noch gebräuchliche Terminus einer „T-CLL“ heute als T-Prolymphozytenleukämie (T-PLL) klassifiziert wird.<sup>3,4</sup> Mit einer jährlichen Inzidenz von etwa fünf Neuerkrankungen je 100 000 Menschen und jährlich 2000 bzw. 3000 CLL-Neudiagnosen bezogen auf das weibliche bzw. das männliche Geschlecht in Deutschland stellt die CLL die häufigste leukämische Erkrankung der westlichen Industrienationen dar.<sup>5</sup> Etwa 30% aller Leukämieformen und ungefähr 10% aller Lymphome vom Non-Hodgkin-Typ entfallen auf die CLL, wobei Männer durchschnittlich doppelt so häufig betroffen sind als Frauen.<sup>6</sup> Ebenso erkranken Menschen kaukasischer Abstammung häufiger an einer CLL als Menschen, welche aus Afrika oder Asien stammen, was vermuten lässt, dass auch genetische Faktoren bei diesem Krankheitsbild eine Rolle spielen.<sup>2</sup> Im Allgemeinen ist die CLL eine Erkrankung des älteren Menschen, da das durchschnittliche Alter der Patienten bei Erstdiagnose in etwa bei 71 Jahren liegt und lediglich 15% aller Erstdiagnostizierten jünger als 50 Jahre alt sind.<sup>7</sup>

#### **1.1.2 Ätiologie und Pathogenese**

Chromosomale Veränderungen der B Zellen, welche u.a. zur Anhäufung der reifen, jedoch nicht vollständig funktionsfähigen Zellen im Knochenmark sowie in sekundären lymphatischen Organen führen, sind ebenso wie ein fortgeschrittenes Lebensalter als bedeutsame Risikofaktoren für die Krankheitsentstehung zu nennen.<sup>8</sup>

Der genaue Ursprung der CLL-Zellen bleibt weiterhin unbekannt, da bisher noch keine eindeutige Subpopulation im Verlauf der B Zellreifung identifiziert werden konnte, auf deren Entartung die Entwicklung einer CLL eindeutig zurückzuführen ist. Vielmehr wird davon ausgegangen, dass CLL-Zellen, nicht zuletzt aufgrund eines ähnlichen Genexpressionsmusters, morphologisch eher B Gedächtniszellen entsprechen, die somit prinzipiell schon mit einem spezifischen Antigen in Kontakt getreten sind.<sup>9</sup> Diese differenzierte B Zellpopulation entsteht nach T Zell-abhängiger Aktivierung von B Zellen in Anwesenheit eines spezifischen Antigens. Hierbei wird das Antigen von der B Zelle so prozessiert, dass es mithilfe von MHC-II-Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert und damit von T Zellen erkannt werden kann. Daraufhin sekretieren T Helferzellen stimulierende Zytokine, woraufhin die B Zelle in das Keimzentrum des Lymphfollikels sekundär lymphatischer Organe eintritt und hier proliferiert. Im Zuge dessen kommt es zur Mutation der Antigenbindungsstelle des B Zell-Rezeptors mit dem Ziel, die Affinität zum Antigen noch weiter zu erhöhen.<sup>10,11</sup> Nach erfolgreicher Differenzierung ausgewählter B Zellen in Antikörperproduzierende Plasmazellen schließt sich die Bildung von B Gedächtniszellen an. Diese durch T Zellen vermittelte Aktivierung von B Zellen, welche zur Bildung spezifischer Antikörper führt, läuft so für die meisten Antigene ab. Nur eine kleine Zahl bestimmter Antigene ist in der Lage, eine direkte humorale Antwort von B Zellen auszulösen, mit dem Unterschied, dass weder die beschriebenen Vorgänge im Bereich des Lymphfollikels noch die anschließende Bildung von B Gedächtniszellen stattfinden.<sup>12</sup>

Damit vereinbar ist die Tatsache, dass eine Hypermutation der schweren Immunglobulinkette (IgVH) der Antigenbindungsstelle (*variable region*) des B Zell-Rezeptors bei etwa zwei Drittel aller CLL-Patienten vorliegt („mutierter Subtyp“). Im Gegensatz dazu werden die oben beschriebenen Vorgänge im Keimzentrum eines Lymphfollikels bei den malignen B Zellen des restlichen Drittels der CLL-Patienten nicht vollzogen, sodass sich der B Zell-Rezeptor hier in einem unmutierten Zustand befindet („unmutierter Subtyp“).<sup>13</sup> Diese Unterscheidung bringt auch eine prognostische Aussagekraft zur mittleren Überlebenszeit von CLL-Patienten mit sich. Während sich ein mutierter IgVH-Status als prognostisch

günstig für das Überleben erwiesen hat, zeigt der unmutierte Subtyp einen eher aggressiveren Krankheitsverlauf.<sup>14,15</sup>

Im Allgemeinen können genetische Abweichungen bei CLL-Zellen verglichen mit gesunden B Zellen bei etwa 80% aller CLL-Patienten gefunden werden, wobei zahlreiche Gene betroffen sind, welche den natürlichen Zelltod und das Überleben der Zellen steuern. Es konnte gezeigt werden, dass CLL-Zellen mitunter anti-apoptotische und damit das Überleben der Zellen begünstigende Proteine in einem erhöhten Ausmaß exprimieren.<sup>16</sup> Eine herausragende Stellung kommt hierbei dem anti-apoptotisch wirkenden Protein *B-cell lymphoma 2 (Bcl-2)* zu, welches den CLL-Zellen nicht nur zu einer längeren Lebensdauer, sondern auch zu einer gewissen Resistenz gegenüber Systemtherapeutika verhilft, indem es infolge seines vermehrten Vorkommens und des daraus resultierenden Ungleichgewichts zwischen pro- und anti-apoptotischen Proteinen zu einer verminderten Sensitivität gegenüber stressinduzierter Apoptose führt.<sup>17,18</sup>

Darüber hinaus scheint die mit der Einnistung in sekundäre lymphatische Organe einhergehende Ausbildung eines protektiven Mikromilieus zum verlängerten Überleben und Schutz der malignen Zellen vor therapeutischen Maßnahmen beizutragen. Benachbarte Zellpopulationen, wie *Nurse-like cells* (NLC) oder folliculäre dendritische Zellen, vermögen durch direkte Zell-Zell-Interaktion oder alternativ über parakrine Signalwege unter Freisetzung verschiedener Zytokine, wie *A proliferation-inducing ligand* (APRIL) oder *B cell activating factor* (BAFF), das Überleben der CLL-Zellen zu fördern.<sup>14,19</sup>

CLL-Zellen, welche gewebeständig sind und sich hauptsächlich im Bereich von Lymphknoten ansiedeln, zeigen im Vergleich zu zirkulierenden CLL-Zellen im peripheren Blut eine deutliche Proliferationsaktivität.<sup>8</sup> Untersucht man diese sich teilenden Zellen genauer, so fällt auf, dass sie zumeist in direktem Kontakt zu anderen supportiven Zellen des Mikromilieus standen, worunter neben T Zellen vor allem Stroma-Zellen sowie NLCs zusammengefasst werden.<sup>20,21</sup> Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass bei diesem Zellkollektiv nicht nur der B Zell-Rezeptor und die daran anknüpfenden Signalwege vermehrt aktiviert sind, sondern auch bestimmte Rezeptortypen des Tumornekrosefaktor (TNF)-

Rezeptorsystems stärker exprimiert werden, was auch für die Rezeptoren für BAFF zutrifft. Schlüsselenzyme, welche sich an die Aktivierung des B Zell-Rezeptors anschließen, sind neben den Kinasen Syk und Lyn vor allem auch die beiden Rezeptortyrosinkinasen Bruton-Tyrosinkinase (BTK) sowie Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K), welche mittlerweile auch aus therapeutischer Sicht von Bedeutung sind. Über diese Wege kommt es anschließend zu einer Aktivierung der Signalwege AKT, mTOR, ERK oder NF- $\kappa$ B, welche die vor konventioneller Therapie schützenden sowie überlebensfördernden Signale des *Microenvironments* auf molekularer Ebene in den CLL-Zellen umsetzen. Damit einhergehend bewirkt eine Interaktion der Leukämiezellen mit umgebenden Stroma-Zellen u.a. eine gesteigerte Expression des Proteins *Myeloid cell leukemia 1 (Mcl-1)*, welches eine zentrale Bedeutung für die Vermittlung anti-apoptischer Effekte besitzt.<sup>22,23</sup>

Zusätzlich spielen Chemokine als Vermittler der Zellmigration von CLL-Zellen eine Rolle. Diese bewirken einerseits eine Wanderung in Richtung der entstandenen Nischen und andererseits ein Verharren der CLL-Zellen ebendort. Zudem können diese Signalmoleküle jedoch auch von CLL-Zellen selbst freigesetzt werden. Auf diese Weise werden weitere Zellen des peripheren Blutes, wie regulatorische T Zellen oder Monozyten, angelockt, welche sich in Gegenwart von CLL-Zellen zu NLCs differenzieren und ein optimales Milieu für die malignen B Zellen schaffen.<sup>20,24</sup>

### 1.1.3 Diagnostik, klinische Symptomatik und Klassifikation

In den meisten Fällen wird die CLL per Zufall im Rahmen routinemäßig durchgeführter Blutuntersuchungen diagnostiziert, bei welchen die Patienten, die nur selten weitere Symptome aufweisen, mit einer teils ausgeprägten Lymphozytose imponieren. So charakterisiert das massenhafte Auftreten von entarteten B Zellen im peripheren Blut die CLL als leukämische Erkrankung, wohingegen im Falle eines ausschließlichen Befalls von Lymphknoten von einem *small lymphocytic lymphoma* (SLL) gesprochen wird. Als typische Vorstufe zu einer manifesten CLL tritt das Bild einer isolierten monoklonalen B Lymphozytose (MBL) auf, welche an sich keinen Krankheitswert besitzt und bei etwa fünf Prozent

aller Menschen, die älter sind als 60 Jahre, im Blut zu finden ist.<sup>25</sup> Das allgemeine Risiko, dass sich eine behandlungsbedürftige CLL aus einer MBL entwickelt, liegt bei etwa einem bis vier Prozent pro Jahr.<sup>26,27</sup>

Nur knapp 40% aller CLL-Patienten leiden bei Erstdiagnose unter Symptomen ihrer Erkrankung. Typischerweise handelt es sich hierbei vor allem um unspezifische Allgemeinsymptome wie Müdigkeit oder Abgeschlagenheit. Die klassische Symptomtrias der sogenannten B-Symptomatik, welche (I) einen Gewichtsverlust von mehr als 10% des ursprünglichen Körpergewichts in einem Zeitraum von sechs Monaten, (II) Nachtschweiß sowie (III) Fieber umfasst, kann in dieser Ausprägung nur in wenigen Fällen bereits bei Diagnosestellung beobachtet werden.<sup>6</sup> Im weiteren Krankheitsverlauf kann es durch die massive Akkumulation von CLL-Zellen u.a. in sekundären lymphatischen Organen zum schmerzhaften Anschwellen von Lymphknoten kommen, was bei etwa 80% aller symptomatischen Patienten der Fall ist. Ungefähr die Hälfte der Patienten zeigt zudem eine Vergrößerung der Milz, eine ausgeprägte Hepatosplenomegalie tritt dagegen nur in seltenen Fällen und bei stark erhöhten Zahlen der leukämischen Zellen im peripheren Blut auf.<sup>1,2</sup>

Infiltrieren die malignen B Zellen zudem vermehrt das Knochenmark, kann es zu einer Verdrängung der gesunden Blutbildung kommen, was sich als Anämie, Thrombozytopenie und Leukopenie bzw. Granulozytopenie äußert und bei weniger als einem Drittel der Patienten in Erscheinung tritt. Dabei kommt es infolge der geschwächten Immunität auf humoraler und zellulärer Ebene zum gehäuftem Auftreten zumeist bakterieller Infektionen, welche zu den Haupttodesursachen von CLL-Patienten in fortgeschrittenen Krankheitsstadien zählen.<sup>28,29</sup>

Im Allgemeinen verläuft die CLL bei der Mehrzahl der Patienten langsam progredient und häufig symptomarm, sodass auch ohne Therapie keine Einschränkung der normalen Lebenserwartung besteht. Nichtsdestotrotz sind auch aggressivere Verlaufsformen der CLL bekannt, worunter u.a. auch der Übergang in ein hochmalignes Non-Hodgkin-Lymphom im Rahmen der sogenannten Richter-Transformation fällt, die bei etwa 5 bis 10% aller CLL-Patienten auftritt.<sup>30</sup>

Nicht selten existieren in der Onkologie, wie auch hier für die CLL, unterschiedliche Klassifikationssysteme, die anhand bestimmter Labor- oder klinischer Parameter eine Aussage dazu ermöglichen, wie weit die Leukämie bereits fortgeschritten und mit welcher ungefähren Lebenserwartung unter diesen Gesichtspunkten zu rechnen ist. Hierzu bedient man sich für die CLL im europäischen Raum vor allem der Binet-Klassifikation (siehe Tabelle 1) aus dem Jahre 1981. Im Gegensatz zum etwas früher entstandenen Rai-Klassifikationssystem (siehe Tabelle 2), welches das Ausmaß der vorhandenen Lymphozytose im peripheren Blut besonders in den Vordergrund stellt, legt die Klassifikation nach Binet ihren Schwerpunkt eher auf die Anzahl befallener Lymphknotenstationen. Daneben sind als zusätzliche Kriterien in beiden Einteilungsschemata der Hämoglobinwert sowie die Zahl an Thrombozyten pro Mikroliter Blut als Laborparameter, welche Rückschlüsse auf die Blutbildungsfunktion des Knochenmarks erlauben, enthalten. Trotz der weiten Verbreitung im klinischen Alltag sollten die Klassifikationssysteme insbesondere aufgrund der Vielschichtigkeit und der interindividuell stark variierenden klinischen Verläufe der CLL nur vereinfacht als orientierende Hilfe zur Einschätzung der Risikokonstellation verstanden werden.<sup>4</sup> In der Zwischenzeit haben sich aussagekräftigere molekulare Marker etabliert, auf die im Folgenden noch näher eingegangen wird.

Typische Anhaltspunkte im konventionellen Blutaussstrich gemeinsam mit charakteristischen Merkmalen des Immunphänotyps der entarteten B Zellen ermöglichen in aller Regel auch ohne weitere klinische Symptomatik die Diagnosestellung einer CLL. Hierzu zählt das Vorkommen von sogenannten „Gumprecht’schen Kernschatten“, welche beim Ausstreichen des Blutes infolge der eingeschränkten Membranstabilität der Leukämiezellen entstehen. Dies ist auf eine verminderte Expression von Vimentin, welches als Protein des Zytoskeletts essentiell für die Membranintegrität von Zellen ist, zurückzuführen.<sup>31,32</sup> Noch aussagekräftiger ist ein für die Erkrankung typisches Expressionsmuster an Oberflächenproteinen, welches sich mittels Durchflusszytometrie bestimmen lässt. Hierbei präsentieren sich CLL-Zellen mit einer Mischung aus B und T Zell-typischen Oberflächenmolekülen. Neben CD5, welches sich sonst typischer-

weise auf gesunden T Zellen nachweisen lässt, finden sich auf CLL-Zellen zeitgleich die B Zell-Antigene CD19, CD20 und CD23.<sup>8,33</sup> Zusätzlich zu diesem vom Gesunden abweichenden Repertoire an Oberflächenantigenen ist die Expression weiterer, für physiologische B Zellen charakteristischer Moleküle bei CLL-Zellen vermindert. Dies gilt für die Antigene CD79b und FMC7 sowie für Immunglobuline, die meist leichtkettenrestringiert ( $\kappa$  oder  $\lambda$ ) sind und welche die Herkunft der CLL-Zellen zu einem bestimmten Zellklon definieren. Generell kann die Diagnose einer CLL beim vermehrten und persistierenden Vorkommen von reifen B Lymphozyten im Sinne einer Lymphozytose ( $> 5000$  Lymphozyten/Mikroliter Blut) im peripheren Blut gestellt werden, wobei der bereits beschriebene Immunphänotyp der analysierten Zellen zugrunde liegen muss.<sup>34</sup> Zusätzlich können heute weitere molekulare Marker untersucht werden, welche die Erstellung eines individuellen Risikoprofils ermöglichen. Anhand dessen kann sowohl der weitere Krankheitsverlauf grob abgeschätzt als auch ein Rückschluss auf das individuelle Therapieansprechen gezogen werden. Exemplarisch sei hier der von anderen Krebserkrankungen bekannte Funktionsverlust des Tumorsuppressorgens p53 erwähnt, dessen Genprodukt als „Wächter des Genoms“ fungiert und eine übermäßige Zellteilung, insbesondere bei vorhandenen zellulären oder genetischen Defekten, unterbinden soll.<sup>35</sup> In der genetischen Untersuchung der CLL-Zellen zeigen sich konkret Chromosomenaberrationen in Form einer Deletion von Teilen des kurzen Arms des Chromosoms 17 (17p-Deletion) oder alternativ eine Mutation des für p53 codierenden Gens (TP53-Mutation), was sich negativ sowohl auf das Therapieansprechen auf konventionelle Behandlungsregimes als auch auf das Überleben der Patienten auswirkt.<sup>36-38</sup> Hieraus resultiert die Klassifikation als Hochrisiko-Form der CLL, was bei der Therapieplanung unbedingt berücksichtigt werden sollte.<sup>39,40</sup> Weitere Marker mit prognostischer Aussagekraft sind neben dem bereits beschriebenen IgVH-Mutationsstatus beispielsweise auch das Oberflächenantigen CD38 oder das Protein ZAP-70, welche als Indikatoren für die Krankheitsaktivität sowie für das Ausmaß des Zellumsatzes dienen.<sup>19,41-45</sup>

Stadium	Definition	Medianes Überleben
<b>A</b>	Höchstens 2 Lymphknoten- regionen befallen Hb $\geq$ 10 g/dl Thrombozyten $\geq$ 100 000/ $\mu$ l	> 10 Jahre
<b>B</b>	Mindestens 3 Lymphknoten- regionen befallen Hb $\geq$ 10 g/dl Thrombozyten $\geq$ 100 000/ $\mu$ l	5 Jahre
<b>C</b>	Befall der Lymphknotenregionen irrelevant Hb < 10 g/dl Thrombozyten < 100 000/ $\mu$ l	2 – 3 Jahre

**Tabelle 1: Stadieneinteilung der CLL nach Binet, 1981<sup>1</sup>**



Stadium	Definition	Medianes Überleben
<i>Niedriges Risiko</i> 0	Lymphozytose (> 15 000/μl) Knochenmarkinfiltration (> 40%)	> 10 Jahre
<i>Intermediäres Risiko</i> I	Lymphozytose (> 15 000/μl) Lymphknotenvergrößerung	7 Jahre
II	Lymphozytose (> 15 000/μl) Hepato- und/oder Splenomegalie <i>ggf. Lymphknotenvergrößerung</i>	
<i>Hochrisiko</i> III	Lymphozytose (> 15 000/μl) Anämie (Hb < 11 g/dl) <i>ggf. Lymphknotenvergrößerung und/oder Organomegalie</i>	2 – 3,5 Jahre
IV	Lymphozytose (> 15 000/μl) Thrombozytopenie (< 100 000/μl) <i>ggf. Anämie (Hb &lt; 11 g/dl) und/oder Lymphknotenvergrößerung und/oder Organomegalie</i>	

**Tabelle 2: Stadieneinteilung der CLL nach Rai, 1975<sup>2</sup>**

### 1.1.4 Therapeutisches Vorgehen

In Abhängigkeit vom klinischen Stadium, von den Symptomen und dem damit verbundenen Leidensdruck für den Patienten, sowie ergänzt durch molekular-pathologische Analysen, kann aus therapeutischer Sicht vielfältig mit der CLL umgegangen werden. Um eine Chance auf eine definitive Heilung erhalten zu können, müssen sich Patienten auch heutzutage noch einer allogenen Stammzelltransplantation unterziehen, die allerdings mit erheblichen Risiken verbunden ist. Dies sollte insbesondere deshalb sorgfältig abgewogen werden, da einerseits mehr als drei Viertel der Patienten bei Erstdiagnose älter als 55 Jahre sind und mit steigendem Alter das Risiko Transplantations-assoziierten Komplikationen, wie zum Beispiel Infektionen, deutlich zunimmt. Andererseits befinden

sich etwa 85% der CLL-Patienten in den Krankheitsstadien Binet A und B, welche *per se* keine Therapieindikation bedeuten und erst bei Erfüllen zusätzlicher Kriterien die Einleitung therapeutischer Maßnahmen erforderlich machen.<sup>1,46</sup> In diesem Fall eignet sich die „Watch-and-wait-Strategie“, bei welcher sich die Patienten in regelmäßigen zeitlichen Abständen zu ambulanten Kontrolluntersuchungen vorstellen, um möglichst frühzeitig ein Fortschreiten der Erkrankung feststellen und mit entsprechenden Maßnahmen darauf reagieren zu können.<sup>47</sup> Ist dagegen eine Therapieindikation gegeben, stehen unterschiedliche Behandlungsoptionen, angelehnt an die aktuell gültigen Therapieleitlinien, zur Verfügung. Ein sehr geläufiges Therapieregime für die Behandlung der CLL von Patienten ohne Hochrisiko-Profil und mit gutem Allgemeinzustand ist bis heute die Kombination der beiden Zytostatika Fludarabin und Cyclophosphamid mit dem CD20-Antikörper Rituximab (FCR-Schema).<sup>48</sup> Als Alternative für Patienten im fortgeschrittenen Lebensalter oder bei Vorliegen von therapeutisch limitierenden Komorbiditäten kann anstelle von Fludarabin und Cyclophosphamid entweder auf Chlorambucil in Kombination mit dem CD20-Antikörper Obinutuzumab oder auf Bendamustin zusammen mit Rituximab zurückgegriffen werden. Sowohl Chlorambucil als auch Bendamustin zählen ebenfalls zur Klasse der Zytostatika, sind jedoch weniger toxisch und verursachen weniger Nebenwirkungen.<sup>49</sup> Hinsichtlich des progressionsfreien Überlebens sowie der Rate vollständiger Remissionen zeigte sich Bendamustin gegenüber einer Monotherapie mit Chlorambucil überlegen.<sup>48,50</sup> Gleiches gilt, wenn beide Substanzen zusätzlich mit dem CD20-Antikörper Rituximab kombiniert wurden.<sup>51</sup>

Ein weiteres mögliches Ziel der Antikörpertherapie im Kontext der CLL stellt das Oberflächenantigen CD52 dar, für welches der therapeutische Antikörper Alemtuzumab entwickelt wurde. Alemtuzumab kommt speziell für Patienten infrage, welche nicht mehr von herkömmlicher Chemotherapie profitieren können, unter einem Rezidiv der Erkrankung leiden und insbesondere zusätzlich noch ein molekulares Hochrisiko-Profil - konkret eine TP53-Mutation - aufweisen.<sup>52-56</sup> Hier konnten für Alemtuzumab als Monotherapeutikum oder auch in Kombination mit Fludarabin eine höhere allgemeine Ansprechrate sowie erhöhte Remissionsraten erreicht werden.<sup>57-59</sup> Allerdings stellte sich heraus, dass eine Kombinations-

therapie aus Fludarabin und Cyclophosphamid mit Alemtuzumab verglichen mit dem bekannten FCR-Schema keinen Vorteil für den Patienten mit sich bringt, sondern eher mit unerwünschten, toxischen Effekten assoziiert ist.<sup>60-62</sup> Deshalb spielt Alemtuzumab heutzutage bei der Therapie der meisten CLL-Patienten nur noch eine untergeordnete Rolle, kann jedoch als Reservetherapeutikum in Ausnahmefällen angewandt werden.

