

Aus der
Neurologischen Universitätsklinik Tübingen
Abteilung Neurologie mit Schwerpunkt
neurovaskuläre Erkrankungen

**Charakterisierung CD20-positiver T-Zellen in Zellkultur und
im zeitlichen Verlauf unter Ocrelizumab-Therapie
bei Patienten mit Multipler Sklerose**

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

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

vorgelegt von

Schlotterbek, Michael Christian Lenard

2023

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Krumbholz

2. Berichterstatter: Professorin Dr. S. E. Autenrieth

Tag der Disputation: 27.06.2023

Inhaltsverzeichnis

<i>Inhaltsverzeichnis</i>	3
<i>Tabellen- und Abbildungsverzeichnis</i>	6
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	9
1 Einleitung	11
1.1 Multiple Sklerose	11
1.1.1 Epidemiologie.....	11
1.1.2 Ätiologie.....	12
1.1.3 Pathophysiologie.....	12
1.1.4 Symptome und Verlaufsformen	14
1.1.5 Ocrelizumab und Rituximab als B-Zell-depletierende Therapie.....	15
1.2 CD3 ⁺ CD20 ^{dim} Zellen.....	17
1.2.1 Initiale Kontroverse über die Existenz von CD3 ⁺ CD20 ^{dim} Zellen	17
1.2.2 Verteilung von CD3 ⁺ CD20 ^{dim} Zellen in gesunden Probanden, unterschiedlichen Erkrankungen, sowie Unterschiede im Phänotyp zu CD20-negativen T-Zellen	19
1.2.2.1 In gesunden Probanden	19
1.2.2.2 In Patienten mit MS	20
1.2.2.3 In weiteren (autoimmunologischen) Erkrankungen.....	21
1.2.3 Unterschiede im Phänotyp von CD3 ⁺ CD20 ^{dim} Zellen verglichen zu CD20-negativen T-Zellen	22
1.2.4 CD20 als Ziel für B-Zell depletierende Therapien	23
1.2.4.1 Funktionen des CD20-Proteins	23
1.2.4.2 Unterschiede in anti-CD20-Antikörpern	24
1.2.4.3 CD3 ⁺ CD20 ^{dim} Zellzahl nach anti-CD20-Therapie: Kinetik und Depletion vs. Kaschierung.....	25
1.3 <i>In vitro</i> Stimulation von T-Zellen und CD3 ⁺ CD20 ^{dim} Zellen speziell.....	27
1.3.1 Gängige Stimulationsmethoden	27
1.3.2 Bislang bekannte Effekte einer T-Zell-Stimulation auf CD3 ⁺ CD20 ^{dim} Zellen	28
1.4 Fragestellungen dieser Arbeit.....	28

1.4.1 Findet nach Gabe therapeutischer anti-CD20-Antikörper eine echte Depletion von CD3 ⁺ CD20 ^{dim} Zellen oder nur eine Kaschierung der Nachweisbarkeit von CD20 statt?	29
1.4.2 Findet sich eine Änderung der CD20-Expression <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> durch T-Zell-Stimulation?	29
1.4.3 Gibt es CD3 ⁺ CD20 ^{dim} Zellen <i>in vivo</i> auch ohne externe Antigen-Stimulation?	30
1.4.4 Finden sich Gemeinsamkeiten im TCR-Repertoire von CD3 ⁺ CD20 ^{dim} <i>memory</i> Zellen im Vergleich zu CD3 ⁺ CD20 ^{neg} <i>memory</i> Zellen als Hinweis auf eine gemeinsame Abstammung dieser Zellen?	30
2 Material und Methoden	31
2.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien, Antikörper	31
2.1.1 Geräte & Software	31
2.1.2 Verbrauchsmaterialien, Reagenzien, Lösungen	31
2.1.3 Konjugierte Antikörper für Durchflusszytometrie/FACS	33
2.1.4 Weitere Antikörper, Beads, Apoptosemarker	34
2.2 Patientenkollektiv und gesunde Probanden	35
2.3 Probenbearbeitung für analytische Durchflusszytometrie & FACS mit Sortieren von PBMC	38
2.3.1 PBMC-Isolation aus EDTA-Vollblut	38
2.3.2 Probenbearbeitung aus EDTA-Vollblut ohne Dichtegradienten	38
2.3.3 Färbung mittels konjugierter Antikörper	39
2.3.4 Versuche zur Kompetition von anti-CD20-Antikörpern	39
2.3.5 Spezielle Probenbearbeitung für FACS von CD3 ⁺ CD20 ^{dim} Zellen zur anschließenden TCR-Sequenzierung und <i>in vitro</i> Stimulation	40
2.3.6 Spezielle Probenbearbeitung für durchflusszytometrische Untersuchungen von CD19-spezifischen CAR-T-Zellen	41
2.4 Methoden zur <i>in vitro</i> Stimulation von T-Zellen	42
2.5 Durchflusszytometrie	43
2.6 Probenbearbeitung zur TCR-Sequenzierung	45
2.7 Statistische Auswertung	45
3 Ergebnisse	47
3.1 CD20 lässt sich auf einer kleinen Population nicht-T-, nicht-B-Zellen nachweisen	47
3.2 Verlauf der CD3 ⁺ CD20 ^{dim} T-Zellzahl unter Therapie mit anti-CD20-Antikörpern	49

3.2.1.1 Kinetik der Zunahme der CD3 ⁺ CD20 ^{dim} T-Zell-Zahl.....	49
3.2.1.2 Unter Therapie mit anti-CD20-Antikörpern kommt es zu einer signifikanten Abnahme der <i>mean fluorescence intensity</i> für CD20 von CD3 ⁺ CD20 ^{dim} Zellen	53
3.2.2 Stabile Repletion der CD3 ⁺ CD20 ^{dim} T-Zellen auch nach späteren Zyklen mit OCR und RTX.....	55
3.2.3 CD3 ⁺ CD20 ^{dim} Zellen sind nach der Erstgabe OCR nicht nur maskiert, sondern tatsächlich depletiert	56
3.3 Wirkung von <i>in vivo</i> Antigenkontakt auf die CD20-Expression von T-Zellen	62
3.3.1 Vorkommen von CD20 in geringem Ausmaß auf CD19-spezifischen CAR-T-Zellen bei Patienten unter CAR-T-Zell-Therapie.....	64
3.3.2 CD3 ⁺ CD20 ^{dim} Zellen in CBMC zeigen einen vorwiegend naiven Phänotyp	66
3.3.3 Die Verteilung von <i>naive/memory</i> - sowie CD4 ⁺ /CD8 ⁺ T-Zell- Subpopulationen in CD3 ⁺ CD20 ^{dim} Zellen in erwachsenen Probanden bleibt in einem mittelfristigen Intervall nahezu konstant.....	69
3.4 Diskrete Steigerung des Anteils von CD3 ⁺ CD20 ^{dim} Zellen an T-Zellen <i>in vitro</i> durch T-Zellstimulation	72
3.5 αβ-TCR-Repertoire von CD3 ⁺ CD20 ^{dim} memory Zellen zeigt eine hohe Diversität und Überlappungen mit CD3 ⁺ CD20 ^{neg} T-Zellen	78
3.6 Nachweis von CD3 ⁺ CD20 ^{dim} Zellen in einem Patienten mit Bruton- Syndrom.....	82
4 Diskussion.....	83
5 Zusammenfassung.....	90
6 Literaturverzeichnis	92
7 Erklärung zum Eigenanteil	95
8 Danksagung.....	97

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1:	Verbrauchsmaterialien.....	31
Tabelle 2:	Reagenzien.....	32
Tabelle 3:	Selbst angesetzte Lösungen, Puffer, Medien und deren Zusammensetzung.....	32
Tabelle 4:	Konjugierte Antikörper für Durchflusszytometrie/FACS.....	33
Tabelle 5:	Weitere Antikörper, Beads, Apoptosemarker	34
Tabelle 6:	Hintergrundinformationen zu Patienten mit erhöhtem CRP, gesunden erwachsenen Probanden.....	35
Tabelle 7:	Hintergrundinformationen zu Patienten unter OCR-/RTX-Therapie.....	36
Tabelle 8:	Hintergrundinformationen zu Patienten unter CAR-T-Zelltherapie.....	37
Tabelle 9:	Anzahl der sortierten Zellen, der Gesamtanzahl an TCR-Sequenzen und unterschiedlichen TCR-Sequenzen (<i>clonotypes</i>) pro Probe.....	80
Tabelle 10:	Variable Häufigkeit der sich überlappenden einzigartigen TCR-Sequenzen (<i>clonotypes</i>) in den verglichenen CD20 ^{dim} /CD20 ^{neg} Populationen.....	82

Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1:	CD3 ⁺ CD20 ^{dim} Zellen stellen sich als Einzelzellen sowie weniger hell für CD20 verglichen zu einer B-T-Zell-Doublette dar.....	18
Abbildung 2:	Eigener Versuch mit repräsentativer Darstellung von CD3 ⁺ CD20 ^{dim} Zellen mittels Durchflusszytometrie von PBMC eines gesunden Probanden....	19
Abbildung 3:	Schematische Struktur des CD20-Moleküls mit den Epitopen der jeweiligen Antikörper, extrazelluläre Anteile als Aminosäuren (Einzelbuchstabencode) dargestellt.....	25
Abbildung 4:	Repräsentative Gating-Strategie für Durchflusszytometrie von PBMC bei Patienten und gesunden Probanden.....	44
Abbildung 5:	Gating-Strategie für NK- und NK-T-Zellen.....	47
Abbildung 6:	Abnahme des Anteils von CD20 ^{dim} NK-Zellen an NK-Zellen in Patienten mit MS nach der Erstgabe OCR.	48
Abbildung 7:	Signifikante Abnahme der CD3 ⁺ CD20 ^{dim} Zellzahl unter anti-CD20-Antikörper-Therapie nach Baseline, gefolgt von einer langsamen Zunahme.	51
Abbildung 8:	CD3 ⁺ CD20 ^{dim} Zellen regenerieren schneller als B-Zellen unter anti-CD20-Antikörpertherapie.....	52
Abbildung 9:	Signifikante Abnahme der MFI von CD3 ⁺ CD20 ^{dim} Zellen für CD20 unter Therapie mit anti-CD20-Antikörpern.....	53
Abbildung 10:	CD3 ⁺ CD20 ^{dim} Zellen zeigen im Verlauf unter anti-CD20-Antikörper-Therapie nach initialer Abnahme tendenziell höhere CD20-Intensitäten.....	54

Abbildung 11: Während CD3 ⁺ CD20 ^{dim} Zellen sich auch am Endpunkt späterer Zyklen RTX/OCR in ähnlicher Zahl zum 1. Zyklus OCR nachweisen lassen, zeigen sich B-Zellen hier gleichermaßen depletiert.	55
Abbildung 12: OCR und diagnostische anti-CD20-Antikörper kompetitieren um CD20-Bindungsstellen auf PBMC in vitro.	57
Abbildung 13: CD3 ⁺ CD20 ^{dim} Zellen können auch nach vorheriger Inkubation mit OCR durch Färbung mit dem intrazellulär bindenden anti-CD20-Antikörper (Klon 1412) nachgewiesen werden.....	58
Abbildung 14: Es finden sich ähnliche Anteile von CD3 ⁺ human IgG ⁺ Zellen an T-Zellen nach Inkubation mit OCR verglichen zum Anteil CD3 ⁺ CD20 ^{dim} Zellen an T-Zellen vor Inkubation.....	59
Abbildung 15: Depletion von CD3 ⁺ CD20 ^{dim} Zellen in 4 Patienten mit MS vor/nach Erstgabe OCR, gemessen mit intrazellulär- sowie extrazellulär-bindendem Antikörper gegen CD20 und Sekundärantikörper gegen humanes IgG.	60
Abbildung 16: CD3 ⁺ CD20 ^{dim} Zellen lassen sich nach Erstgabe OCR durch keine der erwähnten Methoden nachweisen, sind somit a.e. tatsächlich depletiert....	61
Abbildung 17: Niedrigerer Anteil von CD3 ⁺ CD20 ^{dim} Zellen an T-Zellen in CBMC verglichen zu gesunden erwachsenen Probanden und erwachsenen Patienten mit erhöhtem CRP.	62
Abbildung 18: Gating-Strategie für die Untersuchung von CD19-spezifischen CAR-T-Zellen auf CD20 in Patienten unter CAR-T-Zelltherapie.....	64
Abbildung 19: Niedrigere Anteile von CD20 ^{dim} Zellen in CAR-T- verglichen zu nicht-CAR-T-Zellen.	65
Abbildung 20: Gating-Strategie für T-Zell-Subpopulationen (CD4 ⁺ /CD8 ⁺ , CD20 ^{neg} /CD20 ^{dim} , naive/CM/EM/effector) in gesunden erwachsenen Probanden, CBMC, erwachsenen Patienten mit erhöhtem CRP.....	67
Abbildung 21: Unterschiedliche Verteilung von naiven, effector-, CM- und EM-T-Zellen in CD4 ⁺ und CD8 ⁺ Zellen in gesunden erwachsenen Probanden, erwachsenen Patienten mit erhöhtem CRP und CBMC.....	68
Abbildung 22: CD3 ⁺ CD20 ^{dim} Zellen in CBMC unterscheiden sich im CD4:CD8 Verhältnis sowie in ihrem Anteil an naive/memory Zellen verglichen zu PBMC von gesunden erwachsenen Probanden.....	69
Abbildung 23: Der Anteil von CD3 ⁺ CD20 ^{dim} Zellen an CD4 ⁺ bzw. CD8 ⁺ Zellen zeigt sich mittelfristig nahezu konstant.	70
Abbildung 24: Der Anteil von CM/naive/effector/EM-Zellen an CD4 ⁺ CD20 ^{dim} bzw. CD8 ⁺ CD20 ^{dim} Zellen zeigt sich mittelfristig für einzelne Subpopulationen nahezu konstant.	71
Abbildung 25: Gating-Strategie für PBMC in Stimulationsversuchen in vitro.....	73
Abbildung 26: Pilotversuche mit in vitro-Stimulation von PBMC zweier Probanden mit SEB 1µg/ml für 3 bzw. 6 Tage.	74
Abbildung 27: Verlauf der FSC/SSC-Populationen, CD3 ⁺ CD20 ^{dim} Zellen sowie CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ Zellen in PBMC eines gesunden erwachsenen Probanden während in vitro Stimulation mit SEB 1µg/ml.	75

Abbildung 28: Reproduzierbarkeit des Anstiegs von CD3 ⁺ CD20 ^{dim} Zellen unter SEB-Stimulation in 6 Versuchen (inklusive der Pilotversuche aus Abb. 26) mit unterschiedlicher Stimulationsdauer und -Zeitpunkten.....	77
Abbildung 29: CD3 ⁺ CD20 ^{dim} Zellen sind besonders anfällig für Apoptose unter Stimulation mit SEB.....	78
Abbildung 30: Gating-Strategie für FACS von PBMC für anschließende TCR-Sequenzierung.....	79
Abbildung 31: Deutliche Überlappung in den TCR-Sequenzen zwischen CD20 ^{dim} und CD20 ^{neg} Zellen.....	81

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin D
ACK-Puffer	Ammonium-Chlorid-Kalium-Puffer
ADCC	<i>antibody dependent cellular cytotoxicity</i> , Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität
AF	Alexa Fluor
AICD	<i>activation-induced cell death</i> , Aktivierungs-induzierter Zelltot
APC	Allophycocyanin
BE	Blutentnahme
BV	Brilliant Violet
CAR	<i>chimeric antigen receptor</i> , chimärer Antigenrezeptor
CBMC	<i>cord blood mononuclear cells</i> , Mononukleare Zellen aus Nabelschnurblut
CD	<i>cluster of differentiation</i> , Unterscheidungsgruppe
CDC	<i>complement dependent cytotoxicity</i> , Komplement-abhängige Zytotoxizität
CM	<i>central memory cell</i> , Zentrale Gedächtniszelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDSS	<i>expanded disability status scale</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EM	<i>effector memory cell</i> , Effektor Gedächtniszelle
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i> , Sortieren von Zellen mittels fluoreszierender Marker
FCS	<i>fetal calf serum</i> , Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FMO	<i>fluorescence minus one</i> , Färbung mit konjugierten Antikörper ohne den Antikörper <i>of interest</i>
FSC	<i>forward scatter</i> , Vorwärtsstreulicht
HLA	Humanes Leukozytenantigen
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IQR	<i>interquartil range</i> , Interquartilenabstand
MACS	<i>magnetic-activated cell sorting</i> , magnetische Zellsortierung
MFI	<i>mean fluorescence intensity</i> , Mittlere Fluoreszenzintensität

MHC	<i>major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
MLR	<i>mixed lymphocyte reaction</i> , Lymphozytenreaktion
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> , Boten-Ribonukleinsäure
MS	Multiple Sklerose
NK	Natürliche Killerzellen
NMODS	<i>neuromyelitis optica spectrum disorders</i> , Neuromyelitis- optica-Spektrum-Erkrankungen
OCR	Ocrelizumab
OFA	Ofatumumab
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i> , Mononukleare Zellen des peripheren Blutes
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PE-Cy7	Phycoerythrin-Cyanine 7
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PerCP-Cy5.5	Peridinin-Chlorophyll-Protein-Cyanine 5.5
PI	Propidiumiodid
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PPMS	Primär progrediente Multiple Sklerose
RMS	<i>relapsing multiple sclerosis</i> , schubförmige Multiple Sklerose
RRMS	<i>relapsing remitting multiple sclerosis</i> , schubförmig remittierende Multiple Sklerose
RT	Raumtemperatur
RTX	Rituximab
SD	<i>standard deviation</i> , Standardabweichung
SEB	Staphylokokken Enterotoxin B
SPMS	Sekundär progrediente Multiple Sklerose
SSC	<i>sideward scatter</i> , Seitwärtsstreulicht
T _c	Zytotoxische T-Zelle
TCR	T-Zell-Rezeptor
T _H	T-Helferzelle
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

Die *Multiple Sklerose* (MS) ist eine der häufigsten chronisch entzündlichen Autoimmunerkrankung des *Zentralen Nervensystems* (ZNS) und gehört zu den häufigsten Ursachen für Behinderungen bei jungen Erwachsenen in Industrienationen (1). Die Erkrankung zeigt sich klinisch-neurologisch sehr heterogen, und kann in unterschiedliche Verlaufsformen eingeteilt werden. Derzeit (Stand 2022) gibt es keine Heilungsmöglichkeit, aber sowohl Therapieoptionen für eine akute Exazerbation als auch verschiedene immunmodulierende und immunsuppressive Therapien, um den chronischen Verlauf günstig zu beeinflussen.

1.1.1 Epidemiologie

In der geographischen und ethnischen Verteilung der MS bestehen deutliche Unterschiede, bekannt ist bspw. eine deutlich höhere Inzidenz und Prävalenz in nördlichen Gebieten (Prävalenz Schweden 170,5 : 100.000 Einwohnern (2)) verglichen zu Gebieten in Äquatornähe (Prävalenz Zentralafrika 2,1 : 100.000 (3)). Hierfür scheint eine multifaktorielle Genese (bspw. Umwelteinflüsse, sozioökonomische Faktoren, genetische Komponenten) verantwortlich zu sein (4). In den letzten Jahrzehnten konnte zudem eine globale Zunahme der Inzidenz und Prävalenz der MS beobachtet werden (5). Eine Rolle hierfür spielen einerseits die verbesserte medizinische Versorgung, die erleichterte Diagnosestellung durch die Verwendung der sensitiveren McDonald-Diagnosekriterien, sowie die bessere Verfügbarkeit und Sensitivität von Magnetresonanztomographie (*MRT*)-Untersuchungen mit neueren Geräten (1). Andererseits scheint es darüber hinaus eine tatsächliche Zunahme der Inzidenz, insbesondere bei Frauen, zu geben, bspw. in Kanada (6) und Frankreich, wobei sich in letzterem Fall der Anstieg auf die schubförmige Variante zu beschränken scheint (7). Die bereits länger bekannte gynäkotrope Verteilung bei Patienten mit MS wird hierdurch noch deutlicher, von einem Verhältnis Frauen : Männer von 1,4 : 1 im Jahr 1955 zu 2,3 : 1 im Jahr 2000 (5).

Einleitung

MS ist eine Erkrankung, die sich typischerweise erstmalig im jungen Erwachsenenalter manifestiert. Bezüglich Mortalität und Lebensqualität konnte in Ländern mit großen MS-Registern eine erhöhte Mortalität bei Patienten mit MS verglichen zur Normalbevölkerung beobachtet werden, wobei Todesursachen in der Regel auf Erkrankungskomplikationen zurückzuführen waren (8). Insgesamt fließen jedoch auch in kürzlich zurückliegende Studien große Patientenbasen mit zeitlich länger zurückliegendem Erkrankungsbeginn ein, sodass bei rezenten Behandlungsmöglichkeiten, welche früher erkrankungsmodifizierend und symptomatisch eingreifen, solche Studien eine höhere Mortalität als die tatsächliche aktuelle (Stand 2022) widerspiegeln können.

1.1.2 Ätiologie

Die Ätiologie der MS ist nicht abschließend geklärt. Bisher konnten mögliche genetische und Umweltrisikofaktoren identifiziert werden; eine Assoziation mit bestimmten Allelen des *Humanen Leukozytenantigens* (HLA), vor allem der Allele HLA-DRB1*15-01, scheint für familiäre Formen der MS relevant zu sein (9). Weiterhin werden auch polygenetischen Ursachen eine Rolle in der Entstehung der MS zugeschrieben (4). Mögliche Umweltfaktoren, welche stark mit der Erkrankung korrelieren, sind eine stattgehabte Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus sowie der Zustand nach einer infektiösen Mononukleose (10). Eine aktuelle, retrospektive Arbeit, untersuchte hierzu den klinischen und serologischen Verlauf bei 10 Millionen US-Militärangehörigen, von denen 955 an einer MS erkrankten; die Daten legen einen kausalen Charakter des Risikofaktors Epstein-Barr-Virus für das Auftreten einer MS nahe, nicht aber z.B. für eine Infektion mit dem Cytomegalievirus (11). Eine große Metaanalyse aus dem Jahr 2015 konnte zusätzlich Rauchen als Risikofaktor für MS identifizieren (12).

1.1.3 Pathophysiologie

Das pathophysiologische Korrelat zu der inflammatorischen Krankheitsaktivität bilden lokale entzündliche Läsionen im ZNS, welche sich typischerweise in der weißen Substanz um kleine venöse Gefäße finden und zu einer lokalen Demyelinisierung führen. In aktiven demyelinisierenden Läsionen finden sich oftmals eine hohe Anzahl an Makrophagen mit intrazellulären Abbauprodukten

Einleitung

der Myelinscheiden, sowie T-Zellen. Davon wiederum vermehrt *Cluster of Differentiation* (CD) 8⁺ zytotoxische T-Zellen (T_C), in geringerem Maße CD4⁺ T-Helferzellen (T_H), und nur wenige B-Zellen (13). Regelmäßig kommt es zu einer Störung der Blut-Hirn-Schranke, sodass eine Migration von Leukozyten in das ZNS möglich wird (14). Besonders T-Zellen werden im Zusammenhang mit der Entstehung der MS die Hauptrolle zugeschrieben. Dafür sprechen bspw. die genetische Assoziation der MS zu bestimmten HLA-Molekülen, die Induktion von Autoantikörpern durch T-B-Zell-Interaktion sowie die Tatsache, dass die Transfusion Myelin-spezifischer T-Zellen in gesunde Tiere in Modellen der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis, Krankheitsbilder mit ähnlichen Aspekten der MS auslösen kann (15 S. 644f). Ein klares Autoantigen konnte für die MS bisher jedoch nicht identifiziert werden (16).

Gleichzeitig scheint auch B-Zellen eine wichtige Rolle zuzukommen. Einerseits finden sich in ca. 90%-95% aller Patienten mit MS liquorspezifische oligoklonale Banden vom *Immunglobulin* (Ig)-G-Typ im Liquor, welche bereits früh im Krankheitsverlauf nachgewiesen werden können, und auf einer intrathekalen Ig-Synthese beruhen (17, 18). Weiterhin finden sich in Patienten mit MS vermehrt B-Zellen sowohl im Liquor als auch im Hirnparenchym, bis hin zu Fokkel-ähnlichen Strukturen in den Meningen, welchen eine Funktion als Reservoir für Lymphozyten zugeschrieben wird (16). Neben der Produktion von Ig agieren B-Zellen auch als antigen-präsentierende Zellen, und können über sowohl pro- als auch antiinflammatorische Zytokine Einfluss auf die Immunantwort nehmen. Die Depletion von B-Zellen durch anti-CD20-Antikörper wie *Rituximab* (RTX) und *Ocrelizumab* (OCR) beeinflusst dagegen das Krankheitsgeschehen bei MS positiv (19). Die Menge an Serum-IgG nahm unter Therapie mit anti-CD20-Antikörpern, zumindest in den ersten Jahren, nur leicht ab, was sich durch CD20-negative Plasmazellen als Hauptproduzenten von Ig erklären lässt. Somit scheinen B-Zell-depletierende Therapien vorwiegend über Immunglobulin-unabhängige Mechanismen einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf bei MS zu nehmen (20).

1.1.4 Symptome und Verlaufsformen

Am häufigsten (ca. 85%) beginnt die Erkrankung mit einzelnen, klar abgrenzbaren Erkrankungsschüben (schubförmige MS, *relapsing-remitting MS*, RR-MS). Ursache der Schubsymptomatik sind neu aufgetretene, histologisch aktiv demyelinisierende und MR-tomographisch Gadolinium-anreichernde fokale Entzündungsherde, meist um kleine venöse Gefäße. Diese Läsionen betreffen das gesamte ZNS, einschließlich Nervus opticus, und führen je nach Lokalisation zu entsprechenden Ausfallserscheinungen (bspw. Verschwommensehen, Sensibilitätsstörungen, Lähmungen, Gleichgewichts- oder Blasenstörungen). Schubsymptome können sich teils spontan, besser jedoch durch eine Schubtherapie (typischerweise Methylprednisolon hochdosierte intravenös, ggf. Plasmaaustauschverfahren) über Wochen zurückbilden. Hierbei können in unterschiedlichem Ausmaß Residualsymptome bestehen bleiben und zu einer Behinderungszunahme akkumulieren (*relapse associated worsening*). Erkrankungsschübe treten ohne schubprophylaktische Therapie in interindividuell deutlich unterschiedlicher Frequenz auf, im Mittel ca. 1x/Jahr.

Bei vielen Patienten (ca. 30-60% nach ca. 20 Jahren) stellt sich jedoch nach den – oft mit dem Alter abnehmenden – Erkrankungsschüben eine schubunabhängige, schleichende Behinderungszunahme (*progression independent of relapse activity*, PIRA) in den Vordergrund. Diese Erkrankungsphase ist histologisch gekennzeichnet durch eine zunehmend im ZNS kompartimentalisierte, also vom Zustrom aus der Blutzirkulation weniger abhängige, diffusere Entzündungsreaktion, sowie zunehmenden neurodegenerativen Mechanismen, und ist therapeutisch schlechter zu beeinflussen als der schubförmige Verlauf (21). Diese Erkrankungsphase wird als *sekundär progrediente MS* (SPMS) bezeichnet, wobei der Übergang vom schubförmigen in den sekundär progredienten Verlauf oft unscharf abgrenzbar ist und beide Phasen überlappend bestehen können.

Ca. 10-15% der Patienten haben hingegen auch anfangs keine abgrenzbaren Erkrankungsschübe, sondern von Beginn an eine schleichende Zunahme der Behinderung (*primär progrediente MS*, PPMS), insbesondere in Form von Gehstörungen. Dieser schleichende Verlauf ist ebenfalls deutlich schwerer zu

Einleitung

beeinflussen als ein schubförmiger Verlauf. OCR ist das erste zugelassene Medikament zur Behandlung der PPMS (22).

Die Diagnose einer MS wird nach den entsprechenden, im Verlauf mehrfach aktualisierten McDonald-Kriterien gestellt. Kern dieser Kriterien ist jeweils eine, zu einer MS passenden und nicht besser erklärten klinischen Symptomatik mit Nachweis einer örtlichen und zeitlichen Dissemination, die klinisch und MR-tomographisch erfolgen kann. Als Hilfsmittel für eine möglichst einfache und vergleichbare Beschreibung des Ausmaßes der Behinderung wird die *expanded disability status scale* (EDSS) nach Kurtzke verwendet. Diese fasst Beeinträchtigungen aus verschiedenen Funktionssystemen (bspw. visuelles System, Hirnstamm, Pyramidenbahn, etc.) nach Punkten zusammen und reicht von EDSS 0 (keine Symptome) bis EDSS 10 (Tod durch MS).