Auch wenn das Ansprechen auf die Chemoimmuntherapie in aller Regel initial sehr hoch ist, muss bei einem Großteil der behandelten Patienten damit gerechnet werden, dass die Leukämie teilweise bereits nach kurzer Zeit wieder zurückkehrt.<sup>63-65</sup>

Aufgrund dieser unbefriedigenden Situation wurde in den letzten Jahren intensiv daran geforscht, effektivere Alternativen zu den konventionellen Therapeutika zu finden. Dies führte im Bereich der Immuntherapie zur Entwicklung weiterer Antikörper gegen das B Zelloberflächenantigen CD20, welche, verglichen mit Rituximab, eine bessere klinische Wirksamkeit erzielen sollen. Heute geht man davon aus, dass diese Antikörper über drei zentrale Effekte zur Lyse von Tumorzellen führen können: Neben der direkten Induktion von Apoptose durch Aktivierung von u.a. Caspasen nach Bindung an CD20 sind bestimmte Antikörper in der Lage, die Aktivierung des Komplementsystems (*complement dependent cytotoxicity*, CDC) oder die Aktivierung bestimmter Mitglieder der zellulären Immunität, wie z.B. NK-Zellen (*antibody dependent cellular cytotoxicity*, ADCC), zu vermitteln.<sup>66</sup>

So wurde Obinutuzumab im Jahre 2014 von der *Food and Drug Administration* (FDA) für die CLL zugelassen, nachdem zuvor gezeigt werden konnte, dass es in Kombination mit Chlorambucil insbesondere bei Patienten mit reduziertem Allgemeinzustand zu höheren allgemeinen Ansprechraten, einem verlängerten progressionsfreien Überleben sowie zu mehr Komplettremissionen führte, als dies bei Chlorambucil sowie dem Therapieschema aus Chlorambucil und Rituximab der Fall war. Verglichen mit Chlorambucil alleine konnte durch die zusätzliche Gabe von Obinutuzumab auch das Gesamtüberleben verbessert werden.<sup>67</sup> Ofatumumab erhielt seine Zulassung bereits im Jahr 2010 und scheint in der Anwendung für ein ähnliches Patientenkollektiv geeignet zu sein wie auch

Obinutuzumab. Hierbei konnte bei gemeinsamer Applikation mit Chlorambucil eine signifikante Verlängerung des progressionsfreien Überlebens gegenüber einer alleinigen Gabe von Chlorambucil herausgearbeitet werden.<sup>68</sup> Allerdings wurde Ofatumumab Anfang 2019 vom deutschen Markt genommen, sodass diese Therapieoption derzeit nicht zur Verfügung steht.<sup>69</sup>

Eine komplett neue Herangehensweise an die Therapie der CLL stellt der seit 2014 mögliche Einsatz von *small molecule inhibitors* dar. Diese Substanzen, welche im Gegensatz zu herkömmlichen Chemotherapeutika nicht intravenös sondern oral in Tablettenform verabreicht werden, greifen spezifisch an zentralen Zielmolekülen innerhalb der Signaltransduktionskaskade von B Zellen ein. Prädestiniert hierfür scheinen Signalwege, die sich der Aktivierung des B Zell-Rezeptors anschließen, welche unerlässlich für das Überleben der B Zellen sind. Auf diese Weise kann versucht werden, in die Pathophysiologie der CLL einzugreifen und einen hierfür bedeutenden Mechanismus, die Überaktivität der B Zell-Rezeptor-Achse, zu inhibieren.

Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, therapeutisch in die gestörte Regulation der Apoptose von CLL-Zellen einzugreifen. Hierzu zählt der neueste Vertreter der *small molecule inhibitors* Venetoclax, welcher seit Ende 2016 zur Therapie bestimmter Formen der CLL zur Verfügung steht und das in den leukämischen B-Zellen überexprimierte Protein *Bcl-2* inhibiert. Dies hat zur Folge, dass CLL-Zellen durch die Aufhebung des Ungleichgewichts zwischen pro- und anti-apoptischen Signalen rasch dem programmierten Zelltod erliegen.<sup>70</sup> Konkret findet Venetoclax gemäß aktueller Standards in Kombination mit Rituximab im Rahmen der Zweitlinientherapie Anwendung, insbesondere wenn unter Therapie mit einem anderen, am B Zell-Rezeptor ansetzenden Vertreter der *small molecule inhibitors* kein Benefit mehr oder gar ein Krankheitsprogress beobachtet wurde.<sup>71-74</sup>

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die beiden Tyrosinkinaseinhibitoren (TKIs) Ibrutinib und Idelalisib. Konkret inaktiviert Ibrutinib die BTK, welche für die Entwicklung und Funktion von gesunden B Zellen unerlässlich ist und der auch bei der Pathogenese der CLL eine wichtige Rolle zukommt, insbesondere durch die Vermittlung von proliferativen und Überlebenssignalen aus dem

*Microenvironment*.<sup>19,75-77</sup> Gleiches gilt für das Enzym PI3K, das zusätzlich hemmend auf ex- sowie intrinsische Wege der Apoptose wirken kann. Darüber hinaus fördert es nach Aktivierung die Chemotaxis von CLL-Zellen sowie die Freisetzung von Chemokinen.<sup>78,79</sup> In der Therapie der CLL spielt die Delta-Isoform des Enzyms die ausschlaggebende Rolle, deren Expression primär für Lymphozyten und myeloische Zellen beschrieben ist und die mittels Idelalisib, das aktuell nur in Kombination mit Rituximab zur Behandlung der CLL zugelassen ist, blockiert werden kann.<sup>80,81</sup> Beide *small molecule inhibitors* stören zentral die Interaktion zwischen CLL-Zellen und dem umgebenden Tumormikromilieu, vermitteln hierdurch eine Unterdrückung überlebensfördernder Signale und erhöhen gleichzeitig die Empfindlichkeit von CLL-Zellen gegenüber der zytotoxischen Wirkung von anderen angewandten Therapeutika.<sup>8,78</sup>

Darüber hinaus konnte in *in vitro* Experimenten nachgewiesen werden, dass die beiden TKIs Ibrutinib und Idelalisib nicht nur indirekt durch Interferenz mit dem schützenden Umfeld der Tumorzellen Einfluss auf das Überleben der CLL-Zellen nehmen, sondern auch direkt zytotoxisch auf diese wirken, indem sie durch Aktivierung von Caspasen zur Induktion von Apoptose führen.<sup>82,83</sup> Aufgrund dieses dualen Therapieansatzes mit Wirkung sowohl auf die Krebszellen selbst als auch auf die Umgebungsbedingungen wird von einem „*Double face*“ der *small molecule inhibitors* gesprochen.<sup>84</sup>

Gemäß der aktuell gültigen Leitlinie ist Ibrutinib allgemein in der Erstlinientherapie von CLL-Patienten, jedoch insbesondere beim Vorliegen einer 17p-Deletion oder einer TP53-Mutation, sowie in der Zweitlinientherapie bei refraktärer oder rezidivierender CLL zugelassen. Es konnte gezeigt werden, dass Ibrutinib gegenüber Chlorambucil nicht nur zu einer Verlängerung des progressionsfreien Überlebens bei zuvor unbehandelten Patienten, die mindestens 65 Jahre alt sind, sondern auch zu einem gesteigerten Gesamtüberleben derselben führt.<sup>85</sup> Dieser beachtliche therapeutische Zugewinn konnte unabhängig bestätigt und sogar für das Hochrisiko-Patientenkollektiv mit einer TP53-Mutation oder einer 17p-Deletion, sowohl bei der primären Erkrankung als auch im Rezidiv, nachgewiesen werden.<sup>86,87</sup>

Im Gegensatz dazu hat Idelalisib bisher noch keinen Eingang in die Erstlinientherapie gefunden und wird aktuell ausschließlich in Kombination mit Rituximab in der Zweitlinientherapie eingesetzt. Die Zulassung basiert auf Ergebnissen einer Studie, welcher zufolge die Kombination aus Idelalisib und Rituximab, verglichen mit der alleinigen Therapie mit Rituximab, eine Verbesserung des progressionsfreien Überlebens, der Gesamtansprechrates sowie des Gesamtüberlebens herbeiführen konnte.<sup>88</sup> Dabei konnte kaum ein Unterschied zum Therapieerfolg zwischen Patienten mit prognostisch ungünstigen molekularen Markern und solchen mit einem geringeren Risikoprofil beobachtet werden, sodass auch im Falle von Patienten mit einer TP53-Mutation oder 17p-Deletion ein Therapieansprechen zu beobachten ist. So steht Idelalisib zusammen mit Rituximab als alternative Therapie für Patienten mit einer 17p-Deletion oder TP53-Mutation, welche nicht mit Ibrutinib behandelt werden können, zur Verfügung. Allerdings sollte unter Therapie mit Idelalisib eine regelmäßige Kontrolle der Infektparameter stattfinden, da vermehrt Fälle von *Pneumocystis jirovecii*-Pneumonie (PJP)- sowie Cytomegalievirus (CMV)-Infektionen bekannt wurden, woran Patienten mitunter verstarben.<sup>89</sup>

Wie für konventionelle Chemotherapeutika bereits seit Längerem bekannt, konnte auch für die TKIs Ibrutinib und Idelalisib vereinzelt gezeigt werden, dass es unter laufender Therapie zu einem Fortschreiten der Erkrankung kommen kann. Hierzu können Resistenzmechanismen beitragen, die therapeutisch blockierte Schnittstellen im Signalweg umgehen und somit die Wirkung der Medikamente abschwächen oder gar ganz aufheben. Im Falle von Ibrutinib ist hierzu bekannt, dass Mutationen der Bindungsstelle an der Zielkinase zu einer verminderten Hemmung der Enzymaktivität durch Ibrutinib führen. Zusätzlich können auch *gain-of-function*-Mutationen der Phospholipase C (PLC)  $\gamma 2$ , welche sich im Signalweg unmittelbar im Anschluss an die BTK befindet, zu einer Überaktivität der PLC führen und hierüber die Ibrutinib-vermittelte Inhibition der BTK umgehen.<sup>90,91</sup> Derart konkret identifizierte Resistenzmechanismen sind für Idelalisib bislang noch nicht beschrieben. Es wird allerdings angenommen, dass

ein vermindertes Ansprechen auf Idelalisib ggf. auf die Hochregulation anderer PI3K-Isoenzyme zurückzuführen ist.<sup>92</sup>

Untersucht man das Kollektiv genauer, welches hauptsächlich von Resistenzen gegenüber TKIs betroffen ist, so fällt auf, dass diese bevorzugt bei denjenigen Patienten vorkommen, welche bereits intensiv vortherapiert sind und an einer Hochrisiko-Form der CLL leiden. Folglich kann diese Subgruppe weiterhin in vielen Fällen nur unzureichend behandelt werden.<sup>90,93</sup> Nicht zu vergessen ist in diesem Kontext die Richter-Transformation, welche sich auch unter Therapie mit Ibrutinib oder Idelalisib ereignen kann und dann andere Therapiestrategien erforderlich macht.<sup>94</sup>

Die neuartigen Erkenntnisse machen es notwendig, die CLL als Krankheit auf zellulärer Ebene noch weiter aufzuschlüsseln und zu verstehen. Besonders wichtig ist hierbei die Identifizierung ausschlaggebender Faktoren in der Entstehung und Pathogenese der Leukämie, sodass therapeutisch gezielt an diesen Stellen interveniert werden kann. Eine mögliche Herangehensweise stellt die gemeinsame Gabe von Therapeutika dar, welche Schwachstellen, die bei Verwendung der Einzelsubstanzen auftreten, kompensieren können. Mit einem solchen Ansatz, der Kombination aus zielgerichteter Therapie durch *small molecule inhibitors* und Immuntherapie durch Antikörper, beschäftigt sich die vorliegende Arbeit.

## **1.2 Tumornekrosefaktor-Familie (TNF-Familie)**

Diese Proteinfamilie besteht aus diversen Rezeptoren und den entsprechenden Liganden, welche in ihrer Gesamtheit u.a. eine maßgebliche Rolle bei der Steuerung von Prozessen der körpereigenen Immunabwehr einnehmen.<sup>95</sup> Als Namensgeber dieser Proteinfamilie gilt das bereits vor mehr als 40 Jahren identifizierte Molekül TNF. Für dieses konnte gezeigt werden, dass es, seinem Namen entsprechend, das Absterben von Tumorzellen induziert, sobald es von Makrophagen freigesetzt wird.<sup>96,97</sup> Schon an dieser Stelle wird deutlich, dass den TNF-Familienmitgliedern eine nicht zu unterschätzende Bedeutung bei der Interaktion des körpereigenen Immunsystems mit malignen Zellen zukommt. Zusätzlich zu Makrophagen konnte die Expression verschiedener TNF-

Familienmitglieder für eine Vielzahl weiterer Zellarten des Immunsystems nachgewiesen werden, wobei bis heute noch nicht genau verstanden ist, wie dieselben Moleküle bei unterschiedlichen Zellarten verschiedene Effekte vermitteln.<sup>98</sup> Auf molekularer Ebene weisen alle TNF-Familienmitglieder bestimmte Merkmale auf, welche durch Struktur- und Sequenzanalysen genauer beschrieben werden konnten und auf diesem Weg eine Einordnung in entsprechende Rezeptor- oder Ligandensubgruppen ermöglichen.

### 1.2.1 TNF-Rezeptoren

Diese Typ-I-Transmembranproteine weisen allesamt ein extrazelluläres Element auf, welches durch das gehäufte Vorkommen der Aminosäure Cystein charakterisiert ist (Cystein-reiche Domänen, CRD).<sup>99</sup> Zusätzlich können weitere Gemeinsamkeiten hinsichtlich intrazellulär gelegener Strukturen bei den einzelnen Rezeptoren gefunden werden, welche einen starken Einfluss auf die jeweils vermittelte Wirkung des Rezeptors haben. Hierzu zählt zum Beispiel die sogenannte Todesdomäne (*death domain, DD*), über die hauptsächlich apoptotische Signale vermittelt werden, welche zum Zelltod der entsprechenden Zelle führt.<sup>100-102</sup> Die Mehrzahl der TNF-Rezeptoren vermittelt allerdings Effekte, welche das Zellüberleben begünstigen und weist innerhalb der intrazellulären Domäne bestimmte Strukturmerkmale auf, die eine Interaktion mit TRAF-Adapterproteinen (*TNF-receptor associated factor*) ermöglichen.<sup>103</sup> Über diese sogenannten TRAF-interagierenden Motive (TIM) in der intrazellulären Domäne können, je nach rekrutierten Signalproteinen, sehr variable Wirkungen entfaltet werden, wozu beispielsweise die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs gehört.<sup>104</sup> Dies kann sowohl mit der Auslösung einer starken Entzündungsreaktion, einschließlich der konsekutiven Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, einhergehen, als auch regulierend auf die Homöostase und Organogenese des lymphatischen Systems wirken.<sup>95,105,106</sup> Nicht zuletzt können hierüber auch anti-apoptotische Effekte vermittelt werden, was zur Pathophysiologie bestimmter Tumorerkrankungen beiträgt. Auf diese Weise werden die malignen Zellen vor dem Zelltod bewahrt, ihr Zellumsatz kann gesteigert oder die Metastasierung in andere Organe begünstigt werden.<sup>107,108</sup> Dies gilt für bestimmte Leukämiefor-



men, u.a. auch für die CLL, bei der es durch verschiedene Faktoren zur Aktivierung derartiger Überlebenswege kommt, wozu u.a. auch das TNF-Familienmitglied BAFF beiträgt, worauf später noch näher eingegangen wird.<sup>109,110</sup>

### 1.2.2 TNF-Liganden

Verglichen mit ihren Rezeptoren sind die meisten TNF-Liganden im zellgebundenen Zustand Typ-II-Transmembranproteine, was bedeutet, dass der C-Terminus der Proteine extrazellulär lokalisiert ist.<sup>111</sup> In diesem Bereich befindet sich das gemeinsame Strukturelement der TNF-Liganden, die sogenannte *TNF homology domain*, welche über Wechselwirkung mit den CRDs der TNF-Rezeptoren zur Signalweiterleitung beiträgt. Daneben ermöglicht diese spezifische Konfiguration der Liganden eine Interaktion derselben untereinander, wodurch es zur Bildung von Trimeren kommen kann.<sup>112</sup>

Hinzu kommt, dass ein Ligand generell mit mehreren unterschiedlichen Rezeptoren interagieren kann. Dies wird exemplarisch anhand des TNF-Familienmitglieds BAFF ersichtlich, welches an drei verschiedene Rezeptoren binden und so verschiedene Wirkungen vermitteln kann.<sup>113</sup>

Neben der zellgebundenen Form können TNF-Liganden auch löslich vorkommen. Dies geschieht entweder durch alternatives Splicing oder durch enzymatische Abspaltung eines bestimmten Anteils der zellmembrangebundenen Moleküle. In welchem Ausmaß diese Fragmente noch biologisch aktiv sind, kann stark variieren.<sup>114-116</sup>

Zusammenfassend sind die durch das TNF-System vermittelten Wirkungen im Körper essentiell für das Funktionieren des Immunsystems. Schon die Störung einzelner Faktoren bewirkt, dass das vorherrschende Gleichgewicht zwischen Aktivierung und Inhibition immunologischer Reaktionen beeinträchtigt wird. Zum einen kann die Abwesenheit von Faktoren des TNF-Systems zu einer eingeschränkten Abwehrfähigkeit des Körpers v.a. gegenüber bakteriellen Infektionen führen, da z.B. TNF neben IL-1 und IL-6 einer der drei Hauptvermittler der Akute-Phase-Reaktion im Körper ist.<sup>117</sup> Bei Fehlen von TNF kann es daher bei-

spielsweise zur Exazerbation einer latenten Tuberkulose-Infektion kommen, da dieses Zytokin zur Aufrechterhaltung der lokalen Granulome essentiell ist.<sup>118</sup>

Zum anderen kann eine gesteigerte Aktivität des TNF-Systems neben der Förderung von Tumorerkrankungen auch zu überschießenden Immunreaktionen führen, welche sich gegen körpereigene Strukturen richten. Dies ist bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen, wie zum Beispiel bei Rheumatoider Arthritis, Schuppenflechte oder bestimmten chronisch entzündlichen Darmerkrankungen der Fall, wogegen therapeutische Strategien entwickelt werden konnten. Hierzu zählen die TNF-neutralisierenden Antikörper Infliximab sowie Adalimumab, wie auch das Fusionsprotein Etanercept, welche bei den genannten Erkrankungen ihren Einsatz finden.<sup>119-121</sup>

### 1.2.3 BAFF und seine Rezeptoren

Im Folgenden soll der Fokus auf das TNF-Familienmitglied BAFF sowie dessen zugehörige Rezeptoren gerichtet werden.

Auch unter dem Namen *B lymphocyte stimulator* (BLyS) bekannt, nimmt dieses Protein großen Einfluss auf die B Zell-Entwicklung, -Reifung, -Differenzierung sowie -Homöostase.<sup>122-124</sup> Dies kann anhand von BAFF-defizienten Mäusen veranschaulicht werden, in welchen hauptsächlich die Zahl reifer B Zellen sowie die Menge an zirkulierenden Immunglobulinen im peripheren Blut verringert ist, sodass es in Abwesenheit von BAFF zu einer starken Einschränkung der humoralen Immunabwehr kommt.<sup>125</sup>

Allerdings ist die Expression von BAFF eher weniger für B Zellen selbst, sondern typischerweise für Zellen myeloischen Ursprungs, wie zum Beispiel für Monozyten, Makrophagen oder neutrophile Granulozyten, sowie für T Zellen beschrieben. Neue Erkenntnisse legen nahe, dass BAFF auch außerhalb des Immunsystems eine Rolle spielt, da BAFF u.a. im Bereich von Epithelien sowie im Bindegewebe nachgewiesen werden konnte.<sup>126-130</sup>

Morphologisch weist das Molekül BAFF als Typ-II-Transmembranprotein die charakteristischen Merkmale eines klassischen TNF-Liganden auf, kann proteolytisch durch die Proproteinkonvertase Furin freigesetzt werden, hierdurch in

Lösung gehen und anschließend zu Molekülaggregaten, bestehend aus drei bis 60 Monomeren, oligomerisieren.<sup>116,122,131-133</sup>

BAFF kann an mehrere Rezeptoren der TNF-Rezeptorfamilie binden. Hierzu gehören der klassische BAFF-Rezeptor (BAFFR) und die zwei Rezeptoren *transmembrane activator-calcium modulator and cyclophilin ligand* (TACI) wie auch *B-cell maturation antigen* (BCMA).<sup>134</sup> Die genannten Rezeptoren finden sich vorwiegend auf Zelltypen der B Zellreihe, in welchen sie ihre Effekte hauptsächlich über den NF- $\kappa$ B-Signalweg vermitteln, sowie auf regulatorischen T Zellen. Je nach Art des gebundenen Rezeptors sowie Konfiguration des BAFF-Moleküls können auf diese Weise unterschiedliche Effekte erzielt werden.<sup>135-139</sup>

Nach Bindung von BAFF in trimerer oder höher organisierter Form an den BAFFR kommt es hauptsächlich zur Aktivierung des alternativen NF- $\kappa$ B-Signalwegs, der das Überleben von B Zellen fördert und zudem eine Ausreifung der einzelnen Zellstadien auf dem Weg zur vollständig differenzierten B Zelle vorantreibt.<sup>126,140</sup>

Die Aktivierung des Rezeptors TACI erfolgt dagegen nach Bildung des stark oligomerisierten „BAFF 60-mers“ und steht mit der konsekutiven Aktivierung des klassischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs teilweise in starkem Gegensatz zu den durch den klassischen BAFF-Rezeptor vermittelten Effekten.<sup>141,142</sup> Trotz eines in Mausmodellen gering ausgeprägten überlebensfördernden Effekts von TACI auf B Zellen, scheint TACI physiologisch das B Zellüberleben zu limitieren, damit vor einer zu langen Lebenszeit der B Zellen mit der Gefahr einer möglichen malignen oder autoreaktiven Transformation zu schützen und humorale B Zell-Antworten zu dämpfen. Weiterhin greift TACI in die *class switch recombination* ein und fördert die Bildung von Antikörpern vom Typ IgA.<sup>141,143-145</sup>

Als dritter bekannter Rezeptor für BAFF ist BCMA zu nennen, welches sich hauptsächlich auf Antikörper-produzierenden Zellen, wie z.B. auf Plasmazellen, nachweisen lässt und an welches BAFF sowohl in trimerer als auch in höher organisierter Form bindet.<sup>141,146,147</sup> Durch die Aktivierung des klassischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs kann hierüber Einfluss auf das Überleben von Plasmazellen genommen und dieses gefördert werden. Zudem vermittelt BCMA Effekte auf

die Funktion von B Zellen als antigenpräsentierende Zellen und verstärkt diese.<sup>147-149</sup>

Für zwei der drei Rezeptoren konnte gezeigt werden, dass an die Stelle von BAFF ein weiteres Molekül treten kann. Dieses besitzt aufgrund seiner teils synergistischen Wirkungen und seiner molekularen Verwandtschaft eine große Ähnlichkeit zu BAFF und kann abgesehen von hämatopoetischen Zellen auch in Epithel-, Knochen- sowie in anderen malignen Zellen gefunden werden.<sup>150-152</sup> Hierbei handelt es sich um das TNF-Familienmitglied APRIL, welches wie auch BAFF sowohl in membranständiger als auch -ungebundener Form vorkommt und schon in geringer Konzentration eine starke Bindung insbesondere zu BCMA, aber auch zu TACI eingehen kann.<sup>134,153</sup> Eine Interaktion mit dem klassischen BAFF-Rezeptor ist dagegen nicht bekannt und scheint dem Molekül BAFF alleine vorbehalten zu sein. Trotzdem verstärkt APRIL die durch BAFF induzierte Proliferation und das Überleben von B Zellen, wohingegen ein Einfluss auf den Reifungsprozess derselben nicht belegt werden konnte.<sup>154-157</sup>

Wie bereits beschrieben, kann es bei einer Störung des Zusammenspiels aus TNF-Liganden und -Rezeptoren zur Entstehung verschiedener Krankheitsbilder kommen. Dies umfasst in Bezug auf BAFF vor allem Störungen des Immunsystems, sowohl in Form von Autoimmunität als auch Immundefizienz, sowie Malignome. Zahlreiche Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises, wie Rheumatoide Arthritis oder das Sjögren-Syndrom, werden daher mit BAFF in Verbindung gebracht.<sup>158-166</sup>

Bedeutung hat BAFF vor allem in Zusammenhang mit Systemischem Lupus erythematoses (SLE), für welchen gezeigt werden konnte, dass BAFF in dessen Pathogenese eine wichtige Rolle spielt, da es das Überleben autoreaktiver B Zellen fördert und diese zur gesteigerten Bildung von Autoantikörpern anregt.<sup>167,168</sup> Dies basiert auf Ergebnissen, die aus verschiedenen Mausmodellen hervorgegangen sind und auch im Menschen beobachtet werden konnten. So neigten BAFF-transgene Mäuse zu Hypergammaglobulinämie, höheren Titern an zirkulierenden Autoantikörpern sowie an einer ausgeprägten renalen Manifestation des SLE mit Proteinurie, was durch den Einsatz von BAFF-

Antagonisten gelindert werden konnte.<sup>169-173</sup> Mehr als die Hälfte der SLE-Patienten weist im Vergleich zu gesunden Probanden erhöhte BAFF-Serumwerte auf, wobei dies gleichzeitig mit einem stärker ausgeprägten Organbefall im Rahmen des SLE assoziiert ist.<sup>174-177</sup>

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde 2011 der Antikörper Belimumab als Zusatztherapie zur Behandlung des therapierefraktären, aktiven SLE bei Erwachsenen zugelassen, die Autoantikörper im Serum aufweisen.<sup>178</sup> Während man lange Zeit davon ausging, dass das Wirkprinzip von Belimumab ausschließlich auf der Bindung von löslichem BAFF basiert, konnte kürzlich gezeigt werden, dass Belimumab die Wirkung von BAFF auch in membrangebundener Form zu neutralisieren vermag.<sup>179,180</sup>

Weitere Arbeiten weisen darauf hin, dass BAFF neben hämatologischen Neoplasien auch bei soliden Tumoren verstärkt exprimiert wird und daher ein Einfluss auch auf derartige Krebserkrankungen möglich scheint.<sup>166</sup> Am sichersten belegt scheint jedoch die Bedeutung von BAFF für maligne Erkrankungen des blutbildenden Systems, insbesondere für B-Zell-Erkrankungen. Dies konnte beispielhaft anhand von Patienten, welche an einem Multiplen Myelom oder anderen Formen des Non-Hodgkin-Lymphoms erkrankt sind, gezeigt werden. Im Falle des Multiplen Myeloms konnte ein Zusammenhang zwischen dem BAFF-Expressionsgrad sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene und dem klinischen Stadium sowie dem Therapieansprechen gefunden werden. Konkret geht eine starke Expression von BAFF mit einem raschen Fortschreiten der Erkrankung sowie einem geringeren Therapieansprechen einher.<sup>181</sup> Gleiches gilt für weitere Formen von Non-Hodgkin-Lymphomen, insbesondere für das diffus großzellige B-Zell-Lymphom, wofür sich BAFF als Prädiktor für das Gesamt- sowie das progressionsfreie Überleben erwiesen hat.<sup>182,183</sup>

Die meisten Erkenntnisse liegen jedoch für die CLL vor. So wurde bereits vor mehr als 15 Jahren erstmalig beschrieben, dass sowohl BAFF als auch seine zugehörigen Rezeptoren von CLL-Zellen exprimiert werden.<sup>184,185</sup>

Betrachtet man jedoch die gesamte Menge an BAFF, welche sich in CLL-Patienten finden lässt, entfällt vermutlich nur ein kleiner Teil auf die von CLL-Zellen selbst produzierte Fraktion. Auch scheint das autokrin wirkende BAFF

nicht auszureichen, um einen protektiven Effekt auf CLL-Zellen gegenüber spontaner und therapeutisch induzierter Apoptose zu vermitteln, weshalb weitere Lieferanten von BAFF im Körper vorhanden sein müssen.<sup>184-186</sup> Hierzu gehören bestimmte Zelltypen des bereits angesprochenen protektiven Tumormikromilieus, die imstande sind, größere Mengen an BAFF freizusetzen und auf diese Weise effektiver das Überleben der malignen B Zellen zu fördern. Hierbei sind v.a. die zuvor schon erwähnten NLCs zu nennen, welche monozytärer Herkunft sind und sich in Gegenwart von CLL-Zellen differenzieren können.<sup>187</sup> Wie bereits an anderer Stelle in dieser Arbeit beschrieben, konnte eine Expression von BAFF für eine Vielzahl unterschiedlicher Zellarten nachgewiesen werden. Dies beinhaltet u.a. auch das CLL-Stroma, ein zelluläres Netzwerk, das sich im Knochenmark, in Lymphknoten sowie in der Milz etabliert und neben Makrophagen, dendritischen Zellen sowie neutrophilen Granulozyten hauptsächlich auch eine bestimmte Subgruppe von Endothelzellen enthält. Diese sogenannten mikrovaskulären Endothelzellen können BAFF ebenfalls in löslicher Form freisetzen und über diesen Mechanismus protektiv auf CLL-Zellen einwirken.<sup>188</sup> Aspekte, inwiefern es unter experimentellen Bedingungen wie auch *in vivo* zu einer Beeinflussung der CLL durch BAFF kommt, sollen im Folgenden konkret dargestellt werden.

Schon *in vitro* konnte gezeigt werden, dass CLL-Zellen, welche unter Kulturbedingungen in aller Regel innerhalb kurzer Zeit apoptotisch werden, in Anwesenheit von BAFF signifikant länger überleben.<sup>189</sup>

Um den direkten Einfluss von BAFF auf das klinische Bild der CLL bei verschiedenen Patienten einschätzen zu können, wurde bestimmt, wie die BAFF-Expression mit dem klinischen Verlauf der Erkrankung zusammenhängt. Generell konnte zunächst nachgewiesen werden, dass die innerhalb von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten bzw. B Zellen vorherrschenden Konzentrationen an BAFF auf Proteinebene bei CLL-Patienten verglichen mit gesunden Probanden signifikant erhöht sind.<sup>190</sup> Erstaunlicherweise und im Gegensatz zu den Erkenntnissen, welche bei SLE-Patienten gewonnen wurden, ist die Menge an löslichem BAFF im Serum von CLL-Patienten geringer.<sup>191</sup> Dies wird darauf zurückgeführt, dass die Serumkonzentration von der B Zellzahl im peripheren

Blut und dem Expressionsgrad der jeweiligen BAFF-Rezeptoren auf den B Zellen abhängig ist. Das Vorhandensein vieler B Zellen mit hoher Rezeptordichte, wie dies auf das Krankheitsbild der CLL zutrifft, führt aufgrund des gesteigerten „Verbrauchs“ an BAFF zu einer geringeren Anzahl an frei detektierbaren Molekülen im Serum.<sup>190,191</sup> Darauf basierend konnte ein inverser Zusammenhang zwischen der BAFF-Serumkonzentration und dem Krankheitsprogress, der Last an Tumorzellen im peripheren Blut sowie den klinischen Stadien, in welchen sich die untersuchten Patienten befanden, hergestellt werden: Je höher die BAFF-Serumlevel, desto weniger aggressiv zeigt sich die Leukämie. Ferner wurde von Molica et al. eine Studie durchgeführt, welche offenbart, dass erhöhte BAFF-Serumkonzentrationen auch auf molekularer Ebene durch ein günstigeres Mutationsprofil mit einer besseren Prognose für den Patienten einhergehen.<sup>192,193</sup>

Einen weiteren Beleg für die klinische Bedeutung von BAFF in der CLL liefert ein Mausmodell. Hierbei wurden E $\mu$ -TCL-1-transgene Mäuse mit BAFF-transgenen Mäusen gekreuzt, die daraufhin, verglichen mit herkömmlichen E $\mu$ -TCL-1-Kontrollmäusen, ein deutlich früheres Auftreten der CLL zeigten, welche zudem einen deutlich aggressiveren Verlauf nahm und früher letal endete. Interessanterweise und in Übereinstimmung mit den beschriebenen Mechanismen zur leukämiefördernden Wirkung durch BAFF konnte in E $\mu$ -TCL-1-transgenen Mäusen, die zudem transgen für BAFF sind, nach Untersuchung des peripheren Blutes der Tiere eine geringere Zahl apoptotischer Leukämiezellen identifiziert werden.<sup>194</sup>

Abschließend decken sich diese Gesichtspunkte mit neuen Erkenntnissen aus einem Kokultur-Experiment zur Imitation des protektiven Tumormikromilieus, in welchem endogenem BAFF eine zentrale Rolle zukommt. Bei therapeutisch gezielter Inhibition des NF- $\kappa$ B-Signalwegs führt diese bei CLL-Zellen ohne Kokultur direkt zur Induktion von Apoptose. Leukämiezellen, welche mit anderen Zellarten kokultiviert wurden und auf diesem Weg zuvor in Kontakt mit BAFF kamen, zeigen dagegen eine ausgeprägte Resistenz. Dies legt nahe, dass BAFF die Zellen direkt vor therapieinduzierter Apoptose schützen und damit konventionelle Therapeutika unwirksam machen kann. Zum anderen wird

dadurch deutlich, dass die überlebensfördernden Effekte von BAFF wohl nicht ausschließlich durch die alleinige Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs zustande kommen können. Daran anschließend wurden zielgerichtete TKIs, wie Ibrutinib, verwendet, welche gemäß ihrer Wirkungsweise zu einer zumindest partiellen Aufhebung der Interaktion zwischen CLL-Zellen und umgebendem, schützendem Stroma führen. Unter diesen Bedingungen konnte eine signifikante Steigerung der Wirksamkeit der NF- $\kappa$ B-Blockade erzielt werden, die durch neue Therapieansätze, wie die Blockade weiterer endogener Protektionsfaktoren, noch ergänzt werden muss.<sup>195</sup>

### **1.3 Zielsetzung der Doktorarbeit**

Bei der neuartigen Möglichkeit, die CLL durch den Einsatz von TKIs behandeln zu können, hat sich gezeigt, dass das Ansprechen der Patienten limitiert ist. Hierzu scheinen Botenstoffe beizutragen, welche direkt oder indirekt auf CLL-Zellen einwirken und bisher nur zum Teil identifiziert werden konnten. Als möglicher Vertreter stellt sich BAFF als TNF-Familienmitglied dar. Dies erlaubt die Vorstellung, dass eine Blockade von BAFF durch Belimumab das durch Medikamente vermittelte Absterben von Leukämiezellen optimieren kann, was im Rahmen von *in vitro* Untersuchungen dieser Arbeit untersucht werden sollte.



## 2. Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte

Brutschrank Heracell	Heraeus, Hanau, Deutschland
Durchlichtmikroskop, Axiovert 25	Zeiss, Jena, Deutschland
FACS BD FACS Canto™ II	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
GloMax® 96 Microplate Luminometer	Promega, Fitchburg, WI, USA
FACS BD LSRFortessa™	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Minishaker MS1	IKA-Werke, Staufen im Breisgau, Deutschland
Multikanalpipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Multistepper	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim, Deutschland
PIPETBOY acu 2 Integra	Biosciences, Fernwald, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sterilbank Herasafe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Thermoblock	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischwaage BL 150S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Tischzentrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortexer, Reax Top	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Wasserbad W22	Köttermann, München, Deutschland
Zentrifuge	Heraeus, Hanau, Deutschland

#### 2.1.2 Verbrauchsmaterial

Combi-Tips	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Cryoröhrchen	Greiner BioOne, Frickenhausen, Deutschland
Einmalpipetten, steril	Corning Inc., NY, USA
Einmalspritzen	Braun, Wertheim, Deutschland

FACS-Röhrchen	Greiner BioOne, Frickenhausen, Deutschland
Nadeln G19	Hospira Inc., Lake Forest; IL, USA
Pasteurpipetten, long size	WU, Mainz, Deutschland
Pipettenspitzen, steril	VWR, Bruchsal, Deutschland
Platten für CellTiter-Glo®	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Platten für FACS (96 well)	Greiner BioOne, Frickenhausen, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5; 1,5; 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Spritzenfilter, Minisart	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> ; 75 cm <sup>2</sup> )	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Zellkulturplatten (24, 96 well)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Zentrifugenröhrchen (15 ml; 50 ml)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA

### 2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Accutase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Ampuwa	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DMEM Zellkulturmedium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
EDTA Solution	Cambrex, Rockland, ME, USA
Ethanol p.a.	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Ficoll-Lösung	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
L-Glutamin	Lonza, Basel, Schweiz
Ibrutinib	Selleckchem, Houston, TX, USA

Idelalisib	Selleckchem, Houston, TX, USA
Latexbeads	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natrium Pyruvate Solution	Lonza, Basel, Schweiz
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Lonza, Basel, Schweiz
Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA, Pasching, Österreich
RPMI 1640-Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
TMRE-Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Trypan Blue Stain 0,4%	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Trypsin-EDTA	Lonza, Basel, Schweiz
Türks Lösung	Merck, Darmstadt, Deutschland
7-AAD Staining Solution	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA

#### 2.1.4 Antikörper und Zytokine

Anti-Active Caspase-3 Alexa Fluor <sup>®</sup> 647 (clone C92-605; USA rablgG)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Anti-APRIL (clone Aprily 1; mlgG1)	Enzo Life Sciences, Lausen, Schweiz
Anti-BAFF (clone 1D6)	eBioscience, San Diego, CA, USA
Humanes BAFF (rekombinant)	Immunotools, Friesoythe, Deutschland
Anti-BAFFR (clone 11c1; mlgG1)	Biologend, San Diego, CA, USA
Anti-BCMA (clone Vicky-1, ratlgG1)	Enzo Life Sciences, Lausen, Schweiz
Belimumab (Benlysta <sup>®</sup> )	GlaxoSmithKline, Brentford, UK
Bevacizumab (Avastin <sup>®</sup> )	Roche, Basel, Schweiz
CD3-Pacific Blue	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
CD5-Allophycocyanin	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA

CD5-Phycoerythrin	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
CD19-Fluoresceinisothiocyanat	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
CD19-Allophycocyanin eFluor780	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
CD45-Allophycocyanin	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Cetuximab (Erbix <sup>®</sup> )	Universitätsapotheke, Tübingen
Goat-anti-mouse-PE	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
Humanes IgG (hIgG)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Mouse anti-human-IgG1-PE	SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA
Mouse IgG1	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Mouse IgG2b	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Rabbit IgG Isotype Control (Alexa Fluor <sup>®</sup> 647)	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Rat IgG1	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Anti-TACI (clone 165604; mIgG1)	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Trastuzumab (Herceptin <sup>®</sup> )	Universitätsapotheke, Tübingen

### 2.1.5 Zelllinien

HS-5	ATCC, Manassas, VA, USA
------	-------------------------

### 2.1.6 Kits

Anti-Mouse Ig, $\kappa$ /Negative Control	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Compensation Particles Set	USA
CellTiter-Glo <sup>®</sup> Luminescent Cell Viability Assay	Promega, Fitchburg, WI, USA

Fluoresceinisothiocyanat Annexin V Apoptosis Detection Kit	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Fixation/Permeabilization Solution Kit	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
LIVE/DEAD™ Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

### 2.1.7 Medien und Puffer

Einfriermedium	RPMI 1640 + 20% FCS + 10% DMSO
FACS-Puffer	PBS + 1% FCS + 0,01 NaN <sub>3</sub>
Kulturmedium für HS-5	DMEM + GlutaMax + 10% FCS + 1% P/S
Zellkulturmedium	RPMI 1640 + 10% FCS + 1% P/S

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Zellbiologie**

Alle Versuchsansätze wurden in einem Brutschrank inkubiert, der eine Temperatur von 37°C, eine relative Luftfeuchtigkeit von 95% sowie einen CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% aufwies. Durch Färbung von Zellen mit Trypanblau konnte unter Ausschluss toter Zellen die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop bestimmt werden. Wenn nicht anders angegeben, erfolgte die Zentrifugation der Zellen bei einer Geschwindigkeit von 1500 rpm für 5 min.

#### **2.2.1.1 Kultivierung von Zelllinien**

Das Medium der genannten (semi-)adhärenten Zelllinie HS-5 wurde alle 3 bis 4 Tage erneuert. Hierzu wurde der Kulturüberstand vorsichtig entfernt, die Zellen einmalig mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin-EDTA für 5 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von frischem Medium wurden die Zellen vorsichtig von der Zellkulturflasche gelöst und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Im Anschluss an die Zentrifugation wurde das Zellpellet in frischem Medium aufgenommen und die Zellsuspension auf  $5 \times 10^6$  Zellen in 10 ml Medium eingestellt.

#### **2.2.1.2 Spender primären Zellmaterials**

Den Richtlinien der Ethikkommission entsprechend (13/2007V) und nach Einholen des freiwilligen Einverständnisses wurde Blut zur Isolation mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) von verschiedenen Leukämiepatienten gewonnen. Die Patientenproben wurden zum Zeitpunkt der Diagnosestellung sowie im Rahmen ambulanter Verlaufskontrollen entnommen, wobei ein zeitlicher Abstand von mindestens drei Monaten zur zuletzt durchgeführten Therapie bestand.

#### **2.2.1.3 Isolation, Einfrieren und Auftauen des Primärmaterials**

Von Leukämiepatienten gewonnenes Vollblut, zur Verhinderung der Gerinnung mit Heparin versetzt, wurde direkt im Anschluss an die Entnahme aufgearbeitet.

Zur Isolation von PBMC diente eine Dichtegradientenzentrifugation mittels isotonischer Ficoll-Lösung (Ficoll-Hypaque). Hierzu wurde das Patientenblut zunächst etwa im Verhältnis 1:3 mit PBS verdünnt. Anschließend erfolgte das vorsichtige Auftragen von 35 ml der hergestellten Verdünnung auf 15 ml vorgelegte Ficoll-Lösung. Nach der Zentrifugation (2000 rpm für 18 min; ohne Bremse) wurden die Zellen der Interphase abgenommen, in PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieses Vorgehen wurde dreimal wiederholt und mit einem abschließenden Zentrifugationsschritt (800 rpm für 10 min; mit Bremse) zur Entfernung der noch enthaltenen Thrombozyten komplettiert. Nach erneuter Resuspension des hauptsächlich PBMCs enthaltenden Zellpellets in PBS konnte die Zellzahl bestimmt werden. Die Zellen wurden daraufhin erneut zentrifugiert und mit einer Zelldichte von 1 oder  $2 \times 10^7$ /ml in Einfriermedium aufgenommen und in sterile Cryoröhrchen in einem Volumen von 1 ml überführt. Einer kurzzeitigen Lagerung der Zellen von wenigen Tagen bei  $-80^\circ\text{C}$  schloss sich eine langfristige Lagerung in Flüssigstickstoff an.

Für die einzelnen Versuche wurden die ausgewählten Patientenzellen zunächst mitsamt des Cryoröhrchens im Wasserbad bei  $37^\circ\text{C}$  erwärmt, anschließend direkt in Medium aufgenommen, zentrifugiert, das Pellet in frischem Medium resuspendiert und nachfolgend die Zellzahl bestimmt.

#### **2.2.1.4 Ansetzen einer Kokultur**

Zellen der (semi-)adhärenten Zelllinie HS-5 wurden wie oben beschrieben der Zellkulturflasche entnommen. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden jeweils  $3 \times 10^5$  Zellen pro well in einem Volumen von 1 ml Medium in einer 24-well-Zellkulturplatte verteilt. Nach einem Zeitraum von etwa 48 Stunden, in welchem die Zellen adhären und einen lückenlosen *Monolayer* am Boden jeden wells bilden konnten, wurde das Medium vorsichtig, ohne den Zellrasen zu beschädigen, abgenommen. Direkt im Anschluss daran wurden  $3 \times 10^6$  PBMCs von einem jeweils ausgewählten CLL-Patienten in einem Volumen von 1 ml frischen Mediums vorsichtig auf den gebildeten Zellrasen gegeben und anschließend für die Dauer der jeweiligen Behandlung im Brutschrank inkubiert.

### **2.2.1.5 CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay**

Zur Bestimmung zellulärer ATP-Level als Surrogatparameter für Zellviabilität wurde der CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay von Promega angewandt. Die Zugabe des CellTiter-Glo® Reagens führt zur Lyse von CLL-Zellen mit anschließender Freisetzung von ATP, was für die enzymatische Umsetzung von Luciferin zu Oxyluciferin benötigt wird. Hierbei wird ein Lumineszenzsignal generiert, welches sich in einem bestimmten Bereich direkt proportional zum ATP-Gehalt der eingesetzten Zellen verhält und gemessen werden kann. Die Stärke des erhaltenen Signals wiederum korreliert direkt mit der Anzahl an lebenden, metabolisch aktiven Zellen in Kultur und lässt damit Rückschlüsse auf deren Viabilität zu.

In den nachfolgenden Experimenten wurden PBMCs eines CLL-Patienten zu je  $5 \times 10^4$  in 100  $\mu$ l Endvolumen in einer weißen 96-well Flachbodenplatte für 72 Stunden in An- oder Abwesenheit von Ibrutinib bzw. Idelalisib, BAFF, Belimumab oder einem Isotyp-Kontrollantikörper kultiviert, wobei BAFF zunächst mit dem jeweiligen Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur vorinkubiert wurde. Daran anschließend wurden 100  $\mu$ l des CellTiter-Glo® Reagens hinzugefügt und die Zellviabilität nach etwa 15 Minuten Inkubation unter Verwendung des GloMax® 96 Microplate Luminometer von Promega bestimmt. Die Messungen wurden in drei technischen Replikaten durchgeführt.

### **2.2.2 Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie wurde sowohl zur Identifizierung bestimmter Oberflächenmoleküle auf CLL-Zellen als auch zur Detektion von apoptotischen Zellen verwendet. Hierzu wurden fluoreszenzmarkierte Antikörper, welche spezifisch an bestimmte Zielmoleküle auf bzw. innerhalb der untersuchten Zellen binden, sowie fluoreszierende Farbstoffe verwendet. Hierdurch konnten gezielt CLL-Zellen analysiert und anhand ihrer Viabilität unterschieden werden. Die Messungen wurden sowohl mit dem BD FACS Canto™ II als auch mit dem BD LSRFortessa™ durchgeführt und anschließend mit dem Analyse-Programm FlowJo v10.4.1 ausgewertet.



Die Grundlage für durchflusszytometrische Messungen stellt die Erzeugung eines Stroms aus einzeln hintereinander angeordneten Zellen dar, die mit hoher Geschwindigkeit einen Laserstrahl passieren. Dieser regt die verwendeten fluoreszierenden Farbstoffe an, wobei ein Fluoreszenzsignal bestimmter Wellenlänge emittiert wird. Dieses wird nach Durchlauf eines komplexen Systems bestehend aus Polarisationsfiltern und Spiegeln von einem Detektor empfangen und in ein digitales Signal übersetzt, welches in Abhängigkeit vom verwendeten Farbstoff eine Differenzierung der Zellen zulässt. Schon das emittierte Streulicht der Zellen allein ermöglicht eine grobe Einordnung derselben hinsichtlich ihrer Größe (Vorwärtsstreulicht, FSC = *forward scatter*) und Granularität (Seitwärtsstreulicht, SSC = *side scatter*).

### **2.2.2.1 Differenzierung zwischen lebenden, apoptotischen und toten Zellen mittels TMRE und 7-AAD**

Zur Unterscheidung von apoptotischen und lebenden Zellen wurde das TMRE-Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit von Thermo Fisher Scientific verwendet. TMRE ist ein roter Farbstoff, welcher die Zellmembran durchdringen und sich aufgrund seiner positiven Ladung innerhalb intakter und funktionsfähiger Mitochondrien anreichern kann. Während der Apoptose kommt es zu einer Depolarisierung der inneren mitochondrialen Membran, was mit einem Verlust des Membranpotentials einhergeht. Eine Akkumulation des Farbstoffes innerhalb des Mitochondriums ist daher nicht mehr möglich. Der Farbstoff 7-AAD hingegen dringt in tote Zellen ein und interkaliert hier die DNA. Dies ermöglicht eine Unterscheidung der Zellen anhand ihrer Viabilität: Lebende Zellen können somit als TMRE<sup>+</sup>/7-AAD<sup>-</sup>, apoptotische Zellen als TMRE<sup>-</sup>/7-AAD<sup>-</sup> charakterisiert werden, wohingegen sowohl tote als auch nekrotische Zellen als TMRE<sup>-</sup>/7-AAD<sup>+</sup> beschrieben werden können.

Zu diesem Zweck wurden PBMCs von jeweils einem ausgewählten CLL-Patienten zu je  $3 \times 10^6$  Zellen in 1 ml PBMC-Medium in 24-well Zellkulturplatten überführt und zunächst mit BAFF, welches mit Belimumab oder einem Isotyp-Kontrollantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur vorinkubiert wurde, ver-

setzt. Nach einer Inkubation von 24 Stunden wurde die Zugabe der genannten Substanzen wiederholt und durch das Hinzufügen von Ibrutinib bzw. Idelalisib komplettiert. Die auf diese Art behandelte Zellsuspension inkubierte daraufhin für weitere 48 bzw. 72 Stunden im Falle von Ibrutinib bzw. Idelalisib im Brutschrank. Nach Entnahme der Zellen und Überführung in eine 96-well Zellkulturplatte wurden diese mit den direkt markierten Antikörpern CD3-Pacific Blue (1:200), CD5-Allophycocyanin (1:100) und CD19-Fluoresceinisothiocyanat (1:100) in PBS für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einmaligem Waschen der Zellen mit PBS wurden diese jeweils mit 100 µl TMRE in einer Konzentration von 50 nM für 20 Minuten im Brutschrank gefärbt. Diese wurden daraufhin erneut mit PBS gewaschen und zu je 100 µl in FACS-Puffer aufgenommen. Abschließend erfolgte die Zugabe von 7-AAD in einer Verdünnung von 1:100.

### **2.2.2.2 Bestimmung der Caspase-3-Aktivität**

Caspasen spielen als Exekutive der Zelldegradation im Rahmen der Apoptose eine essentielle Rolle. Die Aktivität der Caspase-3, welche innerhalb dieser Enzymkaskade eine zentrale Stellung einnimmt, dient stellvertretend in dem hier beschriebenen experimentellen Setting als Parameter für das Ausmaß der Apoptose von CLL-Zellen. Die Aktivität des Enzyms wurde durchflusszytometrisch durch Antikörper, welche die aktive Form der Caspase-3 innerhalb von Zellen detektieren, bestimmt.

PBMCs eines jeweils bestimmten CLL-Patienten wurden hierzu zu je  $2 \times 10^6$  Zellen in 400 µl Volumen in 24-well-Zellkulturplatten gegeben und zunächst mit BAFF, welches mit Belimumab oder einem Isotyp-Kontrollantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur vorinkubiert wurde, für 24 Stunden kultiviert. Anschließend erfolgte die erneute Zugabe der genannten Substanzen und der *small molecule inhibitors* Ibrutinib bzw. Idelalisib. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen aus der Zellkulturplatte entnommen, mit PBS gewaschen und anschließend in 200 µl PBS in 96-well-Zellkulturplatten überführt. Die nächsten Schritte folgten dem Standardprotokoll für intrazelluläre FACS-Färbungen.

Zunächst wurde eine Unterscheidung von (I) lebenden und bereits toten Zellen sowie (II) die Identifizierung der CLL-Zellpopulation anhand ihrer typischen Oberflächenmarker durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen mit einer Mischung aus Fixable Aqua (1:1000 in PBS) und den direkt markierten Antikörpern CD3-Pacific Blue (1:200), CD5-Phycoerythrin (1:100) sowie CD19-Fluoresceinisothiocyanat (1:100) für 30 Minuten in PBS auf Eis im Dunkeln inkubiert. Nach dem anschließenden Waschen mit PBS wurden die gefärbten Zellen fixiert und permeabilisiert, indem sie mit der Lösung Cytofix/Cytoperm versetzt wurden. Hierzu wurden die Zellen erneut für 30 Minuten auf Eis im Dunkeln belassen und anschließend mit der Lösung Perm/Wash gewaschen. Abschließend erfolgte die Zugabe des direkt gefärbten Antikörpers Anti-Active Caspase-3 Alexa Fluor 647 (1:50), woraufhin die Zellen für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Nach einem erneuten Waschschriff mit Perm/Wash wurden die Zellen schließlich in FACS-Puffer in einem Volumen von 200 µl aufgenommen, in FACS-Röhrchen überführt und innerhalb von 24 Stunden analysiert.