1.1.5 Ocrelizumab und Rituximab als B-Zell-depletierende Therapie

Für die MS sind eine Vielzahl immunmodulierender und immunsuppressiver Therapien zugelassen. An dieser Stelle soll jedoch aufgrund der Relevanz für diese Arbeit nur auf die Wirkweise und Therapie mit den anti-CD20-Antikörpern *Ocrelizumab* (OCR) und *Rituximab* (RTX) genauer eingegangen werden.

OCR ist ein rekombinanter, humanisierter anti-CD20-Antikörper, welcher in Ovarialzelllinien des chinesischen Hamsters produziert wird. Die Zulassung für die Behandlung von Patienten mit RR-MS und PPMS in frühen Stadien erfolgte in der EU im Januar 2018, nachdem mittels drei randomisierter Doppelblindstudien (OPERA I und II, ORATORIO) eine Überlegenheit von OCR zu Interferon beta-1a bzw. Placebo hinsichtlich klinischer und bildgebender Endpunkte gezeigt werden konnte (18, 23). OCR bindet an CD20 auf B-Zellen und führt durch zytotoxische Effekte (detaillierte Beschreibung der Wirkmechanismen in Kapitel 1.2.4.2) zu einer Reduktion der B-Zellzahl im peripheren Blut und (weniger vollständig) in lymphatischen Organen mit daraus resultierender Immunmodulation, wobei das genaue Ausmaß der verschiedenen, damit aufgehobenen B-Zell-Funktionen, an der gesamten therapeutischen Wirkung unbekannt ist. Dabei scheint sowohl der Pool langlebiger Plasmazellen und damit die bereits erworbene humorale Immunantwort sowie die Fähigkeit der

Einleitung

B-Zell-Regeneration zumindest während der ersten Behandlungszyklen weitgehend erhalten zu bleiben (24).

OCR wird intravenös in einer Dosis von 600 mg in einem Abstand von 6 Monaten verabreicht, wobei die erste Gabe in zwei Dosen mit jeweils 300 mg mit zwei Wochen Abstand verabreicht wird (22). Dadurch kommt es zu einer raschen und nachhaltigen Depletion der B-Zellen, welche bereits bei der zweiten Gabe nach 14 Tagen nachweisbar ist (25). In dem Nachbeobachtungszeitraum einer Phase-II-Studie dauerte es im Median 72 Wochen bis zur B-Zell-Repletion nach Gabe von OCR, definiert als ein Anstieg auf den Wert der Baseline-Messung oder auf die untere Grenze des Referenzbereiches, je nachdem welcher Wert zuerst erreicht wurde (22). In bis zu 5 % aller Patienten konnte eine solche Repletion von B-Zellen bereits in den 6 Monaten zwischen zwei Gaben von OCR nachgewiesen werden (22). Durch anti-CD20-Antikörper werden jedoch nicht nur B-Zellen eliminiert. Forschungen zu RTX (19, 26), ein weiterer anti-CD20-Antikörper welcher zur Behandlung von B-Zell-Neoplasien sowie bei rheumatologischen Autoimmunerkrankungen und Off-Label bei autoimmun-entzündlichen ZNS-Erkrankungen verwendet wird, und OCR (25) zeigten, dass eine Population CD20-positiver T-Zellen unter Therapie ebenfalls nicht mehr nachweisbar war. Ob in der Elimination dieser Population eine weitere therapeutische Wirkung von anti-CD20-Antikörpern liegt, lässt sich mittels der derzeitigen Datenlage jedoch nicht abschließend sagen.

Ergänzend geht aus den Daten zu den pharmakokinetischen Eigenschaften von OCR eine mittlere Maximalkonzentration im Blut von 212 µg/ml nach Gabe von 600 mg OCR, bzw. 141 µg/ml nach Gabe von 300 mg OCR intravenös hervor. Die effektive Gesamtmenge über die Zeit, gemessen als *Area under the curve* in einem Zeitraum von 6 Monaten bis zur nächsten Gabe unterschied sich für die in der Studie zur Pharmakokinetik untersuchten intravenösen Darreichungsformen (1x 600mg vs. 2x 300mg) erwartungsgemäß nicht. Die Elimination von OCR soll, vergleichbar mit anderen therapeutischen Antikörpern, durch den Abbau in kleinere Peptide aus dem Blut erfolgen, wobei die Halbwertszeit mit 26 Tagen angegeben wird (22).

1.2 CD3⁺CD20^{dim} Zellen

CD3 ist ein Oberflächenmolekül spezifisch für T-Zellen, und wichtig für Interaktionen des *T-Zell-Rezeptors* (TCR) mit u.a. antigen-präsentierenden Zellen. CD20 ist ein Oberflächenmolekül welches bei Entdeckung, ähnlich CD19, als spezifisch für B-Zellen angesehen wurde. Im Falle von CD20 ist das Vorkommen jedoch nicht nur auf B-Zellen beschränkt, sondern konnte auch in einer Subpopulation von T-Zellen, aufgrund ihrer verglichen zu B-Zellen geringeren (*dim*) Expression von CD20 sogenannten CD3⁺CD20^{dim} Zellen, nachgewiesen werden (27).

1.2.1 Initiale Kontroverse über die Existenz von CD3⁺CD20^{dim} Zellen

Mittels Durchflusszytometrie konnten Hultin et al. in gesunden Probanden neben CD19⁺CD20⁺ B-Zellen auch eine Population an CD20^{dim} Zellen dargestellt werden, welche im Durchschnitt 2,4% ± 1,5% (Mittelwert ± Standardabweichung, *standard deviation*, SD) aller Lymphozyten im peripheren Blut ausmachte, typische pan-T-Zell-Marker wie CD3 trug, zum Großteil negativ für B-Zell-Marker (CD19, HLA-DR^{bright}) erschien und einen TCR, jedoch nicht B-Zell-Rezeptor trug (27). Diese neu entdeckten CD3⁺CD20^{dim} Zellen wurden somit als T-Zellen eingeordnet (27). Da sie außerdem weitere T-Zell-spezifische Marker trugen (CD4, CD8, TCR α/β, TCR γ/δ), sich die prozentualen Anteile dieser Marker bei CD3⁺CD20^{dim} Zellen jedoch von CD20-negativen T-Zellen unterschieden, schlossen Hultin et al. eine neue T-Zell-Subpopulation charakterisiert zu haben, welche CD20^{dim} ist und sich phänotypisch von CD20-negativen T-Zellen unterscheidet (27).

Da eine Zellpopulation mit sowohl klassischen B- als auch T-Zell-Markern unerwartet war, wurden mögliche Artefakte als Ursache für diese Ergebnisse diskutiert: T- und B-Zellen können aneinanderlagern (28) und als Doubletten in der Durchflusszytometrie den Eindruck einer Co-Expression erwecken (19). Jedoch konnten CD3⁺CD20^{dim} Zellen auch nach rigorosem Ausschluss von Doubletten durch strenges Gating auf Einzelzellen und die ggü. B-Zellen schwächere Expression von CD20 (29), dem Fehlen weiterer B-Zell-Marker wie CD19 (30), sowie in der Image-Stream-Durchflusszytometrie (Abb. 1) bildgebend als Einzelzellen nachgewiesen werden (vgl. Palanichamy et al, (19)). Diese

Einleitung

Charakteristika von CD3⁺CD20^{dim} Zellen in Abgrenzung zu B-T-Zell-Doubletten konnten ebenfalls in dieser Arbeit nachvollzogen werden.

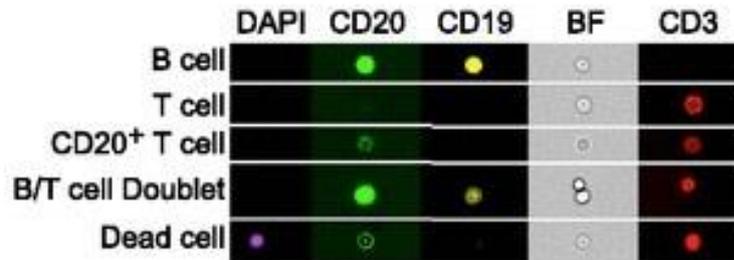


Abbildung 1: CD3⁺CD20^{dim} Zellen stellen sich als Einzelzellen sowie weniger hell für CD20 verglichen zu einer B-T-Zell-Doublette dar.

ImageStream Aufnahmen, in den Zeilen verschiedene Zellpopulationen, in den Spalten Oberflächenmarker, sowie Totfarbstoff (DAPI), sowie Hellfeld-Mikroskopie (BF=Brightfield). Die CD20-positive T-Zelle stellt sich im CD20-Kanal dunkler im Vergleich zu einer B-T-Zell-Doublette dar. Weiterhin erscheint sie lichtmikroskopisch als Einzelzelle und ist CD19⁻. Modifiziert nach: Palanichamy A, Jahn S, Nickles D, Derstine M, Abounasr A, Hauser SL, et al. Rituximab efficiently depletes increased CD20-expressing T cells in multiple sclerosis patients. *The Journal of Immunology*. 2014;193(2):580-6. Die schriftliche Erlaubnis des Verlages für die Verwendung der Grafik liegt vor.

Die Existenz von CD3⁺CD20^{dim} Zellen wurde weiterhin dadurch angezweifelt, dass CD20, zumindest unter Zellkultur-Bedingungen, per Trogozytose von B- auf T-Zellen übertragen werden (28), und zu einem Nachweis von CD20 auf T-Zellen führen kann (31). Dies ging jedoch in den durchgeführten Studien mit höheren Anteilen CD20-positiver T-Zellen als unter *ex vivo* Bedingungen, sowie einer für Trogozytose typischen Mitübertragung von HLA-DR einher (31), welche unter *ex vivo* Bedingungen fehlte (19). Gegen eine reine Übertragung auf Proteinebene und gegen Doubletten spricht weiterhin die Expression von mRNA (*messenger ribonucleic acid*) für CD20, nicht aber für CD19 in CD3⁺CD20^{dim} Zellen (26, 30). Zusammenfassend ist somit von einer genuinen Gen- und Proteinexpression von CD20 in einer Subpopulation von T-Zellen auszugehen. Um eine falsch hohe Anzahl CD3⁺CD20^{dim} Zellen zu vermeiden, erfordert die durchflusszytometrische Analyse dieser Subpopulation jedoch eine gewisse Sorgfalt, wie ein strenges Gating auf Einzelzellen (vgl. Kapitel 2.5, Abb. 4), und eine rasche Probenbearbeitung (in dieser Arbeit <6h für Bearbeitung von EDTA-Blut für Durchflusszytometrie), was in dieser Arbeit von Beginn an beachtet wurde. Unter Berücksichtigung dieser Vorkehrungen lassen sich CD3⁺CD20^{dim} Zellen eindeutig darstellen (Abb. 2).

Einleitung

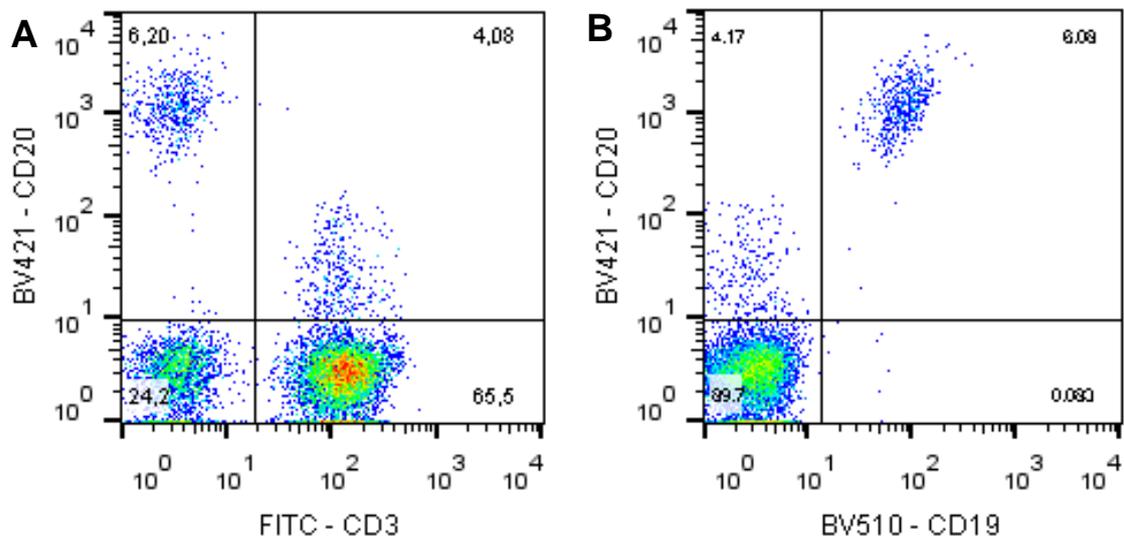


Abbildung 2: Eigener Versuch mit repräsentativer Darstellung von CD3⁺CD20^{dim} Zellen mittels Durchflusszytometrie von PBMC eines gesunden Probanden.

Hier konnte ein Panel zum verlässlichen Nachweis von CD3⁺CD20^{dim} Zellen etabliert werden, die Abgrenzung zu CD20-negativen T-Zellen erfolgte mittels FMO für CD20. Die Zahlen in den jeweiligen Quadranten geben die Prozentzahlen als Anteil an Lymphozyten wieder. **(A)** CD20 ist gegen CD3 aufgetragen. CD3⁺CD20^{dim} Zellen befinden sich hier im oberen rechten Quadranten. **(B)** CD20 ist gegen CD19 aufgetragen, hier stellen sich CD3⁺CD20^{dim} Zellen negativ für CD19 dar und haben eine ca. 10-fach geringere Intensität für CD20 als CD20⁺CD19⁺ B-Zellen (B-Zellen im rechten oberen Quadranten). Abkürzungen: FITC – Fluorescein Isothiocyanate, BV – Brilliant Violet.

1.2.2 Verteilung von CD3⁺CD20^{dim} Zellen in gesunden Probanden, unterschiedlichen Erkrankungen, sowie Unterschiede im Phänotyp zu CD20-negativen T-Zellen

1.2.2.1 In gesunden Probanden

CD3⁺CD20^{dim} Zellen finden sich im Blut von gesunden Spendern mit prozentualen Anteilen an allen T-Zellen im unteren einstelligen Prozentbereich (Anteil an Lymphozyten [%]: Mittelwert \pm SD 2,4 \pm 1,5 (27), 3,8 \pm 0,6 (26). Anteil an T-Zellen [%]: Mittelwert \pm SD 5,4 \pm 2,4 (19), Mittelwert 1,6 Verteilung 0,1-6,2 (30)). Im mittelfristigen zeitlichen Verlauf (wenige Monate) scheint dieser Anteil relativ konstant (27). Eine Erklärung für die Unterschiede in der Häufigkeit bei Gesunden je nach Arbeit könnten unterschiedliche Altersgruppen der untersuchten Probanden sein, da der Anteil von CD3⁺CD20^{dim} Zellen an T-Zellen im Laufe des Lebens zu steigen scheint, in einer Arbeit mit einem sehr geringen Anteil in Nabelschnurblut (Mittelwert \pm SD 0,3 \pm 0,1%), einem höheren Anteil in

Einleitung

20-60-Jährigen ($2,1 \pm 1,1\%$) und mit dem höchsten Anteil in >60-Jährigen ($6,9 \pm 3,2\%$) (32). Weiterhin findet sich bei $CD3^+CD20^{dim}$ Zellen durchflusszytometrisch ein Spektrum von nicht bis deutlich detektierbarer Oberflächenexpression von CD20, sodass bei der Abgrenzung dieser Zellen auch unterschiedliche Antikörperkonzentrationen sowie die Festlegung des Gates für $CD3^+CD20^{dim}$ Zellen eine Rolle spielen können. In dieser Arbeit wurden, um eine nachvollziehbare und konstante Herangehensweise zu gewährleisten, die Gates für $CD3^+CD20^{dim}$ Zellen für jeden Versuch mittels Färbung aller Antikörper bis auf den konjugierten anti-CD20-Antikörper (*fluorescence minus one*, FMO-Kontrolle für CD20) festgelegt (Vgl. Kapitel 2.5).

Die altersabhängige Verteilung von $CD3^+CD20^{dim}$ Zellen lässt auf eine Entwicklung des $CD3^+CD20^{dim}$ -Kompartimentes im Laufe des ersten bis zweiten Jahrzehntes schließen. Mit einem frühen Erwerb in der T-Zell-Entwicklung vereinbar ist der Nachweis von $CD3^+CD20^{dim}$ Zellen in kindlichen Thymusproben (26, 30), jedoch finden sich $CD3^+CD20^{dim}$ Zellen in höherem Anteil bei älteren Menschen, bei welchen der Thymus sich altersbedingt zurückentwickelt und die Entwicklung der Lymphozyten durch die beginnende Immunoseneszenz weiter eingeschränkt wird. $CD3^+CD20^{dim}$ Zellen wurden auch in weiteren Organen bei Gesunden nachgewiesen, u.a. in Gewebe von Lymphknoten, Leber, Knochenmark, sowie im Liquor cerebrospinalis bei Patienten ohne entzündliche neurologische Erkrankungen, sowie in Patienten mit MS (26, 30). Weiterhin wurde in einer Arbeit von einer $CD3^{neg}CD20^{dim}$ Populationen berichtet, welche jedoch einen deutlich geringeren Anteil der $CD20^{dim}$ Lymphozyten ausmachten, und zum Großteil $CD56^+$ *Natürliche-Killer*(NK)-Zellen oder $CD19^+$ B-Zellen waren (27).

1.2.2.2 In Patienten mit MS

$CD3^+CD20^{dim}$ Zellen fanden sich bei Patienten mit RMS und PPMS in etwas höheren Anteilen an T-Zellen in *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC) verglichen zu gesunden Probanden (19, 33), und ließen sich auch post-mortem mittels Immunhistochemie in chronischen MS-Läsionen im Gehirn nachweisen (34). Die Assoziation von $CD3^+CD20^{dim}$ Zellen zum ZNS wird weiter durch das

Einleitung

vermehrte Vorkommen Myelin-spezifischer CD3⁺CD8⁺CD20^{dim} Zellen bei Patienten mit MS untermauert (35).

Der Anteil von CD3⁺CD20^{dim} Zellen an allen Lymphozyten bzw. an allen T-Zellen im Liquor bei Patienten mit MS zeigte sich im Vergleich zu gesunden Spendern ähnlich (26), als auch bei größerer Fallzahl leicht erhöht (33). Eine vermehrte Expression von Chemokinrezeptoren und Adhäsionsmolekülen verglichen zu CD20-negativen T-Zellen legt hierbei ein vermehrtes Migrationspotential von CD3⁺CD20^{dim} Zellen nahe (33), und könnte höhere Anteile von CD3⁺CD20^{dim} Zellen im Liquor verglichen zu PBMC erklären. Weiterhin scheint es eine positive Korrelation zwischen dem Anteil von CD3⁺CD20^{dim} Zellen an T-Zellen im Liquor und der Menge an Myelin-basischem Protein im Liquor einerseits, sowie der Krankheitsschwere gemessen mittels EDSS andererseits zu geben (33).

CD3⁺CD20^{dim} Zellen sprechen auf diverse, für MS zugelassene immunmodulatorische Therapien an (19, 26, 33), und sind zudem nach Gabe von anti-CD20-Antikörpern wie RTX und OCR im Blut nicht mehr nachweisbar (19, 25, 26), erscheinen im zeitlichen Verlauf nach Elimination jedoch wieder mit einer eigenen, von B-Zellen scheinbar unabhängigen Dynamik der Repopulation (Vgl. Kapitel 1.2.4.3).

1.2.2.3 In weiteren (autoimmunologischen) Erkrankungen

Auch in weiteren Erkrankungen fanden sich Hinweise auf eine mögliche pathophysiologische Rolle von CD3⁺CD20^{dim} Zellen. In Patienten mit Rheumatoider Arthritis fand sich zwar kein signifikanter Unterschied im Anteil von CD3⁺CD20^{dim} Zellen an T-Zellen in PBMC verglichen zu gesunden Probanden, jedoch kamen in der Patientengruppe *Interleukin* (IL) -17 produzierende CD20^{dim} T_H-17-Zellen häufiger vor, welchen eine pathologische Rolle in der Entwicklung der Rheumatoiden Arthritis zugesprochen wird (36). Eine ähnliche Beobachtung zum Zytokinprofil von CD3⁺CD20^{dim} Zellen konnte auch in Patienten mit Psoriasis gemacht werden (37). Weiterhin fand sich im Aszites von Patientinnen mit Eierstockkrebs ein höherer Anteil von CD3⁺CD20^{dim} Zellen an T-Zellen verglichen zu PBMC, mit einer Tendenz zu *effector memory* (EM) und T_C-1 Phänotypen (31). Beiden Subpopulationen an T-Zellen werden in der Immunantwort bei Eierstockkrebs wichtige Rollen zugeschrieben, die Infiltration von T_{EM}-Zellen in

Einleitung

Tumorgewebe ist mit einem günstigeren Tumorverlauf assoziiert, und Tc-1-Zellen scheinen eine Hauptrolle in der Immunreaktion bei Eierstockkrebs zu spielen (31). Hier könnte sich somit potenziell eine den Krankheitsverlauf positiv beeinflussende Rolle, von CD3⁺CD20^{dim} Zellen zeigen, auch wenn der fehlende Vergleich zum Vorkommen von CD3⁺CD20^{dim} Zellen in Aszites bei Patienten ohne Tumorerkrankung in dieser Studie keine Aussage zur Selektivität einer Anreicherung von CD3⁺CD20^{dim} Zellen in malignem Aszites zulässt.

1.2.3 Unterschiede im Phänotyp von CD3⁺CD20^{dim} Zellen verglichen zu CD20-negativen T-Zellen

CD3⁺CD20^{dim} Zellen zeigten nach Stimulation mit quervernetzenden CD3-Antikörpern höhere Level an intrazellulären Ca²⁺-Ionen verglichen zu CD20-negativen T-Zellen (27). Passend dazu exprimierten CD3⁺CD20^{dim} Zellen *ex vivo* vermehrt Aktivierungsmarker (bspw. CD25, CD69) und produzierten in höheren Anteilen Zytokine, eine funktionelle Aktivität die bei CD20-negativen T-Zellen direkt nach Isolation aus Blut nur sehr selten vorkommt (30). Dieser Anteil zytokinproduzierender CD3⁺CD20^{dim} Zellen nahm nach *in vitro* Stimulation noch weiter zu verglichen zu CD20-negativen T-Zellen, wobei u.a. proinflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor- α und Interferon- γ vermehrt von CD3⁺CD20^{dim} Zellen produziert wurden (26, 33). Beiden Zytokinen wird eine Rolle in der Pathophysiologie der MS zugeschrieben (38), Tumornekrosefaktor- α weiterhin auch eine tragende Rolle in der Pathophysiologie der Rheumatoiden Arthritis (39). Neben einer vermehrten Zytokinproduktion fiel in CD3⁺CD20^{dim} Zellen auch eine verstärkte Proliferation nach *in vitro* Exposition mit Antigenen wie dem Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein auf (33). In diesen Zellen fand sich jedoch auch eine höhere Zahl an apoptotischen und toten Zellen nach Stimulation sowie nach direkter Isolation aus Blut auf, gemessen an dem Anteil positiver Zellen für Annexin V, einem Marker für externalisiertes Phosphatidylserin (30). Passend dazu wurde eine vermehrte Expression von Fas (CD95) (und auch Fas-Ligand (CD95L)) bei CD3⁺CD20^{dim} Zellen beobachtet (19, 33). Die Beobachtungen zur Apoptoserate sind vereinbar mit der teils vertretenen Interpretation von CD3⁺CD20^{dim} Zellen als eine aktivierte Subpopulation an T-Zellen (26), und ließe sich hier als *activation-*

induced cell death (AICD) verstehen, ein Prozess bei welchem aktivierte T-Zellen mittels Fas-/Fas-Ligand-Interaktion zum Schutz vor einer übermäßigen Immunantwort in die Apoptose getrieben werden (40).

Weitere Unterschiede im Phänotyp von CD3⁺CD20^{dim} Zellen zu CD20-negativen T-Zellen sind ein vermehrtes Vorkommen von CD8⁺ Zellen, hier lag das CD4:CD8 Verhältnis ca. bei 1:1, im Vergleich zu dem typischen 2:1 Verhältnis in der gesamten T-Zell-Population (19). Bezüglich der Reifestadien und der Unterteilung in *naive/memory* Zellen, charakterisiert durch die Expression von CD45RA/CD45RO und CCR7, zeigten CD3⁺CD20^{dim} Zellen vermehrt einen Phänotyp als Gedächtniszellen, und hier gehäuft als T_{EM}-Zellen (26).

1.2.4 CD20 als Ziel für B-Zell depletierende Therapien

1.2.4.1 Funktionen des CD20-Proteins

CD20 ist ein 33-37 Kilodalton schweres, membranständiges Protein, welches in den meisten Entwicklungsstadien von B-Zellen präsent ist, mit Ausnahme von Plasmazellen und frühen prä-B-Zellen (41). Es besitzt vier Transmembrandomänen, zwei extrazelluläre Schleifen und kann als Tetramer auf der Zelloberfläche vorliegen (42). Ein Ligand und die genaue Funktion sind nicht bekannt, eine Rolle in der Signalübermittlung als Ca²⁺-Kanal (43) sowie als Ziel für Phosphorylierung (44) und in der Organisation von Lipid Rafts, speziellen Sphingolipid- und Cholesterin-reichen Bereichen in der Zellmembran, welche eine wichtige Rolle in diversen Prozessen der intra- und extrazellulären Kommunikation spielen (42), scheinen jedoch wahrscheinlich. Weiterhin spielt CD20 auch eine Rolle in der Entwicklung von B-Zellen (42). Untersuchungen zur Funktion eines murinen Analogons (45) zeigten jedoch geringe Auswirkungen auf den Phänotyp von Mäusen mit fehlerhaftem CD20-Gen (46), was die genaue Funktion von CD20 weiterhin rätselhaft lässt. Nebenbei bemerkt scheinen CD3⁺CD20^{dim} Zellen verglichen zu CD20-negativen T-Zellen deutlich weniger CD38 auf ihrer Oberfläche zu exprimieren (27). Hier könnte CD20 Funktionen typisch für CD38 wie die Regulation von Ca²⁺-Signalübertragungen und die Organisation von Lipid Rafts übernommen haben, und als Alternative zu CD38 fungieren (30).

1.2.4.2 Unterschiede in anti-CD20-Antikörpern

Insbesondere die hohe Dichte von CD20 auf der Zelloberfläche von B-Zellen machen es zu einem attraktiven Ziel für B-Zell-depletierende Therapien (47). Zwischen den verschiedenen, sowohl therapeutischen als auch nicht-therapeutischen anti-CD20-Antikörpern bestehen teils große Unterschiede hinsichtlich ihrer Wirkung auf den Zellzyklus von B-Zellen (42), der Bindungsstelle des Antigen-bindenden Fragments sowie in der Potenz und der Art in der diese den Zelltod von B-Zellen bewirken, zusammengefasst u.a. in Cragg et al (42), sowie Klein et al (48). Abhängig davon werden zwei Gruppen unterschieden:

Antikörper vom Typ I zeichnen sich durch starke *Komplement-abhängige Zytotoxizität* (CDC) und *Antikörper-abhängige Zytotoxizität* (ADCC), einer geringen Induktion von Apoptose, sowie durch die Fähigkeit, CD20 zu Lipid Rafts zu organisieren aus (42, 48). Antikörper vom Typ I führen weiterhin bei Bindung zu einer Internalisierung von CD20 (49). Zu dieser Gruppe gehört ein Großteil der therapeutischen anti-CD20-Antikörper, wie RTX, OCR und *Ofatumumab* (OFA).

Antikörper vom Typ II zeichnen sich durch fehlende CDC, einer ähnlich starken ADCC wie Antikörper vom Typ I, sowie der Unfähigkeit, CD20 zu Lipid Rafts zu organisieren aus. Weiterhin können diese auch Fc-unabhängig Apoptose in B-Zellen auslösen (50) und führen zu geringerer Internalisierung von CD20 verglichen zu anti-CD20-Antikörpern vom Typ I (49), was sie insgesamt potenter in ihrer Wirkung macht (51). Hierzu gehören bspw. Obinutuzumab (Klon GA101), ein speziell für RTX-resistente B-Zell-Malignome entwickelter anti-CD20-Antikörper (50). Den meisten anti-CD20-Antikörpern ist gemeinsam, dass sie an die extrazellulären Schleifen des Moleküls binden (48), wobei hier vor allem ein Prolin-Rest auf der großen extrazellulären Schleife an Stelle 172 besonders relevant für die Bindung ist (52). Es scheint somit naheliegend, dass diese therapeutischen anti-CD20-Antikörper, sowie diverse in der Forschung zur durchflusszytometrischen Analyse genutzten anti-CD20-Antikörper um dieselbe Bindungsstelle konkurrieren und sich gegenseitig an der Bindung hindern könnten (27). Im Vergleich dazu erkennt OFA ein Epitop (48), welches N-terminal

Einleitung

zu den oben genannten Epitopen liegt, und sich über die kleine und große extrazelluläre Schleife hinweg erstreckt (52) (Abb. 3).