### **2.2.2.3 Bestimmung apoptotischer und toter Zellen unter Kokulturbedingungen mittels AnnexinV/7-AAD**

Eine Möglichkeit zur Detektion von apoptotischen Zellen, insbesondere in frühen Stadien der Apoptose, stellt AnnexinV dar, welches an Phosphatidylserin bindet, ein Molekül, das physiologisch auf der Innenseite der Zellmembran exprimiert wird, im Zuge der Apoptose jedoch auf der Zelloberfläche zu finden ist. Zellen der Kokultur wurden in An- oder Abwesenheit von Belimumab oder eines Isotyp-Kontrollantikörpers mit Ibrutinib oder Idelalisib für 72 Stunden inkubiert. Daraufhin erfolgte die Entnahme der PBMC möglichst ohne Beschädigung des gebildeten *Monolayers* aus ausgesäten Stromazellen, indem diese unter Verwendung des Minishakers vorsichtig vom gebildeten Zellrasen gelöst und anschließend langsam abpipettiert wurden. Die erhaltenen Zellen wurden gewaschen und mit FACS-Puffer, versetzt mit humanem IgG, für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die Färbung der Zellen mit direkt markierten Antikörpern (CD5-Phycoerythrin (1:100), CD19-Allophycocyanin eFluor780

(1:100), CD45-Allophycocyanin (1:50)) für 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur. Nach dem Waschen der Zellen wurden diese zu je 50 µl in AnnexinV-Fluoresceinisothiocyanat in einer Verdünnung von 1:50 aufgenommen, in FACS-Röhrchen überführt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Daran anschließend wurden 50 µl einer 1:50 Verdünnung von 7-AAD zu den Zellen gegeben und diese dann mit 100 µl des AnnexinV Binding Buffers auf ein Gesamtvolumen von 200 µl aufgefüllt. Die Proben wurden innerhalb von ein bis zwei Stunden gemessen.

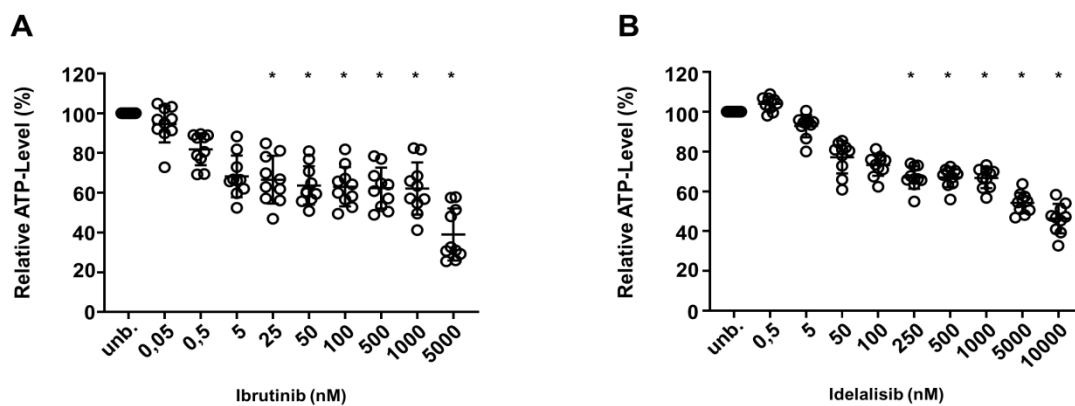
### **2.2.3 Statistische Auswertung**

Zur Untersuchung einer vorliegenden Normalverteilung der ermittelten Datensätze wurde zunächst ein Shapiro-Wilk-Test durchgeführt. Hieran anknüpfend wurde bei Vorliegen einer Normalverteilung auf eine RM one-way ANOVA zurückgegriffen. Bei nicht-normalverteilten Daten wurde ein Friedman's test angewandt. Statistisch signifikante Unterschiede wurden für ein Signifikanzniveau  $p < 0,05$  angenommen und in den entsprechenden Abbildungen mit einem „\*“ gekennzeichnet.

### 3. Ergebnisse

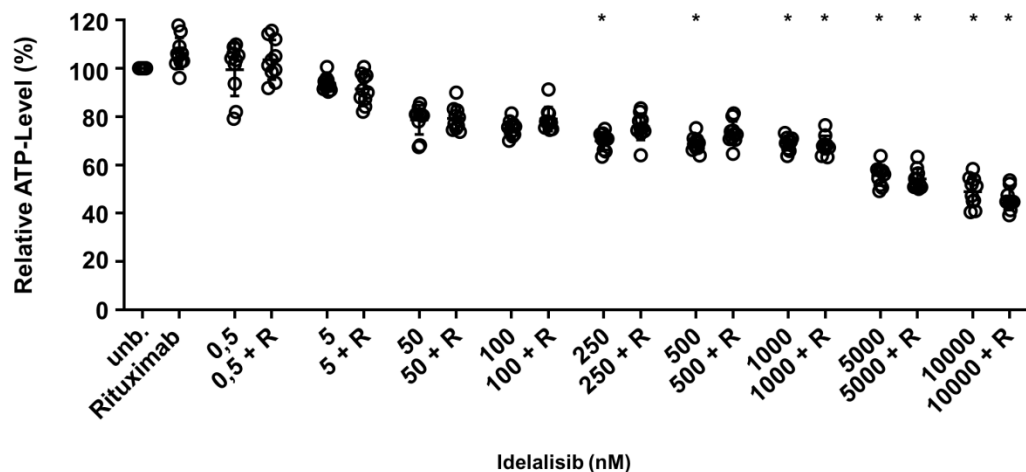
#### 3.1 Einfluss von Ibrutinib und Idelalisib auf zelluläre ATP-Level als Surrogatparameter für die Viabilität von CLL-Zellen *in vitro*

Zur Identifizierung adäquater Konzentrationen an Ibrutinib und Idelalisib für die weiteren *in vitro* Untersuchungen wurden zunächst Dosistitrationen durchgeführt, wobei die zellulären ATP-Level der behandelten CLL-Zellen zur jeweiligen Konzentration des TKIs in Relation gesetzt wurden. Hierzu wurde der CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay verwendet. Sowohl für Ibrutinib als auch für Idelalisib wurden PBMC von jeweils 10 CLL-Patienten ansteigenden Konzentrationen des jeweiligen Therapeutikums für 72 Stunden ausgesetzt und im Anschluss daran ATP-Level bestimmt. Um eine Vergleichbarkeit über mehrere Patienten hinweg trotz der jeweiligen Donorvariabilität zu ermöglichen, wurden hier und in nachfolgenden Untersuchungen die Ergebnisse der jeweils unbehandelten Zellen auf 100% gesetzt und davon ausgehend die Effekte einer Intervention durch Berechnung der relativen ATP-Level erhoben. Es zeigte sich eine Abnahme der relativen ATP-Level mit ansteigenden Konzentrationen an Ibrutinib bzw. Idelalisib. Sowohl mit Ibrutinib als auch mit Idelalisib konnte mit einer Konzentration von 500 nM eine deutliche Reduktion der relativen ATP-Level erzielt werden. Konkret verringerten Ibrutinib sowie Idelalisib die ATP-Level der CLL-Zellen um durchschnittlich 37% bzw. 33%, so dass zur Behandlung von CLL-Zellen in den darauffolgenden Experimenten die beiden TKIs in dieser oder einer höheren Konzentration eingesetzt wurden (**Abbildung 1**).



**Abbildung 1: Dosisfindung von Ibrutinib und Idelalisib mit primären CLL-Zellen.** PBMCs von CLL-Patienten (n=10; mindestens 80% CD5<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup> Zellen im peripheren Blut) wurden mit ansteigenden Konzentrationen an Ibrutinib (a) bzw. Idelalisib (b) behandelt und für 72 Stunden inkubiert. Anschließend wurden zelluläre ATP-Level mithilfe des CellTiter-Glo<sup>®</sup> Luminescent Cell Viability Assay ermittelt. Dargestellt sind kombinierte Daten unter Angabe des arithmetischen Mittels sowie der Standardabweichung als relative ATP-Level bezogen auf unbehandelte Zellen des entsprechenden Patienten, welche in jedem Datensatz auf 100% gesetzt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede (Friedman's test, p < 0,05) sind mit \* gekennzeichnet und beziehen sich auf unbehandelte CLL-Zellen.

Da Idelalisib gemäß der aktuellen Leitlinie zur Therapie der CLL nur in Kombination mit dem CD20-Antikörper Rituximab zugelassen ist, wurde im Folgenden untersucht, ob die Kombination mit dem Antikörper den Einfluss von Idelalisib auf die zellulären ATP-Level beeinflusst. Hierbei wurde deutlich, dass sich die Anwesenheit von Rituximab nicht auf den Effekt von Idelalisib *in vitro* auswirkt (**Abbildung 2**).

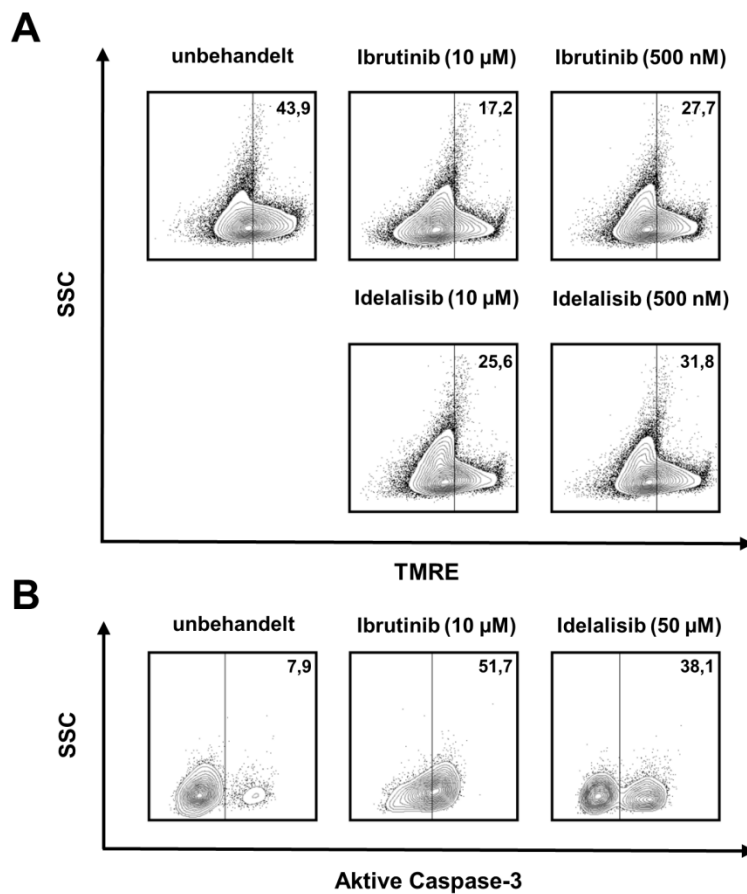


**Abbildung 2: Dosistitration von Idelalisib in An- und Abwesenheit von Rituximab mit primären CLL-Zellen.** PBMCs von CLL-Patienten (n=10; mindestens 80% CD5<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup> Zellen im peripheren Blut) wurden mit Rituximab (10 µg/ml) allein oder mit ansteigenden Konzentrationen an Idelalisib versetzt und für 72 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die zellulären ATP-Level mithilfe des CellTiter-Glo<sup>®</sup> Luminescent Cell Viability Assay ermittelt. Dargestellt sind kombinierte Daten unter Angabe des arithmetischen Mittels sowie der Standardabweichung als relative ATP-Level bezogen auf unbehandelte Zellen des entsprechenden Patienten, welche in jedem Datensatz auf 100% gesetzt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede (Friedman's test,  $p < 0,05$ ) sind mit \* gekennzeichnet und beziehen sich auf unbehandelte CLL-Zellen.

Um die direkte Wirkung von Ibrutinib und Idelalisib auf PBMCs von CLL-Patienten weiter zu untersuchen, wurde die Induktion von Mechanismen des programmierten Zelltodes mittels Durchflusszytometrie analysiert. CLL-Zellen wurden entweder durch Färbung mit dem Farbstoff TMRE oder intrazellulär durch Antikörper-basierte Detektion der aktiven Form der Caspase-3 untersucht. In Übereinstimmung mit den oben dargestellten Ergebnissen kam es auch hier unter Behandlung mit Ibrutinib bzw. Idelalisib konzentrationsabhängig zu einer relativen Verringerung des Anteils an CLL-Zellen mit einem intakten mitochondrialen Membranpotential (Verringerung in Abhängigkeit von der verwendeten Ibrutinib-Konzentration auf 67% bzw. 39% sowie für Idelalisib auf 72% bzw. 58%). Zudem konnte eine Aktivierung von Caspase-3, welche zentral in den Vorgang der Apoptose eingebunden ist, durch beide Therapeutika nachgewiesen werden, was mit Vorarbeiten von Herman et al. übereinstimmt (Zunahme nach Behandlung mit Ibrutinib oder Idelalisib um etwa 44% bzw.

30%).<sup>82,83</sup> Die beobachteten Effekte schienen für Ibrutinib, verglichen mit Idelalisib, ausgeprägter zu sein (**Abbildung 3**). So konnte in der TMRE-Färbung (**Abbildung 3A**) bei identischen Konzentrationen für beide TKIs eine Reduktion der CLL-Zellen mit einem intakten mitochondrialen Membranpotential im Falle von Ibrutinib von 43,9% auf 27,7% beobachtet werden, während durch Idelalisib eine Reduktion auf 31,8% erfolgte. Auch die Untersuchung der Caspase-3-Aktivität (**Abbildung 3B**) zeigte mit einer Steigerung von 7,9% auf 51,7% für Ibrutinib eine um ca. 10% stärkere Induktion des Enzyms verglichen mit Idelalisib, mit welchem ein Anstieg auf 38,1% beobachtet wurde.





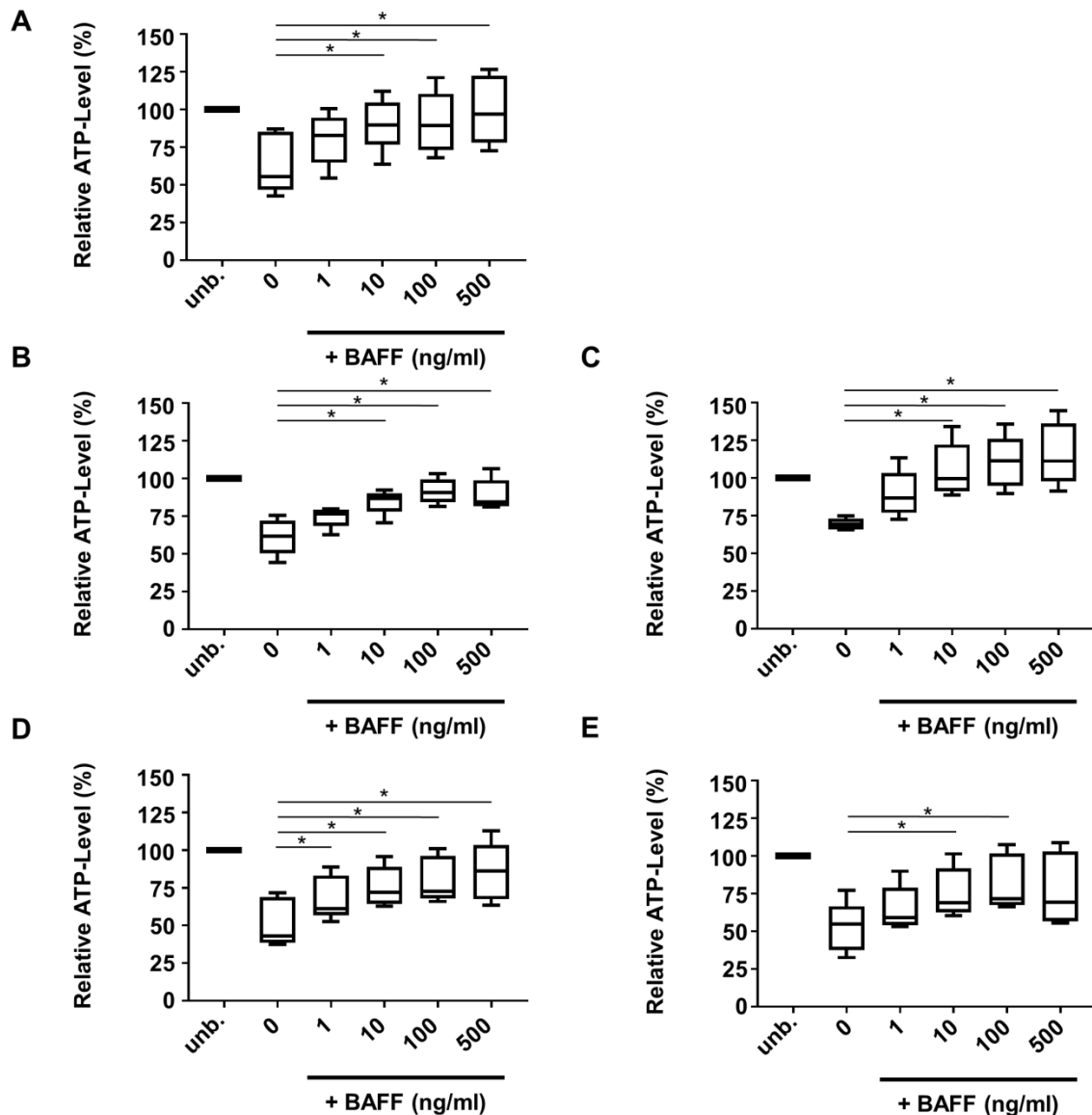
**Abbildung 3: Einfluss von Ibrutinib und Idelalisib auf das mitochondriale Membranpotential und die Caspase-3-Aktivität von primären CLL-Zellen.** PBMCs von CLL-Patienten wurden mit Medium bzw. Ibrutinib oder Idelalisib wie angegeben versetzt und für 24 (Caspase-3) bzw. 48 (Ibrutinib, TMRE) oder 72 (Idelalisib, TMRE) Stunden inkubiert. Die Abbildung zeigt exemplarisch eine TMRE (a) und eine Caspase-3-Färbung (b) von Kulturen eines Patienten. Diese Ergebnisse sind repräsentativ für Ergebnisse, die aus 5 Patientenkulturen gewonnen wurden. Abgebildet ist der prozentuale Anteil der jeweils untersuchten Zellpopulation bezogen auf CD3-negative, CD5- sowie CD19-positive Zellen.

### 3.2 Einfluss von BAFF auf zelluläre ATP-Level, mitochondriales Membranpotential und Caspase-3-Aktivierung von CLL-Zellen in Gegenwart der TKIs Ibrutinib und Idelalisib

Wie in Vorarbeiten von Wild et al. und Schmidt et al. gezeigt werden konnte, steigert BAFF dosisabhängig die metabolische Aktivität von CLL-Zellen *in vitro*. Dieser Effekt erscheint ab einer Konzentration von 100 ng/ml besonders ausgeprägt, wobei bereits ab etwa 500 ng/ml eine Sättigung erreicht wird, sodass es auch bei höheren Konzentrationen nicht mehr zu einer signifikanten Zunahme des untersuchten Parameters kommt.<sup>196,197</sup>

Hierauf basierend wurde analysiert, ob und inwiefern sich BAFF auf die durch Ibrutinib und Idelalisib vermittelte Reduktion der ATP-Level auswirkt. Auf Grundlage der durchgeführten Dosistitrationen wurden PBMCs von fünf CLL-Patienten zu diesem Zweck mit jeweils zwei verschiedenen Konzentrationen von Ibrutinib und Idelalisib behandelt und gleichzeitig mit ansteigenden Konzentrationen BAFF versetzt. Die ATP-Level wurden unter Verwendung des CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay nach 72 Stunden Inkubationszeit gemessen. Wie die Ergebnisse dieses Versuchs zeigen, kann der Einfluss von Ibrutinib bzw. Idelalisib auf die zellulären ATP-Level der CLL-Zellen durch BAFF dosisabhängig verhindert werden. Durch Ibrutinib oder Idelalisib kam es zu einer Reduktion der relativen ATP-Level auf 61%, wohingegen BAFF in einer Konzentration von 500 ng/ml diese Effekte nahezu vollständig aufheben konnte (Relative ATP-Level von 100% für Ibrutinib bzw. 90% für Idelalisib). Dieser protektive Effekt von BAFF, obgleich bei beiden Konzentrationsstufen erkennbar, zeigte sich ausgeprägter bei der niedrigeren Konzentration des eingesetzten TKIs. **(Abbildung 4).**

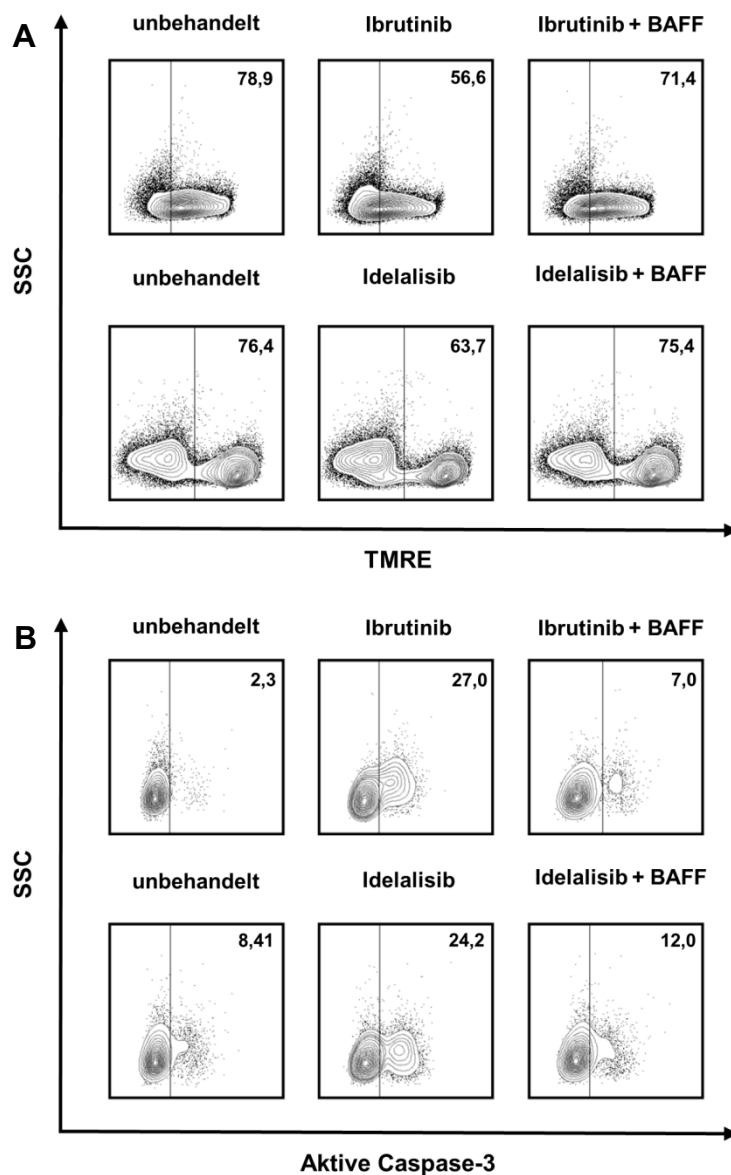
Um ausschließen zu können, dass Rituximab die Wirkung von BAFF *in vitro* einschränkt, wurde für Idelalisib das Vorgehen in Anwesenheit des CD20-Antikörpers wiederholt. Hieraus ging hervor, dass BAFF, unabhängig von der Anwesenheit von Rituximab, die therapeutische Wirkung des TKIs teilweise oder vollständig aufhebt **(Abbildung 4C).**



**Abbildung 4: Einfluss von BAFF auf die Suszeptibilität von CLL-Zellen gegenüber den TKIs Ibrutinib und Idelalisib.** PBMCs von CLL-Patienten (n=5; mindestens 80% CD5<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup> Zellen im peripheren Blut) wurden mit zwei Konzentrationen Ibrutinib (500 nM, a; 2,5  $\mu$ M, d) oder Idelalisib (500 nM, b; 12,5  $\mu$ M, e) versetzt. Zusätzlich wurden PBMCs von CLL-Patienten mit Idelalisib (500 nM) und Rituximab (10  $\mu$ g/ml) behandelt (c). Es erfolgte die Zugabe von BAFF in ansteigenden Konzentrationen. Nach einer Inkubation von 72 Stunden wurde die zellulären ATP-Level mithilfe des CellTiter-Glo<sup>®</sup> Luminescent Cell Viability Assay bestimmt. Dargestellt sind kombinierte Daten unter Angabe des arithmetischen Mittels sowie der Standardabweichung als relative ATP-Level bezogen auf unbehandelte Zellen des entsprechenden Patienten, welche in jedem Datensatz auf 100% gesetzt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede (RM one-way ANOVA,  $p < 0,05$ ) sind mit \* gekennzeichnet. Abbildungen modifiziert nach Tandler et al.<sup>198</sup>

Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde in den darauffolgenden Experimenten vereinfachend auf eine Kombination mit Rituximab verzichtet.