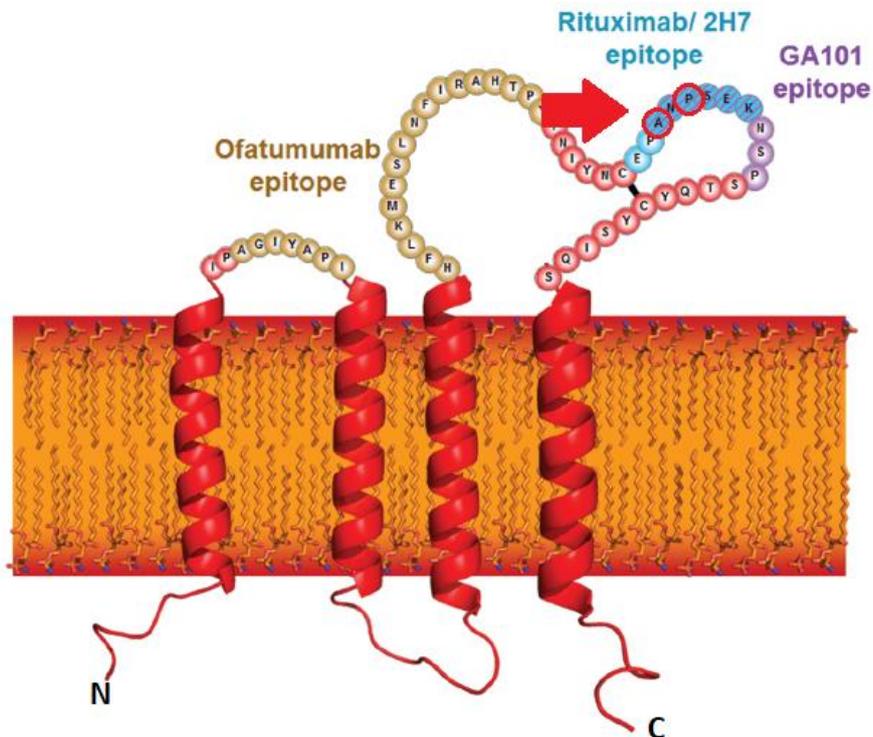


Abbildung 3: Schematische Struktur des CD20-Moleküls mit den Epitopen der jeweiligen Antikörper, extrazelluläre Anteile als Aminosäuren (Einzelbuchstabencode) dargestellt. 2H7 ist der murine Klon, welcher für die Antigen-bindende Domäne von OCR verwendet wurde, und erkennt somit dasselbe Epitop wie diverse diagnostische Antikörper mit dem Klon 2H7. Die für die Bindung zentralen Aminosäuren A170 und P172 sind hervorgehoben. Modifiziert nach: Klein C, Lammens A, Schäfer W, Georges G, Schwaiger M, Mössner E, et al., editors. Epitope interactions of monoclonal antibodies targeting CD20 and their relationship to functional properties. MABs; 2013: Taylor & Francis. Die schriftliche Erlaubnis des Autors für die Verwendung der Grafik liegt vor.

Informationen zu einer möglichen Konkurrenz von bspw. OFA mit RTX oder OCR trotz des weiter entfernten Epitopes von OFA finden sich in der Literatur nicht. Neben dem Großteil der extrazellulär-bindenden Antikörpern gibt es auch einige Antikörper, welche intrazelluläre Epitope von CD20 erkennen (53).

1.2.4.3 CD3⁺CD20^{dim} Zellzahl nach anti-CD20-Therapie: Kinetik und Depletion vs. Kaschierung

Kurz nach der ersten Gabe therapeutischer anti-CD20-Antikörper finden sich durchflusszytometrisch weder B- noch CD3⁺CD20^{dim} Zellen in PBMC von Patienten, sowohl für RTX (30) als auch OCR (25). Während B-Zellen sehr langsam und spät repletieren (RTX: im Mittel ca. 25-32 Wochen bis Beginn der Repopulation (19), OCR: Median 72 Wochen bis Regeneration auf Baseline-

Einleitung

Level bzw. untere Grenze des Referenzbereiches (22)) finden sich CD3⁺CD20^{dim} Zellen deutlich früher wieder (19, 25, 26). Während bislang immer von einer Depletion dieser Zellen durch anti-CD20-Antikörper ausgegangen wurde (25, 26), wurde in dieser Promotionsarbeit jedoch die Frage gestellt, ob die ggü. B-Zellen deutlich geringere CD20-Oberflächenexpression überhaupt ausreicht, um CD3⁺CD20^{dim} Zellen zu depletieren, oder ob CD20 auf diesen Zellen in den ersten Monaten nach Infusion durch Bindung von OCR über Mechanismen wie eine Maskierung oder Internalisierung nur dem Nachweis mittels typischer Marker in der Durchflusszytometrie unzugänglich wurde.

Folgende Aspekte sprechen dafür, diese Fragen zu untersuchen: Einerseits beziehen sich die Daten zur zytotoxischen Wirkung von anti-CD20-Antikörpern auf Zellebene ausschließlich auf B-Zellen (41, 42, 47, 52). Weiterhin legen die Daten zur räumlichen Nähe/Überlappung der verschiedenen Epitope nahe (52), dass verschiedene anti-CD20-Antikörper um ähnliche Bindungsstellen konkurrieren, was den Nachweis von oberflächlichem CD20 bei bereits gebundenem anti-CD20-Antikörper mittels konjugierter Antikörper mit Durchflusszytometrie erschwert bis unmöglich macht (27). Dies findet sich auch in dem Assessment Report der *European Medicines Agency* zu OCR wieder, hier wird darauf verwiesen, dass zur Messung der B-Zell-Depletion mittels Durchflusszytometrie konjugierte Antikörper gegen CD19 anstatt CD20 verwendet werden müssen, da letztere mit bereits gebundenem OCR interferieren würden (22). Zur Bestimmung der B-Zellzahl ist dies mit CD19 als weiterem B-Zell-spezifischen Marker problemlos möglich, für CD3⁺CD20^{dim} Zellen fehlt ein spezifischer Marker jedoch, welcher einen Nachweis trotz gebundenem anti-CD20-Antikörper ermöglichen würde. Da die Halbwertszeit von OCR im Blut 26 Tage beträgt (22), wird somit eine zuverlässige Aussage zu CD3⁺CD20^{dim} Zellen bei der zweiten Gabe von OCR 2 Wochen nach Erstinfusion, und vermutlich auch bei weiteren Messzeitpunkten im Wochen- bis Monatsbereich danach durch noch vorhandene Antikörper vom Zeitpunkt der Erstgabe erschwert.

Andererseits ist das Ausmaß der Zytotoxizität *in vitro* abhängig von der Intensität der CD20-Expression (54). Für CD20-exprimierende T-Zell-Lymphome wurde,

wenn auch mit geringer Fallzahl, eine Korrelation der Intensität der CD20-Expression mit der Wirksamkeit von RTX-basierenden Chemotherapie-Regimes beschrieben (55). Für CD3⁺CD20^{dim} Zellen konnte eine Arbeitsgruppe nach Inkubation mit RTX über 48 Stunden eine zwar signifikante, jedoch im Vergleich zu B-Zellen deutliche geringere Abnahme des Anteils an T-Zellen beobachten (2,63% zu 1,71% für CD3⁺CD20^{dim} Zellen, 8,21% zu 1,86% für B-Zellen, jeweils Median und Anteil an Lymphozyten) (56).

1.3 *In vitro* Stimulation von T-Zellen und CD3⁺CD20^{dim} Zellen speziell

1.3.1 Gängige Stimulationsmethoden

T-Zellen können über diverse Mechanismen *in vitro* stimuliert werden. Eine Methode beruht auf der Verwendung des Superantigens *Staphylokokken Enterotoxin B* (SEB), einem von *Staphylococcus aureus* produzierten Toxin welches u.a. für Lebensmittelvergiftungen verantwortlich und möglicher Auslöser eines *toxic shock syndrom* ist (57). SEB wirkt stark mitogen auf T-Zellen, und induziert eine Transformation zu Lymphoblasten (58) sowie eine vermehrte Expression des *major histocompatibility complex* (MHC)-II (15 S. 240f). Dabei binden bakterielle Superantigene wie SEB nicht an die *complementarity determining* Region des TCR, welche für die Interaktion von T-Zellen mit ihrem spezifischen Antigen verantwortlich ist, sondern an bestimmte Varianten der variablen β -Kette des TCR, und können in Abhängigkeit des jeweiligen Superantigens zwischen 2-20% aller T-Zellen stimulieren (15 S. 241, 57). Eine weitere, TCR-unabhängige Methode, wirkt über Aktivierung der Protein-Kinase-C und gleichzeitiger intrazellulärer Bereitstellung von Ca²⁺-Ionen. *Phorbol-12-Myristat-13-Actetat* (PMA) wird dabei in Kombination mit Ionomycin, einem Ionophor welcher als Ionenkanal für Ca²⁺-Ionen in der Zellmembran fungiert, verwendet (59). Interessanterweise konnte eine Arbeitsgruppe CD3⁺CD20^{dim} Zellen allein mit PMA, ohne Hinzugabe von Ionomycin, zu einer vermehrten Zytokinproduktion verglichen zu CD20-negativen T-Zellen stimulieren. Diese Beobachtung könnte ebenfalls zu den in 1.2.4.1 erwähnten Hinweisen auf eine

Einleitung

Funktion von CD20 als Ca^{2+} -Kanal beitragen, und eine leichtere Stimulation von $\text{CD3}^+\text{CD20}^{\text{dim}}$ Zellen durch vermehrten Ca^{2+} -Einfluss nahelegen (60).

Bei der Stimulation mittels *mixed lymphocyte reaction* (MLR) werden typischerweise Lymphozyten von zwei allogenen Individuen zusammen inkubiert, wobei die Lymphozyten eines Spenders zuvor mittels Bestrahlung oder eines Zytostatikums (bspw. Mitomycin C) unfähig zur Zellteilung gemacht wurden, sodass man bei Untersuchung der Proliferation nur die unbehandelten Lymphozyten misst. Stimulus hierbei sind die allogenen MHC-Moleküle der teilungsunfähigen Lymphozyten (59).

1.3.2 Bislang bekannte Effekte einer T-Zell-Stimulation auf $\text{CD3}^+\text{CD20}^{\text{dim}}$ Zellen

$\text{CD3}^+\text{CD20}^{\text{dim}}$ Zellen sind ein vermehrt aktivierter Subtyp (26) und werden durch T-Zell-Stimulantien leichter und in höherer Anzahl aktiviert verglichen zu CD20-negativen T-Zellen (30). Ein vermehrtes Vorkommen nach Stimulation ist jedoch bisher für menschliche $\text{CD3}^+\text{CD20}^{\text{dim}}$ Zellen nicht beschrieben. Eine Arbeitsgruppe konnte jedoch in T-Zellen aus Lymphknoten von Rhesus-Affen eine vorübergehend vermehrte Expression von CD20 nach *in vitro* Stimulation mit Concanavalin A, einem Lektin, beobachten, sowie eine Zunahme der $\text{CD3}^+\text{CD20}^{\text{dim}}$ Zellzahl in Lymphknoten bei Lymphadenopathie nach Infektion von Rhesus-Affen mit dem Simianen Immundefizienz Virus, einem Analogon zum menschlichen Humanen Immundefizienz-Virus (61).

1.4 Fragestellungen dieser Arbeit

Die übergeordnete Fragestellung dieser Arbeit war, die Dynamik von $\text{CD3}^+\text{CD20}^{\text{dim}}$ Zellen unter verschiedenen Paradigmen wie T-Zell-Stimulation und Therapie mit CD20-depletierenden Antikörpern besser zu verstehen, und Rückschlüsse auf die Entstehung dieser Zellen zu ziehen. Im Einzelnen werden folgende Teil-Fragestellungen bearbeitet:

1.4.1 Findet nach Gabe therapeutischer anti-CD20-Antikörper eine echte Depletion von CD3⁺CD20^{dim} Zellen oder nur eine Kaschierung der Nachweisbarkeit von CD20 statt?

Um Rückschlüsse über die Kinetik der CD3⁺CD20^{dim} Repletion *in vivo* zu erhalten, wurde das Wiederauftreten von CD3⁺CD20^{dim} Zellen bei Patienten unter Therapie mit anti-CD20-Antikörpern detailliert in bis zu monatlichen Intervallen untersucht. Um festzustellen, ob dem fehlenden Nachweis von CD3⁺CD20^{dim} Zellen unter anti-CD20-Therapie *in vivo* andere Mechanismen als eine Depletion, wie bspw. eine Internalisierung/Kaschierung von CD20 zugrunde liegen, wurden CD3⁺CD20^{dim} Zellen in Patienten vor bzw. nach Erstgabe von OCR durchflusszytometrisch auf eine Internalisierung von CD20, sowie auf den potentiellen Nachweis von an CD3⁺CD20^{dim} Zellen gebundene anti-CD20-Antikörper mittels sekundärem Antikörper untersucht.

1.4.2 Findet sich eine Änderung der CD20-Expression *in vitro* und *in vivo* durch T-Zell-Stimulation?

In vitro wurde untersucht, wie sich der Anteil von CD3⁺CD20^{dim} Zellen an T-Zellen bei Exposition mittels des T-Zell-Stimulans SEB ändert, und ob eine Induktion von CD3⁺CD20^{dim} Zellen aus CD20^{neg} T-Zellen möglich ist. Dafür wurden PBMC sowohl direkt nach Isolation aus Blut, als auch mittels *fluorescence-activated cell sorting* (FACS) sortierte PBMC in Zellkultur stimuliert. Als *in vivo* Korrelat zur *in vitro* Stimulation wurden Patienten mit erhöhtem CRP als Zeichen einer Aktivierung des Immunsystems auf vermehrte CD3⁺CD20^{dim} Zellen in PBMC untersucht. Weiterhin wurde in Kooperation mit dem Projekt einer weiteren Promotionsstudentin der Arbeitsgruppe, Frau Lena Beller, die Möglichkeit PBMC von Patienten mit B-Zell-Neoplasien unter Therapie mit *chimeric antigen receptor* (CAR) T-Zellen in der Klinik für Hämatologie, Onkologie, klinische Immunologie und Rheumatologie Tübingen mittels Durchflusszytometrie zu untersuchen. CAR-T-Zellen zeigen eine starke Proliferation und Aktivierung bei Kontakt mit ihrem Antigen (62, 63), sodass diese Population als zusätzliches Korrelat für eine Stimulation *in vivo* untersucht wurde.

1.4.3 Gibt es CD3⁺CD20^{dim} Zellen *in vivo* auch ohne externe Antigen-Stimulation?

Als *in vivo* Paradigma mit allenfalls minimalst denkbarer externer Antigen-Stimulation, sowie aufgrund von uneinheitlichen Aussagen zum Vorkommen von CD3⁺CD20^{dim} Zellen im Nabelschnurblut (32, 33), wurde das Vorkommen sowie der Phänotyp von CD3⁺CD20^{dim} Zellen in Zellen im Nabelschnurblut (*cord blood mononuclear cells*, CBMC) untersucht.

1.4.4 Finden sich Gemeinsamkeiten im TCR-Repertoire von CD3⁺CD20^{dim} *memory* Zellen im Vergleich zu CD3⁺CD20^{neg} *memory* Zellen als Hinweis auf eine gemeinsame Abstammung dieser Zellen?

Über die Zusammensetzung des TCR aus CDR3-Nukleotidsequenz, V-, J- (und D-) Segment lassen sich einzelne Klone (*Clonotypes*) definieren, über deren Verteilung Aussagen zur Heterogenität und Verwandtschaft einzelner T-Zell-Subpopulationen getroffen werden können (64, 65). Um diese Charakteristika in CD3⁺CD20^{dim} Zellen in Vergleich zu CD20-negativen T-Zellen genauer zu untersuchen, und mögliche Rückschlüsse auf die Verwandtschaft und Entstehung von CD3⁺CD20^{dim} Zellen schließen zu können wurde weiterhin das α -/ β -TCR-Repertoire von *memory* T-Zellen in Kooperation mit dem Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin, analysiert.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien, Antikörper

2.1.1 Geräte & Software

PBMC wurden an einem Durchflusszytometer Modell CyAn ADP (Beckman Coulter, Krefeld) mit der Herstellersoftware Summit v4.3.02 analysiert. Die Auswertung und graphische Darstellung erfolgte mit FlowJo v10.0.7r2 (FlowJo LLC, Becton Dickinson, Heidelberg). Für FACS wurde ein BD FACS Aria III Cell Sorter (Becton Dickinson) mit der Herstellersoftware BD FACS Diva v8.0.1 verwendet. Die Bereitstellung und technische Bedienung erfolgte durch Mitarbeiter der *flow cytometry core facility* Tübingen. Weiterhin wurden typische Laborinstrumente (Pipetten, Pipettenspitzen, Eppendorf-Cups, etc.) sowie Laborgeräte (Zentrifuge, Vortex, Wasserbad, etc.) verwendet. Für das Sortieren von PBMC mittels Magneten (*magnetic activated cell sorting*, MACS) wurden MACS Separationsäule LS sowie ein MidiMACS Magnet verwendet (beide Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach). Als Sterilwerkbank wurde eine HERAsafe HS 18 (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) verwendet, als CO₂-Inkubator ein MCO-18AIC (Panasonic, zuvor Sanyo, Hamburg).

2.1.2 Verbrauchsmaterialien, Reagenzien, Lösungen

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
24 Well Zellkulturplatte	Cellstar
48 Well Zellkulturplatte	Costar
Zellfilter 40µm Nylon (Cell strainer 40 µm Nylon)	Falcon
Cellstar Röhrchen 50 ml, 15 ml	Greiner bio-one
Cryo.s-Röhrchen	Greiner bio-one
Falcon 5 ml Rundboden Polypropylen Test Röhrchen	Corning
LS Separationssäule	Miltenyi Biotec
Microplate 96 Wellplatte, u-Boden	Greiner bio-one
Parafilm	Bemis
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Ratiolab
Safe-Lock Röhrchen 1,0 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Eppendorf
Serologische Einmalpipetten 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Costar
Transferpipetten LPDE 5,0 ml	VWR

Material und Methoden

Tabelle 2: Reagenzien

Reagenzien	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Ammoniumchlorid, NH ₄ Cl	Carl-Roth
Annexin V Bindungspuffer	BD Biosciences
CD19 CAR detection reagent human, Biotin	Miltenyi Biotec
<i>Dimethylsulfoxid</i> (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Posphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate-buffered-saline</i> , PBS). Ohne Calciumchlorid oder Magnesiumchlorid, steril gefiltert, auf Endotoxine getestet	Sigma-Aldrich, Bestellnummer: D8537
Ethylalkohol, vergällt	SAV Liquid Production GmbH
<i>Ethylendiamintetraessigsäure</i> (EDTA)	Carl Roth
Fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i> , FCS), hitzeinaktiviert	Thermo Fisher Scientific
Fixierpuffer	BioLegend
Histopaque	Sigma-Aldrich
Ionomycin	Sigma-Aldrich
Kaliumhydrogenacarbonat, KHCO ₃	Carl-Roth
Kupfersulfat, CuSO ₄	Chemdiscount
Mitomycin C	Sigma-Aldrich
Natriumazid, NaN ₃	Carl Roth
Permeabilisationspuffer	BioLegend
Phorbol-12-Myristat-13-Actetat (PMA)	Sigma-Aldrich
RLT Lysepuffer	Qiagen
RPMI 1640	Sigma-Aldrich
RPMI 1640 HEPES	Thermo Fisher Scientific, S2400
Staphylokokken Enterotoxin B (SEB)	Sigma-Aldrich
Trypanblau	Sigma-Aldrich
Interleukin-2	Miltenyi Biotec

Tabelle 3: Selbst angesetzte Lösungen, Puffer, Medien und deren Zusammensetzung

Lösungen, Puffer, Medien	Zusammensetzung
<i>Ammonium-Chlorid-Kalium</i> (ACK)-Puffer	Grundlage: ddH ₂ O 150 mM NH ₄ Cl 10 mM KHCO ₃ 0,1 mM EDTA pH 7,3
Einfriermedium	40 % FCS

Material und Methoden

	20 % DMSO 40 % RPMI
FACS-Puffer	Grundlage: PBS 2 % FCS 2 mM EDTA 0,01 % NaN ₃
MACS-Puffer	Grundlage: PBS 0,5 % FCS 2 mM EDTA pH 7,2
Kulturmedium	Grundlage: RPMI 1640 10 % FCS bzw. autologes humanes Serum
TCM basic medium	Grundlage: RPMI 1640 HEPES 55 µM 2-Mercaptoethanol 10 % autologes humanes Serum 300 U/ml Interleukin-2 30 ng/ml OKT-3 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin

2.1.3 Konjugierte Antikörper für Durchflusszytometrie/FACS

Tabelle 4: Konjugierte Antikörper für Durchflusszytometrie/FACS

Epitop/ Zielstruktur	Fluorophor	Klon	Verdünnung	Hersteller
Biotin	PEVio770	REA746	1:50	Miltenyi Biotech
CCR7	PE-Cy7	G043H7	1:80 für analytische Durchflusszytometrie / 1:45 für FACS mit Sortieren von PBMC*	BioLegend
CCR7	BV 510	G045H7	1:18	BioLegend
CD137	APC	4B4-1	1:15	BioLegend
CD14	FITC	n.a.	1:180	Beckman Coulter
CD154	PE	5C8	1:40	Miltenyi Biotech
CD16	PerCP	3G8	1:180	BioLegend
CD19	FITC	HIB19	1:22,5	BD Pharmingen
CD19	FITC	HIB19	1:360 / 1:50 *	BioLegend
CD19	BV 510	SJ25C1	1:90	BioLegend
CD20	BV 421	2H7	1:18	BioLegend

Material und Methoden

CD20 (cytoplasmic)	APC	1412	1:20	BioLegend
CD25	PE	M-A251	1:22,5	BD Pharmingen
CD27	PerCP- Cy5.5	M-T271	1:90	BioLegend
CD3	FITC	UCHT1	1:180	BioLegend
CD3	APC	UCHT1	1:45 / 1:12,5 *	BD Biosciences
CD3	APC	UCHT1	1:300 / 1:50 *	BioLegend
CD4	PerCP	SK3	1:45 / 1:8,3 *	BD Biosciences
CD4	APC	RPA-T4	1:20	BD Pharmingen
CD45RA	PE-Cy7	HI100	1:300	BioLegend
CD45RA	BV 510	HI100	1:360 / 1:45 *	BioLegend
CD56	PE	B159	1:22,5	BD Pharmingen
CD56	PE	HCD56	1:45	BioLegend
CD8	PerCP	SK1	1:45 / 1:20 *	BD Biosciences
CD8	PerCP	SK1	1:1440 / 1:50 *	BioLegend
CD8	PE-Cy7	RPA-T8	1:45	BD Biosciences
HLA-A2	PE	BB7.2	1:10	Thermo Fisher Scientific
HLA-DR	PE	L243	1:18	BioLegend
Humanes IgG	APC	G18-145	1:9	BD Pharmingen
Humanes IgG (heavy + light chains)	Alexa Fluor (AF) 647	Polyklonal	1:20.000	Invitrogen

*für FACS mit Sortieren von PBMC wurden höhere Zellzahlen im Bereich $2-6 \cdot 10^7$ gefärbt, was eine geringere Verdünnung notwendig machte

2.1.4 Weitere Antikörper, Beads, Apoptosemarker

Tabelle 5: Weitere Antikörper, Beads, Apoptosemarker

Bezeichnung	Hersteller
7-Aminoactinomycin D (7-AAD)	AAT Bioquest
Annexin V-FITC	BD Pharmingen
Annexin V-APC	BioLegend
anti-CD3-Antikörper (Klon OKT-3)	Miltenyi Biotech
CD4 MicroBeads, human	Miltenyi Biotech
CD8 MicroBeads, human	Miltenyi Biotech
LIVE/DEAD Near-IR fluorescent reactive dye	Invitrogen
Ocrelizumab	Roche
Ofatumumab	Novartis
Propidium Iodide (PI) staining solution	BD Pharmingen

2.2 Patientenkollektiv und gesunde Probanden

Bei den in dieser Arbeit untersuchten erwachsenen Patienten und Probanden erfolgte die Probenentnahme als venöse *Blutentnahme* (BE) nach dem Ethikvotum 204/2018BO2. Die untersuchten Patienten gliederten sich in vier Gruppen: 1) Patienten mit erhöhtem *C-reaktivem Protein* (CRP). 2) Patienten unter Therapie mit anti-CD20-Antikörpern mit bis zu monatlichen Verlaufsuntersuchungen; 10 Patienten während des 1. Zyklus OCR, 1 Patient während des 1. Zyklus RTX, sowie 1 Patient während des 2. Zyklus OCR. 3) Patienten in einem späteren ($\geq 4.$) Zyklus OCR oder RTX. 4) Patienten mit B-Zell-Neoplasien unter Therapie mit CD19-spezifischen-*chimärem Antigenrezeptor* (CAR)-T-Zellen nach vorheriger Chemotherapie mittels Fludarabin und Cyclophosphamid. Weiterhin wurden PBMC eines Patienten mit Bruton-Syndrom mittels Durchflusszytometrie untersucht. Bei dieser seltenen Erkrankung kommt es durch Mutationen im Bruton-Tyrosinkinase-Gen zu einer fehlerhaften B-Zell-Reifung und dadurch zu einer fehlenden Antikörperproduktion, sodass betroffene Patienten lebenslang eine erhöhte Infektanfälligkeit zeigen (66).

Bei Patienten unter Therapie mit anti-CD20-Antikörpern erfolgte bei jeder Vorstellung eine Dokumentation neuer klinischer Symptome, eine Blutentnahme mit Bestimmung eines großen Blutbildes sowie die Entnahme eines Röhrchens EDTA-Vollblut für die Untersuchung mittels Durchflusszytometrie.

Tabelle 6: Hintergrundinformationen zu Patienten mit erhöhtem CRP, gesunden erwachsenen Probanden

ID	Hauptdiagnose	Alter	Geschlecht	CRP bei BE [mg/dl]	Hospitationsdauer bei BE
Pat17	Ischämischer Schlaganfall	41	M	7,34	10 Tage
Pat18	Ischämischer Schlaganfall	87	W	14,48	7 Tage
Pat23	Harnwegsinfekt	28	M	5,74	13 Tage
Pat28	Familiäres Mittelmeerfieber	32	M	22,90	1 Tag
Pat48	Pneumogene Sepsis	70	M	11,0	5 Tage
Pat49	Pneumonie	86	M	14,1	16 Tage
Pat50	Pneumonie	84	W	20,9	1 Tag
Pat51	Pneumonie	88	W	9,4	12 Tage

Material und Methoden

Pat52	Pneumonie	83	M	20,6	2 Tage
Pat53	Pneumonie	70	M	24,0	2 Tage
Prob1	Gesunder Proband	23	W		
Prob2	Gesunder Proband	23	M		
Prob3	Gesunder Proband	24	W		
Prob4	Gesunder Proband	36	M		
Prob5	Gesunder Proband	26	W		
Prob6	Gesunder Proband	26	W		
Prob7	Gesunder Proband	54	W		
Prob8	Gesunder Proband	34	M		
Prob9	Gesunder Proband	47	M		
Prob10	Gesunder Proband	22	W		
Prob11	Gesunder Proband	24	W		
Prob12	Gesunder Proband	56	W		
Prob13	Gesunder Proband	40	M		
Prob14	Gesunder Proband	38	W		
Prob15	Gesunder Proband	27	M		

Tabelle 7: Hintergrundinformationen zu Patienten unter OCR-/RTX-Therapie

ID	Hauptdiagnose	Alter	Geschlecht	Therapie	Zyklus bei BE	Blutentnahme (BE)								
						Vor Gabe	Nach 2 Wochen	Monat						
								1	2	3	4	5	6	7
Pat24	RMS	55	W	OCR	1	x		x	x	x		x	x	
Pat32	PPMS	58	M	OCR	1	x		x	x	x	x		x	
Pat33	RMS	54	M	OCR	1	x		x	x	x	x	x	x	
Pat34	PPMS	53	W	OCR	1	x		x		x	x			
Pat35	PPMS	54	M	OCR	1	x			x	x		x		x
Pat36	NMOSD	54	W	RTX	1	x		x	x	x	x	x	x	
Pat37	PPMS	50	W	OCR	1	x		x	x	x	x	x	x	
Pat38	RMS	32	W	OCR	2	x			x		x		x	
Pat39	RMS	30	W	OCR	1	x			x	x	x	x	x	
Pat43	RMS	30	M	OCR	1	x		x						x
Pat44	RMS	58	W	OCR	1	x		x	x			x	x	
Pat46	RMS	34	W	OCR	1	x	x	x						x
Pat63	RMS	29	M	OCR	1	x	x							
Pat66	RMS	22	W	OCR	1	x	x							
Pat67	RMS	33	M	OCR	1	x	x							
Pat72	RMS	27	W	OCR	1	x	x							

Material und Methoden

Pat64	PPMS	61	W	OCR	4	x												
Pat5	RMS	57	W	OCR	5	x												
Pat65	RMS	33	M	OCR	5	x												
Pat61	RMS	27	M	OCR	4	x												
Pat60	PPMS	52	W	OCR	5	x												
Pat68	NMOSD	53	W	RTX	5	x												
Pat36	NMOSD	54	W	RTX	5	x												
Pat70	SPMS	52	W	RTX	13	x												
Pat69	NMOSD	53	M	RTX	4	x												
Pat58	CIDP	60	W	RTX	5	x												

Tabelle 8: Hintergrundinformationen zu Patienten unter CAR-T-Zelltherapie

ID	Hauptdiagnose	CAR-T-Präparat	BE zu		Komplikationen unter Therapie
			Zeitpunkten (Tage)	nach Transplantation	
Tüb_2020_036	Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom	Axicabtagen-Ciloleucel (Yescarta®), Gilead, DE262032	+4	+11	cytokine release syndrome I°, Therapie mittels Tocilizumab
Tüb_2021_003	B-Zell akute lymphatische Leukämie	Eigenherstellung der Klinik für Hämatologie und Onkologie Tübingen, kryokonservierte CAR-T-Zellen (CD19/CD22)	+3	+10	
Tüb_2021_005	Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom	Tisagenlecleucel (Kymriah®), Novartis, Chargennummer MPAEPU1	+4	+11	Neutropenie, Thrombozytopenie, Infekt mit Nachweis von Staphylokokkus hominis in Blutkulturen
Tüb_2021_007	Follikuläres Lymphom (transformiertes diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom)	MB CART 19.1, Miltenyi Biotech, Chargennummer 21-CPUER-003	+3	+10	cytokine release syndrome I°
Tüb_2021_015	Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom	Tisagenlecleucel (Kymriah®), Novartis, Chargennummer MPAES31	+3	+10	cytokine release syndrom I°

Die untersuchten *cord blood mononuclear cells* (CBMC) wurden aus Nabelschnurblut gesunder Neugeborener ohne Infektzeichen, welche per primärem Kaiserschnitt in der Universitätsfrauenklinik Tübingen geboren wurden, gewonnen. Hierfür lag eine schriftliche Einwilligung der Eltern über die Verwendung des Blutes für Forschungszwecke vor, gemäß des Ethikvotums 248/2005A.

2.3 Probenbearbeitung für analytische Durchflusszytometrie & FACS mit Sortieren von PBMC

2.3.1 PBMC-Isolation aus EDTA-Vollblut

PBMC wurden aus EDTA-Vollblut mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. EDTA-Vollblut wurde hierfür 1:1 mit PBS verdünnt, und vorsichtig in einem 50 ml Falcon-Röhrchen auf eine Schicht Ficoll-Hypaque (Histopaque, Sigma-Aldrich) (dann Verhältnis 1:1:1) aufgetragen (67). Es schloss sich eine Zentrifugation an (30 min, 400 g, *Raumtemperatur* (RT, 21°C)) mit langsamer Beschleunigung und Abbremsung, sodass sich zwischen Ficoll-Hypaque und Blutplasma eine zellreiche Schicht (*buffy coat*), bestehend aus PBMC und Thrombozyten absetzte. Diese wurde vorsichtig abpipettiert, und in ein neues, mit PBS gefülltes 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Es erfolgte erneut eine Zentrifugation (15 min, 300 g, RT). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet sanft resuspendiert und mit 10 ml PBS verdünnt. Hiervon wurden 20 µl entnommen, mit 20 µl Trypanblau verdünnt und in eine Neubauer-Zählkammer zur Bestimmung der Lebendzellzahl per Lichtmikroskopie überführt. Die restliche Zellsuspension wurde erneut zentrifugiert (10 min, 200 g, RT). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet entsprechend des weiteren Vorgehens (FACS mit Sortieren von PBMC, analytische Durchflusszytometrie, *in vitro* Stimulation, etc.) resuspendiert und weiterbearbeitet.

2.3.2 Probenbearbeitung aus EDTA-Vollblut ohne Dichtegradienten

Für die Immunphänotypisierung von Lymphozyten ohne Dichtegradientenzentrifugation wurden Erythrozyten aus EDTA-Vollblut mittels ACK-Pufferhypoton lysiert. Dafür wurden je 150 µl EDTA-Blut in je ein Well einer

96-Well-Platte überführt, mit 150 µl PBS verdünnt und zentrifugiert (4 min, 400 g, 4°C). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 180 µl ACK-Puffer resuspendiert und für 10 min bei RT für die Lyse der Erythrozyten inkubiert. Danach erfolgte eine erneute Zentrifugation (4 min, 400 g, 4°C), sowie ein Waschschrift mit 150 µl PBS, dieser Ablauf wurde danach wiederholt. Am Ende fand sich ein weißliches Zellpellet am Boden der Wells, bestehend aus PBMC und Granulozyten, welches nun für die Färbung mit konjugierten Antikörpern bereit war.

2.3.3 Färbung mittels konjugierter Antikörper

An die Lyse von EDTA-Vollblut bzw. die PBMC-Isolation wurde die Färbung mit konjugierten Antikörpern angeschlossen. Hier wurde das isolierte Zellpellet mit PBS auf eine Konzentration von $2 \cdot 10^5$ Zellen pro 200 µl verdünnt, je 200 µl pro Well in eine 96-Well-Platte überführt, abzentrifugiert (4 min, 400 g, 4°C) und der Überstand verworfen. Für die Färbung von extrazellulären Epitopen wurden die verwendeten Antikörper in den angegebenen Verdünnungen (siehe Tab. 4) in einer Gesamtmenge von 45 µl FACS-Puffer auf das Zellpellet gegeben, dieses resuspendiert, und für 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend erfolgten zwei Waschschriffe mit PBS und Zentrifugation (4 min, 400 g, 4°C, 150 µl PBS). Nach dem letzten Waschschrift erfolgte eine Aufnahme in 600 µl FACS-Puffer in ein FACS-Röhrchen für die Messung am Durchflusszytometer.

2.3.4 Versuche zur Kompetition von anti-CD20-Antikörpern

In den *in vitro* Versuchen zur Kompetition zwischen einem zuvor applizierten therapeutischen anti-CD20-Antikörper (OCR, OFA) mit einem diagnostischen, konjugierten Antikörper für die Durchflusszytometrie wurden die Zellen zunächst mit dem therapeutischen Antikörper in einem Volumen von 100 µl inkubiert (15 min, 4°C) und zweimal gewaschen (4 min, 400 g, 4°C, 150 µl PBS). Für die anschließende Färbung wurden zum einen extrazelluläre Antikörper (anti-CD20-Antikörper: Klon 2H7), verwendet. Alternativ wurde mittels eines, die zytoplasmatische Domäne des CD20-Moleküls erkennenden Antikörpers (Klon 1412) auch eine intrazelluläre Färbung durchgeführt. Für diese intrazelluläre Färbung von CD20 wurden weitere Oberflächenmoleküle zur Differenzierung (bspw. CD3, CD19) zunächst mit extrazellulären Antikörpern wie in Kapitel 2.3.3

gefärbt, anschließend erfolgte eine Fixierung der bereits gebundenen Antikörper mittels 500 µl Fixierpuffer (BioLegend, Inhaltsstoffe lt. Hersteller u.a. Formalin) für 15 min bei RT im Dunkeln, sowie 2 Waschschrte (5 min, 700 g, RT, 1ml Permeabilisationspuffer (BioLegend)) und eine anschließende Inkubation der Zellen mit dem intrazellulären anti-CD20-Antikörper Klon 1412 in 100 µl Permeabilisationspuffer, um intrazelluläre Epitope zugänglich zu machen (68). Es schlossen sich erneut zwei Waschschrte (5 min, 700 g, RT, 1 ml Permeabilisationspuffer), und zuletzt die Aufnahme in 600 µl FACS-Puffer in ein FACS-Röhrchen an.

2.3.5 Spezielle Probenbearbeitung für FACS von CD3⁺CD20^{dim} Zellen zur anschließenden TCR-Sequenzierung

PBMC wurden anhand von drei Parametern in acht verschiedene T-Zell-Populationen sortiert: CD4⁺/CD8⁺, CD20^{dim}/CD20⁻ und CD45RA⁺/CD45RA⁻. Für die anschließende TCR-Sequenzierung wurden ca. $2 \cdot 10^4$ sortierte Zellen pro Population angestrebt, sodass bei niedrigem Anteil dieser Populationen an T-Zellen eine entsprechend hohe Ausgangszellzahl (regelmäßig ca. $2 \cdot 6 \cdot 10^7$ PBMC) benötigt wurde. Um die Bedingungen weiter zu verbessern erfolgte vor dem FACS eine Anreicherung der CD4⁺ und CD8⁺ Zellen mittels magnetischer Anreicherung (MACS). Hierbei werden PBMC mit an Magnete konjugierte Antikörper (Beads) spezifisch für ein Epitop, in diesem Fall CD4 oder CD8, inkubiert. Diese PBMC-Bead-Lösung wird auf eine Säule in einem starken magnetischen Feld aufgetragen, woraufhin sich die an die Zielzellen gebundenen Beads von den restlichen Zellen trennen und in ein separates Gefäß überführt werden können. In diesem Fall erfolgte eine Anreicherung von CD4⁺-Zellen nach Herstellerprotokoll, indem PBMC mit je 80 µl MACS-Puffer und 20 µl CD4 MicroBeads (beide Miltenyi Biotec) pro 10^7 Zellen inkubiert wurden (15 min, 4 °C). Im Anschluss wurden 2 ml MACS-Puffer pro 10^7 Zellen hinzugegeben, zentrifugiert (10 min, 300 g, 4 °C), und das Zellpellet anschließend in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert. Für die magnetische Trennung wurde eine LS-Säule (Miltenyi Biotec) in einem MidiMACS Magnet (Miltenyi Biotec) platziert, und diese zunächst mit 3 ml MACS-Puffer gespült. Im Anschluss wurde die Zellsuspension aufgetragen und anschließend drei Mal mit je 3 ml MACS-Puffer gespült. CD4⁺-

Zellen wurden dabei durch den Magneten zurückgehalten, der Durchfluss nach mehrmaligem Spülen bildete die CD4-depletierte Population. Diese wurde im Anschluss zur Anreicherung von CD8⁺-Zellen mittels desselben Protokolls mit CD8 MicroBeads genutzt. Die an den Rand der Säule gebundenen CD4⁺-Zellen wurde durch das Entfernen der LS-Säule aus dem magnetischen Feld, sowie raschem, forciertem Spülen mit 5 ml MACS-Puffer gewonnen.

Die mittels MACS angereicherten Zellen wurden anschließend in 100 µl FACS-Puffer mit konjugierten Antikörpern inkubiert und gewaschen, analog zur Färbung geringerer Zellzahlen (Vgl. Kapitel 2.3.3). Aufgrund der höheren Zellzahl für das FACS mussten hier jedoch höhere Antikörperkonzentrationen verwendet werden, um trotzdem ein adäquates Signal in der Durchflusszytometrie zu gewährleisten (siehe Tab. 4), welche in mehreren Vorversuchen empirisch bestimmt wurden. Im Anschluss an die Färbung erfolgte eine Aufnahme in der PBMC in FACS-Puffer mit einer Konzentration von ca. 10^7 Zellen/ml, sowie das Filtern durch einen 40 µm Filer (40 µm *cell strainer*, Falcon) für eine Einzelzelllösung. Das FACS erfolgte anschließend in der *flow cytometry core facility* Tübingen. Die sortierten Zellen wurden direkt in RLT-Puffer (Qiagen) aufgefangen, 2-Mercaptoethanol für eine Konzentration von 1 % hinzugegeben und sofort bei -80°C eingefroren, um diese im Verlauf für die anschließende TCR-Sequenzierung an das Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin, zu schicken.

2.3.6 Spezielle Probenbearbeitung für durchflusszytometrische Untersuchungen von CD19-spezifischen CAR-T-Zellen

Als ergänzende Versuche zum Vorkommen von CD3⁺CD20^{dim} Zellen unter *in vivo* Stimulationsbedingungen ergab sich in Kooperation mit einer weiteren Promotionsstudentin der Arbeitsgruppe, Frau Lena Beller, die Möglichkeit PBMC von Patienten mit B-Zell-Neoplasien unter Therapie mit *chimeric antigen receptor* (CAR) T-Zellen in der Klinik für Hämatologie, Onkologie, klinische Immunologie und Rheumatologie Tübingen zu untersuchen. Da für Teilfragestellungen beider Projekte eine Untersuchung dieser Proben vorgesehen war, und um eine schnelle Probenbearbeitung dieser wertvollen Proben zu gewährleisten, wurde die Probenbearbeitung und Durchflusszytometrie für diese Versuche in enger gemeinsamer Absprache nur durch eine Person, Frau Lena Beller, durchgeführt.

Die Auswertung und Interpretation der Daten erfolgten durch mich. Zur Detektion von CD19-spezifischen CAR-T-Zellen wurden dafür PBMC, wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben, gewonnen, daraufhin das *CD19 CAR Detection Reagent* (Miltenyi Biotec) nach Herstellerprotokoll verwendet, und im Anschluss die Färbung mit Oberflächenmarkern für die Durchflusszytometrie, wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben, angeschlossen. Das *CD19 CAR Detection Reagent* beinhaltet ein Fusionsprotein mit einer Struktur ähnlich extrazellulärer CD19-Domänen, welches von CD19-spezifischen CAR-T-Zellen gebunden wird und anschließend mittels Sekundärantikörper gegen Biotin nachgewiesen werden kann.

2.4 Methoden zur *in vitro* Stimulation von T-Zellen

Aus Blut isolierte PBMC wurden für die *in vitro* Stimulation in Kulturmedium (RPMI 1640, 10% FCS bzw. humanes autologes Serum) in 24- bzw. 48-well-Platten typischerweise in einer Zelldichte von $2 \cdot 10^5$ Zellen/ml Medium überführt. Die Probenbearbeitung erfolgte an einer Sterilwerkbank (HERAsafe HS 18, Thermo Fisher Scientific) mit laminarem Luftzug unter sterilen Arbeitsbedingungen. Die Lagerung und Inkubation der Zellen erfolgte in einem CO₂-Inkubator (MCO-18AIC, Panasonic, zuvor Sanyo) mit 5 % CO₂-Anteil, 37 °C und mittlerer Luftfeuchtigkeit. Das Kulturmedium wurde regelmäßig (alle 2-3 Tage) bzw. bei Umschlagen des Farbindikators in saure Bereiche erneuert.

Bei Stimulation von PBMC mit SEB (Endkonzentration 1 µg/ml) wurde dieses 3h nach Transfer der Zellen in die Platten hinzugegeben. Bei Erneuerungen des Mediums wurde SEB ebenfalls in das neue Medium hinzugegeben, um diese Konzentration beizubehalten. Als unstimulierte negativ-Kontrolle wurde 1 µl PBS auf 1 ml Kulturmedium hinzugegeben. Bei Entnahme der Zellen zur Untersuchung mittels Durchflusszytometrie erfolgte die Färbung mit Antikörpern analog den Abläufen in Kapitel 2.3.3.

Tote Zellen wurden mittels Toffarbstoffe (Propidiumiodid (PI), BD Pharmingen), 7-Aminoactinomycin D (7-AAD, AAT Bioquest), LIVE/DEAD Near-IR Fluorescent Reactive Dye, Invitrogen) exkludiert. LIVE/DEAD NIR wurde dabei parallel zur Färbung mit konjugierten Antikörpern wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben in einer

Verdünnung von 1 : 900 hinzugegeben. PI und 7-AAD wurden nach o.g. Färbung in einer Konzentration von 1 μM (7-AAD) bzw. 2,5 $\mu\text{g/ml}$ (PI) mit PBMC inkubiert (15 min, RT, im Dunkeln) und anschließend direkt per Durchflusszytometrie untersucht. Zur Unterscheidung zwischen sich in Apoptose befindenden und toten Zellen, und insbesondere deren Anteil an $\text{CD3}^+\text{CD20}^{\text{dim}}$ Zellen, wurde bei Stimulationsversuchen ebenfalls eine Färbung mit Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen) durchgeführt. Dabei wurden nach der Färbung mit Antikörpern wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben PBMC nach Herstellerprotokoll in 100 μl Annexin-V-Bindungspuffer resuspendiert, anschließend 5 μl Annexin V-FITC und 5 μl PI hinzugegeben, diese für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert, und im Anschluss die Messung mittels Durchflusszytometrie angeschlossen. Bei vorheriger Färbung der Zellen mit einem an FITC-konjugierten Antikörper wurde alternativ auch an APC konjugiertes Annexin V (BioLegend) verwendet.

2.5 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie bzw. FACS mit Sortieren von PBMC werden Zellen auf Einzelzellebene bezüglich Größe, Granularität und fluoreszierenden Markern analysiert. Größe und Granularität lassen eine Einteilung in bspw. Lymphozyten, Monozyten oder Granulozyten zu. Mittels an Antikörper konjugierte Fluorophore lassen sich verschiedene Oberflächenmarker, häufig *cluster of differentiation* (CD)-Moleküle, zur Immunphänotypisierung abgrenzen. Die Zellen passieren dabei Laser unterschiedlicher Wellenlänge, welche die gebundenen Fluorophore erregen und zur Strahlung in einer für jedes Fluorophor spezifischen Wellenlänge anregen. Das emittierte Fluoreszenzspektrum passiert Filter für spezifische Wellenlängen, und wird in *photomultiplier tubes* verstärkt und gemessen. So kann jede Zelle einzeln bezüglich ihrer Oberflächenmarker analysiert, und schnell eine für die gesamte Probe repräsentative Menge an Zellen gemessen werden. FACS beruht auf demselben Prinzip, zusätzlich können hier die Zellen anhand der gemessenen Oberflächenmarker sortiert werden. Dazu werden einzelne Zellen in kleine Tropfen suspendiert, dieser elektrisch geladen und anschließend im elektromagnetischen Feld entsprechend der Ladung angezogen bzw. abgestoßen, um diesen in Auffangbehälter zu navigieren.

Für die Versuche mit Durchflusszytometrie und FACS wurden die Grundlagen und gute wissenschaftliche Praxis bezüglich Geräteeinstellungen, Kompensation, Einzelfärbungen und FMO-Kontrollen (69) befolgt. Routinemäßig wurde ein Gating auf Einzelzellen mittels *forward scatter* (FSC) und *side scatter* (SSC) durchgeführt, sowie ein Totfarbstoff (7-AAD, LIVE/DEAD Near-IR, PI) zur Exklusion von toten Zellen verwendet. Insbesondere bei Markern, für welche die Grenze zwischen negativer und positiver Population schwierig zu bestimmen war (v.a. CD20 auf T-Zellen, Aktivierungsmarker wie HLA-DR, CD25, CD154) wurde in jedem Versuch eine Anpassung des Gates für positive und negative Ereignisse anhand einer FMO-Kontrolle vorgenommen. Die typische Gating-Strategie für Lymphozyten, T-/B-Zellen, sowie CD3⁺CD20^{dim} Zellen ist in Abbildung 4 dargestellt, bei abweichender oder ergänzender Gating-Strategie wurde diese im Ergebnisteil bei dem jeweiligen Versuch erwähnt.

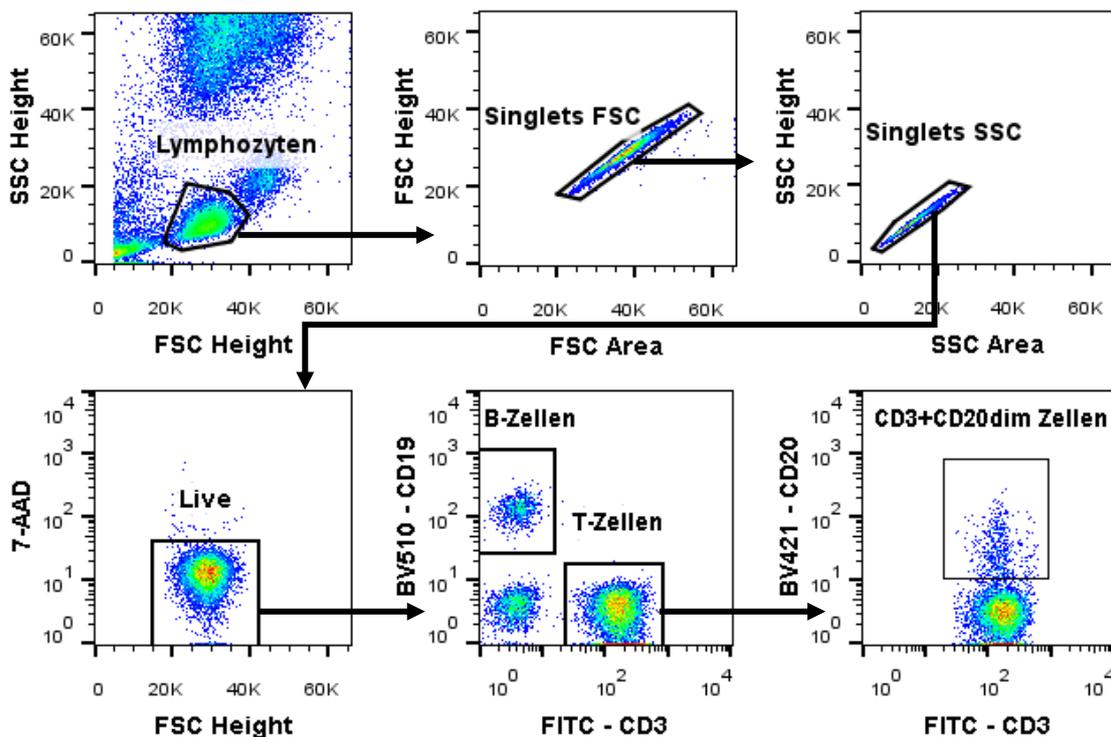


Abbildung 4: Repräsentative Gating-Strategie für Durchflusszytometrie von PBMC bei Patienten und gesunden Probanden.

Zunächst erfolgte ein Gating auf Lymphozyten mittels FSC/SSC, hier wurden typischerweise $2-4 \cdot 10^4$ Lymphozyten pro Probe gemessen. Im Anschluss erfolgte eine Einstellung der Einzelzellen (singlets) per FSC Area und SSC Area. Ein Ausschluss von toten Zellen erfolgte mittels 7-AAD bzw. LIVE/DEAD Near-IR. Gating auf B-/T-Zellen erfolgte mit CD19/CD3. Die Grenzen des Gates für CD3⁺CD20^{dim} Zellen wurde mittels FMO für CD20 festgelegt.

2.6 Probenbearbeitung zur TCR-Sequenzierung

Die weitere Probenbearbeitung zur TCR-Sequenzierung nach dem in Kapitel 2.3.5 beschriebenen FACS erfolgte durch Frau Dr. Caterina Curato und Dr. Katherina Siewert am Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin. Hier wurde zunächst RNA mittels RNeasy Micro Kit (Qiagen) isoliert. Es folgte eine reverse Transkription in cDNA inklusive *template switch* zur Markierung mittels *unique molecular identifier (UMI)* sowie zwei Zyklen Polymerasekettenreaktion (*PCR*) zur Amplifikation von TCR α - und β -Ketten mit anschließender Aufreinigung der DNA (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen). Im Anschluss erfolgte eine Kopplung an Illumina Adapter (TruSeq DNA PCR-Free LT Library Prep Kit, Illumina) sowie die Sequenzierung der PCR-Produkte (MiSeq Reagent Kit v3 (2x250 bp paired-end sequencing, Illumina)). Die PCR-Produkte wurden mittels MIGEC über einen Probenbarcode in den Primersequenzen wieder einzelnen Proben zugeordnet, sowie die *unique molecular identifier* zur Fehlerkorrektur verwendet. TCR-Sequenzen wurden mittels MIXCR bestimmt, wobei Sequenzen mit denselben V- und J-Segmenten und identischer CRD3-Nukleotidsequenz als ein Klon gewertet wurden. In VDJtools wurden nicht-funktionelle TCR-Sequenzen (mit Stopcodon) entfernt (70, 71).

2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung sowie graphische Darstellung erfolgte mit GraphPad Prism v9.0.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA), sowie Excel. Datensätze wurden zunächst auf Normalverteilung getestet. Bei zwei Datengruppen mit Normalverteilung und unterschiedlichen Standardabweichungen wurden diese bei ungepaarten Werten mittels *Welch's t test* untersucht, bei gepaarten Werten mittels *paired t test*. Bei zwei Datenpunkten ohne Normalverteilung wurden diese bei ungepaarten Werten mittels *Mann-Whitney test* untersucht, bei gepaarten mittels *Wilcoxon matched-pairs signed rank test*. Für den Vergleich von mehr als zwei Datenpunkten untereinander wurde bei Normalverteilung mittels *Welch's ANOVA test*, sowie *Dunnett's T3 multiple comparisons* getestet. Für nicht-normalverteilte Datensätze wurde mittels *Kruskal-Wallis test*, sowie *Dunn's multiple comparisons test* getestet. Für

Material und Methoden

gruppierte Datensätze wurde mittels *two-way ANOVA* und *Šidák's multiple comparisons test* getestet. Bei Testung auf Korrelation zweier Datengruppen wurde bei fehlender Normalverteilung mittels *nonparametric Spearman correlation* getestet. P-Werte $\leq 0,05$ wurden als signifikant gewertet. In Abbildungen wurden Asterikse wie folgt verwendet: **** für $p < 0,0001$, *** für $p < 0,001$, ** für $p < 0,01$, * für $p \leq 0,05$. Die Diversität der TCR-Sequenzen wurde mittels Shannon-Index (72) bestimmt. Für die statistische Auswertung wurde die methodische Beratung des Instituts für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie der Universität Tübingen in Anspruch genommen.

3 Ergebnisse

3.1 CD20 lässt sich auf einer kleinen Population nicht-T-, nicht-B-Zellen nachweisen

Zunächst untersuchten wir, auf welchen Blutzellen außer B-Zellen sich CD20 durchflusszytometrisch nachweisen lässt. Untersucht wurden 5 Proben CBMC, 6 gesunden erwachsenen Probanden (PBMC), 4 Patienten mit MS vor bzw. nach der Erstgabe OCR sowie je 4 Patienten am Ende des ≥ 4 . Zyklus OCR bzw. RTX

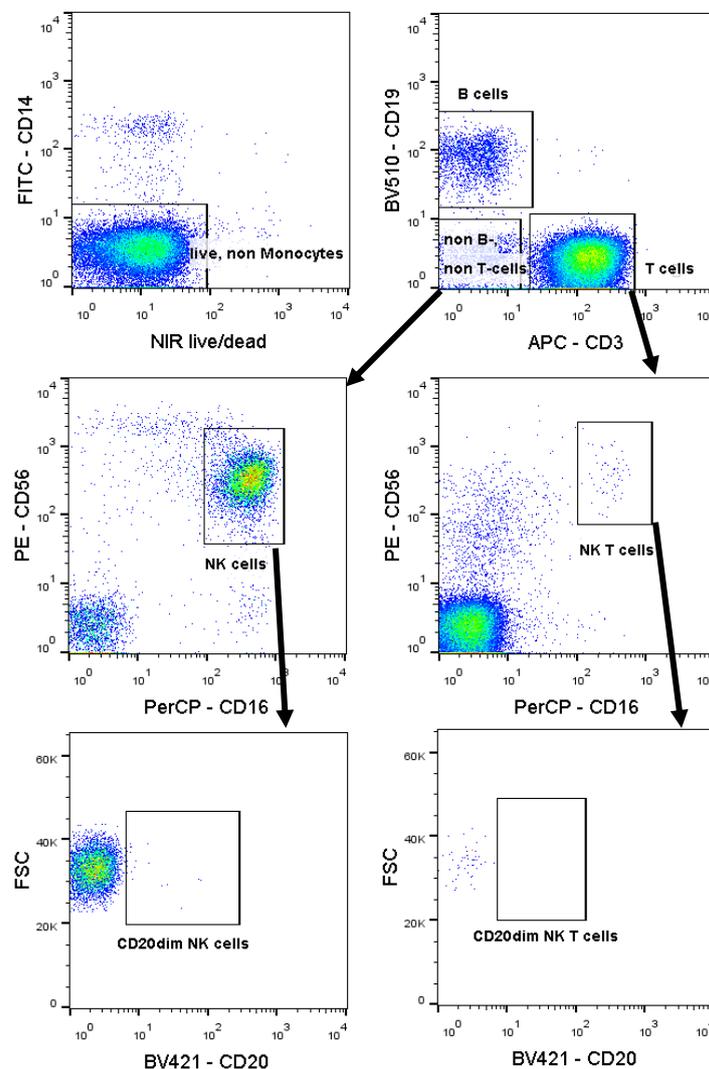


Abbildung 5: Gating-Strategie für NK- und NK-T-Zellen. Dotplot von PBMC eines gesunden Probanden, repräsentativ für die untersuchten Proben. Zunächst gating auf Einzelzellen wie in Kapitel 2.6 beschrieben. Dann Exklusion von toten Zellen und Monozyten mittels LIVE/DEAD Near-IR und CD14. Dann Gating auf T-Zellen und nicht-T-nicht-B-Zellen mittels CD3 und CD19. Gating auf NK- und NK-T-Zellen mittels CD56 und CD16, dann auf $CD20^{dim}$ Zellen. Gategrenzen für CD20 wurde mittels FMO gesetzt.