Hieran anknüpfend wurden durchflusszytometrische Messungen durchgeführt, die den Einfluss von BAFF sowohl auf die Intaktheit des mitochondrialen Membranpotentials als auch auf die Caspase-3-Aktivität der behandelten CLL-Zellen untersuchten. Zu diesem Zweck wurden CLL-Zellen, die in Anwesenheit von BAFF mit Ibrutinib oder Idelalisib inkubiert wurden, anschließend entweder mit TMRE und 7-AAD oder mit dem spezifisch gegen die aktive Form der Caspase-3 gerichteten Antikörper gefärbt. Es zeigte sich erneut sowohl für Ibrutinib als auch für Idelalisib in Gegenwart von BAFF eine nahezu vollständige Neutralisation des therapeutischen Effektes. So wurde mithilfe von TMRE-Färbungen gezeigt, dass es durch Ibrutinib bzw. Idelalisib zu einer Verringerung des Anteils an CLL-Zellen mit intaktem mitochondrialen Membranpotential um etwa 20% bzw. 13% kam. Nach Zugabe von BAFF stieg dieser Anteil um etwa 15% bzw. 12%. Untersuchungen zur Caspase-3-Aktivierung durch Ibrutinib oder Idelalisib belegten eine Induktion des Enzyms in 25% bzw. 15% der CLL-Zellen, wohingegen in Anwesenheit von BAFF dieser Effekt um etwa 20% bzw. 12% reduziert wurde, sodass die schützende Wirkung von BAFF auch in diesem experimentellen Setting nachgewiesen werden konnte (**Abbildung 5**).



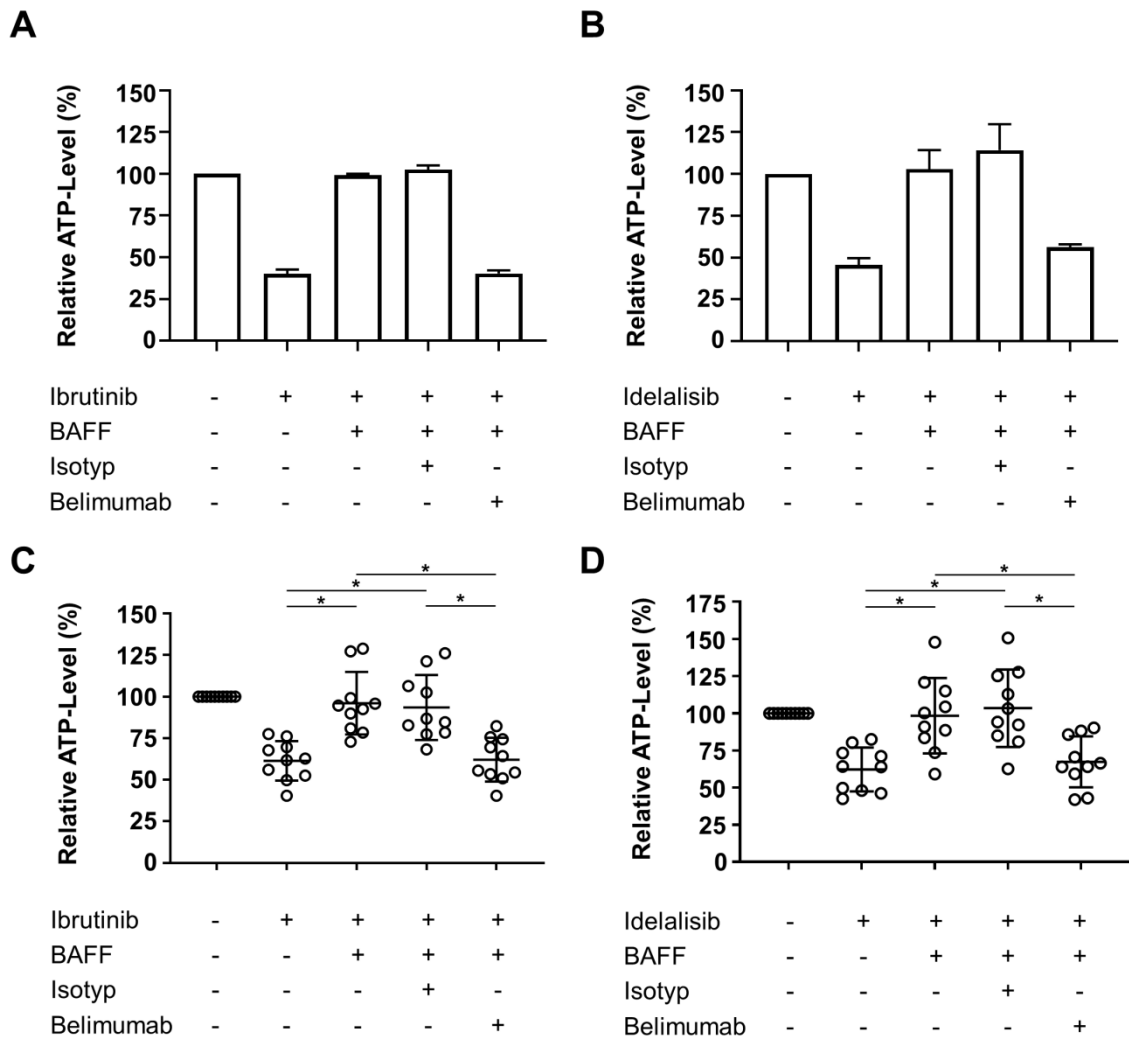
**Abbildung 5: Einfluss von BAFF auf die Intaktheit des mitochondrialen Membranpotentials und die Caspase-3-Aktivität von primären CLL-Zellen in Gegenwart von Ibrutinib und Idelalisib.** PBMCs von CLL-Patienten wurden in An- oder Abwesenheit von BAFF (500 ng/ml) für 24 Stunden vorinkubiert und anschließend mit Ibrutinib oder Idelalisib (jeweils 10  $\mu$ M, a; 10  $\mu$ M für Ibrutinib bzw. 50  $\mu$ M für Idelalisib, b) in Gegenwart oder Abwesenheit von BAFF für weitere 24 (Caspase-3) bzw. 48 (Ibrutinib, TMRE) oder 72 (Idelalisib, TMRE) Stunden inkubiert. Anschließend wurde durchflusszytometrisch das mitochondriale Membranpotential mittels TMRE/7-AAD (a) bzw. die Caspase-Aktivität (b) analysiert. Exemplarisch wird ein repräsentatives aus mindestens fünf gleichartigen Experimenten dargestellt. Gekennzeichnet ist der prozentuale Anteil der jeweils untersuchten Zellpopulation bezogen auf CD3-negative, CD5- sowie CD19-positive Zellen. Abbildungen modifiziert nach Tandler et al.<sup>198</sup>

### 3.3 Einfluss von Belimumab auf die durch BAFF beeinflusste zelluläre Aktivität von CLL-Zellen unter Behandlung mit Ibrutinib und Idelalisib

Basierend auf Erkenntnissen von Wild et al. und Schmidt et al., welche die BAFF-neutralisierende Wirkung des Antikörpers Belimumab anhand der Stoffwechselaktivität von CLL-Zellen, die mit BAFF inkubiert wurden, nachweisen konnten, sollte nachfolgend evaluiert werden, ob Belimumab ebenso den zuvor gezeigten schützenden Effekt von BAFF bei der Behandlung mit Ibrutinib oder Idelalisib aufheben kann.<sup>196,197</sup>

Zu diesem Zweck wurden im ersten Schritt PBMCs von CLL-Patienten mit Ibrutinib bzw. Idelalisib in An- oder Abwesenheit von BAFF, Belimumab oder einem Isotyp-Kontrollantikörper inkubiert. Nach 72 Stunden erfolgte die Bestimmung von ATP-Level mittels CellTiter-Glo<sup>®</sup> Luminescent Cell Viability Assay.

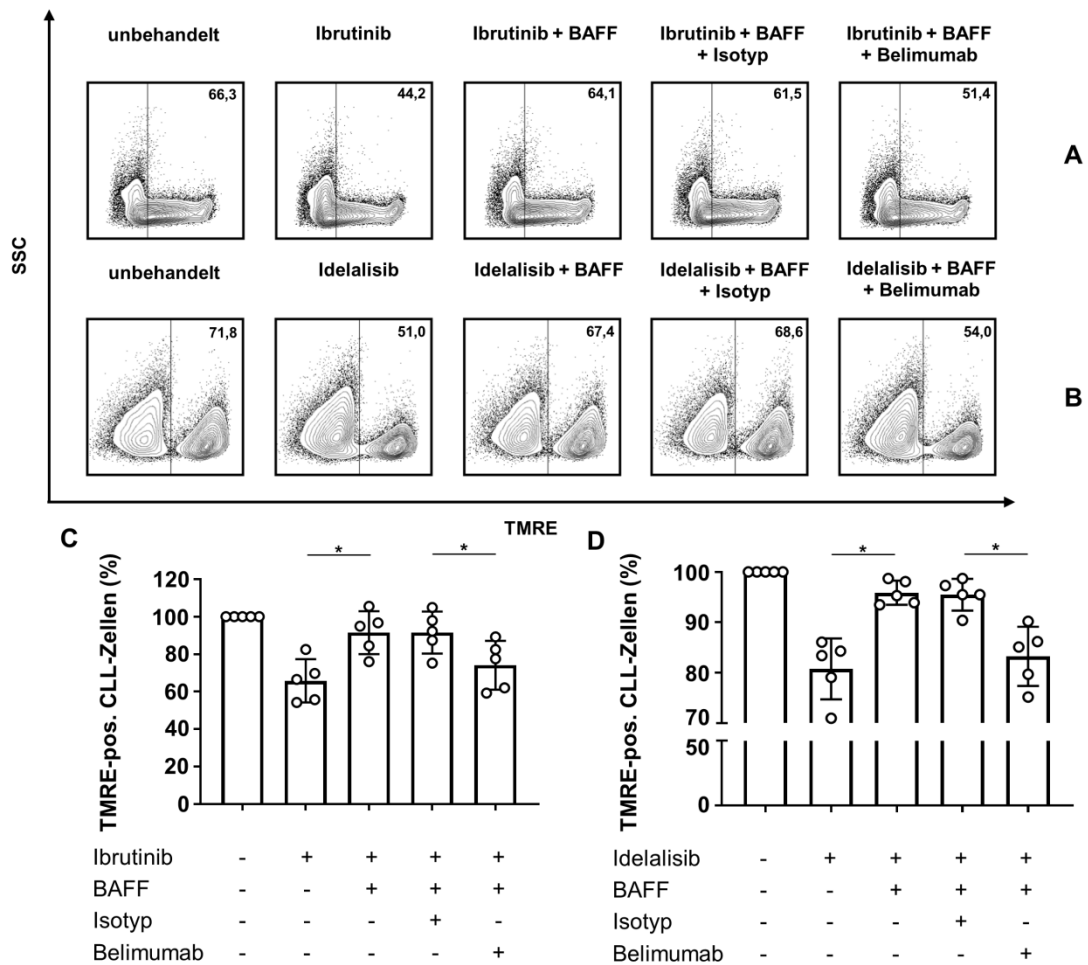
Hierbei konnte gezeigt werden, dass, im Einklang mit den bisherigen Erkenntnissen, die durch den jeweiligen TKI bedingte Verringerung der zellulären ATP-Level durch Anwesenheit von BAFF nahezu vollständig aufgehoben wurde. Konkret reduzierte Ibrutinib bzw. Idelalisib die ATP-Level der CLL-Zellen gemessen im CTG-Assay auf durchschnittlich 62%. Durch die Anwesenheit von BAFF wurde dieser Effekt verhindert, was sich in relativen ATP-Level von ungefähr 96% für Ibrutinib bzw. 98% für Idelalisib widerspiegelte. Durch Hinzugabe von Belimumab konnte jedoch der protektive Effekt von BAFF neutralisiert werden. Auf diese Weise kam es, verglichen mit der Kontrollgruppe, zu einer erneuten Abnahme der relativen ATP-Level um durchschnittlich 31% für mit Ibrutinib behandelte bzw. um 36% für mit Idelalisib behandelte CLL-Zellen. Dieser Vorgang zeigte sich spezifisch für Belimumab, ein irrelevanter Isotyp-Kontrollantikörper hingegen hatte keinen Einfluss (**Abbildung 6**).



**Abbildung 6: Einfluss der BAFF-Neutralisation durch Belimumab auf das Ansprechen von CLL-Zellen auf Behandlung mit Ibrutinib bzw. Idelalisib.** PBMCs von CLL-Patienten (n=10; mindestens 80% CD5<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup> Zellen im peripheren Blut) wurden mit Ibrutinib (500 nM; a und c) bzw. Idelalisib (500 nM; b und d) versetzt. In den einzelnen Behandlungsgruppen erfolgte die Zugabe von BAFF (500 ng/ml) in An- oder Abwesenheit von Belimumab (10 µg/ml) oder einem Isotyp-Kontrollantikörper (10 µg/ml). Nach einer Inkubation von 72 Stunden wurden die zellulären ATP-Level mithilfe des CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay bestimmt. Dargestellt sind exemplarische Daten eines Spenders (a und b) sowie kombinierte Daten (c und d) unter Angabe des arithmetischen Mittels und der Standardabweichung als relative ATP-Level bezogen auf unbehandelte Zellen des entsprechenden Patienten, welche in jedem Datensatz auf 100% gesetzt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede (RM one-way ANOVA, p < 0,05) sind mit \* gekennzeichnet. Abbildungen modifiziert nach Tandler et al.<sup>198</sup>

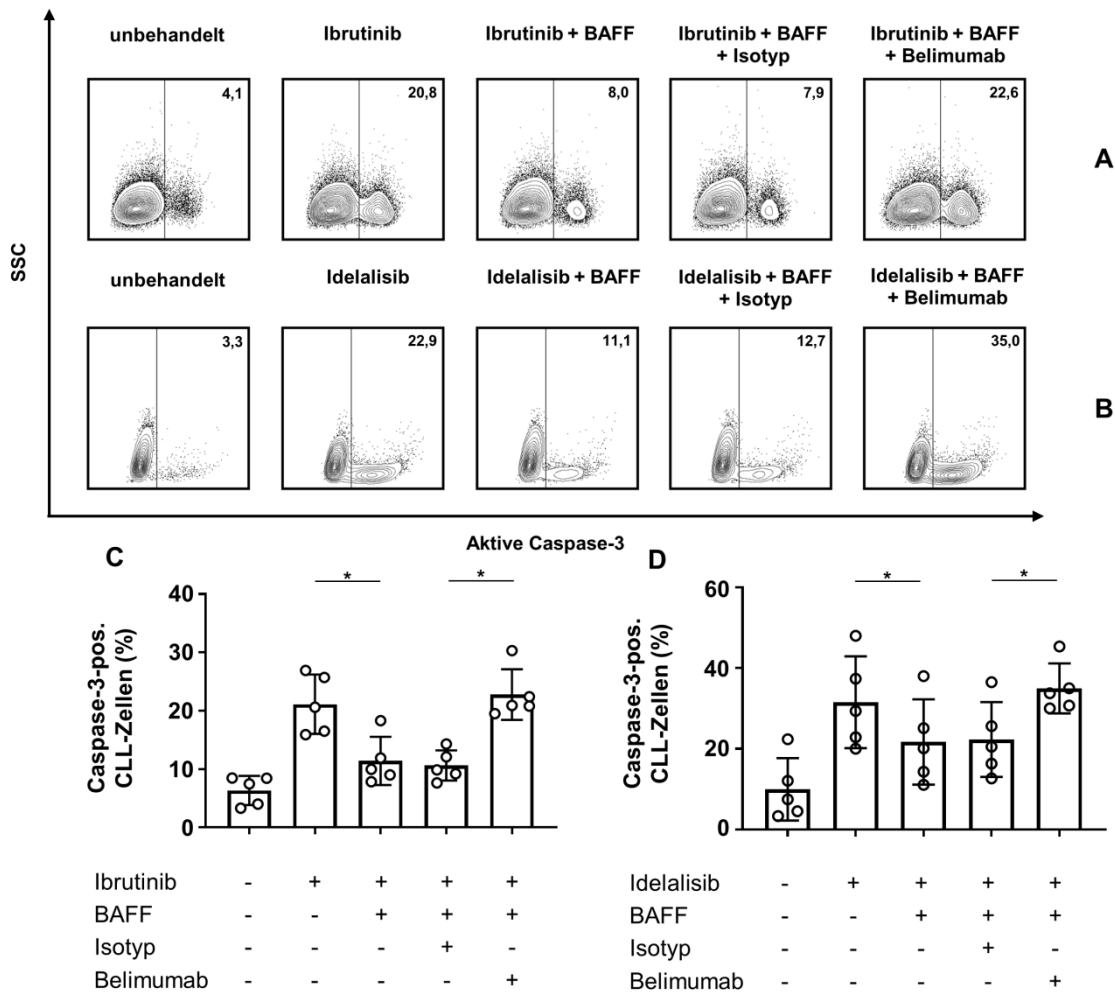
Im Anschluss daran sollte durchflusszytometrisch untersucht werden, inwiefern eine Neutralisation von BAFF durch Belimumab die durch Ibrutinib und Idelalisib induzierte Reduktion des Anteils an CLL-Zellen mit intaktem mitochondrialen Membranpotential als Surrogatparameter für Apoptose beeinflusst. Hierzu wurden PBMCs von CLL-Patienten jeweils mit einer Konzentration an Ibrutinib bzw. Idelalisib in An- oder Abwesenheit von BAFF, Belimumab oder einem Isotyp-Kontrollantikörper inkubiert. Nach 72 Stunden erfolgte eine Färbung mit TMRE und 7-AAD. Hierbei wurde ersichtlich, dass es, in Analogie zu den bereits gezeigten Ergebnissen, durch Ibrutinib und Idelalisib zu einer Reduktion der oben beschriebenen CLL-Zellfraktion kam, verglichen mit unbehandelten Zellen auf durchschnittlich 65% bzw. 80%. Unter dem Einfluss von BAFF zeigten sich diese deutlich unempfindlicher gegenüber der therapeutischen Wirkung beider TKIs, sodass sich Messwerte von ungefähr 91% bzw. 95% ergaben. Durch Zugabe des BAFF-neutralisierenden Antikörpers Belimumab konnte diese Resistenz zumindest partiell überwunden werden, was sich in einer erneuten Reduktion der CLL-Zellen mit intaktem mitochondrialen Membranpotential in Gegenwart von Ibrutinib bzw. Idelalisib auf im Durchschnitt 74% bzw. 83% widerspiegelte (**Abbildung 7**).





**Abbildung 7: Einfluss der BAFF-Neutralisation durch Belimumab auf die Intaktheit des mitochondrialen Membranpotentials von CLL-Zellen unter Behandlung mit Ibrutinib bzw. Idelalisib.** PBMCs von CLL-Patienten (n=5) wurden mit BAFF (500 ng/ml) in An- oder Abwesenheit von Belimumab (10 µg/ml) oder eines Isotyp-Kontrollantikörpers (10 µg/ml) für 24 Stunden vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von Medium, Ibrutinib (10 µM; a und c) bzw. Idelalisib (10 µM; b und d) in Gegenwart oder Abwesenheit von BAFF, wo angegeben in Anwesenheit von Belimumab oder eines Isotyp-Kontrollantikörpers. Das mitochondriale Membranpotential wurde durchflusszytometrisch mittels TMRE/7-AAD untersucht. Dargestellt sind exemplarische Daten eines Spenders (a und b) als prozentualer Anteil der TMRE-positiven Zellen bezogen auf CD3-negative, CD5- sowie CD19-positive Zellen sowie kombinierte Daten (c und d) unter Angabe des arithmetischen Mittels und der Standardabweichung als Anteil TMRE-positiver Zellen bezogen auf unbehandelte Zellen des entsprechenden Patienten, welche in jedem Datensatz auf 100% gesetzt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede (RM one-way ANOVA, p < 0,05) sind mit \* gekennzeichnet. Abbildungen modifiziert nach Tandler et al.<sup>198</sup>

Daran anknüpfend wurde der Einfluss einer BAFF-Neutralisation durch Belimumab auf das Ausmaß der Aktivität einer der zentralen Effektorcaspasen in mit Ibrutinib und Idelalisib behandelten CLL-Zellen untersucht. Dafür wurden PBMCs von CLL-Patienten zunächst mit einer Konzentration an Ibrutinib bzw. Idelalisib in An- oder Abwesenheit von BAFF, Belimumab oder einem Isotyp-Kontrollantikörper inkubiert. Nach 24 Stunden erfolgte die Bestimmung der Caspase-3-Aktivität durchflusszytometrisch unter Verwendung eines spezifisch gegen die aktive Form des Enzyms gerichteten Antikörpers. Wie in den vorangegangenen Experimenten wurde auch hier die durch Ibrutinib oder Idelalisib induzierte Aktivierung der Caspase-3 durch BAFF bis zu einem gewissen Ausmaß limitiert. So kam es durch Behandlung mit Ibrutinib bzw. Idelalisib zu einer Zunahme der Caspase-3-positiven Zellfraktion um ungefähr 15% bzw. 20% (von 6% auf 21% bzw. 10% auf 31%). Dieser Effekt wurde durch BAFF um durchschnittlich jeweils 10% verringert (11% bzw. 21% Caspase-3-Aktivität). In Anwesenheit von Belimumab wurde dieser schützende Effekt aufgehoben (Caspase-3-Aktivität von 23% bzw. 35%) (**Abbildung 8**).

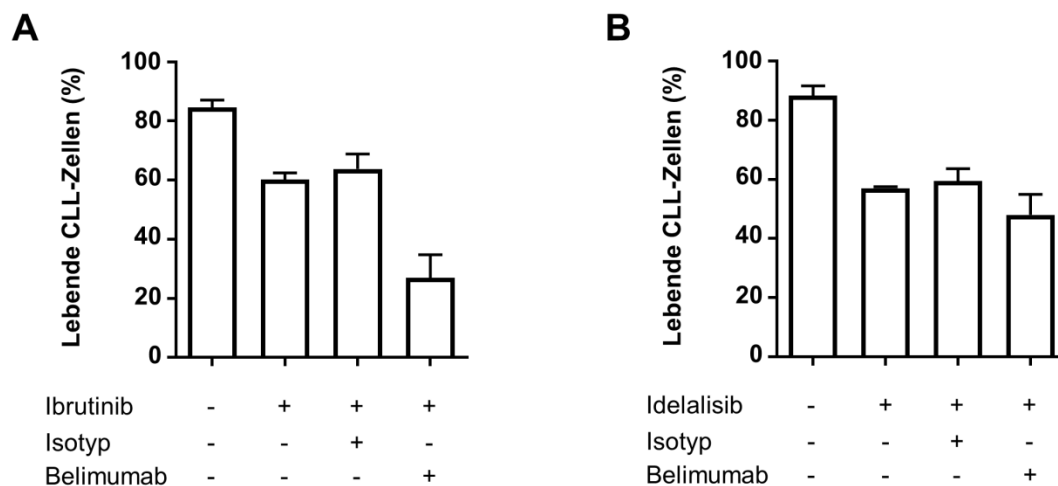


**Abbildung 8: Einfluss der BAFF-Neutralisation durch Belimumab auf die Caspase-3-Aktivität von CLL-Zellen unter Behandlung mit Ibrutinib bzw. Idelalisib.** PBMCs von CLL-Patienten (n=5; mindestens 80% CD5<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup> Zellen im peripheren Blut) wurden mit BAFF (500 ng/ml) in An- oder Abwesenheit von Belimumab (10 µg/ml) oder eines Isotyp-Kontrollantikörpers (10 µg/ml) für 24 Stunden vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von Medium, Ibrutinib (10 µM; a und c) bzw. Idelalisib (50 µM; b und d) in An- oder Abwesenheit von BAFF, wo angegeben in Gegenwart von Belimumab oder eines Isotyp-Kontrollantikörpers. Die Caspase-3-Aktivität wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind exemplarische Daten eines Spenders (a und b) sowie kombinierte Daten (c und d) unter Angabe des arithmetischen Mittels und der Standardabweichung als prozentualer Anteil Caspase-3-positiver Zellen bezogen auf CD3-negative, CD5- sowie CD19-positive Zellen. Statistisch signifikante Unterschiede (RM one-way ANOVA bzw. Friedman's test, p < 0,05) sind mit \* gekennzeichnet. Abbildungen modifiziert nach Tandler et al.<sup>198</sup>

### 3.4 Einfluss von Belimumab auf die Suszeptibilität von CLL-Zellen gegenüber Ibrutinib und Idelalisib in einem Kokultur-Setting

Nachdem in den vorherigen Experimenten gezeigt werden konnte, dass Belimumab das Ausmaß des direkten therapeutischen Effekts von Ibrutinib und Idelalisib auf CLL-Zellen, die in Kontakt mit BAFF gekommen sind, wiederherstellt und teilweise sogar steigert, sollte im Folgenden herausgearbeitet werden, ob sich der BAFF-neutralisierende Antikörper ebenso förderlich auf den therapeutischen Effekt beider TKIs im Beisein des *Microenvironments* von CLL-Zellen auswirken kann.