Ergebnisse

weitergehend untersucht. Folgende Gating-Strategie wurde hierfür angewandt (Abb. 5).

Neben den $CD3^+CD20^{dim}$ T-Zellen, die im Fokus dieser Arbeit stehen, konnten bei unbehandelten Patienten mit MS $CD20^{dim} CD16^+ CD56^+$ NK und $CD20^{dim} CD16^+ CD56^+ CD3^+NK$ -T-Zellen nachgewiesen werden, jedoch in deutlich geringerer Anzahl. Hier zeigten sich $CD20^{dim}$ NK-Zellen einerseits in 4 von 5 Proben CBMC mit einem mittleren Anteil an allen Lymphozyten von ca. 0,12 % bzw. in einem Anteil von 1,39 % an NK-Zellen. Weiterhin fanden diese sich in 4 Patienten mit MS vor Erstgabe OCR, sowie ein vollständiger Rückgang dieser $CD20^{dim}$ NK-Zellen zum Zeitpunkt der zweiten Infusion 2 Wochen nach Erstgabe (Abb. 6).

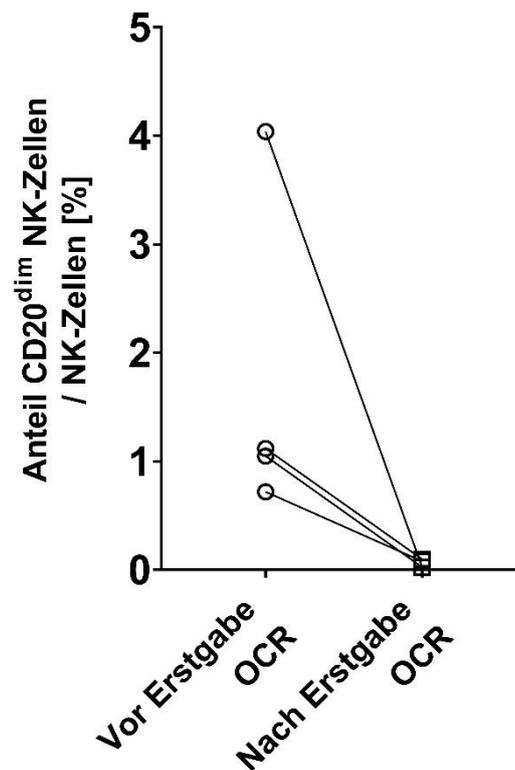


Abbildung 6: Abnahme des Anteils von $CD20^{dim}$ NK-Zellen an NK-Zellen in Patienten mit MS nach der Erstgabe OCR.

Untersucht wurden 4 Patienten vor, sowie 2 Wochen nach der Erstgabe OCR. In jedem Patienter konnte zum ersten Zeitpunkt eine deutliche Population an $CD20^{dim}$ NK-Zellen dargestellt werden, welche zum zweiten Zeitpunkt nicht mehr nachweisbar waren.

In gesunden erwachsenen Probanden und Patienten am Ende späterer Zyklen OCR/RTX konnten $CD20^{dim}$ NK-Zellen in geringerem Ausmaß dargestellt werden. Für NK-T-Zellen gestalte sich der Nachweis in allen Proben aufgrund

physiologisch sehr geringer NK-T-Zellzahlen schwierig, sodass auf eine Darstellung dieser Daten verzichtet wurde. In nicht-T, nicht-B-Zellen lässt sich eine CD20^{dim} Population somit ebenfalls in NK-Zellen in einzelnen Proben abgrenzen, bei jedoch deutlich geringerem Anteil an Lymphozyten verglichen zu CD3⁺CD20^{dim} Zellen oder CD20⁺ B-Zellen. Für die weiteren Fragestellungen wurden daraufhin der Fokus auf CD3⁺CD20^{dim} Zellen gelegt.

3.2 Verlauf der CD3⁺CD20^{dim} T-Zellzahl unter Therapie mit anti-CD20-Antikörpern

Um Aussagen über die Kinetik des Wiederauftretens von CD3⁺CD20^{dim} Zellen unter Therapie mit anti-CD20-Antikörpern zu treffen, wurden PBMC von 12 Patienten mit MS in bis zu monatlichen Abständen mittels Durchflusszytometrie untersucht (Vgl. Tab. 7; 10 Patienten während des 1. Zyklus OCR, 1 Patient während des 1. Zyklus RTX, sowie 1 Patient während des 2. Zyklus OCR). Die Hinzunahme der beiden, sich nicht im 1. Zyklus OCR befindenden Patienten, vergrößerte die Stichprobe und führte zu keiner relevanten Änderung der statistischen Ergebnisse, sodass sich dafür entschieden wurde diese Patienten ebenfalls einzubeziehen. Ein Gating auf CD3⁺CD20^{dim} Zellen erfolgte wie in Kapitel 2.6 beschrieben. Ein Zyklus dauert normalerweise 6 Monate. Aufgrund individueller Erfordernisse erfolgte bei zwei Patienten der Folgezyklus jedoch erst nach 7 Monaten, sodass für diese zwei Patienten Messpunkte auch für Monat 7 nach Erstgabe zur Verfügung stehen.

3.2.1.1 Kinetik der Zunahme der CD3⁺CD20^{dim} T-Zell-Zahl

Im zeitlichen Verlauf fand sich nach rascher weitgehender Depletion eine langsame kontinuierliche Zunahme der CD3⁺CD20^{dim} Zellzahl absolut pro μl , sowie im Anteil an T-Zellen (Abb. 7). Dabei zeigten sich patientenabhängig sehr unterschiedliche Verläufe. In den meisten Fällen lag eine annähernd lineare Zunahme vor, bei einigen Patienten jedoch auch eine zunächst geringe Zunahme gefolgt von einem sprunghaften Anstieg innerhalb eines bzw. zwei Monaten. Zudem fiel auf, dass der Patient mit dem höchsten Anteil CD3⁺CD20^{dim} Zellen an T-Zellen bei Baseline-Messung auch in Monat 7 vor Beginn des 2. Zyklus OCR

Ergebnisse

den höchsten Anteil CD3⁺CD20^{dim} Zellen an T-Zellen hatte. Zu signifikanten Änderungen der Gesamt-T-Zellzahl kam es dabei nicht.

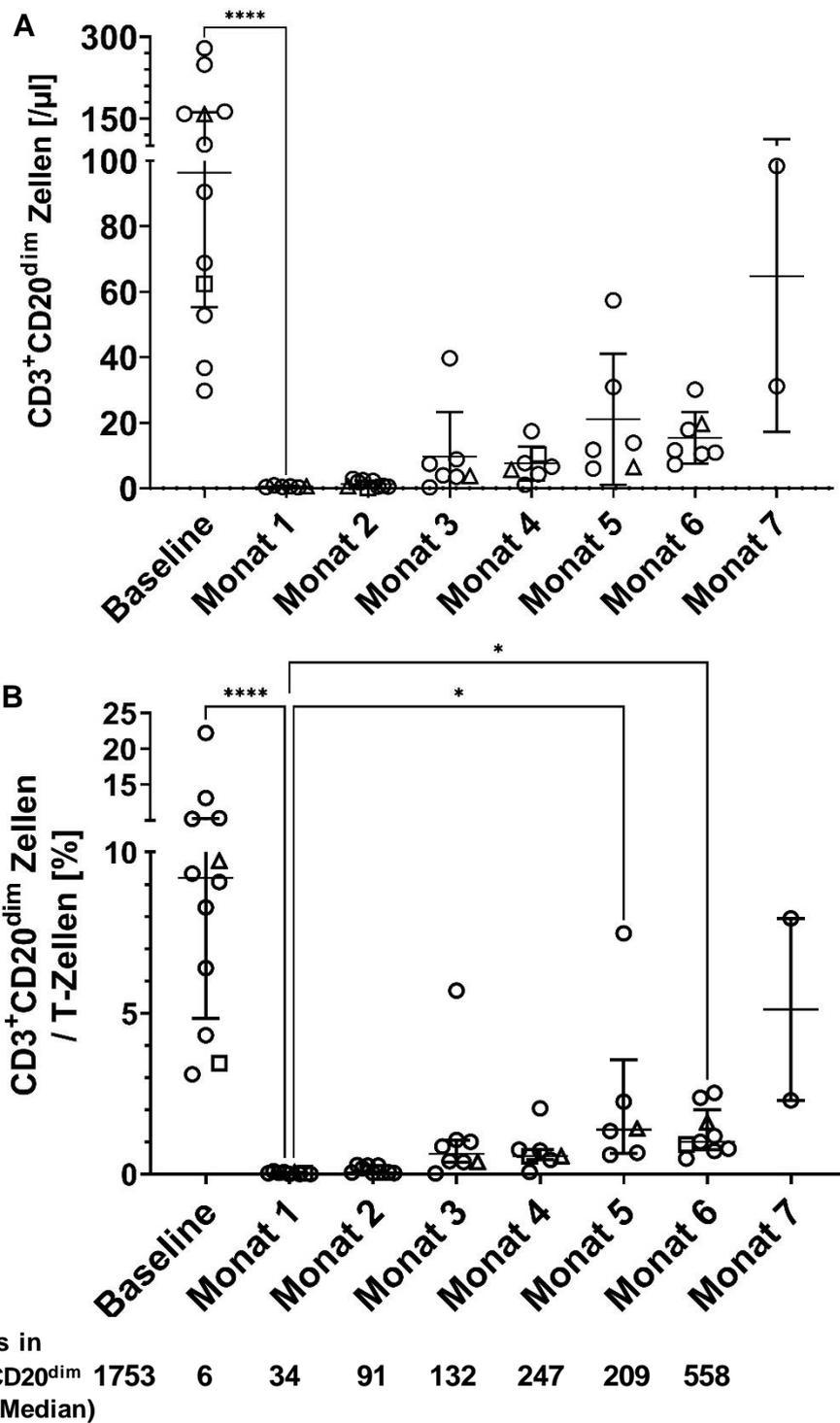


Abbildung 7: Signifikante Abnahme der CD3⁺CD20^{dim} Zellzahl unter anti-CD20-Antikörper-Therapie nach Baseline, gefolgt von einer langsamen Zunahme.

Patienten im 1. Zyklus OCR sind als Kreise dargestellt, 1 Patient im 1. Zyklus RTX als Dreieck, 1 Patient im 2. Zyklus OCR als Viereck. Sowohl in der Absolutzahl pro μ l (A), als auch im Anteil an T-Zellen (B) zeigt sich eine signifikante, rasche Reduktion der CD3⁺CD20^{dim} Zellzahl nach Baseline gefolgt von einer langsamen, kontinuierlichen Zunahme von Monat 1 bis 7. Jeweils Median \pm Interquartilrange (IQR). Kruskal-Wallis test, Dunn's multiple comparisons test. (C) Median der gemessenen Events im CD3⁺CD20^{dim} Gate pro Monat, mit zunächst geringer, im Verlauf jedoch deutlich zunehmender Stichprobenzahl.

Ergebnisse

Parallel zur Zunahme von $CD3^+CD20^{dim}$ Zellen konnte im zeitlichen Verlauf auch eine Zunahme der B-Zellzahl in geringerem Ausmaß nachgewiesen werden. Um zu untersuchen, welche der beiden Zellpopulationen im zeitlichen Verlauf schneller regeneriert, wurde für jeden Messzeitpunkt der Anteil von $CD3^+CD20^{dim}$ Zellen an T-Zellen gegen den Anteil von B-Zellen an Lymphozyten jeweils in Verhältnis zum Wert bei Baseline aufgetragen (Abb. 8). Hier fiel eine deutliche Tendenz der $CD3^+CD20^{dim}$ Zellen zu einem höheren Anteil am Baselinewert auf, entsprechend einer im Vergleich zu B-Zellen schnelleren Regeneration dieser Zellen nach Depletion durch anti-CD20-Antikörper.

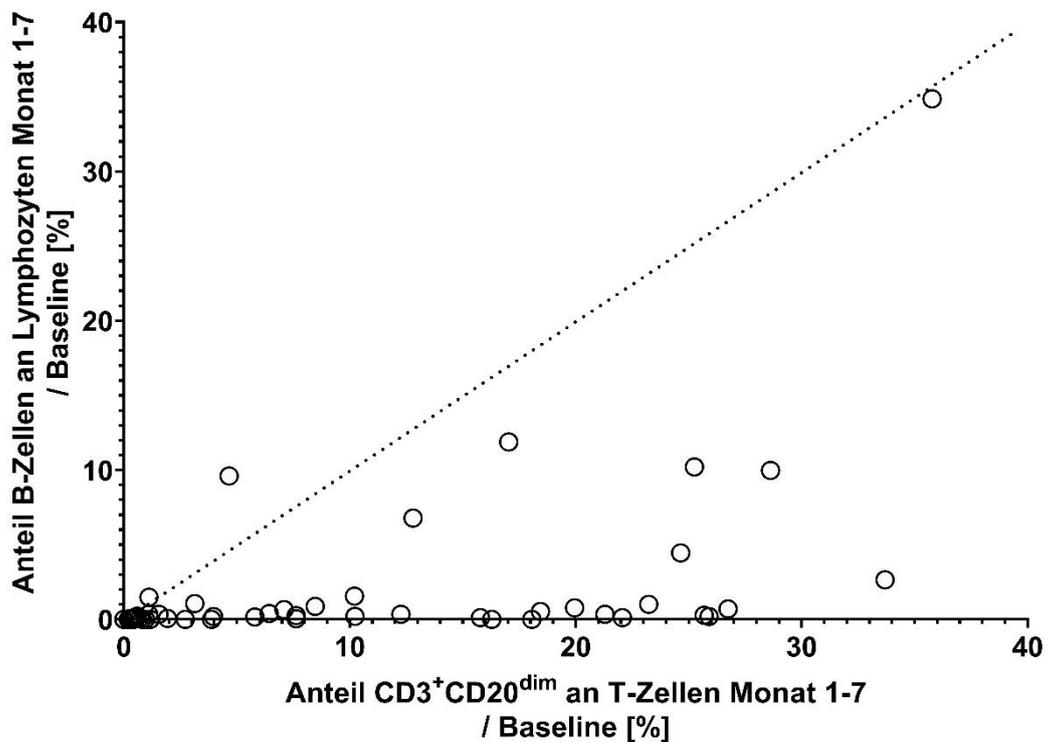


Abbildung 8: $CD3^+CD20^{dim}$ Zellen regenerieren schneller als B-Zellen unter anti-CD20-Antikörpertherapie.

Jeder Datenpunkt entspricht einem Zeitpunkt, bestehend aus der Relation des Anteils $CD3^+CD20^{dim}$ Zellen an T-Zellen (x-Achse) sowie des Anteils B-Zellen an Lymphozyten (y-Achse) zum Anteil bei Baseline. Zusätzlich Winkelhalbierende eingezeichnet. Auffällig ist eine deutliche Gruppierung der Punkte unterhalb der Winkelhalbierenden, entsprechend einer schnelleren prozentualen Regeneration des Anteils der $CD3^+CD20^{dim}$ Zellen an T-Zellen zum Baseline-Wert verglichen zum Anteil von B-Zellen an Lymphozyten.

Ergebnisse

3.2.1.2 Unter Therapie mit anti-CD20-Antikörpern kommt es zu einer signifikanten Abnahme der *mean fluorescence intensity* für CD20 von CD3⁺CD20^{dim} Zellen

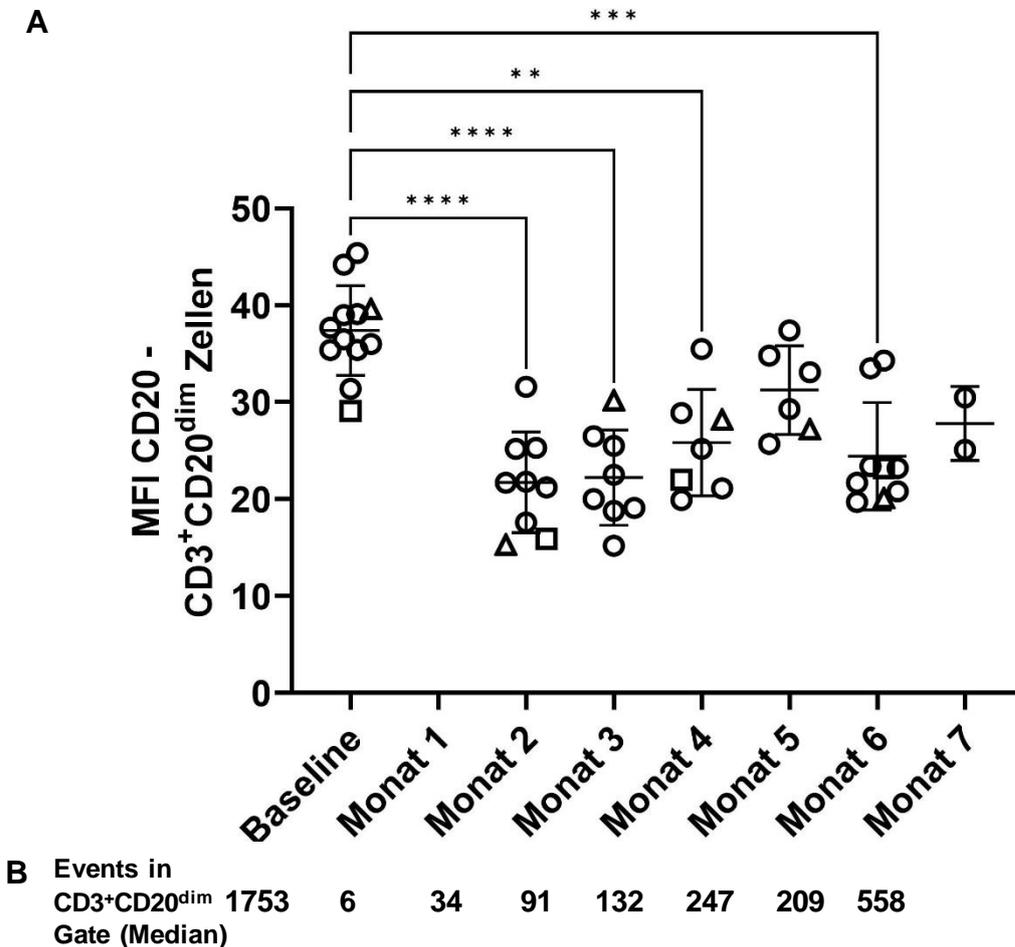


Abbildung 9: Signifikante Abnahme der MFI von CD3⁺CD20^{dim} Zellen für CD20 unter Therapie mit anti-CD20-Antikörpern.

(A) Es zeigt sich eine signifikante Reduktion der MFI für CD20 von Baseline zu Monat 2-4, sowie Monat 6. Bei sehr geringer Eventzahl ohne klar abgrenzbarer CD3⁺CD20^{dim} Population in Monat 1 wurde auf eine Darstellung dieser Werte verzichtet und diese erst ab Monat 2, als sich eine klarere Population abgrenzen ließ, dargestellt. (B) Median der gemessenen Events in CD3⁺CD20^{dim} Gate pro Monat, mit zunächst geringer, im Verlauf jedoch deutlich zunehmender Anzahl. Mittelwert \pm SD. Welch's ANOVA test, Dunnett's T3 multiple comparisons.

In den untersuchten Patienten unter Therapie mit anti-CD20-Antikörpern fiel parallel zur Reduktion der CD3⁺CD20^{dim} Zellzahl auch eine signifikante Abnahme der *mean fluorescence intensity* (MFI) von CD20 auf CD3⁺CD20^{dim} Zellen von Baseline zu Monaten 2-4 und 6 auf (Abb. 9). In Monat 1 konnten nur sehr wenige Events gemessen werden, zudem ließ sich hier optisch in *dot plots* keine eindeutige CD3⁺CD20^{dim} Population abgrenzen (Vgl. Abb. 10). Auf einen

Ergebnisse

Vergleich der MFI von Monat 1 zu den anderen Monaten wurde deshalb verzichtet. In Monaten 2-3 fanden sich zwar weiterhin tendenziell wenige Zellen im Gate für CD3⁺CD20^{dim} Zellen, bei sich jedoch deutlicher abgrenzenden CD3⁺CD20^{dim} Population wurden diese Events in die Auswertung miteinbezogen. Statistisch zeigten sich die Änderungen der MFI von Monat 2-7 nicht signifikant, optisch fiel in *dot plots* jedoch für alle Patienten auf, dass im Verlauf neu aufgetretene CD3⁺CD20^{dim} Zellen immer am unteren CD20-Spektrum für CD3⁺CD20^{dim} Zellen auftraten, und Zellen mit einem hohen CD20-Signal (mittleres bis oberes Drittel des definierten *gates*) sich erst im Verlauf und noch nicht bei Monat 2 fanden (Abb. 10).

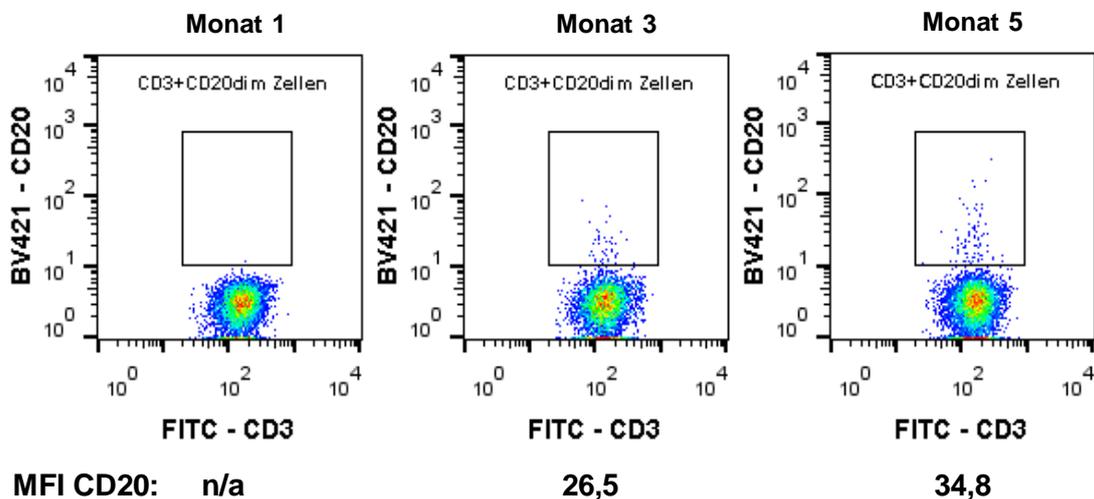


Abbildung 10: CD3⁺CD20^{dim} Zellen zeigen im Verlauf unter anti-CD20-Antikörper-Therapie nach initialer Abnahme tendenziell höhere CD20-Intensitäten. PBMC desselben Patienten nach Erstgabe OCR, repräsentativ für alle untersuchten Patienten. Zunächst Gating auf lebende Einzelzellen, wie in Kapitel 2.6 beschrieben, dann auf T-Zellen. Exemplarisch sind *dot plots* von Monat 1, 3 und 5 dargestellt, hier zeigen sich bei Monat 1 noch keine CD3⁺CD20^{dim} Zellen, bei Monat 3 eine bereits abgrenzbare Population (126 Events) mit einer MFI von 26,5 in der unteren Hälfte des definierten *gates* und bei Monat 5 eine deutlichere CD3⁺CD20^{dim} Population (305 Events) mit einer MFI von 34,8 und Zellen mit deutlich höherer CD20-Intensität.

3.2.2 Stabile Repletion der CD3⁺CD20^{dim} T-Zellen auch nach späteren Zyklen mit OCR und RTX

Nachdem in Patienten im 1. Zyklus OCR nach der Depletion wieder eine Zunahme der CD3⁺CD20^{dim}-Zellzahl beobachtet wurde, stellte sich die Frage, ob sich mit häufigeren Gaben diese Zunahme ändert. Dafür wurden Daten von 8 Patienten am Ende (Monat 6-7) des 1. Zyklus OCR mit jeweils 5 Patienten am Ende (Monat 6) des ≥ 4 . Zyklus OCR, sowie des ≥ 4 . Zyklus RTX untersucht (Abb. 11). Die weiteren Patientendaten sowie genaue Anzahl der Zyklen können Tab. 7 entnommen werden. Die B-Zellzahl wurde hierbei als besser untersuchte Population unter anti-CD20-Antikörpertherapie ebenfalls untersucht. Hier zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten

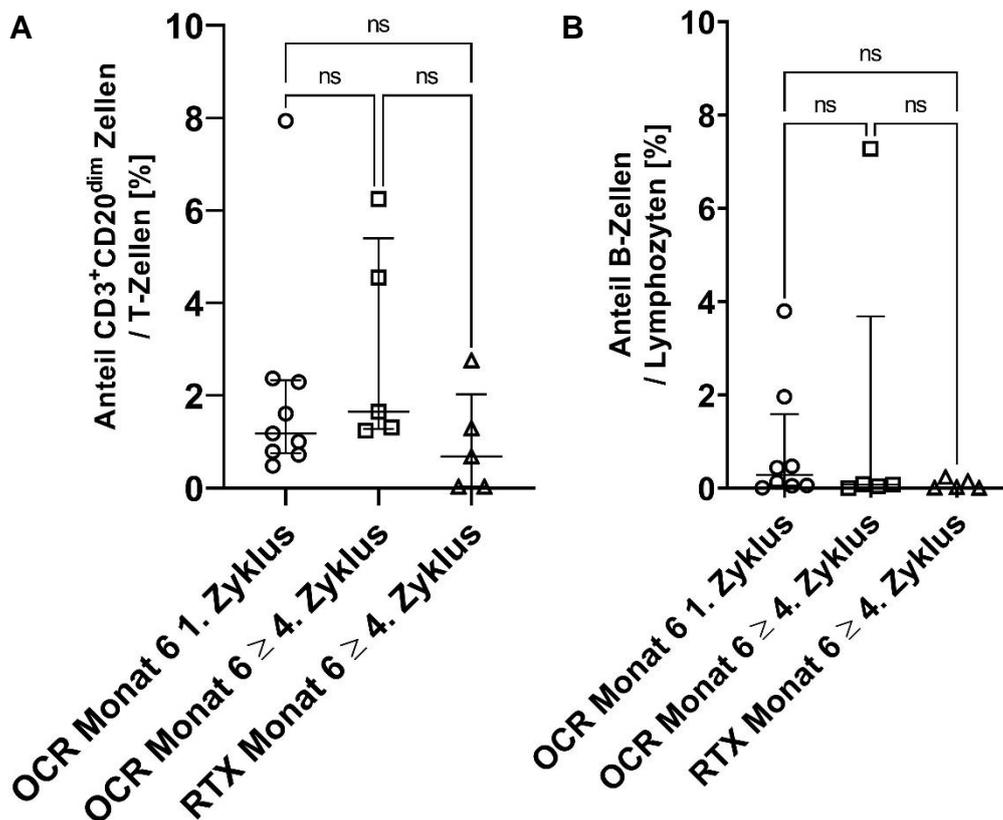


Abbildung 11: Während CD3⁺CD20^{dim} Zellen sich auch am Endpunkt späterer Zyklen RTX/OCR in ähnlicher Zahl zum 1. Zyklus OCR nachweisen lassen, zeigen sich B-Zellen hier gleichermaßen depletiert.

(A) Kein signifikanter Unterschied im Anteil von CD3⁺CD20^{dim} Zellen an T-Zellen zwischen Patienten am Endpunkt des 1. Zyklus OCR zu Endpunkten späterer Zyklen OCR/RTX. (B) Ebenfalls kein signifikanter Unterschied im Anteil von B-Zellen an Lymphozyten, welche sich auch zu den Endpunkten späterer Zyklen kaum nachweisen lassen. Jeweils Median \pm IQR. Kruskal-Wallis test, sowie Dunn's multiple comparisons test.

Ergebnisse

Patientengruppen (1. Zyklus vs. ≥ 4 - Zyklus), weder für CD3⁺CD20^{dim} noch für B-Zellen. Während B-Zellen also durch beide therapeutischen Antikörper zu Ende des ersten und weiteren (hier ≥ 4 .) Zyklen jeweils stark depletiert werden, zeigten CD3⁺CD20^{dim} Zellen eine Repletion im Verlauf des ersten Zyklus, die sich verglichen zu Patienten in späteren Zyklen – z.B. durch eine manchmal diskutierte „tiefere“ Depletion – nicht wesentlich veränderte.

3.2.3 CD3⁺CD20^{dim} Zellen sind nach der Erstgabe OCR nicht nur maskiert, sondern tatsächlich depletiert

Die im Vergleich zu B-Zellen deutlich geringere Expression von CD20 auf CD3⁺CD20^{dim} Zellen warf die Frage auf, ob anti-CD20-Antikörper wie OCR (Klon 2H7) hier ausreichend binden, und Mechanismen entfalten können, die zur Lyse von CD3⁺CD20^{dim} Zellen führen können, oder ob diese therapeutischen Antikörper hier ohne Depletion der Zellen binden und mit diagnostischen Antikörpern für die Durchflusszytometrie kompetitieren könnten.

Erwartungsgemäß wurde nach vorheriger Inkubation von PBMC mit OCR *in vitro* die nachfolgende Färbung von CD20 mittels diagnostischer Antikörper weitestgehend gehemmt, mit einer vollständigen Blockade des Nachweises von CD20 ab 100 µg/ml OCR (Abb. 12). Als Möglichkeiten, CD20 trotz Bindung von OCR darzustellen, kamen folgende Optionen in Betracht: (a) Nachweis mittels eines anti-CD20-Antikörpers (Ofatumumab (OFA), Novartis), welcher ein anderes, entfernteres extrazelluläres Epitop als OCR erkennt (Vgl. Abb. 3) und somit möglicherweise nicht um die Bindung konkurriert. (b) Nachweis durch einen *intrazellulär* bindenden CD20-Antikörper (CD20 (cytoplasmic)-APC, Klon 1412, BioLegend). (c) Indirekter Nachweis des zellgebundenen OCR anhand dessen humanen Fc-Anteils mittels eines sekundären Antikörpers gegen humanes IgG (human IgG-AF647, polyklonal, Invitrogen).

Diese Möglichkeiten zum Nachweis von CD20 trotz bereits *in vivo* gebundenem OCR bzw. RTX wurden zunächst getestet, nachdem PBMC von gesunden Probanden *in vitro* mit OCR inkubiert wurden. Für die erste Option stellte sich

Ergebnisse

leider heraus, dass OFA und OCR trotz des entfernteren Epitopes miteinander um eine Bindung an CD20 konkurrieren. Diese Option wurde somit verworfen.

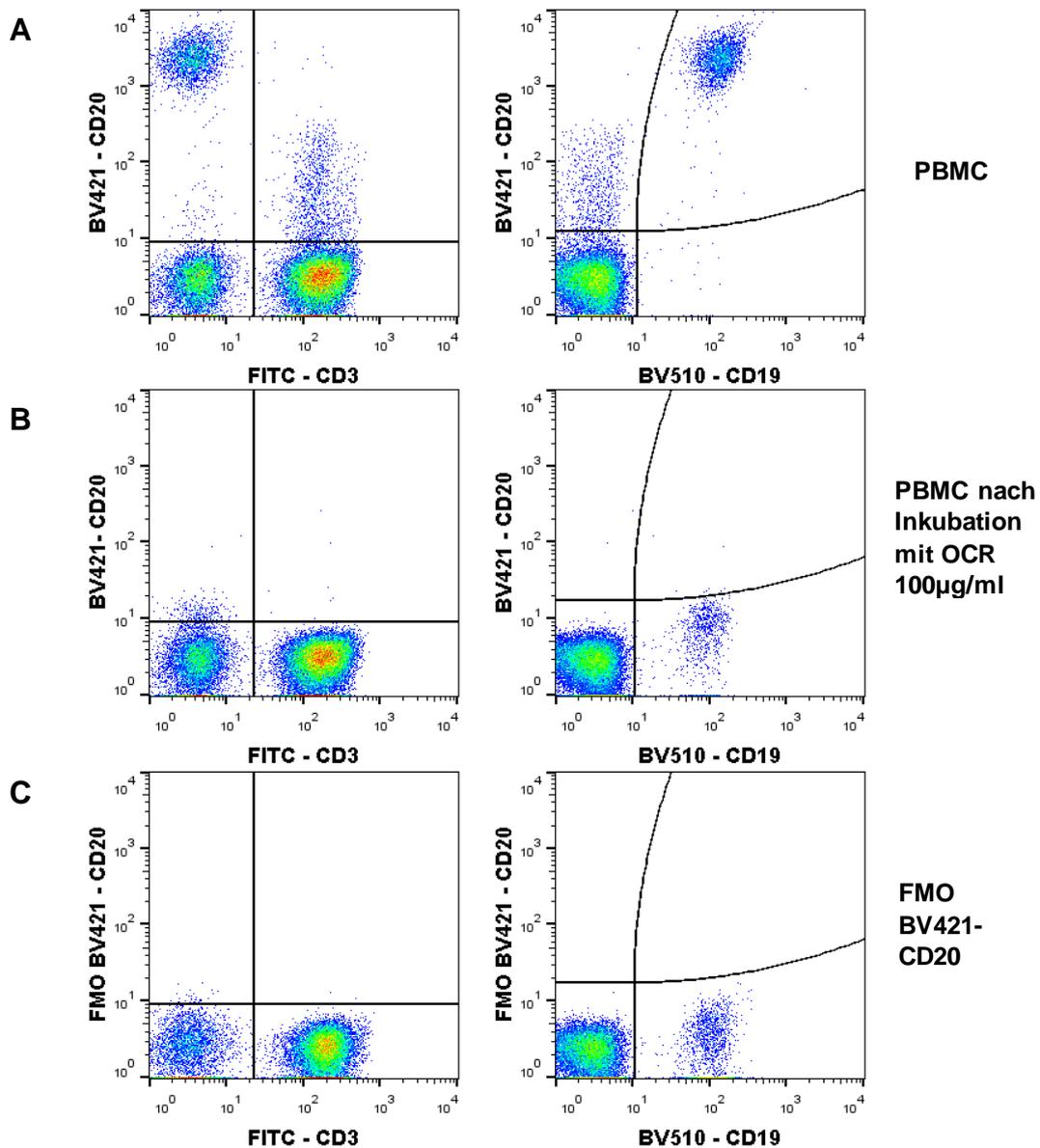


Abbildung 12: OCR und diagnostische anti-CD20-Antikörper konkurrieren um CD20-Bindungsstellen auf PBMC *in vitro*.

Zunächst Gating auf lebende Einzelzellen, wie in Kapitel 2.6 beschrieben. (A) PBMC ohne OCR. (B) PBMC nach Inkubation mit 100 µg/ml OCR, Färbung mit CD3-FITC, CD20-BV421, CD19-BV510. Trotz Färbung mit CD20-BV421 erscheinen CD3⁺CD20^{dim} Zellen und B-Zellen negativ für CD20. (C) PBMC, Färbung mit CD3-FITC, CD19-BV510 (FMO CD20). Aufgrund des fehlenden Antikörpers findet sich hier kein Signal für CD20.

Anmerkung: Das etwas hellere CD20-Signal der CD19⁺ B-Zellen verglichen zu CD19⁺ Zellen kommt (trotz optimaler Kompensation) durch geringen Spillover des Fluorophors BV510 in der benachbarten Kanal für das Fluorophor BV421 zustande, und entspricht keiner Bindung vor CD20-BV421. Die Grenzen für positive und negative Populationen wurden dementsprechend angepasst (gebogene Quadrantenlinien in der rechten Spalte).

Ergebnisse

Mittels eines intrazellulär bindenden, an APC-konjugierten anti-CD20-Antikörpers (Klon 1412) gelang jedoch der Nachweis von CD20 auf CD3⁺CD20^{dim} Zellen trotz extrazellulärer Bindung von OCR. In der Färbung von PBMC ohne OCR-Bindung erschien dieser Klon weniger sensitiv im Nachweis von CD3⁺CD20^{dim} Zellen als der extrazellulär bindende, an BV-421-konjugierte anti-CD20-Antikörper (Klon 2H7), konnte jedoch trotzdem ca. 1/3 der CD3⁺CD20^{dim} Zellen nachweisen (Abb. 13). Obwohl dies einen quantitativen Vergleich der CD3⁺CD20^{dim} Zahlen zwischen beiden Antikörpern unmöglich macht, ermöglicht es eine qualitative Aussage zum Vorkommen von CD3⁺CD20^{dim} Zellen in einer Probe mittels Klon 1412.

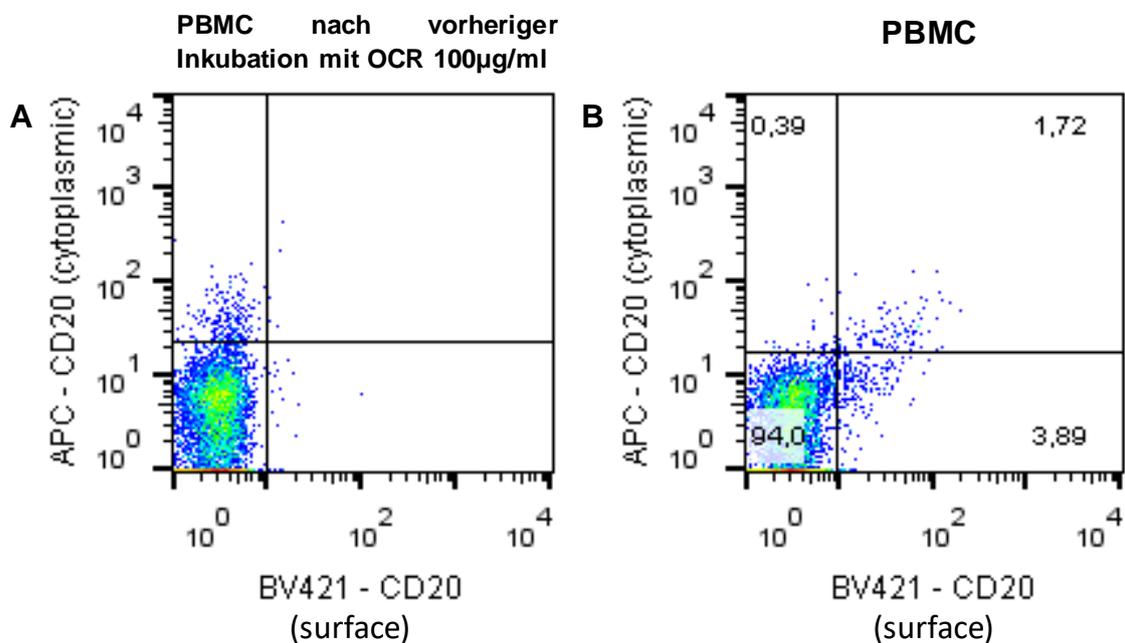


Abbildung 13: CD3⁺CD20^{dim} Zellen können auch nach vorheriger Inkubation mit OCR durch Färbung mit dem intrazellulär bindenden anti-CD20-Antikörper (Klon 1412) nachgewiesen werden.

Gating auf lebende Einzelzellen und T-Zellen, wie in Kapitel 2.6 beschrieben. Plots mit extrazellulär (X-Achse, BV421, surface) und intrazellulär bindendem (Y-Achse, APC, cytoplasmic) anti-CD20-Antikörper. (A) PBMC nach vorheriger Inkubation mit 100 µg/ml OCR, wodurch der extrazellulär bindende, an BV421 konjugierte, anti-CD20-Antikörper nicht mehr an CD20 binden kann (Vgl. Abb. 10). Der an APC konjugierte, intrazellulär bindende anti-CD20 Antikörper (Klon 1412) kann CD20 auf CD3⁺CD20^{dim} Zellen durchflusszytometrisch weiterhin nachweisen. (B) PBMC, CD3⁺CD20^{dim} Zellen stellen sich dim sowohl für den extrazellulär wie den intrazellulär bindenden Antikörper dar.

Zuletzt konnte, ausschließlich nach vorheriger Inkubation mit OCR 100 µg/ml, mittels eines an Alexa Fluor 647-konjugierten, polyklonalen Antikörpers gegen

Ergebnisse

humanes IgG ebenfalls ein Signal auf T-Zellen nachgewiesen. Dieser Anteil IgG⁺ T-Zellen lag dabei in ähnlichen Prozentzahlen vor, wie der von mittels extrazellulärem anti-CD20-Antikörper markierten CD3⁺CD20^{dim} Zellen ohne vorherige Inkubation mit OCR (Abb. 14).

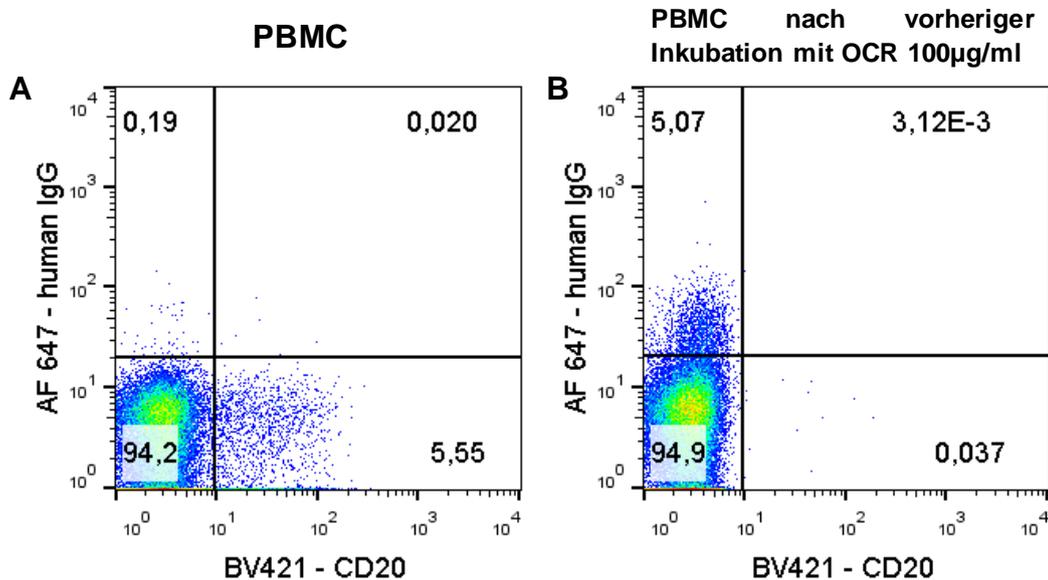


Abbildung 14: Es finden sich ähnliche Anteile von CD3⁺ human IgG⁺ Zellen an T-Zellen nach Inkubation mit OCR verglichen zum Anteil CD3⁺CD20^{dim} Zellen an T-Zellen vor Inkubation. Gating auf lebende Einzelzellen und T-Zellen, wie in Kapitel 2.6 beschrieben, Färbung mit FITC-CD3, BV421-CD20, BV510-CD19, AF 647-human IgG. (A) human IgG gegen CD20 aufgetragen. PBMC ohne vorherige Inkubation mit OCR. CD3⁺CD20^{dim} Zellen finden sich im rechten unteren Quadranten und sind negativ für human IgG. (B) Dieselben PBMC wie in (A) nach Inkubation mit 100µg/ml OCR. Indirekter Nachweis der CD3⁺CD20^{dim} Zellen im linken oberen Quadranten mittels Sekundäantikörper, welcher den human Fc-Teil von OCR auf CD3⁺CD20^{dim} Zellen erkennt. Beachte den ähnlichen Anteil dieser Zellen wie CD3⁺CD20^{dim} Zellen in (A).

Zusammenfassend stehen daher mit dem intrazellulär bindenden CD20-Antikörper (Klon 1412) und der indirekten Färbung mittels sekundärem Antikörper gegen humanes IgG (polyklonal) zwei Verfahren zur Verfügung, um *ex vivo* das Vorkommen von CD3⁺CD20^{dim} Zellen nach Gabe von OCR zu untersuchen.

Ergebnisse

Mit diesem Wissen zum Nachweis von CD20 trotz Bindung von OCR wurden PBMC von 4 Patienten mit MS vor der Erstgabe OCR, sowie zur Zweitgabe OCR zwei Wochen später untersucht. Hier fiel das bereits vorherbeschriebene Fehlen von CD3⁺CD20^{dim} Zellen, gemessen mittels extrazellulärem anti-CD20-Antikörper, auf. Weiterhin ließen sich CD3⁺CD20^{dim} Zellen bei Zweitgabe weder mit intrazellulär bindendem anti-CD20-Antikörper Klon 1412, noch mittels Antikörper gegen humanes IgG (i.e. Sekundäntikörper gegen den humanen Fc-Teil von OCR) nachweisen (Abb. 15). Der Anteil von CD3⁺ human IgG⁺ Zellen änderte sich zwischen beiden Zeitpunkten ebenfalls nicht, wobei der fehlende Nachweis von CD3⁺ human IgG⁺ Zellen vor der Erstgabe OCR zu erwarten war, da die Bindung von OCR für den Nachweis mittels Sekundäntikörper notwendig ist. Dieser fehlende Nachweis von CD3⁺CD20^{dim} Zellen durch Methoden, die wie zuvor dargestellt, CD20 auf diesen Zellen auch nach Maskierung durch OCR

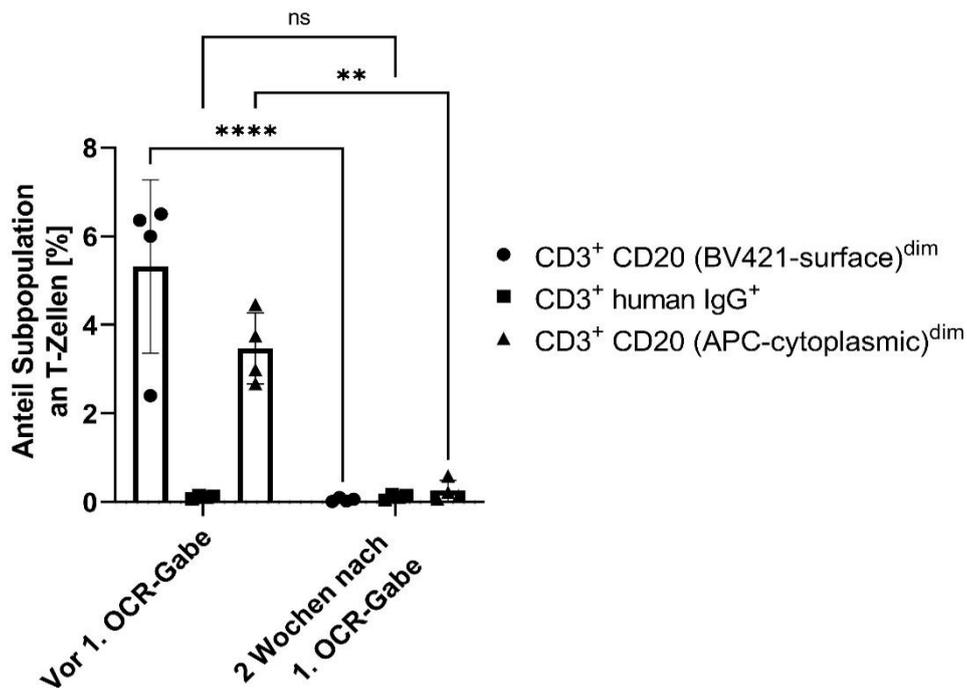


Abbildung 15: Depletion von CD3⁺CD20^{dim} Zellen in 4 Patienten mit MS vor/nach Erstgabe OCR, gemessen mit intrazellulär- sowie extrazellulär-bindendem Antikörper gegen CD20 und Sekundäntikörper gegen humanes IgG.

Signifikante Abnahme sowohl der CD3⁺CD20 (BV421-surface) dim-Zellen als auch der CD3⁺CD20 (cytoplasmic) dim-Zellen von vor der 1. Gabe OCR zu vor der 2. Gabe OCR. Konstantes Fehlen von CD3⁺ human IgG⁺ Zellen. Insgesamt spricht dieser fehlende Nachweis trotz Methoden, welche CD20 auf CD3⁺CD20^{dim} Zellen auch nach Maskierung durch OCR nachweisen konnten, deutlich für eine Depletion dieser Zellen durch OCR im Gegensatz zu einer Maskierung. Mittelwert \pm SD. Two-way ANOVA, Šidák's multiple comparisons test.

Ergebnisse

darstellen können, lässt somit kaum Zweifel an einer tatsächlichen Depletion von $CD3^+CD20^{dim}$ Zellen durch OCR.

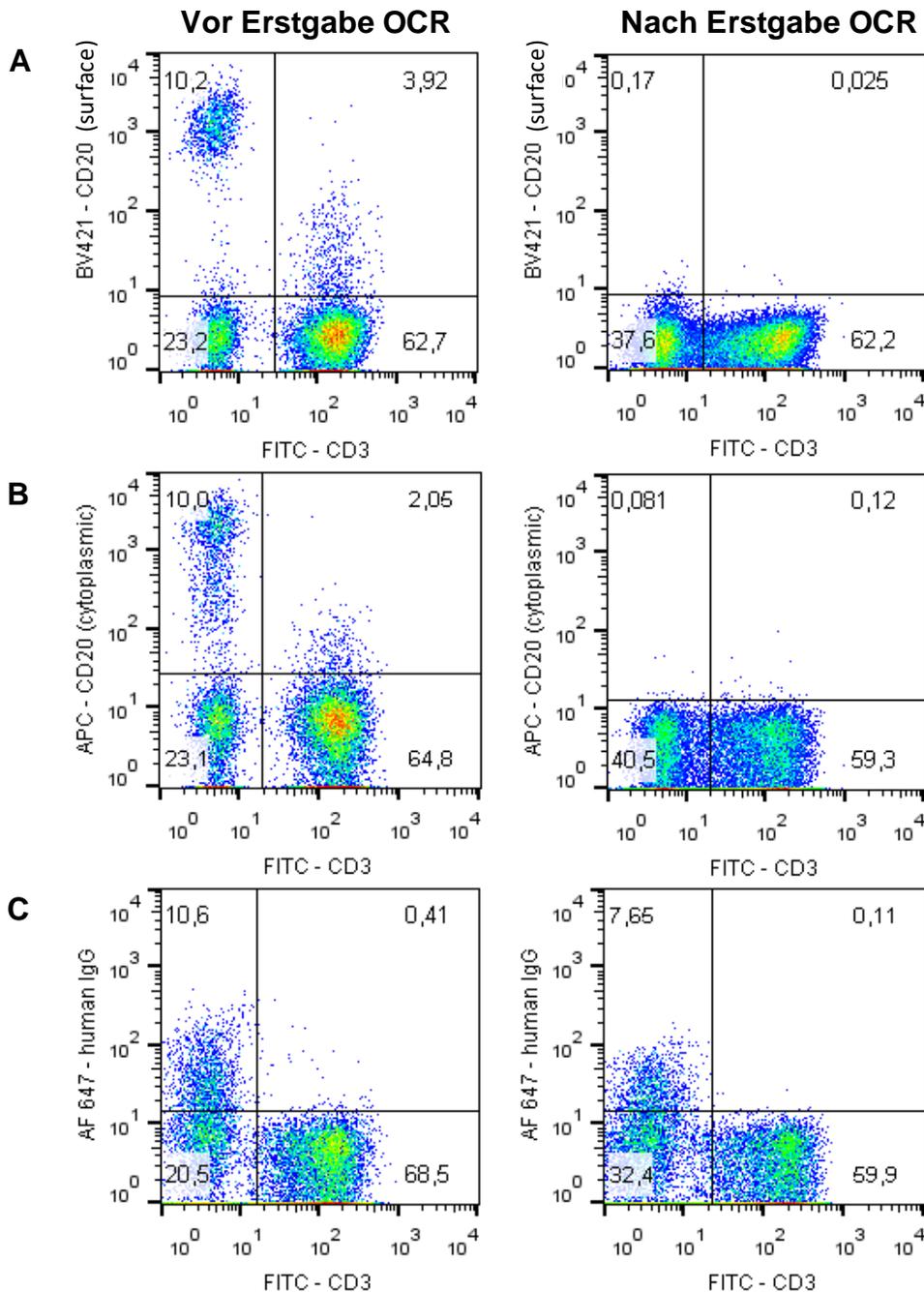


Abbildung 16: $CD3^+CD20^{dim}$ Zellen lassen sich nach Erstgabe OCR durch keine der erwähnten Methoden nachweisen, sind somit a.e. tatsächlich depletiert PBMC desselben Patienten, links vor Erstgabe OCR, rechts danach. Gating auf lebende Einzelzellen und T-Zellen, wie in Kapitel 2.6 beschrieben. (A) CD3 gegen CD20 (extrazellulär) aufgetragen. Bekanntes Fehlen von $CD3^+CD20^{dim}$ Zellen nach Erstgabe OCR. (B) CD3 gegen CD20 (cytoplasmic) aufgetragen. Auch mittels des intrazellulären anti-CD20-Antikörpers (Klon 1412) lassen sich $CD3^+CD20^{dim}$ Zellen nach Erstgabe OCR nicht darstellen. (C) CD3 gegen human IgG aufgetragen. Ein Nachweis von an $CD3^+$ Zellen gebundenem OCR mittels Sekundärantikörper gegen humanes IgG nach Erstgabe OCR gelang ebenfalls nicht.

3.3 Wirkung von *in vivo* Antigenkontakt auf die CD20-Expression von T-Zellen

Da es sich bei CD3⁺CD20^{dim} Zellen um eine aktivierte T-Zell-Subpopulation handelt und Ursachen für die Entstehung dieser Zellen bishernicht abschließend geklärt sind wurde *ex vivo* der Einfluss von einer möglichen Antigenexposition auf die CD20-Expression von T-Zellen untersucht. Dabei wurden drei verschiedene Kohorten auf CD3⁺CD20^{dim} Zellen sowie T-Zell-Subpopulationen (*naive/memory*, CD4⁺, CD8⁺) untersucht; 1) *Cord blood mononuclear cells* (CBMC) in Nabelschnurblut von 10 gesunden, per Kaiserschnitt geborenen Neugeborenen in Kooperation mit Prof. Gille, Abteilung Neonatologie der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen. 2) PBMC von 14 gesunden erwachsenen Probanden. 3) PBMC von 10 Patienten mit erhöhtem CRP (Patientendaten Vgl. Tab.6).

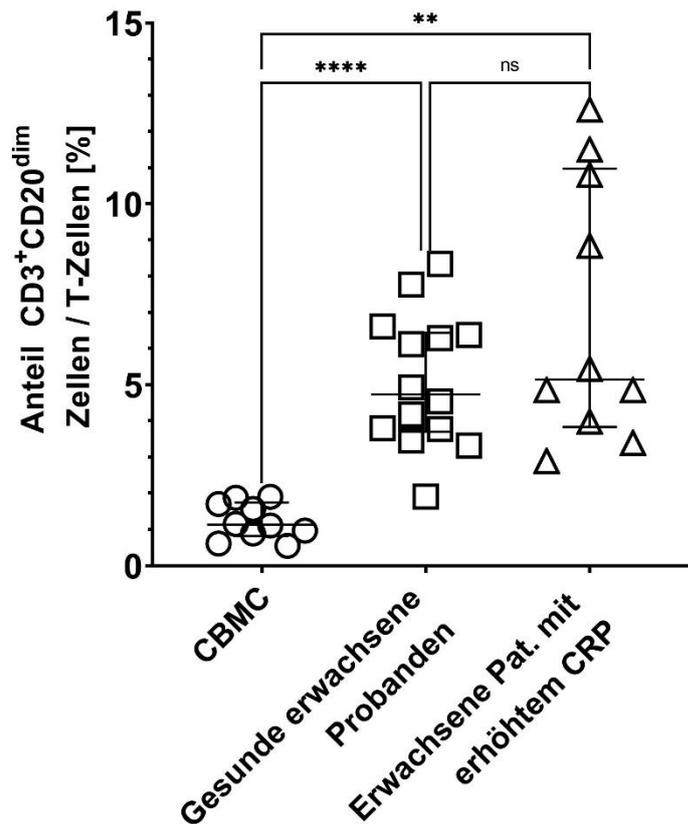


Abbildung 17: Niedrigerer Anteil von CD3⁺CD20^{dim} Zellen an T-Zellen in CBMC verglichen zu gesunden erwachsenen Probanden und erwachsenen Patienten mit erhöhtem CRP. In CBMC zeigt sich der niedrigste Anteil von CD3⁺CD20^{dim} Zellen an T-Zellen (1,13% ± 0,76%), gefolgt von gesunden erwachsenen Probanden (4,74% ± 2,57%) und Patienten mit erhöhtem CRP (5,15% ± 6,11%). Median ± IQR. Welch's ANOVA test, sowie Dunnett's T3 multiple comparisons.