Hierzu wurde ein Kokultur-Setting etabliert, dessen Grundlage die humane Knochenmarkstroma-Zelllinie HS-5 bildete, für die eine BAFF-Expression und -Freisetzung beschrieben ist.<sup>199</sup> Nach Generierung eines intakten *Monolayers* aus diesen Zellen wurden PBMC von CLL-Patienten hinzugegeben und daraufhin mit Ibrutinib bzw. Idelalisib in Kombination mit Belimumab oder einem Isotyp-Kontrollantikörper behandelt. 72 Stunden später wurden die auf diese Weise kokultivierten CLL-Zellen durchflusszytometrisch mittels AnnexinV/7-AAD analysiert. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass es unter den beschriebenen Kulturbedingungen zu einer deutlichen Reduktion von AnnexinV/7-AAD<sup>-</sup> CLL-Zellen durch Ibrutinib bzw. Idelalisib kam. Wurden die beiden TKIs zusätzlich mit Belimumab kombiniert, konnte eine weitere Zunahme der apoptotischen Zellfraktion beobachtet werden, im Falle von Ibrutinib sogar um weitere 30%. Für Idelalisib erschien dieser additive Effekt nicht derart ausgeprägt, wobei zumindest eine Abnahme des Anteils AnnexinV/7-AAD<sup>-</sup> Zellen um weitere 10% im Mittel festgestellt werden konnte. Diese Effekte waren spezifisch für Belimumab, ein irrelevanter Isotyp-Kontrollantikörper zeigte keinen Einfluss (**Abbildung 9**).



**Abbildung 9: Einfluss von Belimumab auf die Suszeptibilität von CLL-Zellen unter Behandlung mit Ibrutinib bzw. Idelalisib in einem Kokultur-Setting.** Zellen der humanen Knochenmarkstroma-Zelllinie HS-5 wurden nach Ausbildung eines intakten Monolayers mit PBMCs von CLL-Patienten für 72 Stunden mit Ibrutinib (a) oder Idelalisib (b) in An- oder Abwesenheit von Belimumab oder eines Isotyp-Kontrollantikörpers inkubiert. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Bestimmung der Zellviabilität mittels AnnexinV/7-AAD. Dieses Ergebnis ist repräsentativ für Ergebnisse, die aus 3 Patientenkulturen gewonnen wurden. Abgebildet ist der prozentuale Anteil der lebenden Zellpopulation (AnnexinV/7-AAD<sup>-</sup>) bezogen auf CD3-negative, CD5- sowie CD19-positive Zellen der jeweiligen Behandlungsgruppe unter Angabe des arithmetischen Mittels und der Standardabweichung.

Zusammenfassend legen die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse nahe, dass das TNF-Familienmitglied BAFF eine wichtige Einflussgröße in der zielgerichteten Behandlung der Chronisch Lymphatischen Leukämie darstellt. BAFF scheint in der Lage zu sein, die Wirksamkeit der beiden TKIs Ibrutinib und Idelalisib auf CLL-Zellen herabzusetzen, wenn nicht sogar aufzuheben. Eine gezielte Neutralisation von BAFF und seiner Effekte erscheint daher aus therapeutischer Sicht sinnvoll und vielversprechend und kann, wie hier gezeigt, durch die Verwendung des Antikörpers Belimumab, erreicht werden. Auf diese Weise kann das Ansprechen von CLL-Zellen auf die Therapie mit Ibrutinib sowie Idelalisib nicht nur wiederhergestellt, sondern deren Empfindlichkeit gegenüber beiden *small molecule inhibitors* potenziell sogar gesteigert werden.

#### 4. Diskussion

Die CLL ist ungeachtet ihrer Prävalenz und des intensiven Forschungsaufwands, mit welchem die Entwicklung neuartiger Behandlungsansätze verbunden ist, bis zum heutigen Tage medikamentös nicht vollständig heilbar. Nichtsdestotrotz und gerade im Zuge der intensiven wissenschaftlichen Auseinandersetzung mit dieser Leukämieform ließ sich in den vergangenen Jahren ein Paradigmenwechsel in der Standardtherapie, insbesondere im Hinblick auf bestimmte Hochrisiko-Formen sowie den Umgang mit Rezidiven der CLL, erzielen. Neuartige Pharmaka, welche im Gegensatz zu konventioneller Chemotherapie nicht nur ein geringeres Nebenwirkungsprofil aufweisen, sondern durch ihre Darreichungsform als Tabletten zusätzlich die Compliance der behandelten Patienten steigern können, sind in den Mittelpunkt des Interesses gerückt.<sup>85,88,200</sup> Hierzu zählen neben dem neuesten, erst im Jahre 2016 in die Leitlinien zur Behandlung der CLL aufgenommenen Vertreter Venetoclax die beiden TKIs Ibrutinib und Idelalisib. Diese konnten im Rahmen von klinischen Studien bereits beachtliche therapeutische Erfolge erzielen und scheinen insbesondere bei Patienten, deren Leukämiezellen molekulare Marker aufweisen, die mit einer schlechten Prognose assoziiert sind, der herkömmlichen Chemoimmuntherapie überlegen zu sein.<sup>86,87,201</sup>

Hanahan und Weinberg beschrieben bereits im Jahre 2000, dass die Malignität von Tumorzellen auf einigen wenigen zentralen Eigenschaften, die sie als Krebszellen definieren und von gesunden Körperzellen abgrenzen, beruht. Diese werden als „*hallmarks of cancer*“ bezeichnet und können teilweise als Angriffspunkte moderner Krebstherapie genutzt werden. So versucht der *small molecule inhibitor* Venetoclax, die Resistenz der CLL-Zellen gegenüber dem natürlichen Zelltod zu vermindern, indem das anti-apoptotische Protein Bcl-2 neutralisiert wird. Ibrutinib wie auch Idelalisib greifen dagegen an einem weiteren *hallmark of cancer* an.<sup>202</sup> Konkret wird hierbei versucht, die Fähigkeit von Tumorzellen, unabhängig von externen Wachstumssignalen zu proliferieren, einzuschränken oder aufzuheben. Diese Eigenschaft der Tumorzellen wird maßgeblich durch die beiden Tyrosinkinase BTK und PI3K ermöglicht, welche entweder selbst konstitutiv aktiv oder als zentrale Schaltstellen in andere in den

Leukämiezellen mutierte oder überaktivierte Signalwege involviert sind.<sup>203,204</sup> Interessanterweise gilt der PI3K-Signalweg als der am häufigsten mutierte Signalweg in humanen Tumoren, was dessen Bedeutung für die Entstehung und Aufrechterhaltung von Tumorerkrankungen im Allgemeinen unterstreicht. Gleichzeitig wird auf diese Weise der potentielle Nutzen einer gezielten therapeutischen Ausschaltung dieses oder verwandter Signalwege, nicht nur im Hinblick auf die CLL, verdeutlicht.<sup>205</sup> So sind Ibrutinib und Idelalisib neben der CLL auch zur Behandlung weiterer Erkrankungen zugelassen. Hierzu zählen neben dem Morbus Waldenström verschiedene Formen von Lymphomen, wie das Follikuläre Lymphom oder das Mantelzelllymphom, seit Kurzem auch die chronische Graft-versus-Host-Reaktion, für welche jedoch ausschließlich in den USA eine Zulassung besteht.<sup>206</sup> Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass den beiden Enzymen BTK und PI3K, welche durch Ibrutinib und Idelalisib selektiv inhibiert werden, auch in soliden Tumoren, wie dem Prostata-, Mamma- oder Endometriumkarzinom, eine wichtige Rolle zukommt. Daher wird aktuell untersucht, ob und inwiefern ein therapeutischer Nutzen durch beide *small molecule inhibitors* bei diesen Erkrankungen zu erzielen ist.<sup>207,208</sup>

Trotz dieser insgesamt sehr vielversprechend erscheinenden Ergebnisse darf nicht außer Acht gelassen werden, dass es mit zunehmender Dauer der Behandlung zu einer allmählichen Verringerung der therapeutischen Wirkung kommt. Diese Tendenz stellt eine bekannte Herausforderung im Rahmen des Einsatzes von Proteinkinaseinhibitoren dar, da u.a. auch CML-Patienten, welche lange Zeit mit Imatinib behandelt werden, ab einem gewissen Zeitpunkt nicht mehr von der zielgerichteten Therapie profitieren. Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit beleuchteten TKIs, für welche die verantwortlichen Resistenzmechanismen bislang nur unzureichend verstanden sind, konnten im Falle der CML die auf molekularer Ebene stattfindenden Prozesse zumindest teilweise identifiziert und so die Entwicklung neuartiger Behandlungsansätze vorangetrieben werden.<sup>209</sup> Allerdings wird vermutet, dass neben Mutationen der Tyrosinkinasen selbst, welche die Bindung beider Therapeutika und damit die erwünschte Blockade beeinflussen, ebenso Signale aus dem Tumormikromilieu zu einem geringeren Therapieansprechen beitragen können. So konnten Shin-

ners und McWilliams bereits nachweisen, dass durch BAFF Signale über den alternativen NF- $\kappa$ B-Signalweg auch bei gleichzeitiger Inhibition der BTK vermittelt werden können.<sup>210,211</sup>

Hieran anknüpfend wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, in welchem Ausmaß das TNF-Familienmitglied BAFF, ein Faktor des *Microenvironments* von CLL-Zellen<sup>195</sup>, die Behandlung mit Ibrutinib bzw. Idelalisib beeinflusst und, darauf aufbauend, ob eine Neutralisierung dieses Moleküls durch Verwendung des Antikörpers Belimumab die Wirkung beider Substanzen verbessern kann. Dies könnte die Brücke zu Vorarbeiten von Wild et al. und Schmidt et al. schlagen, im Rahmen welcher bereits gezeigt werden konnte, dass BAFF die Suszeptibilität von CLL-Zellen gegenüber NK-Zelllyse sowie dem Bcl-2-Inhibitor Venetoclax verringert, durch Einsatz des Antikörpers Belimumab diese Effekte von BAFF jedoch aufgehoben werden können.<sup>197,212</sup>

Zu Beginn wurden zunächst für Ibrutinib wie auch für Idelalisib Dosistitrationen durchgeführt, welche stellvertretend für das allgemeine Therapieansprechen eine Abnahme der Viabilität von CLL-Zellen *in vitro* veranschaulichen sollten. Hierzu wurden ATP-Level als Indikator für die Aktivität der Atmungskette bestimmt, welche eine Aussage über die Viabilität von Zellen zulassen und hierüber das Ausmaß des therapeutischen Effekts von Ibrutinib oder Idelalisib einschätzbar machen. Für Idelalisib wurde dies zusätzlich unter Hinzunahme des CD20-Antikörpers Rituximab untersucht, wobei kein zusätzlicher therapeutischer Effekt des Antikörpers beobachtet werden konnte. Dosisabhängig führten beide *small molecule inhibitors* zu einer Verringerung der zellulären ATP-Level, wobei zwischen PBMCs verschiedener Spender große Unterschiede hinsichtlich der erzielten Wirkung beider Therapeutika beobachtet wurden. Konkret führten Ibrutinib sowie Idelalisib bei einer Konzentration von 500 nM zu einer signifikanten Reduzierung der ATP-Level der CLL-Zellen um durchschnittlich 37% bzw. 33%. Die im Rahmen pharmakokinetischer Analysen ermittelten maximalen Plasmakonzentrationen von Ibrutinib oder Idelalisib im menschlichen Organismus betragen etwa 500 nM bzw. 4200 nM.<sup>213,214</sup> Auch bei unphysiologisch hohen *in vitro* Konzentrationen, insbesondere für Ibrutinib, konnte eine Abnahme der ATP-Level als Surrogatparameter für Viabilität der CLL-Zellen



lediglich auf nahezu die Hälfte des Ausgangswertes erzielt werden. Für Ibrutinib oder Idelalisib wurde hierbei bei der jeweils maximalen, von uns untersuchten Konzentration (5000 nM bzw. 10000 nM) eine Verringerung der relativen ATP-Level auf durchschnittlich 39% bzw. 46% beobachtet. Dies deckt sich mit bestehenden Vorarbeiten zur Pharmakokinetik der verwendeten TKIs und steht im Einklang mit der Vorstellung eines „*double face*“ der *small molecule inhibitors*.<sup>215-218</sup> Demzufolge ist ihre direkte Zytotoxizität auf Zellen und damit die Induktion von Apoptose auf ein bestimmtes Ausmaß begrenzt, wohingegen ein weiterer, nicht zu vernachlässigender Anteil ihrer Wirkung auf die Störung des Zusammenspiels mit dem Tumormikromilieu entfällt.<sup>84</sup> Weiterhin ist für Ibrutinib eine halbmaximale inhibitorische Konzentration  $IC_{50}$  von 0,5 nM bekannt.<sup>219</sup> In der von uns durchgeführten Dosistitration beleuchteten wir einen Konzentrationsbereich von 0,05 nM bis 5000 nM und erfassen somit ein Konzentrationspektrum, welches die  $IC_{50}$  sowie die im Menschen maximal erreichbare Plasmakonzentration, die der von uns verwendeten Konzentration in CTG-Assays entspricht, beinhaltet. Im Rahmen der von uns durchgeführten *in vitro* Experimente konnte gezeigt werden, dass therapeutische Effekte erst bei höheren Konzentrationen in signifikantem Ausmaß zu finden sind (gemäß Abbildung 1 erst bei einer Ibrutinib-Konzentration von 25 nM), was auch von Cheng et al. beschrieben wurde.<sup>220</sup> Um ein optimales Read-Out gewährleisten zu können, wurden insbesondere in durchflusszytometrischen Untersuchungen mitunter höhere Konzentrationen von Ibrutinib eingesetzt. Es konnte durchflusszytometrisch gezeigt werden, dass die behandelten CLL-Zellen nach Exposition gegenüber Ibrutinib oder Idelalisib tatsächlich Apoptose einleiten. Hierzu trugen sowohl Analysen des mitochondrialen Membranpotentials als auch die Detektion der Aktivität der Caspase-3 bei. Gleichzeitig konnten im Rahmen unserer Experimente Unterschiede zwischen den beiden TKIs hinsichtlich ihrer Potenz, Apoptose von CLL-Zellen zu induzieren, herausgearbeitet werden. Diese ist für Ibrutinib bei derselben oder gar geringeren Konzentrationen verglichen mit Idelalisib stärker ausgeprägt, worauf bereits Erkenntnisse von Herman et al. hindeuteten. So konnte in der TMRE-Färbung bei identischen Konzentrationen für beide TKIs eine Verringerung der CLL-Zellen mit einem intakten mitochon-

drialen Membranpotential um etwa 26% durch Ibrutinib und lediglich um 18% im Falle von Idelalisib bestimmt werden. Auch die Untersuchung der Caspase-3-Aktivität ergab eine verglichen mit Idelalisib 10% stärkere Aktivität für CLL-Zellen, welche mit Ibrutinib behandelt wurden. Der Grund hierfür könnte in abweichenden pharmakokinetischen und –dynamischen Eigenschaften beider Therapeutika liegen: Im Gegensatz zu Idelalisib, welches lediglich als kompetitiver Inhibitor der PI3K wirkt, legt Ibrutinib die BTK irreversibel still.<sup>219,221</sup> Andererseits könnten diese Effekte auch auf unterschiedliche Stellenwerte der jeweilig inhibierten Proteinkinase für den Zellmetabolismus und das Überleben der CLL-Zellen zurückzuführen sein.<sup>82,83</sup>

Aus Vorarbeiten war bereits bekannt, dass BAFF neben der Verringerung der spontanen Apoptose von CLL-Zellen auch die Wirkung konventioneller Chemotherapeutika, wie die von Chlorambucil oder Flavopiridol, schmälern kann.<sup>184,185,189</sup> Hieran anknüpfend sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob und inwieweit das Molekül BAFF die therapeutische Wirkung von Ibrutinib und Idelalisib auf CLL-Zellen beeinträchtigen kann. Zu diesem Zweck wurde exogenes, rekombinant humanes BAFF in aufsteigenden Konzentrationen zu CLL-Zellen, welche gleichzeitig mit Ibrutinib oder Idelalisib inkubiert wurden, hinzugegeben. Tatsächlich konnte hierbei beobachtet werden, dass sich das Ausmaß der durch Ibrutinib und Idelalisib vermittelten Verringerung der zellulären ATP-Level umgekehrt zur Menge an verwendetem BAFF verhielt, wobei dessen schützender Effekt gegenüber beiden TKIs in etwa gleich stark ausgeprägt war. Bereits bei BAFF-Konzentrationen von 1 ng/ml konnte ein geringeres Ansprechen der CLL-Zellen auf beide verwendeten Therapeutika nachgewiesen werden. Maximale BAFF-vermittelte protektive Effekte wurden bei Konzentrationen zwischen 100 ng/ml und 500 ng/ml erreicht, welche teilweise eine vollständige Aufhebung der Wirkung von Ibrutinib oder Idelalisib auf CLL-Zellen bewirkten.<sup>198</sup> Bei Kultivierung primärer CLL-Zellen mit Ibrutinib oder Idelalisib in einer Konzentration von 500 nM konnte im Durchschnitt eine Reduktion der relativen ATP-Level auf 61% festgestellt werden. Die Zugabe von BAFF in einer Konzentration von 500 ng/ml verhinderte die Effekte der *small molecule inhibitors* (Relative ATP-Level von 100% für Ibrutinib bzw. 90% für Idelalisib). Mit

den verwendeten Mengen an BAFF in dieser Größenordnung zeigten sich die von uns durchgeführten Experimente und deren Resultate konform zu Vorarbeiten von Novak und Kern, welche einen protektiven Effekt von BAFF gegenüber Chemotherapeutika bei BAFF-Konzentrationen zwischen 100 ng/ml und 250 ng/ml ausmachen konnten.<sup>184,185</sup> Die genauen Mechanismen, welche die Grundlage für die beschriebene Wirkung von BAFF auf unter Therapie stehende CLL-Zellen bilden, sind weiterhin nur zum Teil verstanden. Wie bereits erläutert, trägt die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs entscheidend zur Vermittlung der physiologisch stattfindenden Effekte nach Bindung von BAFF an seine Rezeptoren bei. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung desselben Signalwegs, insbesondere derjenigen Transkriptionsfaktoren, welche den alternativen Teil dieser Signalkaskade bilden, auch für das verlängerte Überleben von CLL-Zellen in Anwesenheit von BAFF verantwortlich sind.<sup>222</sup> Hier schließt sich ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Proteine an, welche dazu führen, dass der natürliche Zelltod umgangen werden kann und die Empfindlichkeit der CLL-Zellen gegenüber verschiedener Therapeutika reduziert wird. Diese „Flucht“ der CLL-Zellen vor Apoptose als eines der *hallmarks of cancer* findet ihre Fortsetzung in weiteren, auf molekularer Ebene stattfindenden Mechanismen, die ein Ungleichgewicht zwischen überlebensfördernden und –limitierenden Faktoren schaffen. Woodland et al. fanden heraus, dass nicht nur das anti-apoptotische Protein Bcl-2, sondern auch das eng damit verwandte Protein Mcl-1 in CLL-Zellen überexprimiert und mitunter verantwortlich für die verlängerte Überlebenszeit von CLL-Zellen durch BAFF ist.<sup>223</sup> Beachtlich ist, dass hierdurch nicht nur das bloße Überleben von CLL-Zellen gefördert wird, vielmehr macht das vermehrte Vorkommen von Mcl-1 diese auch deutlich unempfindlicher gegenüber Chemotherapeutika wie Fludarabin oder Chlorambucil.<sup>224</sup> Schließlich scheint in diesem Kontext einer weiteren Proteinkinase, welche das Überleben peripherer B-Zellen reguliert, eine besondere Stellung zuzukommen. Konkret handelt es sich um die Serin/Threonin-Proteinkinase C $\delta$  (PKC $\delta$ ), deren Anhäufung im Zellkern über die Phosphorylierung bestimmter Histone zur Apoptose beiträgt und auf diese Weise Einfluss auf die Lebenszeit von B Zellen nimmt. Es stellte sich heraus, dass durch BAFF weniger PKC $\delta$ -

Moleküle den Weg in den Zellkern finden und hierüber Signale zum Erhalt von CLL-Zellen bevorzugt vermittelt werden.<sup>225</sup>

Als Schlussfolgerung des ersten Teils dieser Arbeit kann somit festgehalten werden, dass BAFF tatsächlich die Behandlung von CLL-Zellen mit Ibrutinib bzw. Idelalisib beeinflusst, da sich CLL-Zellen nach Kontakt mit BAFF deutlich unempfindlicher gegenüber beiden TKIs zeigen. Wie bereits zum Teil erläutert, gelingt dies hauptsächlich durch eine Imbalance zwischen pro- und anti-apoptischen Faktoren, wodurch CLL-Zellen insgesamt, sei es in An- oder Abwesenheit von Therapeutika, besser überleben können.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich, nachdem BAFF als kritischer Einflussfaktor in der Behandlung der CLL mit Ibrutinib oder Idelalisib identifiziert werden konnte, mit dem Versuch der gezielten Neutralisierung der durch BAFF vermittelten Effekte. Zu diesem Zweck wurde Belimumab, ein rekombinant hergestellter, monoklonaler, humaner Antikörper vom Typ IgG1 $\lambda$ , verwendet und hierunter die Wirksamkeit von Ibrutinib und Idelalisib im Beisein von BAFF untersucht. Dabei konnte zunächst durch die Messung intrazellulärer ATP-Level der CLL-Zellen gezeigt werden, dass Belimumab imstande ist, die protektive Wirkung des exogen hinzugefügten BAFF vollständig aufzuheben.<sup>198</sup> Die durchschnittliche Steigerung der relativen ATP-Level um 35% durch BAFF in Gegenwart der TKIs konnte nach Zugabe von Belimumab nahezu wieder auf das Ausgangsniveau reduziert werden. Dies konnte anschließend in durchflusszytometrischen Analysen des mitochondrialen Membranpotentials und der Caspase-3-Aktivität bestätigt werden.<sup>198</sup> Nach Zugabe von exogenem BAFF zeigte sich eine Steigerung von Zellen mit intaktem Membranpotential bzw. des Anteils von CLL-Zellen mit Caspase-3-Aktivität um mindestens 15% bzw. 10%. Belimumab hingegen antagonisierte diesen Effekt und führte zu einer Verringerung an Zellen mit intaktem Membranpotential bzw. Steigerung der Caspase-3-Aktivität um mindestens 10%. Interessanterweise zeigten sich bei Analyse der Caspase-3-Aktivität bei gleichzeitigem Einsatz von TKI und Belimumab teilweise höhere Effekte verglichen mit Zellen, die lediglich mit Ibrutinib oder Idelalisib behandelt wurden. Dies könnte einen ersten Hinweis dafür liefern, dass Belimumab nicht nur die Suszeptibilität von CLL-Zellen gegenüber beiden TKIs

wiederherstellen kann, sondern CLL-Zellen sogar noch empfänglicher für die zielgerichtete Therapie macht. Diese Überlegung wird ferner unterstützt durch die im Rahmen unseres Kokultur-Settings erhaltenen Ergebnisse. Hierbei ließ sich ein Vorteil des kombinierten Einsatzes von *small molecule inhibitor* und Belimumab feststellen, welcher insbesondere für Ibrutinib mit einer Steigerung des apoptotischen Anteils an CLL-Zellen um weitere 30% sehr ausgeprägt war. Anhand dieser Ergebnisse lässt sich zusammenfassend die eingangs gestellte Frage nach der Möglichkeit einer wirksamen BAFF-Neutralisation durch Belimumab zur Wiederherstellung der therapeutischen Wirksamkeit von Ibrutinib und Idelalisib eindeutig beantworten. Die Verwendung von Belimumab ermöglicht nicht nur das Erreichen der ursprünglichen therapeutischen Wirkung beider TKIs, vielmehr konnte herausgearbeitet werden, dass die Wirksamkeit der Kombinationstherapie diejenige der Einzelsubstanzen übersteigt.