Ergebnisse

In CBMC fiel ein niedriger Anteil von CD3⁺CD20^{dim} Zellen an T-Zellen auf verglichen zu den anderen beiden Kohorten. In der Kohorte der Patienten mit erhöhtem CRP wurde ebenfalls auf eine Korrelation des Anteils CD3⁺CD20^{dim} Zellen an T-Zellen mit dem Alter der Patienten untersucht, zudem auch auf eine Korrelation des Anteils mit der Hospitationszeit zum Zeitpunkt der BE sowie der Höhe des CRPs (*nonparametric Spearman correlation*, Daten nicht dargestellt). Es zeigte sich lediglich eine positive Korrelation des Anteils CD3⁺CD20^{dim} Zellen mit dem Alter der Patienten. Bei höherem Altersdurchschnitt dieser Kohorte verglichen zu den untersuchten gesunden Probanden könnte dies zusammen mit den verschiedenen Krankheitsbildern unterschiedlicher Ätiologien die breitere Streuung und höheren einzelnen Werte in dieser Kohorte erklären (Abb. 17).

3.3.1 Vorkommen von CD20 in geringem Ausmaß auf CD19-spezifischen CAR-T-Zellen bei Patienten unter CAR-T-Zell-Therapie

Als ergänzender Versuch zum Vorkommen von CD3⁺CD20^{dim} Zellen unter *in vivo* Stimulationsbedingungen konnten in Kooperation mit einer weiteren Promotionsstudentin der Arbeitsgruppe, Frau Lena Beller, PBMC von Patienten mit B-Zell-Neoplasien unter Therapie mit CAR-T-Zellen in der Klinik für Hämatologie, Onkologie, klinische Immunologie und Rheumatologie Tübingen auf das Vorkommen von CD3⁺CD20^{dim} Zellen mittels Durchflusszytometrie untersucht werden. Da für Teilfragestellungen beider Projekte eine Untersuchung dieser Proben vorgesehen war, und um eine schnelle Probenbearbeitung dieser wertvollen Proben zu gewährleisten, wurde die Probenbearbeitung und Durchflusszytometrie für diese Versuche in enger gemeinsamer Absprache nur durch eine Person, Frau Lena Beller, durchgeführt. Die Auswertung und

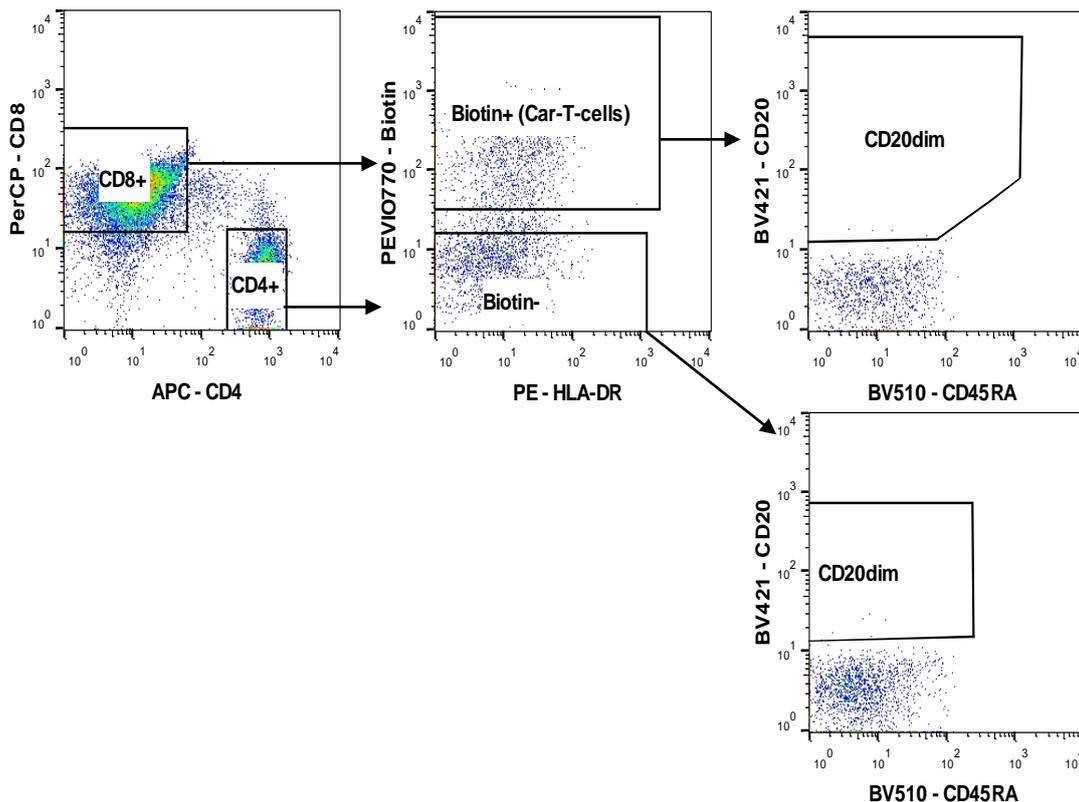


Abbildung 18: Gating-Strategie für die Untersuchung von CD19-spezifischen CAR-T-Zellen auf CD20 in Patienten unter CAR-T-Zelltherapie. Dot plots von PBMC, repräsentativ für die untersuchten Proben. Zunächst erfolgte ein Gating auf lebende T-Zellen wie in Kapitel 2.6 beschrieben. Dann Differenzierung von CD4 und CD8, Gating auf CAR-T-Zellen mittels sekundärem Nachweis von Biotin (CD19 CAR detection reagent, Miltenyi). Gating auf CD20^{dim} Zellen, Grenzen der Gates wurden mit FMO für CD20 gesetzt.

Ergebnisse

Interpretation der Daten erfolgten dabei eigenständig durch mich. In einer Kohorte von 5 Patienten unter Therapie mit autologen, CD19-spezifischen CAR-T-Zellen wurden PBMC dieser Probanden zu zwei Zeitpunkten (3-4 Tage und 10-11 Tage nach Transplantation) auf das Vorkommen von CD3⁺CD20^{dim} T-Zellen allgemein, sowie speziell von CD20 auf CAR-T-Zellen untersucht. Folgende Gating-Strategie wurde hierfür angewandt (Abb. 18).

Zu den zwei untersuchten Zeitpunkten umfassten CAR-T-Zellen im Median ca. 3 bzw. 7% aller T-Zellen. Der Anteil der CD3⁺CD20^{dim} Zellen an allen T-Zellen, sowie an nicht-CAR-T-Zellen war im Vergleich zu gesunden Erwachsenen nicht erhöht bis tendenziell sogar erniedrigt, bei z.T. auch relativ geringen Signalintensitäten innerhalb der anhand der FMO-Kontrollen definierten Gates. Interessanterweise war der Anteil der CD3⁺CD20^{dim} Zellen an CAR-T-Zellen ebenfalls nicht erhöht bis sogar etwas niedriger im Vergleich zu nicht-CAR-T-Zellen (Abb. 19). Obwohl zumindest initial genügend Lymphom-CD19-Antigen

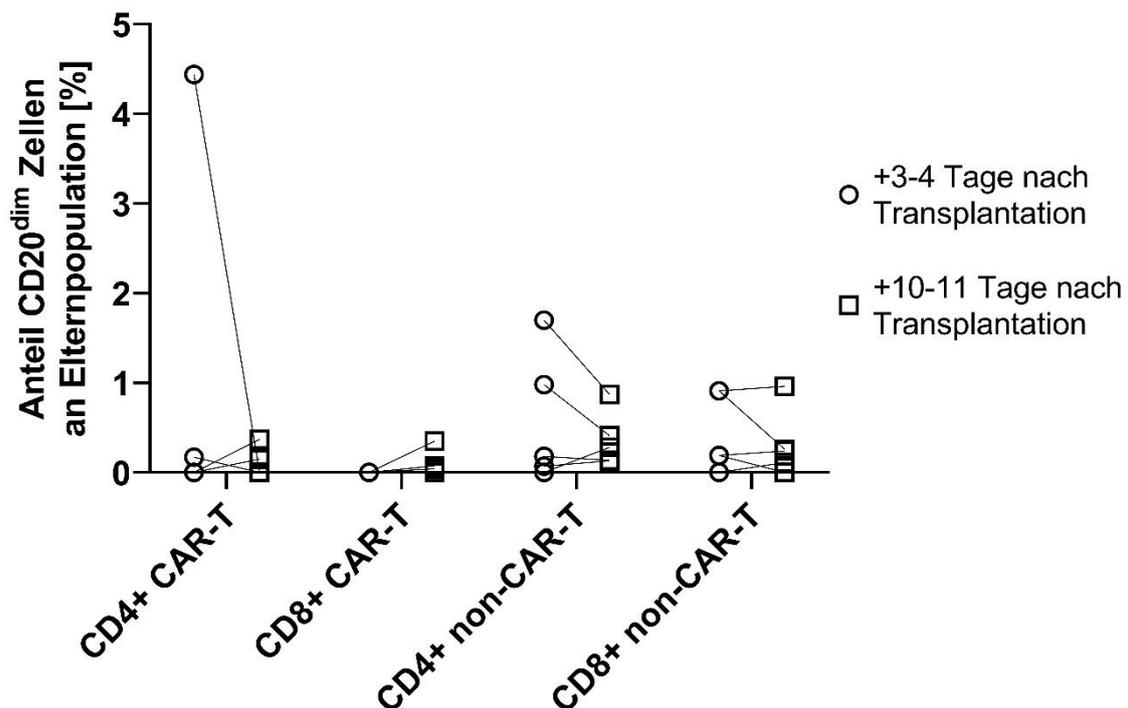


Abbildung 19: Niedrigere Anteile von CD20^{dim} Zellen in CAR-T- verglichen zu nicht-CAR-T-Zellen.

In 5 Patienten fanden sich zu zwei Zeitpunkten (+3-4 Tage und +10-11 Tage nach Transplantation) unter CAR-T-Zell-Therapie niedrige Anteile von CD3⁺CD20^{dim} Zellen in nicht-CAR-T-Zellen, wobei dieser Anteil in CAR-T-Zellen noch geringer ausfiel. In einem Patienten fand sich zum ersten Zeitpunkt ein verhältnismäßig hoher Anteil von CD20^{dim} Zellen an CD4⁺ CAR-T-Zellen (4,44%), bei jedoch geringer Absolutzahl der gemessenen Events (4/90).

zur Stimulation der CAR-T-Zellen erwartet wurde, und ausreichend hohe Ereignisse (ca. 340-4700 events) in den definierten Gates für CD4⁺ bzw. CD8⁺ CAR-T-Zellen gemessen wurden, um eine im unteren einstelligen Prozentbereich liegende Population nachweisen zu können, zeigte sich in den untersuchten CAR-T-Zellen somit keine vermehrt vorkommende CD3⁺CD20^{dim} Population.

3.3.2 CD3⁺CD20^{dim} Zellen in CBMC zeigen einen vorwiegend naiven Phänotyp

Folgende Gating-Strategie wurde zur Differenzierung von CD4⁺-, CD8⁺-, T_{CM}-, T_{EM}-, *effector* und *naiven* T-Zellen angewandt (Abb. 20), mit teils deutlichen Unterschieden in der Verteilung der T-Zell-Subpopulationen zwischen CBMC, gesunden erwachsenen Probanden sowie erwachsenen Patienten mit erhöhtem CRP (Abb. 17). Zwischen gesunden erwachsenen Probanden und erwachsenen Patienten mit erhöhtem CRP fanden sich sowohl in den CD4⁺CD20^{dim} als auch in den CD8⁺CD20^{dim} Populationen allenfalls leichte Unterschiede im *naive/memory*-Phänotyp. In den CD20-negativen Populationen fiel ein deutlich niedrigerer Anteil von naiven Zellen an sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen in Patienten mit erhöhtem CRP verglichen zu gesunden erwachsenen Probanden auf.

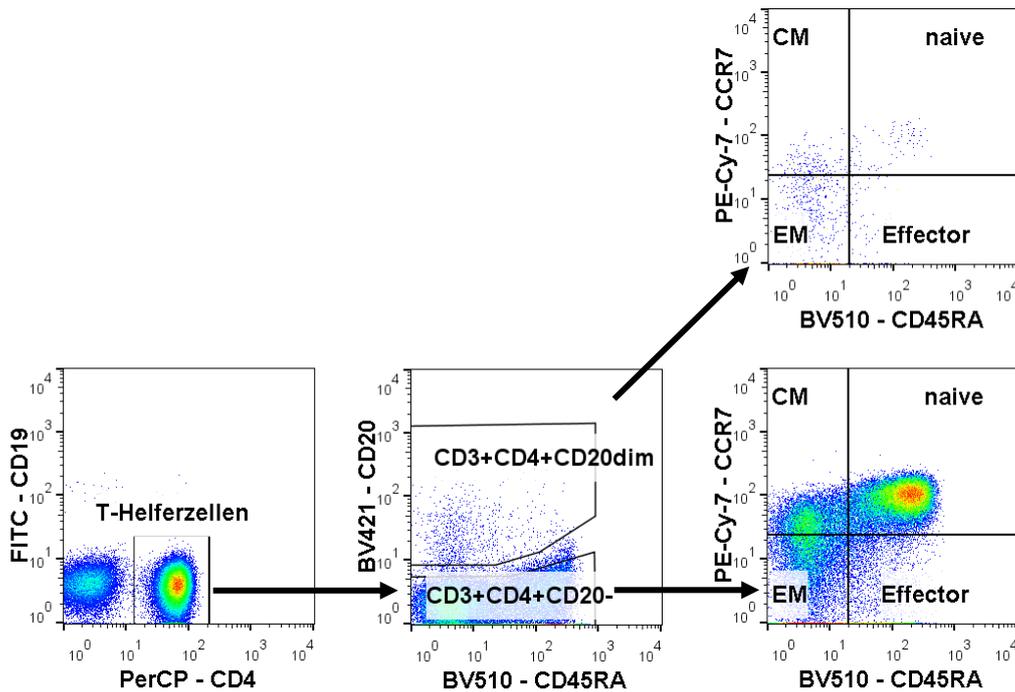


Abbildung 20: Gating-Strategie für T-Zell-Subpopulationen ($CD4^+/CD8^+$, $CD20^{neg}/CD20^{dim}$, naive/CM/EM/effector) in gesunden erwachsenen Probanden, CBMC, erwachsenen Patienten mit erhöhtem CRP.

Dotplot von PBMC eines gesunden erwachsenen Probanden, repräsentativ für alle untersuchten Proben. Zunächst Gating auf lebende Einzelzellen wie in Kapitel 2.6 beschrieben. Für die weitere Differenzierung von $CD4$ und $CD8$ wurden zwei Färbungen verwendet, entweder mit an PerCP konjugiertem anti- $CD4$ - oder anti- $CD8$ -Antikörper. Die Grenzen des Gates für $CD3^+CD20^{dim}$ Zellen wurde mittels FMO für $CD20$ festgelegt, ebenso die Grenzen für die Differenzierung von $CD45RA^+$ und $CCR7^+$ Zellen mittels FMO für $CD45RA$ und $CCR7$.

Für CBMC fand sich überraschenderweise in den, in Erwachsenen PBMC vorwiegend dem $CD8^+$ T_{EM} Phänotyp zugeordneten, $CD3^+CD20^{dim}$ Zellen ein hoher Anteil naiver T-Zellen, sowohl in der $CD4^+$ als auch in der $CD8^+$ Population (Abb. 21). Gleichzeitig war das $CD4:CD8$ -Verhältnis von $CD3^+CD20^{dim}$ Zellen in CBMC deutlich zugunsten der $CD4$ -Zellen verschoben, verglichen zu gesunden Probanden (Abb. 22). $CD3^+CD20^{dim}$ Zellen kommen somit in CBMC nicht nur in geringerem Anteil an T-Zellen als in Erwachsenen vor, sie zeigen hier auch einen deutlich unterschiedlichen Phänotyp mit einem höheren Anteil von naiven und $CD4^+$ Zellen. Diesem höheren Anteil von naiven Zellen liegt weiterhin eine zusätzliche Anreicherung von $CD3^+CD20^{dim}$ Zellen im *naiven* Zellpool in CBMC verglichen zu gesunden erwachsenen Probanden zugrunde, bei passenderweise gleichzeitiger Abnahme des Anteils dieser Zellen im *memory* Zellpool (Abb 21).

Ergebnisse

Bei geringerem Anteil der CD3⁺CD20^{dim} Zellen in CBMC interessierte ebenfalls, ob es Unterschiede in der MFI dieser Zellen im Vergleich zu gesunden erwachsenen Probanden gibt, was jedoch nicht der Fall war (*Welch's t test*, Daten nicht dargestellt).

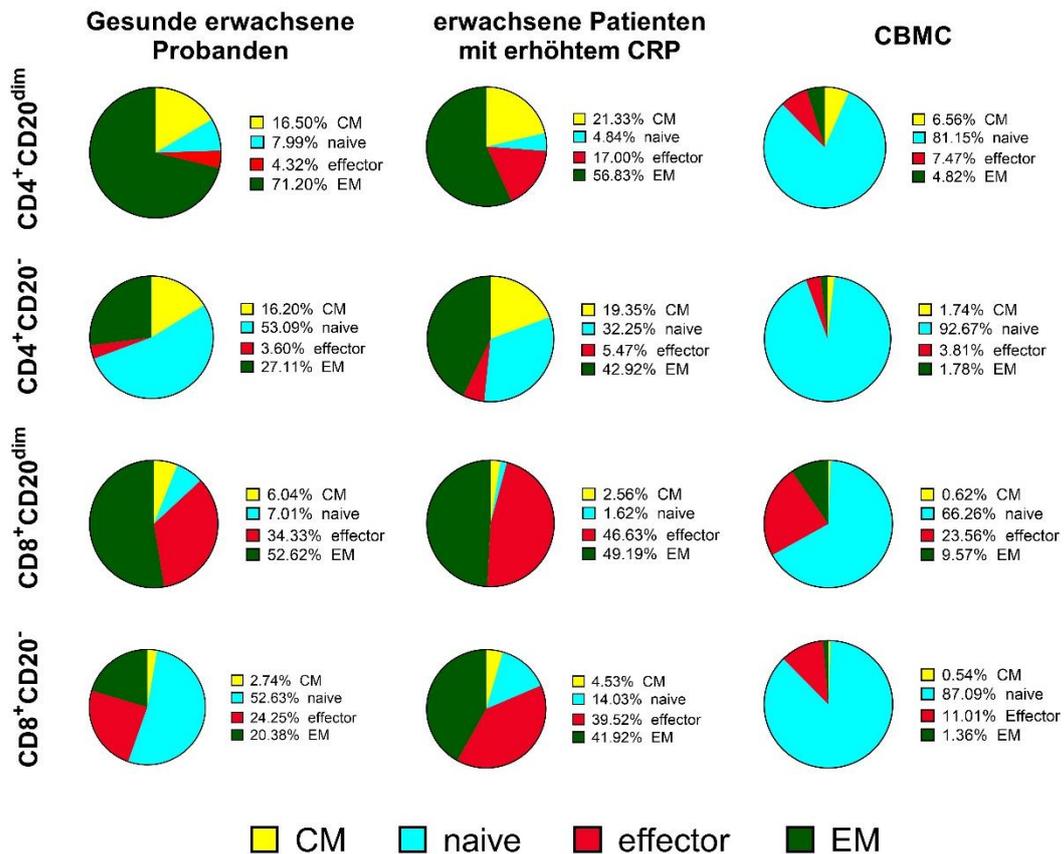


Abbildung 21: Unterschiedliche Verteilung von naiven, effector-, CM- und EM-T-Zellen in CD4⁺ und CD8⁺ Zellen in gesunden erwachsenen Probanden, erwachsenen Patienten mit erhöhtem CRP und CBMC.

Mittelwerte der untersuchten Proben als Tortendiagramme dargestellt. Es fielen deutliche Unterschiede im Anteil der jeweiligen Subpopulationen auf, insbesondere der hohe Anteil vor naiven Zellen in CBMC im Vergleich zu gesunden erwachsenen Probanden.

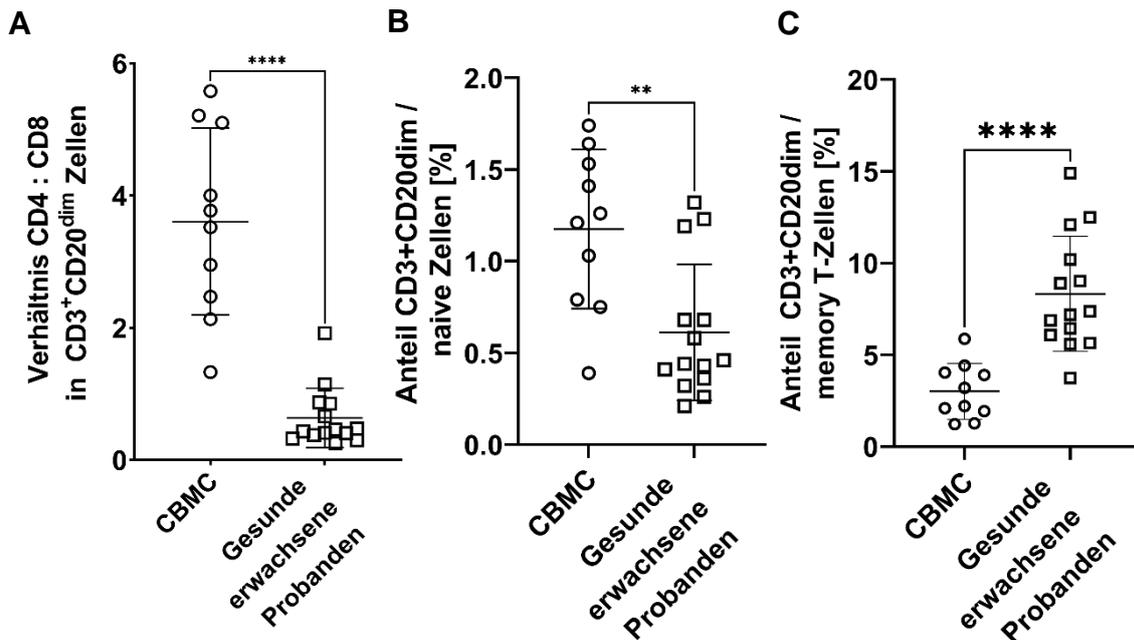


Abbildung 22: CD3⁺CD20^{dim} Zellen in CBMC unterscheiden sich im CD4:CD8 Verhatnis sowie in ihrem Anteil an naive/memory Zellen verglichen zu PBMC von gesunden erwachsenen Probanden.

(A) Das CD4:CD8-Verhatnis ist in CBMC signifikant erhöhet ($3,65 \pm 2,74$), verglichen zu gesunden erwachsenen Probanden ($0,44 \pm 0,50$). (B) Die Frequenz von CD3⁺CD20^{dim} Zellen in der naiven Zellpopulation in CBMC ist erhöhet verglichen zu erwachsenen PBMC, bei gleichzeitig erniedrigtem Anteil an memory Zellen (C). Jeweils Mean \pm SD. Welch's t test.

3.3.3 Die Verteilung von naive/memory- sowie CD4⁺/CD8⁺ T-Zell-Subpopulationen in CD3⁺CD20^{dim} Zellen in erwachsenen Probanden bleibt in einem mittelfristigen Intervall nahezu konstant

Um zu untersuchen, inwiefern sich der mittelfristig konstante Anteil von CD3⁺CD20^{dim} Zellen an T-Zellen auch auf die naive/memory- bzw. CD4⁺/CD8⁺-Subpopulation übertragen lässt, wurden PBMC von 6 gesunden Probanden zu zwei Zeitpunkten ca. 5 Monate versetzt untersucht. Hier fand sich eine weitgehende Konstanz sowohl des Anteils von CD3⁺CD20^{dim} Zellen an CD4⁺ bzw. CD8⁺ Zellen (Abb. 23), als auch von naiven, T_{EM}-, T_{CM}- sowie effector Zellen an CD4⁺CD20^{dim} bzw. CD8⁺CD20^{dim} Zellen (Abb. 24).

Ergebnisse

Die maximale Streuung eines Probanden zwischen den zwei Zeitpunkten betrug dabei für den Anteil von CD4⁺CD20^{dim} an CD4⁺-Zellen $\pm 0,36\%$, für den Anteil von CD8⁺CD20^{dim} an CD8⁺-Zellen $\pm 3,13\%$. Für die naive/memory-Subpopulationen lag die maximale Streuung ebenfalls in einem Bereich um 10% (CM: $\pm 7,8\%$, EM $\pm 9,9\%$, *effector* $\pm 12,7\%$, naive $\pm 2,4\%$).

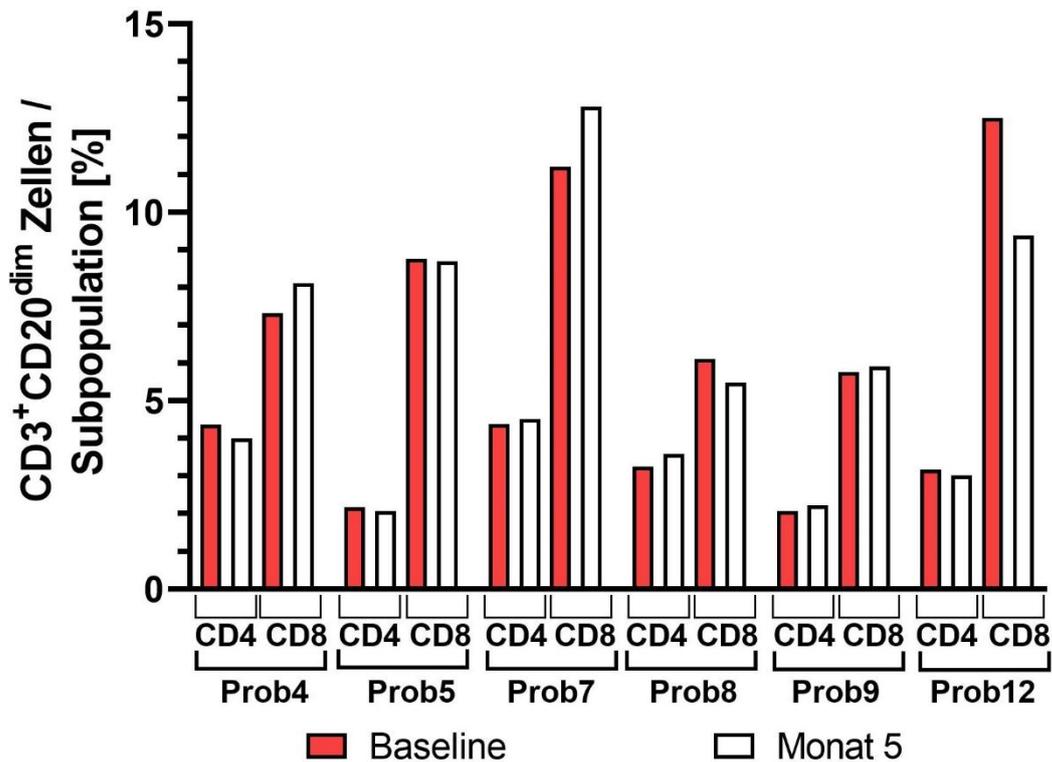


Abbildung 23: Der Anteil von CD3⁺CD20^{dim} Zellen an CD4⁺ bzw. CD8⁺ Zellen zeigt sich mittelfristig nahezu konstant.

PBMC von gesunden erwachsenen Probanden wurden zu zwei Zeitpunkten, ca. 5 Monate versetzt, untersucht. Auf der x-Achse sind als Balken die einzelnen Subpopulationen dargestellt, und für eine optimale Anschaulichkeit der Ergebnisse diese sowie die einzelnen Probanden (Prob4-Prob12) gruppiert. Auf der y-Achse findet sich der Anteil von CD3⁺CD20^{dim} Zellen an der jeweiligen (CD4 bzw. CD8) Subpopulation. Der Anteil von CD3⁺CD20^{dim} Zellen an der jeweiligen Subpopulation zeigte sich zwischen beiden Zeitpunkten relativ konstant.