Mit diesem abschließenden Resultat gelingt es dieser Arbeit, an bestehende Vorarbeiten von Wild et al. und Schmidt et al. anzuknüpfen und den Nutzen einer BAFF-Neutralisation auch für das Feld der TKIs zu demonstrieren. Es konnte gezeigt werden, dass das TNF-Familienmitglied BAFF eine zentrale Rolle in der Pathogenese der CLL, insbesondere im Hinblick auf Therapierefraktärität, einnimmt, da das Therapieansprechen sowohl der Erst- als auch Zweitlinientherapie zumindest *in vitro* maßgeblich negativ beeinflusst wird.<sup>198</sup> Daher erscheint es sinnvoll, Therapeutika, welche das Zusammenspiel von BAFF und seinen Rezeptoren unterbinden, in aktuell bestehende Therapieregimes zu integrieren. Hierzu lieferten auch McWilliams et al. einen wertvollen Beitrag, welche den Antikörper VAY-736, der gegen den BAFF-Rezeptor gerichtet ist, präklinisch testeten und hierdurch die Wirksamkeit von Ibrutinib steigern konnten.<sup>211</sup>

Im nächsten Schritt gilt es, diese aus *in vitro* Experimenten gewonnenen Erkenntnisse im lebenden Organismus nachzuvollziehen und zu verifizieren. Einen vielversprechenden Anhalt für die *in vivo* Wirksamkeit einer BAFF-Neutralisation lieferten Enzler et al. bereits im Jahr 2009. Hierbei konnte die Leukämielast in BAFF-transgenen Mäusen, welche hohe Level an BAFF aufweisen, nach Applikation der Fusionsproteine BAFF-R-Fc bzw. BCMA-Fc signifikant gesenkt werden, wobei die Effekte unter Verwendung von BCMA-Fc am

stärksten zur Geltung kamen.<sup>194</sup> Weiterhin existieren Erkenntnisse aus einer klinischen Phase-Ib-Studie, im Rahmen welcher Atacicept, ein rekombinantes Fusionsprotein, welches die Bindungsdomäne des TACI-Rezeptors aufweist, auf experimenteller Basis Patienten, die an einer refraktären Form oder einem Rezidiv der CLL litten, appliziert wurde. Hierbei konnte unter Einsatz hoher Dosen dieses Therapeutikums eine Stabilität oder teilweise sogar ein Rückgang der Erkrankung herbeigeführt werden.<sup>226</sup>

Trotz dieser bestehenden Datengrundlage fehlt es bis heute an klinischen Studien, welche den Einfluss von Substanzen zur Neutralisierung des BAFF-Effekts in Gegenwart etablierter Therapeutika zur medikamentösen Behandlung der CLL untersuchen. Ein exemplarischer Vertreter dieser Gruppe, welcher hierfür besonders geeignet sein könnte, ist der Antikörper Belimumab, der BAFF sowohl in löslicher als auch in membrangebundener Form zu binden vermag.<sup>180</sup> Dessen experimenteller Einsatz im Rahmen klinischer Studien zur Behandlung von CLL-Patienten erscheint prädestiniert in Anbetracht der Tatsache, dass viele pharmakokinetische Eigenschaften des Antikörpers bereits bekannt sind, da zahlreiche Studien zur Identifizierung seiner Wirkung auf den menschlichen Körper bis zum Erhalt der Zulassung zur Therapie des SLE bereits realisiert wurden. Ziel dieser Arbeit war es, durch die durchgeführten Experimente Belimumab präklinisch zu testen, um ihn als möglichen Kandidaten für zukünftige klinische Studien in Betracht ziehen zu können.

Die Durchführung solcher Studien erscheint auf diesem Forschungsgebiet besonders relevant, da die CLL als Erkrankung nur schwer „im Reagenzglas“ modelliert werden kann. Zentral in der Pathogenese steht das Mikromilieu, welches erst in den vergangenen Jahren allenfalls teilweise aufgeschlüsselt und verstanden wurde. Nach aktuellen Vorstellungen besteht es aus einem komplexen Gefüge aus verschiedenen Zellgruppen, welche bestimmte Adhäsionsmoleküle exprimieren und spezifische Zytokine sowie Chemokine freisetzen. Aufgrund dessen müssen die in den von uns durchgeführten Experimenten vorherrschenden Bedingungen als stark vereinfachtes Abbild der wirklichen Gegebenheiten angesehen werden. Betrachtet man die Serumkonzentrationen von

BAFF in CLL-Patienten, so fällt vielleicht etwas überraschend auf, dass diese, verglichen mit gesunden Personen, geringer ausfallen. Allerdings konnte auch nachgewiesen werden, dass niedrigere BAFF-Serumkonzentrationen mit einem klinisch schlechteren Verlauf der CLL einhergehen.<sup>190-193</sup> Dies lässt die Vermutung zu, dass freigesetztes BAFF entweder sofort von CLL-Zellen gebunden wird oder große Mengen an BAFF in Nischen, wie beispielsweise im Bereich von Lymphknoten oder im Knochenmark, zu finden sind, welche mithilfe herkömmlicher Blutuntersuchungen nicht erfasst werden können. Gerade deswegen kann hier zum einfacheren Verständnis versucht werden, die Umgebungsbedingungen der CLL-Zellen durch Zugabe von rekombinant humanem BAFF zu imitieren.

Gleichzeitig wird auf diesem Weg ersichtlich, dass der hier verfolgte therapeutische Ansatz nur eine von vielen Möglichkeiten beschreibt, die CLL auf eine neuartige Weise zu behandeln. Diese Tatsache verdeutlicht, dass die stetige Entwicklung bisher noch unbekannter Behandlungsstrategien und deren kombinierter Einsatz notwendig sein mögen, um noch größere therapeutische Erfolge auf dem Gebiet der CLL zu erzielen. Hierzu kann neben der Entwicklung von weiteren *small molecule inhibitors*, die noch selektiver wirken und so mit weniger Nebenwirkungen vergesellschaftet sind, auch das Erkunden bisher vollständig unbekannter Herangehensweisen, wie beispielsweise eine Optimierung der Erkennung der Leukämiezellen durch das Immunsystem, zählen.<sup>227</sup> Die Tatsache, dass die Immuntherapie, insbesondere der Einsatz von Antikörpern in Kombination mit neuartigen zielgerichteten Therapeutika, aktuell eine der vielversprechendsten Therapiemodalitäten zur Behandlung der CLL darstellt, wird durch neue Erkenntnisse aus der MURANO-Studie weiter untermauert. So führt die Gabe des neuesten Vertreters der *small molecule inhibitors*, Venetoclax, in Kombination mit dem CD20-Antikörper Rituximab bei refraktärer CLL oder in der Rezidivsituation zu herausragenden Ergebnissen verglichen mit den herkömmlichen Therapieregimes.<sup>73</sup> Belimumab als duales Therapeutikum, welches sowohl Effekte des *Microenvironments* durch gezielte Bindung von BAFF blockieren als auch die Potenz von CD20-Antikörpern, zumindest bei Autoimmunerkrankungen, steigern kann, ohne mit diesen, wie unsere *in vitro* Experi-

mente gezeigt haben, störend zu interferieren, besitzt ebenfalls das Potential, sich in diese erfolgsversprechende Gruppe an Therapeutika einzureihen.<sup>228</sup>

Die Immuntherapie ist somit gefragter denn je - welche Rolle genau der in dieser Arbeit thematisierten Vorgehensweise zukommt, gilt es in den sich im Planungsprozess befindlichen klinischen Studien zu ergründen.



## 5. Zusammenfassung

Die Chronisch Lymphatische Leukämie (CLL) stellt die häufigste Form der Leukämie in westlichen Nationen dar und ist zum aktuellen Zeitpunkt medikamentös in der Regel nicht heilbar. In der Behandlung kommen neben etablierten Therapieschemata konventioneller Chemotherapeutika seit 2014 zielgerichtete Medikamente (*small molecule inhibitors*) zum Einsatz. Diese Arbeit legt ihren Fokus auf Ibrutinib und Idelalisib, Vertreter der Gruppe der Tyrosinkinaseinhibitoren (TKIs). Infolge der durch Ibrutinib und Idelalisib verursachten Blockade der entsprechenden Zielenzyme Bruton-Tyrosinkinase (BTK) bzw. Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K), welche zentrale Schnittstellen im B Zell-Rezeptor Signalweg bilden, wird das Zusammenspiel zwischen leukämischer Zelle und ihrem protektiven umgebenden Mikromilieu gestört, was das Überleben der entarteten B Zellen deutlich reduziert.

Insbesondere in der Behandlung von Patientengruppen mit molekularem Risikoprofil konnten durch Einführung dieser neuartigen Substanzen im Rahmen mehrerer klinischer Studien beachtliche Erfolge erzielt werden. Nichtsdestotrotz kommt es im Verlauf der Behandlung zu einer Einschränkung des Therapieansprechens. Die für die bereits beobachteten Resistenzen verantwortlichen Mechanismen sind bisher nur unvollständig verstanden.

Die vorliegende Arbeit untersucht die Rolle des physiologisch vor allem von myeloischen Zellen produzierten und in der Entwicklung und Differenzierung von B Zellen involvierten Tumornekrosefaktor (TNF)-Familienmitglieds *B cell activa-ting factor* (BAFF), welches als zentrales Molekül im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen und B Zell-Malignomen beschrieben wurde. Die im Rahmen dieser Dissertation erarbeiteten Ergebnisse legen nahe, dass BAFF die Wirkung von Ibrutinib und Idelalisib auf CLL-Zellen einschränkt. Messungen intrazellulärer ATP-Level legten eine BAFF-vermittelte Steigerung um etwa 35% nahe und zeigten damit eine praktisch vollständige Aufhebung der therapeutischen Wirkung beider TKIs. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass Belimumab, ein monoklonaler Antikörper mit BAFF-neutralisierender Wirkung, welcher seit 2011 zur Behandlung des Systemischen Lupus Erythematoses (SLE) zugelassen ist, die durch BAFF vermittelte Resistenz von CLL-Zellen ge-

genüber beiden Therapeutika aufhebt. Auf Grundlage von Untersuchungen intrazellulärer ATP-Level sowie durchflusszytometrischer Analysen des mitochondrialen Membranpotentials sowie der Caspase-3-Aktivität bei Anwesenheit von BAFF wurde durch Hinzugabe von Belimumab eine Zunahme der TKI-vermittelten Effekte um durchschnittlich 10 bis 35% ermittelt. Diese präklinischen Ergebnisse sprechen für einen kombinierten Einsatz der TKIs und dem therapeutischen Antikörper Belimumab und bilden die Grundlage für eine gegenwärtig in Vorbereitung befindliche klinische Studie, in welcher diese Therapiekombination evaluiert werden soll.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*. 1981;48(1):198-206.
2. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1975;46(2):219-234.
3. Catovsky D, Müller-Hermelink HK, Ralfkiaer E. T-cell prolymphocytic leukemia. *Who Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. 2008:270-271.
4. Butler T, Gribben JG. Biologic and clinical significance of molecular profiling in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood Rev*. 2010;24(3):135-141.
5. Dores GM, Anderson WF, Curtis RE, et al. Chronic lymphocytic leukaemia and small lymphocytic lymphoma: overview of the descriptive epidemiology. *Br J Haematol*. 2007;139(5):809-819.
6. Rozman C, Montserrat E. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 1995;333(16):1052-1057.
7. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, et al. *SEER Cancer Statistics Review*. National Cancer Institute. Bethesda, MD;1975-2014.
8. Zhang S, Kipps TJ. The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Annu Rev Pathol*. 2014;9:103-118.
9. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, et al. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med*. 2001;194(11):1625-1638.
10. Parker DC. T cell-dependent B cell activation. *Annu Rev Immunol*. 1993;11:331-360.
11. Coutinho A, Pobor G, Pettersson S, et al. T cell-dependent B cell activation. *Immunol Rev*. 1984;78:211-224.
12. Seifert M, Kuppers R. Human memory B cells. *Leukemia*. 2016;30(12):2283-2292.
13. Gaidano G, Foa R, Dalla-Favera R. Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest*. 2012;122(10):3432-3438.
14. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2005;352(8):804-815.
15. Rassenti LZ, Jain S, Keating MJ, et al. Relative value of ZAP-70, CD38, and immunoglobulin mutation status in predicting aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008;112(5):1923-1930.
16. Bannerji R, Byrd JC. Update on the biology of chronic lymphocytic leukemia. *Curr Opin Oncol*. 2000;12(1):22-29.
17. Choudhary GS, Al-Harbi S, Mazumder S, 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;6:e1593.
18. Khaw SL, Merino D, Anderson MA, et al. Both leukaemic and normal peripheral B lymphoid cells are highly sensitive to the selective

- pharmacological inhibition of prosurvival Bcl-2 with ABT-199. *Leukemia*. 2014;28(6):1207-1215.
19. Burger JA, Gribben JG. The microenvironment in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and other B cell malignancies: insight into disease biology and new targeted therapies. *Semin Cancer Biol*. 2014;24:71-81.
  20. Ghia P, Strola G, Granziero L, et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells are endowed with the capacity to attract CD4+, CD40L+ T cells by producing CCL22. *Eur J Immunol*. 2002;32(5):1403-1413.
  21. Ruan J, Hyjek E, Kermani P, et al. Magnitude of stromal hemangiogenesis correlates with histologic subtype of non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2006;12(19):5622-5631.
  22. Herishanu Y, Perez-Galan P, Liu D, et al. The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011;117(2):563-574.
  23. Kurtova AV, Balakrishnan K, Chen R, et al. Diverse marrow stromal cells protect CLL cells from spontaneous and drug-induced apoptosis: development of a reliable and reproducible system to assess stromal cell adhesion-mediated drug resistance. *Blood*. 2009;114(20):4441-4450.
  24. Burger JA. Chemokines and chemokine receptors in chronic lymphocytic leukemia (CLL): from understanding the basics towards therapeutic targeting. *Semin Cancer Biol*. 2010;20(6):424-430.
  25. Shanafelt TD, Ghia P, Lanasa MC, Landgren O, Rawstron AC. Monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL): biology, natural history and clinical management. *Leukemia*. 2010;24(3):512-520.
  26. Rawstron AC, Bennett FL, O'Connor SJ, et al. Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2008;359(6):575-583.
  27. Vander Meeren S, Heyrman B, Renmans W, et al. Lymphoma-like monoclonal B cell lymphocytosis in a patient population: biology, natural evolution, and differences from CLL-like clones. *Ann Hematol*. 2018;97(7):1219-1227.
  28. Wadhwa PD, Morrison VA. Infectious complications of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol*. 2006;33(2):240-249.
  29. Dhalla F, Lucas M, Schuh A, et al. Antibody deficiency secondary to chronic lymphocytic leukemia: Should patients be treated with prophylactic replacement immunoglobulin? *J Clin Immunol*. 2014;34(3):277-282.
  30. DeSantis CE, Lin CC, Mariotto AB, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*. 2014;64(4):252-271.
  31. Szerafin L, Jako J, Risko F, Hevessy Z. [The prognostic value of smudge cells (Gumprecht shadows) in chronic lymphocytic leukaemia]. *Orv Hetil*. 2012;153(44):1732-1737.
  32. Gogia A, Raina V, Gupta R, et al. Prognostic and predictive significance of smudge cell percentage on routine blood smear in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2014;14(6):514-517.

33. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. In: WHO, ed. Vol 2. 4 ed. Geneva, Switz2008.
34. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 2008;111(12):5446-5456.
35. Zilfou JT, Lowe SW. Tumor suppressive functions of p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009;1(5):a001883.
36. el Rouby S, Thomas A, Costin D, et al. p53 gene mutation in B-cell chronic lymphocytic leukemia is associated with drug resistance and is independent of MDR1/MDR3 gene expression. *Blood*. 1993;82(11):3452-3459.
37. Dohner H, Fischer K, Bentz M, et al. p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood*. 1995;85(6):1580-1589.
38. Zenz T, Eichhorst B, Busch R, et al. TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2010;28(29):4473-4479.
39. Schetelig J, van Biezen A, Brand R, et al. Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia with 17p deletion: a retrospective European Group for Blood and Marrow Transplantation analysis. *J Clin Oncol*. 2008;26(31):5094-5100.
40. Dreger P, Schetelig J, Andersen N, et al. Managing high-risk CLL during transition to a new treatment era: stem cell transplantation or novel agents? *Blood*. 2014;124(26):3841-3849.
41. Ibrahim S, Keating M, Do KA, et al. CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2001;98(1):181-186.
42. Damle RN, Temburni S, Calissano C, et al. CD38 expression labels an activated subset within chronic lymphocytic leukemia clones enriched in proliferating B cells. *Blood*. 2007;110(9):3352-3359.
43. Deaglio S, Aydin S, Grand MM, et al. CD38/CD31 interactions activate genetic pathways leading to proliferation and migration in chronic lymphocytic leukemia cells. *Mol Med*. 2010;16(3-4):87-91.
44. Malavasi F, Deaglio S, Damle R, Cutrona G, Ferrarini M, Chiorazzi N. CD38 and chronic lymphocytic leukemia: a decade later. *Blood*. 2011;118(13):3470-3478.
45. Chen L, Apgar J, Huynh L, et al. ZAP-70 directly enhances IgM signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2005;105(5):2036-2041.
46. Mauro FR, Foa R, Giannarelli D, et al. Clinical characteristics and outcome of young chronic lymphocytic leukemia patients: a single institution study of 204 cases. *Blood*. 1999;94(2):448-454.
47. Flowers CR, Nabhan C, Kay NE, et al. Reasons for initiation of treatment and predictors of response for patients with Rai stage 0/1 chronic lymphocytic leukemia (CLL) receiving first-line therapy: an analysis of the Connect((R)) CLL cohort study. *Leuk Lymphoma*. 2018;59(10):2327-2335.

48. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2010;376(9747):1164-1174.
49. Fischer K, Cramer P, Busch R, et al. Bendamustine in combination with rituximab for previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia: a multicenter phase II trial of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *J Clin Oncol*. 2012;30(26):3209-3216.
50. Knauf WU, Lissitchkov T, Aldaoud A, et al. Bendamustine compared with chlorambucil in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukaemia: updated results of a randomized phase III trial. *Br J Haematol*. 2012;159(1):67-77.
51. Michallet AS, Aktan M, Hiddemann W, et al. Rituximab plus bendamustine or chlorambucil for chronic lymphocytic leukemia: primary analysis of the randomized, open-label MABLE study. *Haematologica*. 2018;103(4):698-706.
52. Osterborg A, Dyer MJ, Bunjes D, et al. Phase II multicenter study of human CD52 antibody in previously treated chronic lymphocytic leukemia. European Study Group of CAMPATH-1H Treatment in Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Clin Oncol*. 1997;15(4):1567-1574.
53. Rai KR, Freter CE, Mercier RJ, et al. Alemtuzumab in previously treated chronic lymphocytic leukemia patients who also had received fludarabine. *J Clin Oncol*. 2002;20(18):3891-3897.
54. Keating MJ, Flinn I, Jain V, et al. Therapeutic role of alemtuzumab (Campath-1H) in patients who have failed fludarabine: results of a large international study. *Blood*. 2002;99(10):3554-3561.
55. Stilgenbauer S, Dohner H. Campath-1H-induced complete remission of chronic lymphocytic leukemia despite p53 gene mutation and resistance to chemotherapy. *N Engl J Med*. 2002;347(6):452-453.
56. Lozanski G, Heerema NA, Flinn IW, et al. Alemtuzumab is an effective therapy for chronic lymphocytic leukemia with p53 mutations and deletions. *Blood*. 2004;103(9):3278-3281.
57. Kennedy B, Rawstron A, Carter C, et al. Campath-1H and fludarabine in combination are highly active in refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002;99(6):2245-2247.
58. Elter T, Borchmann P, Schulz H, et al. Fludarabine in combination with alemtuzumab is effective and feasible in patients with relapsed or refractory B-cell chronic lymphocytic leukemia: results of a phase II trial. *J Clin Oncol*. 2005;23(28):7024-7031.
59. Elter T, Gercheva-Kyuchukova L, Pylylpenko H, et al. Fludarabine plus alemtuzumab versus fludarabine alone in patients with previously treated chronic lymphocytic leukaemia: a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2011;12(13):1204-1213.
60. Lepretre S, Aurrant T, Mahe B, et al. Excess mortality after treatment with fludarabine and cyclophosphamide in combination with alemtuzumab in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia in a randomized phase 3 trial. *Blood*. 2012;119(22):5104-5110.

61. Hallek M. FCA: forget chemoimmunotherapy with alemtuzumab? *Blood*. 2012;119(22):5059-5060.
62. Feugier P, Aurrant T, Mahe B, et al. Long-term follow up of the CLL2007FMP trial evaluating fludarabine and cyclophosphamide in combination with either rituximab or alemtuzumab in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2018;103(7):e304-e306.
63. Badoux XC, Keating MJ, Wang X, et al. Fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab chemoimmunotherapy is highly effective treatment for relapsed patients with CLL. *Blood*. 2011;117(11):3016-3024.
64. Keating MJ, O'Brien S, Albitar M, et al. Early results of a chemoimmunotherapy regimen of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab as initial therapy for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2005;23(18):4079-4088.
65. Tam CS, O'Brien S, Wierda W, et al. Long-term results of the fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab regimen as initial therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008;112(4):975-980.
66. Boross P, Leusen JH. Mechanisms of action of CD20 antibodies. *Am J Cancer Res*. 2012;2(6):676-690.
67. Goede V, Fischer K, Busch R, et al. Chemoimmunotherapy with GA101 plus chlorambucil in patients with chronic lymphocytic leukemia and comorbidity: results of the CLL11 (BO21004) safety run-in. *Leukemia*. 2013;27(5):1172-1174.
68. Hillmen P, Robak T, Janssens A, et al. Chlorambucil plus ofatumumab versus chlorambucil alone in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukaemia (COMPLEMENT 1): a randomised, multicentre, open-label phase 3 trial. *Lancet*. 2015;385(9980):1873-1883.
69. Wendtner CM, Dreger P, Eichhorst B, et al. Chronische Lymphatische Leukämie (CLL). Published 2019. Accessed April 2019, 2019.
70. Anderson MA, Deng J, Seymour JF, et al. The BCL2 selective inhibitor venetoclax induces rapid onset apoptosis of CLL cells in patients via a TP53-independent mechanism. *Blood*. 2016;127(25):3215-3224.
71. Stilgenbauer S, Eichhorst B, Schetelig J, et al. Venetoclax in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion: a multicentre, open-label, phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2016;17(6):768-778.
72. Seymour JF, Mobasher M, Kater AP. Venetoclax-Rituximab in Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*. 2018;378(22):2143-2144.
73. Seymour JF, Kipps TJ, Eichhorst B, et al. Venetoclax-Rituximab in Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*. 2018;378(12):1107-1120.
74. Stilgenbauer S, Eichhorst B, Schetelig J, et al. Venetoclax for Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia With 17p Deletion: Results From the Full Population of a Phase II Pivotal Trial. *J Clin Oncol*. 2018;36(19):1973-1980.
75. Vetrie D, Vorechovsky I, Sideras P, et al. The gene involved in X-linked agammaglobulinaemia is a member of the src family of protein-tyrosine kinases. *Nature*. 1993;361(6409):226-233.

76. Tsukada S, Saffran DC, Rawlings DJ, et al. Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia. *Cell*. 1993;72(2):279-290.
77. Kil LP, de Bruijn MJ, van Hulst JA, Langerak AW, Yuvaraj S, Hendriks RW. Bruton's tyrosine kinase mediated signaling enhances leukemogenesis in a mouse model for chronic lymphocytic leukemia. *Am J Blood Res*. 2013;3(1):71-83.
78. Hoellenriegel J, Meadows SA, Sivina M, et al. The phosphoinositide 3'-kinase delta inhibitor, CAL-101, inhibits B-cell receptor signaling and chemokine networks in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011;118(13):3603-3612.
79. Davids MS, Brown JR. Phosphoinositide 3'-kinase inhibition in chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2013;27(2):329-339.
80. Lucas CL, Chandra A, Nejentsev S, Condliffe AM, Okkenhaug K. PI3Kdelta and primary immunodeficiencies. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(11):702-714.
81. Lannutti BJ, Meadows SA, Herman SE, et al. CAL-101, a p110delta selective phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor for the treatment of B-cell malignancies, inhibits PI3K signaling and cellular viability. *Blood*. 2011;117(2):591-594.
82. Herman SE, Gordon AL, Hertlein E, et al. Bruton tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765. *Blood*. 2011;117(23):6287-6296.
83. Herman SE, Gordon AL, Wagner AJ, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase-delta inhibitor CAL-101 shows promising preclinical activity in chronic lymphocytic leukemia by antagonizing intrinsic and extrinsic cellular survival signals. *Blood*. 2010;116(12):2078-2088.
84. Maffei R, Fiorcari S, Martinelli S, Potenza L, Luppi M, Marasca R. Targeting neoplastic B cells and harnessing microenvironment: the "double face" of ibrutinib and idelalisib. *J Hematol Oncol*. 2015;8:60.
85. Burger JA, Tedeschi A, Barr PM, et al. Ibrutinib as Initial Therapy for Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*. 2015;373(25):2425-2437.
86. Farooqui MZ, Valdez J, Martyr S, et al. Ibrutinib for previously untreated and relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with TP53 aberrations: a phase 2, single-arm trial. *Lancet Oncol*. 2015;16(2):169-176.
87. O'Brien S, Jones JA, Coutre SE, et al. Ibrutinib for patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion (RESONATE-17): a phase 2, open-label, multicentre study. *Lancet Oncol*. 2016;17(10):1409-1418.
88. Furman RR, Sharman JP, Coutre SE, et al. Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2014;370(11):997-1007.
89. Jones JA, Robak T, Brown JR, et al. Efficacy and safety of idelalisib in combination with ofatumumab for previously treated chronic lymphocytic



- leukaemia: an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Haematol.* 2017;4(3):e114-e126.
90. Woyach JA, Furman RR, Liu TM, et al. Resistance mechanisms for the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib. *N Engl J Med.* 2014;370(24):2286-2294.
  91. Ahn IE, Underbayev C, Albitar A, et al. Clonal evolution leading to ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2017;129(11):1469-1479.
  92. Woyach JA, Johnson AJ. Targeted therapies in CLL: mechanisms of resistance and strategies for management. *Blood.* 2015;126(4):471-477.
  93. Maddocks KJ, Ruppert AS, Lozanski G, et al. Etiology of Ibrutinib Therapy Discontinuation and Outcomes in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia. *JAMA Oncol.* 2015;1(1):80-87.
  94. Mertens D, Stilgenbauer S. Ibrutinib-resistant CLL: unwanted and unwonted! *Blood.* 2017;129(11):1407-1409.
  95. Hehlhans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology.* 2005;115(1):1-20.
  96. Helson L, Green S, Carswell E, Old LJ. Effect of tumour necrosis factor on cultured human melanoma cells. *Nature.* 1975;258(5537):731-732.
  97. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1975;72(9):3666-3670.
  98. Gravestain LA, Borst J. Tumor necrosis factor receptor family members in the immune system. *Semin Immunol.* 1998;10(6):423-434.
  99. Smith CA, Farrah T, Goodwin RG. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell.* 1994;76(6):959-962.
  100. Wu H, Hymowitz SG. Structure and function of tumor necrosis factor (TNF) at the cell surface. In: Bradshaw RA, Dennis EA, eds. *Handbook of cell signaling.* 2 ed. Oxford: Academic Press; 2009:265 - 275.
  101. Chinnaiyan AM, Tepper CG, Seldin MF, et al. FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 1996;271(9):4961-4965.
  102. Kischkel FC, Lawrence DA, Chuntharapai A, Schow P, Kim KJ, Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity.* 2000;12(6):611-620.
  103. Li J, Yin Q, Wu H. Structural basis of signal transduction in the TNF receptor superfamily. *Adv Immunol.* 2013;119:135-153.
  104. Dempsey PW, Doyle SE, He JQ, Cheng G. The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003;14(3-4):193-209.
  105. Senftleben U, Karin M. The IKK/NF-kappa B pathway. *Crit Care Med.* 2002;30(1 Suppl):S18-26.
  106. Dejardin E, Droin NM, Delhase M, et al. The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways. *Immunity.* 2002;17(4):525-535.

107. Carra G, Torti D, Crivellaro S, et al. The BCR-ABL/NF-kappaB signal transduction network: a long lasting relationship in Philadelphia positive Leukemias. *Oncotarget*. 2016;7(40):66287-66298.
108. Pickering BM, de Mel S, Lee M, et al. Pharmacological inhibitors of NF-kappaB accelerate apoptosis in chronic lymphocytic leukaemia cells. *Oncogene*. 2007;26(8):1166-1177.
109. Claudio E, Brown K, Park S, Wang H, Siebenlist U. BAFF-induced NEMO-independent processing of NF-kappa B2 in maturing B cells. *Nat Immunol*. 2002;3(10):958-965.
110. Kayagaki N, Yan M, Seshasayee D, et al. BAFF/BLyS receptor 3 binds the B cell survival factor BAFF ligand through a discrete surface loop and promotes processing of NF-kappaB2. *Immunity*. 2002;17(4):515-524.
111. Peschon JJ, Slack JL, Reddy P, et al. An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science*. 1998;282(5392):1281-1284.
112. Bodmer JL, Schneider P, Tschopp J. The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem Sci*. 2002;27(1):19-26.
113. Mackay F, Mackay CR. The role of BAFF in B-cell maturation, T-cell activation and autoimmunity. *Trends Immunol*. 2002;23(3):113-115.
114. Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech*. 2000;50(3):184-195.
115. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(9):745-756.
116. Schneider P, Mackay F, Steiner V, et al. BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. *J Exp Med*. 1999;189(11):1747-1756.
117. Gruys E, Toussaint MJ, Niewold TA, Koopmans SJ. Acute phase reaction and acute phase proteins. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2005;6(11):1045-1056.
118. Lin PL, Plessner HL, Voitenok NN, Flynn JL. Tumor necrosis factor and tuberculosis. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 2007;12(1):22-25.
119. Yamanaka H. TNF as a Target of Inflammation in Rheumatoid Arthritis. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2015;15(2):129-134.
120. Yost J, Gudjonsson JE. The role of TNF inhibitors in psoriasis therapy: new implications for associated comorbidities. *F1000 Med Rep*. 2009;1.
121. Bandzar S, Gupta S, Platt MO. Crohn's disease: a review of treatment options and current research. *Cell Immunol*. 2013;286(1-2):45-52.
122. Mackay F, Schneider P, Rennert P, Browning J. BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:231-264.
123. Kalled SL. The role of BAFF in immune function and implications for autoimmunity. *Immunol Rev*. 2005;204:43-54.
124. Sasaki Y, Casola S, Kutok JL, Rajewsky K, Schmidt-Supprian M. TNF family member B cell-activating factor (BAFF) receptor-dependent and -independent roles for BAFF in B cell physiology. *J Immunol*. 2004;173(4):2245-2252.

125. Gross JA, Dillon SR, Mudri S, et al. TACI-Ig neutralizes molecules critical for B cell development and autoimmune disease. impaired B cell maturation in mice lacking BLYS. *Immunity*. 2001;15(2):289-302.
126. Mackay F, Schneider P. Cracking the BAFF code. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(7):491-502.
127. Nardelli B, Belvedere O, Roschke V, et al. Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells. *Blood*. 2001;97(1):198-204.
128. Scapini P, Nardelli B, Nadali G, et al. G-CSF-stimulated neutrophils are a prominent source of functional BLYS. *J Exp Med*. 2003;197(3):297-302.
129. Huard B, Arlettaz L, Ambrose C, et al. BAFF production by antigen-presenting cells provides T cell co-stimulation. *Int Immunol*. 2004;16(3):467-475.
130. Youinou P, Pers JO. Disturbance of cytokine networks in Sjogren's syndrome. *Arthritis Res Ther*. 2011;13(4):227.
131. Karpusas M, Cachero TG, Qian F, et al. Crystal structure of extracellular human BAFF, a TNF family member that stimulates B lymphocytes. *J Mol Biol*. 2002;315(5):1145-1154.
132. Cachero TG, Schwartz IM, Qian F, et al. Formation of virus-like clusters is an intrinsic property of the tumor necrosis factor family member BAFF (B cell activating factor). *Biochemistry*. 2006;45(7):2006-2013.
133. Liu Y, Hong X, Kappler J, et al. Ligand-receptor binding revealed by the TNF family member TALL-1. *Nature*. 2003;423(6935):49-56.
134. Bossen C, Schneider P. BAFF, APRIL and their receptors: structure, function and signaling. *Semin Immunol*. 2006;18(5):263-275.
135. Thompson JS, Bixler SA, Qian F, et al. BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF. *Science*. 2001;293(5537):2108-2111.
136. Ng LG, Sutherland AP, Newton R, et al. B cell-activating factor belonging to the TNF family (BAFF)-R is the principal BAFF receptor facilitating BAFF costimulation of circulating T and B cells. *J Immunol*. 2004;173(2):807-817.
137. von Bulow GU, Bram RJ. NF-AT activation induced by a CAML-interacting member of the tumor necrosis factor receptor superfamily. *Science*. 1997;278(5335):138-141.
138. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:621-663.
139. Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol*. 2001;11(9):372-377.
140. Gardam S, Brink R. Non-Canonical NF- $\kappa$ B Signaling Initiated by BAFF Influences B Cell Biology at Multiple Junctions. *Front Immunol*. 2014;4:509.
141. Bossen C, Cachero TG, Tardivel A, et al. TACI, unlike BAFF-R, is solely activated by oligomeric BAFF and APRIL to support survival of activated B cells and plasmablasts. *Blood*. 2008;111(3):1004-1012.
142. Mackay F, Schneider P. TACI, an enigmatic BAFF/APRIL receptor, with new unappreciated biochemical and biological properties. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2008;19(3-4):263-276.

143. Castigli E, Wilson SA, Scott S, et al. TACI and BAFF-R mediate isotype switching in B cells. *J Exp Med*. 2005;201(1):35-39.
144. Seshasayee D, Valdez P, Yan M, Dixit VM, Tumas D, Grewal IS. Loss of TACI causes fatal lymphoproliferation and autoimmunity, establishing TACI as an inhibitory BLyS receptor. *Immunity*. 2003;18(2):279-288.
145. Sakurai D, Kanno Y, Hase H, Kojima H, Okumura K, Kobata T. TACI attenuates antibody production costimulated by BAFF-R and CD40. *Eur J Immunol*. 2007;37(1):110-118.
146. Darce JR, Arendt BK, Wu X, Jelinek DF. Regulated expression of BAFF-binding receptors during human B cell differentiation. *J Immunol*. 2007;179(11):7276-7286.
147. O'Connor BP, Raman VS, Erickson LD, et al. BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells. *J Exp Med*. 2004;199(1):91-98.
148. Hatzoglou A, Roussel J, Bourgeade MF, et al. TNF receptor family member BCMA (B cell maturation) associates with TNF receptor-associated factor (TRAF) 1, TRAF2, and TRAF3 and activates NF-kappa B, elk-1, c-Jun N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Immunol*. 2000;165(3):1322-1330.
149. Yang M, Hase H, Legarda-Addison D, Varughese L, Seed B, Ting AT. B cell maturation antigen, the receptor for a proliferation-inducing ligand and B cell-activating factor of the TNF family, induces antigen presentation in B cells. *J Immunol*. 2005;175(5):2814-2824.
150. Huard B, McKee T, Bosshard C, et al. APRIL secreted by neutrophils binds to heparan sulfate proteoglycans to create plasma cell niches in human mucosa. *J Clin Invest*. 2008;118(8):2887-2895.
151. Abe M, Kido S, Hiasa M, et al. BAFF and APRIL as osteoclast-derived survival factors for myeloma cells: a rationale for TACI-Fc treatment in patients with multiple myeloma. *Leukemia*. 2006;20(7):1313-1315.
152. Pelekanou V, Kampa M, Kafousi M, et al. Expression of TNF-superfamily members BAFF and APRIL in breast cancer: immunohistochemical study in 52 invasive ductal breast carcinomas. *BMC Cancer*. 2008;8:76.
153. Lopez-Fraga M, Fernandez R, Albar JP, Hahne M. Biologically active APRIL is secreted following intracellular processing in the Golgi apparatus by furin convertase. *EMBO Rep*. 2001;2(10):945-951.
154. Yu G, Boone T, Delaney J, et al. APRIL and TALL-I and receptors BCMA and TACI: system for regulating humoral immunity. *Nat Immunol*. 2000;1(3):252-256.
155. Hardenberg G, van Bostelen L, Hahne M, Medema JP. Thymus-independent class switch recombination is affected by APRIL. *Immunol Cell Biol*. 2008;86(6):530-534.
156. Belnoue E, Pihlgren M, McGaha TL, et al. APRIL is critical for plasmablast survival in the bone marrow and poorly expressed by early-life bone marrow stromal cells. *Blood*. 2008;111(5):2755-2764.
157. Stein JV, Lopez-Fraga M, Elustondo FA, et al. APRIL modulates B and T cell immunity. *J Clin Invest*. 2002;109(12):1587-1598.

158. Barbosa RR, Silva SL, Silva SP, et al. Reduced BAFF-R and increased TACI expression in common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol.* 2014;34(5):573-583.
159. Krumbholz M, Specks U, Wick M, Kalled SL, Jenne D, Meinl E. BAFF is elevated in serum of patients with Wegener's granulomatosis. *J Autoimmun.* 2005;25(4):298-302.
160. Krumbholz M, Theil D, Derfuss T, et al. BAFF is produced by astrocytes and up-regulated in multiple sclerosis lesions and primary central nervous system lymphoma. *J Exp Med.* 2005;201(2):195-200.
161. Nakajima K, Itoh K, Nagatani K, et al. Expression of BAFF and BAFF-R in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol.* 2007;36(5):365-372.
162. Groom J, Kalled SL, Cutler AH, et al. Association of BAFF/BLyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjogren's syndrome. *J Clin Invest.* 2002;109(1):59-68.
163. Mackay IR, Groom J, Mackay CR. Levels of BAFF in serum in primary biliary cirrhosis and autoimmune diabetes. *Autoimmunity.* 2002;35(8):551-553.
164. Pers JO, Daridon C, Devauchelle V, et al. BAFF overexpression is associated with autoantibody production in autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1050:34-39.
165. Seyler TM, Park YW, Takemura S, et al. BLyS and APRIL in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.* 2005;115(11):3083-3092.
166. Rihacek M, Bienertova-Vasku J, Valik D, Sterba J, Pilatova K, Zdrzilova-Dubská L. B-Cell Activating Factor as a Cancer Biomarker and Its Implications in Cancer-Related Cachexia. *Biomed Res Int.* 2015;2015:792187.
167. Zollars E, Bienkowska J, Czerkowicz J, et al. BAFF (B cell activating factor) transcript level in peripheral blood of patients with SLE is associated with same-day disease activity as well as global activity over the next year. *Lupus Sci Med.* 2015;2(1):e000063.
168. Liu Z, Davidson A. BAFF and selection of autoreactive B cells. *Trends Immunol.* 2011;32(8):388-394.
169. Mackay F, Woodcock SA, Lawton P, et al. Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. *J Exp Med.* 1999;190(11):1697-1710.
170. Khare SD, Sarosi I, Xia XZ, et al. Severe B cell hyperplasia and autoimmune disease in TALL-1 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(7):3370-3375.
171. Gross JA, Johnston J, Mudri S, et al. TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease. *Nature.* 2000;404(6781):995-999.
172. Ramanujam M, Wang X, Huang W, et al. Mechanism of action of transmembrane activator and calcium modulator ligand interactor-Ig in murine systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 2004;173(5):3524-3534.

173. Ramanujam M, Wang X, Huang W, et al. Similarities and differences between selective and nonselective BAFF blockade in murine SLE. *J Clin Invest.* 2006;116(3):724-734.
174. Zhang J, Roschke V, Baker KP, et al. Cutting edge: a role for B lymphocyte stimulator in systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 2001;166(1):6-10.
175. Cheema GS, Roschke V, Hilbert DM, Stohl W. Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. *Arthritis Rheum.* 2001;44(6):1313-1319.
176. Stohl W, Metyas S, Tan SM, et al. B lymphocyte stimulator overexpression in patients with systemic lupus erythematosus: longitudinal observations. *Arthritis Rheum.* 2003;48(12):3475-3486.
177. McCarthy EM, Lee RZ, Ni Gabhann J, et al. Elevated B lymphocyte stimulator levels are associated with increased damage in an Irish systemic lupus erythematosus cohort. *Rheumatology (Oxford).* 2013;52(7):1279-1284.
178. Doria A, Stohl W, Schwarting A, et al. Efficacy and Safety of Subcutaneous Belimumab in Anti-Double-Stranded DNA-Positive, Hypocomplementemic Patients With Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol.* 2018;70(8):1256-1264.
179. Shin W, Lee HT, Lim H, et al. BAFF-neutralizing interaction of belimumab related to its therapeutic efficacy for treating systemic lupus erythematosus. *Nat Commun.* 2018;9(1):1200.
180. Kowalczyk-Quintas C, Chevalley D, Willen L, Jandus C, Vigolo M, Schneider P. Inhibition of Membrane-Bound BAFF by the Anti-BAFF Antibody Belimumab. *Front Immunol.* 2018;9:2698.
181. Pan J, Sun Y, Zhang N, et al. Characteristics of BAFF and APRIL factor expression in multiple myeloma and clinical significance. *Oncol Lett.* 2017;14(3):2657-2662.
182. Novak AJ, Grote DM, Stenson M, et al. Expression of BLyS and its receptors in B-cell non-Hodgkin lymphoma: correlation with disease activity and patient outcome. *Blood.* 2004;104(8):2247-2253.
183. Kim SJ, Lee SJ, Choi IY, et al. Serum BAFF predicts prognosis better than APRIL in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with rituximab plus CHOP chemotherapy. *Eur J Haematol.* 2008;81(3):177-184.
184. Novak AJ, Bram RJ, Kay NE, Jelinek DF. Aberrant expression of B-lymphocyte stimulator by B chronic lymphocytic leukemia cells: a mechanism for survival. *Blood.* 2002;100(8):2973-2979.
185. Kern C, Cornuel JF, Billard C, et al. Involvement of BAFF and APRIL in the resistance to apoptosis of B-CLL through an autocrine pathway. *Blood.* 2004;103(2):679-688.
186. Nishio M, Endo T, Tsukada N, et al. Nurse-like cells express BAFF and APRIL, which can promote survival of chronic lymphocytic leukemia cells via a paracrine pathway distinct from that of SDF-1alpha. *Blood.* 2005;106(3):1012-1020.
187. Burger JA, Tsukada N, Burger M, Zvaifler NJ, Dell'Aquila M, Kipps TJ. Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B

- cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood*. 2000;96(8):2655-2663.
188. Cols M, Barra CM, He B, et al. Stromal endothelial cells establish a bidirectional crosstalk with chronic lymphocytic leukemia cells through the TNF-related factors BAFF, APRIL, and CD40L. *J Immunol*. 2012;188(12):6071-6083.
189. Ghamlouch H, Ouled-Haddou H, Damaj G, Royer B, Gubler B, Marolleau JP. A combination of cytokines rescues highly purified leukemic CLL B-cells from spontaneous apoptosis in vitro. *PLoS One*. 2013;8(3):e60370.
190. Sawicka-Powierza J, Jablonska E, Kloczko J, Piszcz J, Garley M, Ratajczk-Wrona W. Evaluation of TNF superfamily molecules release by neutrophils and B leukemic cells of patients with chronic B - cell lymphocytic leukemia. *Neoplasma*. 2011;58(1):45-50.
191. Kreuzaler M, Rauch M, Salzer U, et al. Soluble BAFF levels inversely correlate with peripheral B cell numbers and the expression of BAFF receptors. *J Immunol*. 2012;188(1):497-503.
192. Bojarska-Junak A, Hus I, Chocholska S, et al. BAFF and APRIL expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: correlation with biological and clinical features. *Leuk Res*. 2009;33(10):1319-1327.
193. Molica S, Digiesi G, Battaglia C, et al. Baff serum level predicts time to first treatment in early chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol*. 2010;85(4):314-320.
194. Enzler T, Kater AP, Zhang W, et al. Chronic lymphocytic leukemia of Emu-TCL1 transgenic mice undergoes rapid cell turnover that can be offset by extrinsic CD257 to accelerate disease progression. *Blood*. 2009;114(20):4469-4476.
195. Simon-Gabriel CP, Foerster K, Saleem S, et al. Microenvironmental stromal cells abrogate NF-kappaB inhibitor-induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2018;103(1):136-147.
196. Wild J. *Rolle des TNF-Familienmitgliedes BAFF und seiner Neutralisation durch Belimumab für die Suszeptibilität von CLL-Zellen gegenüber NK-Zellyse und Systemtherapie* [Dissertation]. Tübingen: Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Eberhard-Karls-Universität; 2016.
197. Schmidt J. *Neutralisation des TNF-Familienmitglieds BAFF durch Belimumab zur Verstärkung der Suszeptibilität von CLL-Zellen gegenüber Therapie mit ABT-199* [Dissertation]. Tübingen: Medizinische Fakultät, Eberhard-Karls-Universität; 2017.
198. Tandler C, Schmidt M, Heitmann JS, et al. Neutralization of B-Cell Activating Factor (BAFF) by Belimumab Reinforces Small Molecule Inhibitor Treatment in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancers (Basel)*. 2020;12(10).
199. Lwin T, Crespo LA, Wu A, et al. Lymphoma cell adhesion-induced expression of B cell-activating factor of the TNF family in bone marrow stromal cells protects non-Hodgkin's B lymphoma cells from apoptosis. *Leukemia*. 2009;23(1):170-177.

200. Gopal AK, Kahl BS, de Vos S, et al. PI3Kdelta inhibition by idelalisib in patients with relapsed indolent lymphoma. *N Engl J Med*. 2014;370(11):1008-1018.
201. Robak T, Burger JA, Tedeschi A, et al. Single-agent ibrutinib versus chemoimmunotherapy regimens for treatment-naive patients with chronic lymphocytic leukemia: A cross-trial comparison of phase 3 studies. *Am J Hematol*. 2018.
202. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674.
203. Woyach JA, Bojnik E, Ruppert AS, et al. Bruton's tyrosine kinase (BTK) function is important to the development and expansion of chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Blood*. 2014;123(8):1207-1213.
204. Okkenhaug K, Burger JA. PI3K Signaling in Normal B Cells and Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). *Curr Top Microbiol Immunol*. 2016;393:123-142.
205. Ortiz-Maldonado V, Garcia-Morillo M, Delgado J. The biology behind PI3K inhibition in chronic lymphocytic leukaemia. *Ther Adv Hematol*. 2015;6(1):25-36.
206. Jaglowski SM, Blazar BR. How ibrutinib, a B-cell malignancy drug, became an FDA-approved second-line therapy for steroid-resistant chronic GVHD. *Blood Adv*. 2018;2(15):2012-2019.
207. Molina-Cerrillo J, Alonso-Gordoa T, Gajate P, Grande E. Bruton's tyrosine kinase (BTK) as a promising target in solid tumors. *Cancer Treat Rev*. 2017;58:41-50.
208. Chalhoub N, Baker SJ. PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu Rev Pathol*. 2009;4:127-150.
209. Valent P. Imatinib-resistant chronic myeloid leukemia (CML): Current concepts on pathogenesis and new emerging pharmacologic approaches. *Biologics*. 2007;1(4):433-448.
210. Shinnars NP, Carlesso G, Castro I, et al. Bruton's tyrosine kinase mediates NF-kappa B activation and B cell survival by B cell-activating factor receptor of the TNF-R family. *J Immunol*. 2007;179(6):3872-3880.
211. McWilliams EM, Lucas CR, Chen T, et al. Anti-BAFF-R antibody VAY-736 demonstrates promising preclinical activity in CLL and enhances effectiveness of ibrutinib. *Blood Adv*. 2019;3(3):447-460.
212. Wild J, Schmiedel BJ, Maurer A, et al. Neutralization of (NK-cell-derived) B-cell activating factor by Belimumab restores sensitivity of chronic lymphoid leukemia cells to direct and Rituximab-induced NK lysis. *Leukemia*. 2015;29(8):1676-1683.
213. Levade M, David E, Garcia C, et al. Ibrutinib treatment affects collagen and von Willebrand factor-dependent platelet functions. *Blood*. 2014;124(26):3991-3995.
214. Ramanathan S, Jin F, Sharma S, Kearney BP. Clinical Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Profile of Idelalisib. *Clin Pharmacokinet*. 2016;55(1):33-45.
215. Amin NA, Balasubramanian S, Saiya-Cork K, Shedden K, Hu N, Malek SN. Cell-Intrinsic Determinants of Ibrutinib-Induced Apoptosis in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin Cancer Res*. 2017;23(4):1049-1059.



216. Voltan R, Rimondi E, Melloni E, et al. Ibrutinib synergizes with MDM-2 inhibitors in promoting cytotoxicity in B chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget*. 2016;7(43):70623-70638.
217. Primo D, Scarfo L, Xochelli A, et al. A novel ex vivo high-throughput assay reveals antiproliferative effects of idelalisib and ibrutinib in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget*. 2018;9(40):26019-26031.
218. Huynh HH, Roessle C, Sauvageon H, et al. Quantification of Idelalisib in Human Plasma by Ultra-Performance Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry in Negative Ionization Mode. *Ther Drug Monit*. 2018;40(2):237-244.
219. Honigberg LA, Smith AM, Sirisawad M, et al. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(29):13075-13080.
220. Cheng S, Ma J, Guo A, et al. BTK inhibition targets in vivo CLL proliferation through its effects on B-cell receptor signaling activity. *Leukemia*. 2014;28(3):649-657.
221. Yang Q, Modi P, Newcomb T, Queva C, Gandhi V. Idelalisib: First-in-Class PI3K Delta Inhibitor for the Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia, Small Lymphocytic Leukemia, and Follicular Lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2015;21(7):1537-1542.
222. Endo T, Nishio M,ENZLER T, et al. BAFF and APRIL support chronic lymphocytic leukemia B-cell survival through activation of the canonical NF-kappaB pathway. *Blood*. 2007;109(2):703-710.
223. Woodland RT, Fox CJ, Schmidt MR, et al. Multiple signaling pathways promote B lymphocyte stimulator dependent B-cell growth and survival. *Blood*. 2008;111(2):750-760.
224. Kitada S, Andersen J, Akar S, et al. Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with In vitro and In vivo chemoresponses. *Blood*. 1998;91(9):3379-3389.
225. Mecklenbrauker I, Kalled SL, Leitges M, Mackay F, Tarakhovskiy A. Regulation of B-cell survival by BAFF-dependent PKCdelta-mediated nuclear signalling. *Nature*. 2004;431(7007):456-461.
226. Kofler DM, Gawlik BB, Elter T, Gianella-Borradori A, Wendtner CM, Hallek M. Phase 1b trial of atacicept, a recombinant protein binding BLyS and APRIL, in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2012;26(4):841-844.
227. Schneidt V, Ilecka M, Dreger P, et al. Antibodies conjugated with viral antigens elicit a cytotoxic T cell response against primary CLL ex vivo. *Leukemia*. 2018.
228. Kraaij T, Kamerling SWA, de Rooij ENM, et al. The NET-effect of combining rituximab with belimumab in severe systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun*. 2018;91:45-54.

## **7. Erklärung zum Eigenanteil**

Die Arbeit wurde in der Abteilung „Klinische Kooperationseinheit Translationale Immunologie“ des Deutschen Konsortiums für Translationale Krebsforschung (DKTK) am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) am Partnerstandort Tübingen im Department für Innere Medizin des Universitätsklinikums Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. Helmut R. Salih durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Prof. Dr. Helmut R. Salih.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Frau Claudia Tandler von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Einarbeitung durch Frau Claudia Tandler eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

## 8. Publikationen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Tandler C, Schmidt M, Heitmann JS, Hierold J, Schmidt J, Schneider P, Dörfel D, Walz J, Salih HR.

Neutralization of B-Cell Activating Factor (BAFF) by Belimumab Reinforces Small Molecule Inhibitor Treatment in Chronic Lymphocytic Leukemia.

Cancers (Basel). 2020 Sep 23;12(10)