Ergebnisse

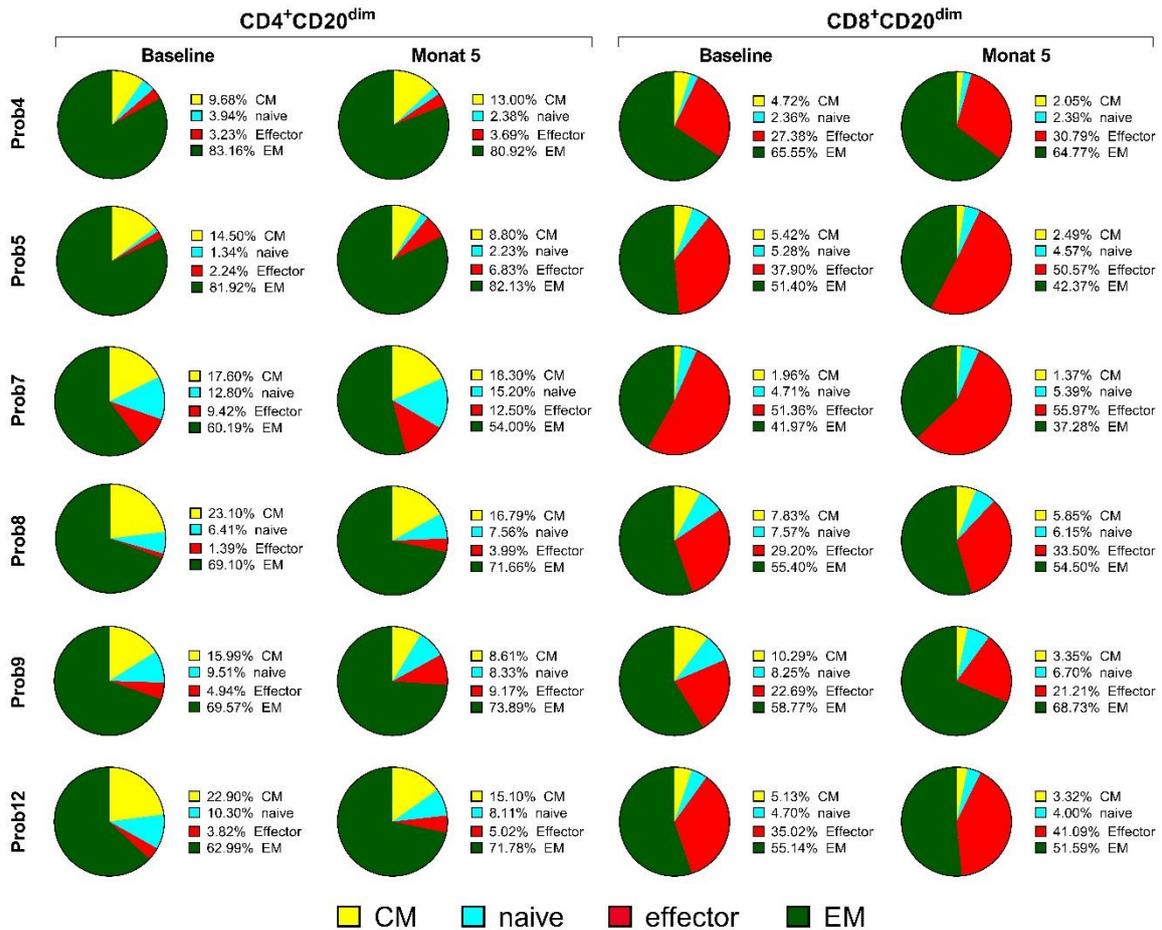


Abbildung 24: Der Anteil von CM/naive/effector/EM-Zellen an CD4+CD20^{dim} bzw. CD8+CD20^{dim} Zellen zeigt sich mittelfristig für einzelne Subpopulationen nahezu konstant. PBMC von gesunden erwachsenen Probanden wurden zu zwei Zeitpunkten, ca. 5 Monate versetzt, untersucht. Die unterschiedlichen Probanden sind als Zeilen dargestellt, die unterschiedlichen Zeitpunkte nach CD4+CD20^{dim} bzw. CD8+CD20^{dim} Zellen gruppiert als Spalten. Der Anteil der T-Zell-Subpopulationen an CD4+CD20^{dim} bzw. CD8+CD20^{dim} Zellen wurde als Tortendiagramm dargestellt und zeigt sich relativ konstant zwischen beiden Zeitpunkten.

3.4 Diskrete Steigerung des Anteils von CD3⁺CD20^{dim} Zellen an T-Zellen *in vitro* durch T-Zellstimulation

Für eine Stimulation von T-Zellen *in vitro* wurde in zwei Pilotversuchen zunächst das Superantigen SEB, welches durchschnittlich 2-20% aller T-Zellen stimulieren kann, zur Stimulation von PBMC von zwei Probanden verwendet. Hier wurden PBMC mit SEB 1 µg/ml für eine Dauer von 3 bzw. 6 Tagen in Zellkultur stimuliert, als negativ-Kontrolle in demselben Versuchsaufbau nur das Lösungsmittel von SEB (PBS) hinzugegeben. Nach 2-3 Tagen ließen sich in beiden Versuchen mittels folgender Gating-Strategie (Abb. 25) in dem FSC/SSC-Gate Lymphoblasten abgrenzen, in einem Versuch wurde zudem HLA-DR als T-Zell-Aktivierungsmarker verwendet, welcher einen adäquaten Anstieg in der stimulierten Population nach Tag 2-3 zeigte. Dieser fiel in CD3⁺CD20^{dim} Zellen stärker aus als auf CD20 negativen T-Zellen (Abb. 26).

Ergebnisse

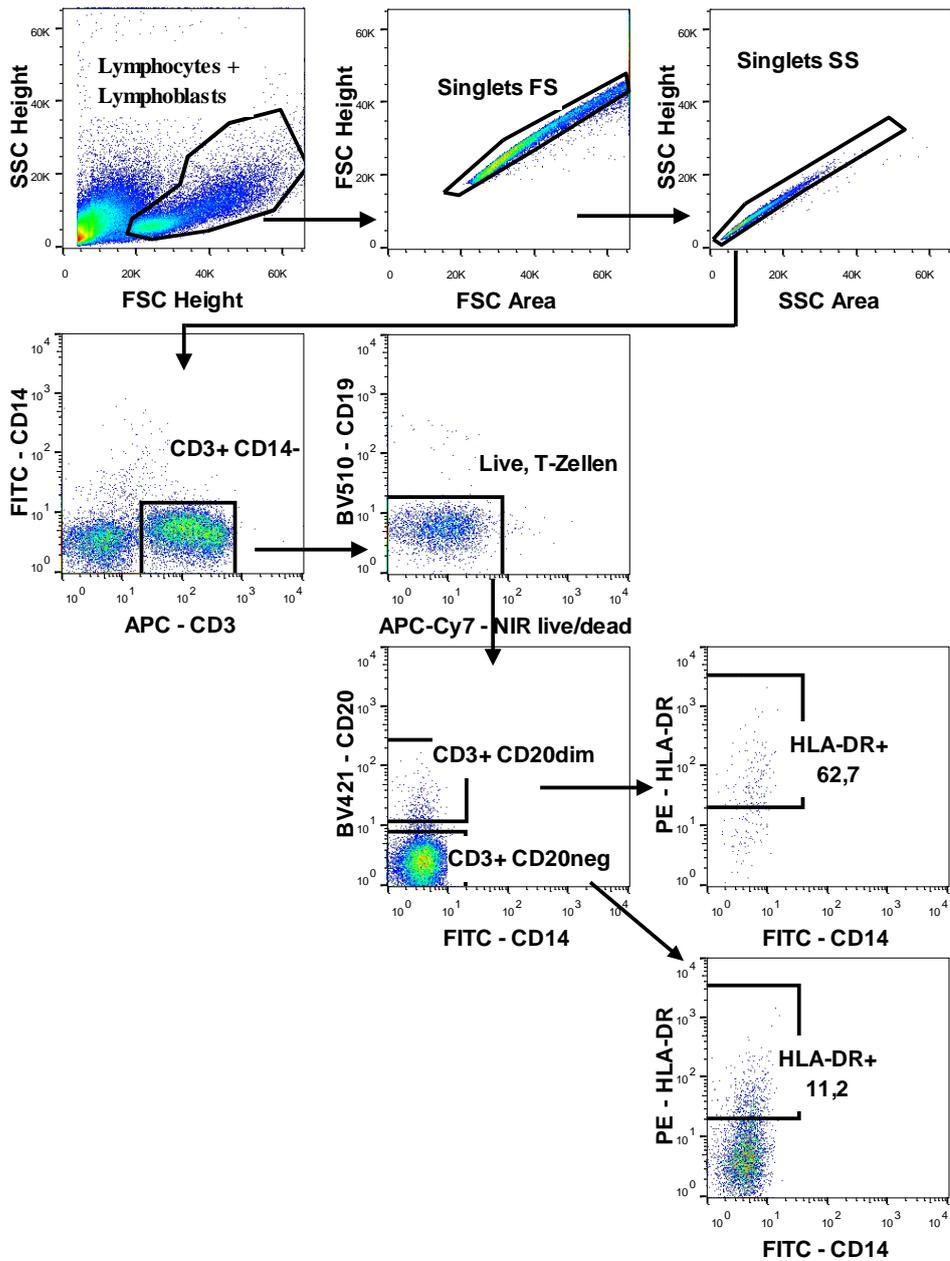


Abbildung 25: Gating-Strategie für PBMC in Stimulationsversuchen *in vitro*. Dot plot von PBMC an Tag 2 nach Stimulation mit SEB 1µg/ml. Zunächst erfolgte ein Gating auf Lymphozyten & Lymphoblasten mittels FSC/SSC. Daraufhin mittels FSC/SSC-Area auf Einzelzellen, Exklusion von Monozyten mittels CD14 und B-Zellen mittels CD19. NIR live/dead Farbstoff zur Exklusion von toten Zellen. Die Grenzen des Gates für die Differenzierung von $CD20^{dim}$ Zellen und $HLA-DR^+$ Zellen wurden mittels FMO der jeweiligen Marker festgelegt.

Ergebnisse

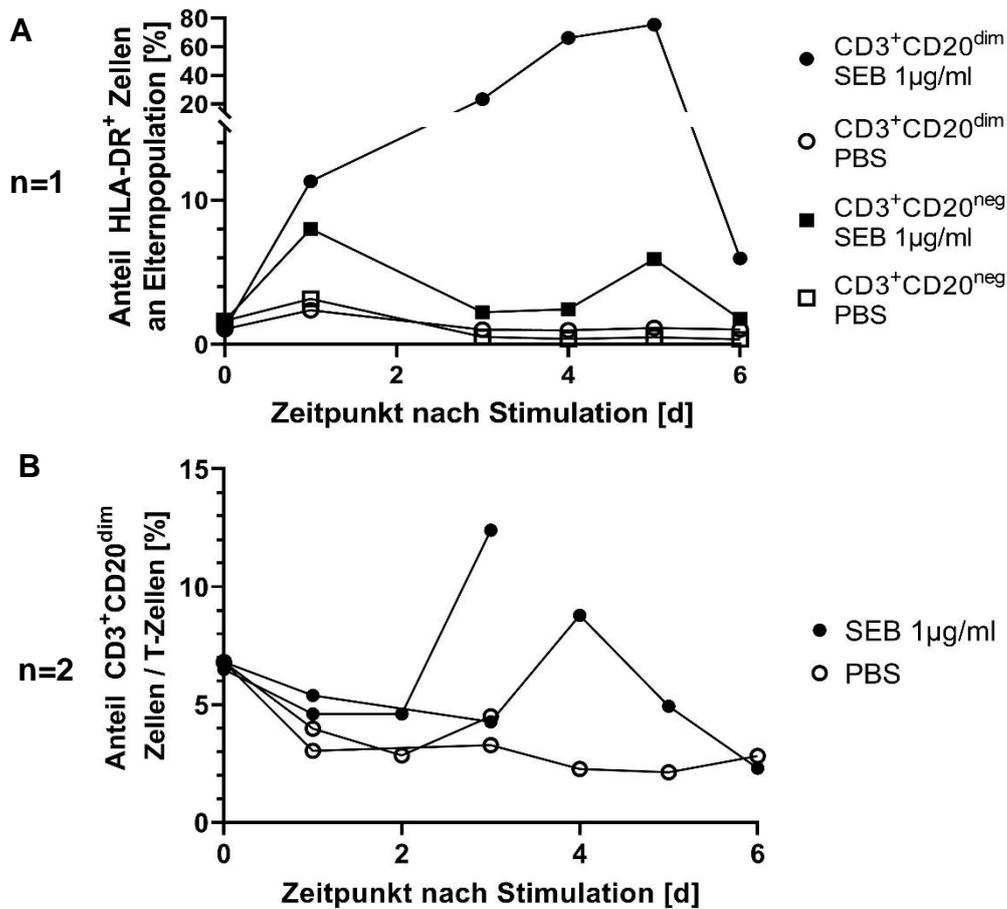


Abbildung 26: Pilotversuche mit *in vitro*-Stimulation von PBMC zweier Probanden mit SEB 1μg/ml für 3 bzw. 6 Tage.

(A) Daten eines Versuches; In CD3⁺CD20^{dim} Zellen zeigte sich der deutlichste Anstieg des Aktivierungsmarkers HLA-DR, verglichen zu CD20-negativen T-Zellen und der Negativkontrolle mittels PBS. (B) Nach 3 bzw. 4 Tagen kam es weiterhin zu einem Anstieg des Anteils CD3⁺CD20^{dim} an T-Zellen verglichen zu PBS. Darstellung beider Versuche als einzelne Verläufe.

Der Verlauf der FSC/SSC-Populationen mit Lymphoblastenformation, sowie der *dot plots* mit Darstellung der Zunahme der CD3⁺HLA-DR⁺ Zellen sowie CD3⁺CD20^{dim} Zellen ist exemplarisch für einen Versuch dargestellt (Abb. 27).

Ergebnisse

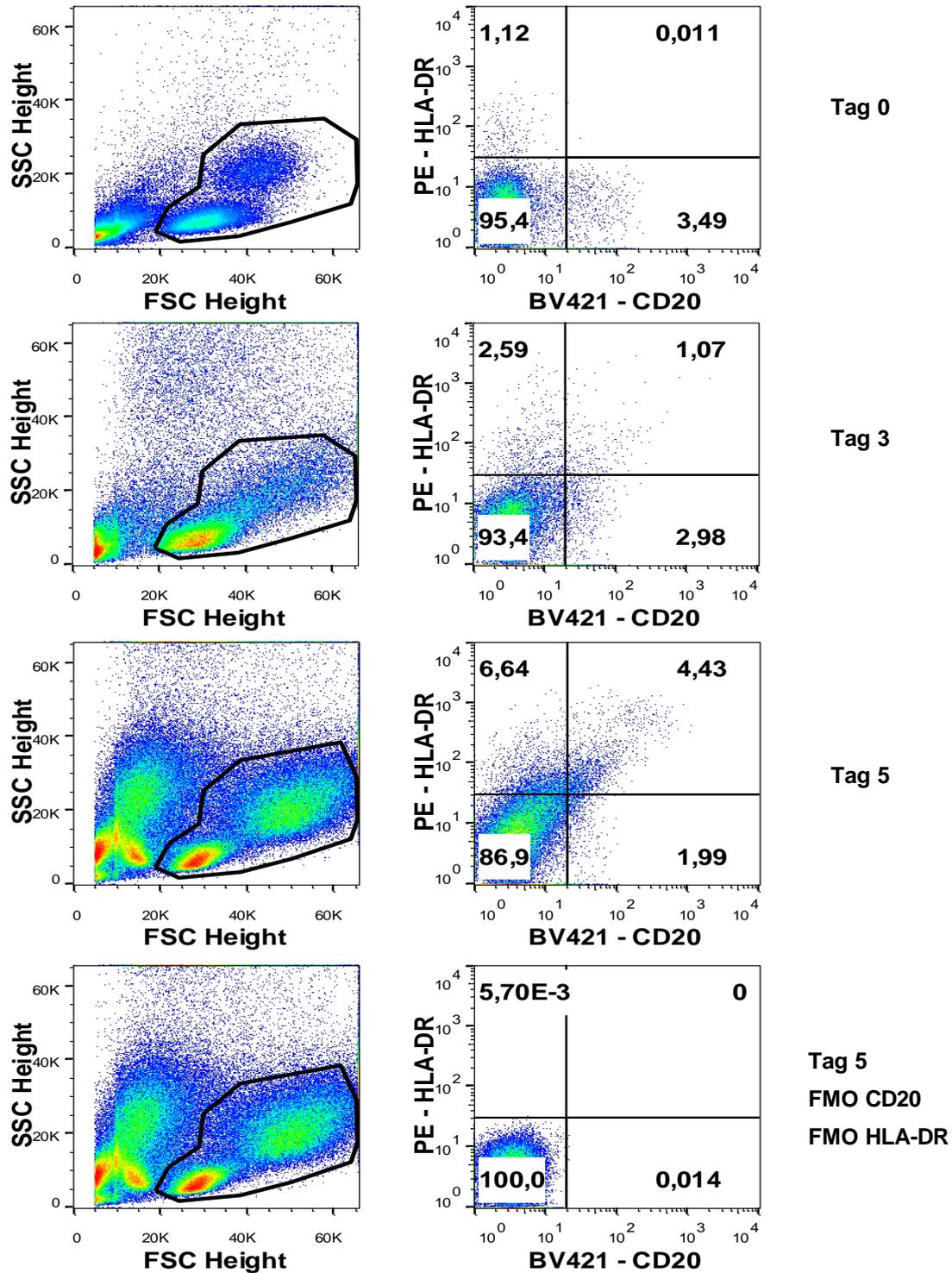


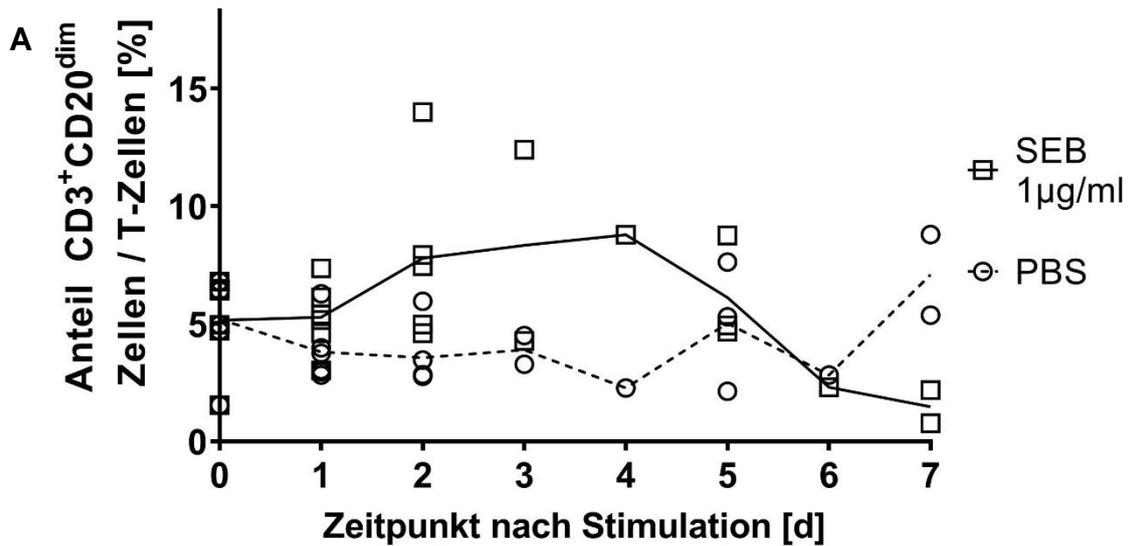
Abbildung 27: Verlauf der FSC/SSC-Populationen, CD3⁺CD20^{dim} Zellen sowie CD3⁺HLA-DR⁺ Zellen in PBMC eines gesunden erwachsenen Probanden während *in vitro* Stimulation mit SEB 1µg/ml.

Die Versuchsdauer betrug 6 Tage, wobei exemplarisch dot plots von Tag 0, Tag 3, Tag 5 sowie eine FMO von Tag 5 für CD20 und HLA-DR gezeigt ist. Links FSC/SSC, rechts BV421-CD20 gegen PE-HLA-DR aufgetragen. Gegen Tag 3 tritt im FSC/SSC anstelle der Monozyten eine Lymphblastenpopulation, welche höhere Werte für FSC und SSC als Lymphozyten aufweist. Im zeitlichen Verlauf nehmen einerseits die CD3⁺HLA-DR⁺ events zu, weiterhin findet sich ein höherer Anteil von CD3⁺CD20^{dim} Zellen. Die CD3⁺CD20^{dim} Population wies dabei einen höheren Anteil HLA-DR⁺ zu HLA-DR⁻ Zellen auf verglichen zur CD20-negativen T-Zellpopulation.

Ergebnisse

In 4 weiteren Versuchsreihen mit SEB als Stimulant konnten diese Ergebnisse bzgl. einem starken Anstieg der HLA-DR⁺-Population in CD3⁺CD20^{dim} Zellen, sowie einer tendenziellen Zunahme der CD3⁺CD20^{dim} Zellen beobachtet werden. In einer Versuchsreihe wurde zudem mittels Annexin-V (Marker für externalisiertes Phosphatidylserin als Zeichen der Apoptose) und PI auch eine Aussage zum lebenden und toten Anteil der CD3⁺CD20^{dim} und CD20-negativen T-Zellen getroffen. Hier unterschieden sich beide Populationen, mit einem höheren Anteil an toten und Annexin-V-positiven Zellen als Apoptosemarker in CD3⁺CD20^{dim} Zellen bereits zu Beginn als auch im Verlauf der Kultur (Abb. 30). Zusammengefasst zeigte sich somit für die Stimulation mit SEB 1 µg/ml *in vitro* in 6 unabhängigen Versuchen mit unterschiedlicher Versuchsdauer um Tag 2-4 ein reproduzierbarer, wenn auch diskreter Anstieg des Anteils von CD3⁺CD20^{dim} Zellen an T-Zellen verglichen zur negativ-Kontrolle PBS. Aufgrund der unterschiedlichen Versuchsdauer dieser 6 Versuche mit verschiedenen Zeitpunkten an denen Zwischenmessungen durchgeführt wurden finden sich nicht für jeden Zeitpunkt gleich viele Datenpunkte. Diese wurden für alle Versuche gruppiert in einer Abbildung dargestellt, worauf bei der Interpretation dieser Abbildung geachtet werden muss (Abb. 28). Eine weitere Darstellung zeigt den Verlauf einzelner Versuche für Tag 0-2, für welche die größte Anzahl einzelner Messwerte vorlag, hier zeigte sich auch die erste Tendenz eines Anstieges (Abb. 29) Der Rückgang des Anteils von CD3⁺CD20^{dim} Zellen nach Tag 2-4 kann sich durch den höheren Anteil toter CD3⁺CD20^{dim} Zellen unter *in vitro* Bedingungen erklären, da diese deutlich anfälliger für Apoptose sind (Vgl. Abb. 30).

Ergebnisse



Unterschiedliche
Datenpunkte zu
diesem Zeitpunkt

6 6 5 2 1 3 1 2

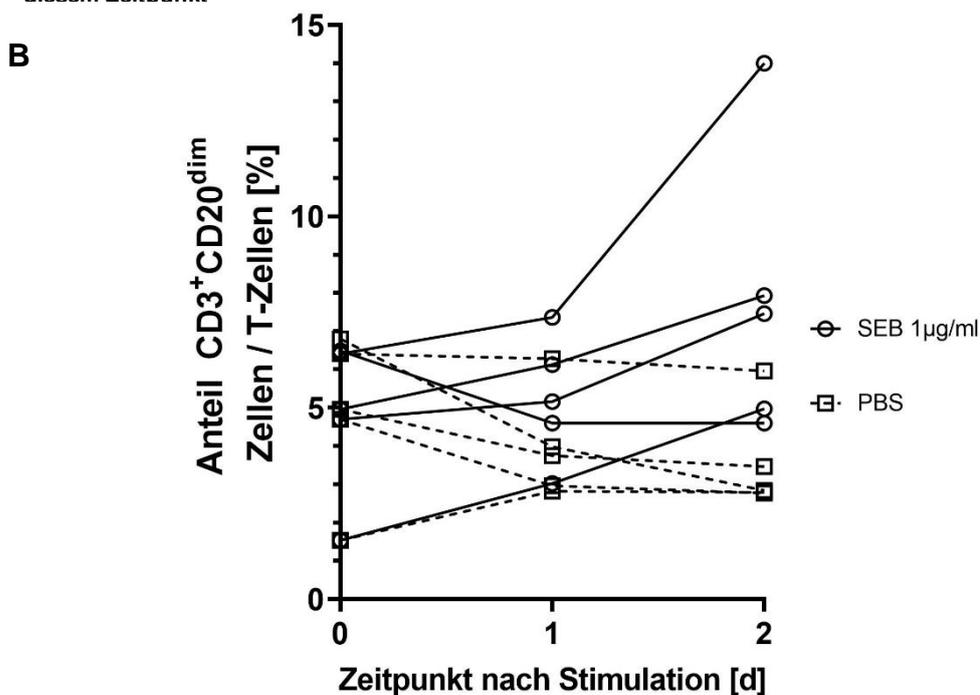


Abbildung 28: Reproduzierbarkeit des Anstiegs von $CD3^+CD20^{dim}$ Zellen unter SEB-Stimulation, in 6 Versuchen (inklusive der Pilotversuche aus Abb. 26) mit unterschiedlicher Stimulationsdauer und -Zeitpunkten.

(A) PBMC, welche mit SEB 1µg/ml *in vitro* stimuliert wurden, zeigen einen leichten Anstieg des Anteils $CD3^+CD20^{dim}$ Zellen an T-Zellen verglichen zur Negativkontrolle mit PBS. Einzelne Werte als Quadrat (SEB) und Kreise (PBS) dargestellt, sowie als Linie der Verlauf des Mittelwertes. Dieser setzt sich jedoch aus einer unterschiedlichen Stichprobenzahl der einzelnen Messungen bei verschiedenen Zeitpunkten, und ist mit Vorsicht zu interpretieren.

(B) Die $CD3^+CD20^{dim}$ Verläufe von 5 Versuchen mit Stimulation SEB 1µg/ml und PBS sind nochmal aufgrund des hier deutlicheren Anstieges detailliert für Tag 0-2 dargestellt.

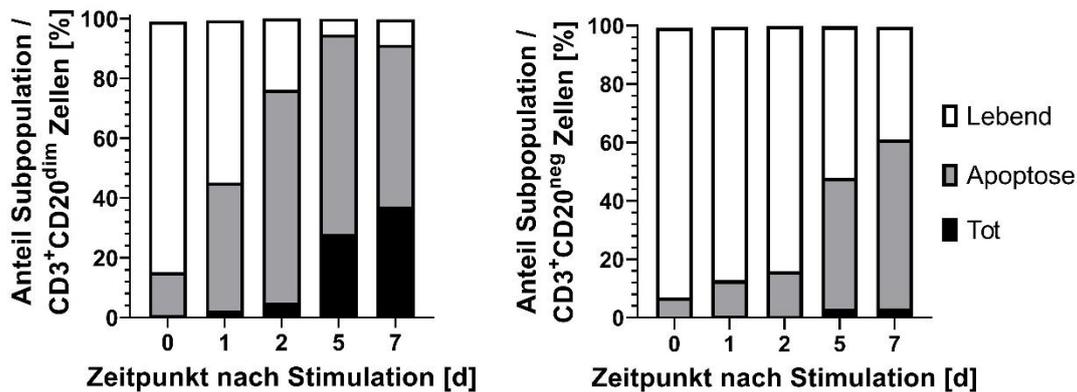


Abbildung 29: CD3⁺CD20^{dim} Zellen sind besonders anfällig für Apoptose unter Stimulation mit SEB.

Links Darstellung des Anteils von lebenden, apoptotischen (Annexin V (als Marker für Phosphatidylserin) positiven) und toten (PI) Zellen an CD3⁺CD20^{dim} Zellen. Rechts Darstellung der Anteile an CD3⁺CD20^{neg} Zellen. In CD3⁺CD20^{dim} Zellen fällt eine schnellere und stärkere Abnahme der lebenden Zellen auf.

Um die Wirkung weiterer Stimulationsmechanismen zu untersuchen, wurden zusätzlich Versuchsreihen mit PMA/Ionomycin, anti-CD3-Antikörper sowie *mixed-lymphocyte-reaction* (MLR) durchgeführt. Hier zeigten sich jedoch nicht zu erwartende Ergebnisse (fehlender Anstieg von HLA-DR auf allen T-Zellen als Positivkontrolle einer erfolgreichen Stimulation, durchflusszytometrisch nicht plausible *dot plots*), sodass eine Wiederholung dieser Versuche für zukünftige Arbeiten geplant ist.

3.5 $\alpha\beta$ -TCR-Repertoire von CD3⁺CD20^{dim} memory Zellen zeigt eine hohe Diversität und Überlappungen mit CD3⁺CD20^{neg} T-Zellen

Für die Analyse des TCR-Repertoires von CD3⁺CD20^{dim} Zellen wurden PBMC von 4 gesunden erwachsenen Probanden zunächst mit Unterstützung der *flow cytometry core facility* Tübingen mit folgender gating-Strategie in memory (CD45RA⁻), CD4⁺/CD8⁺ sowie CD20^{dim}/CD20^{neg} Zellen sortiert (Abb. 31). Für einen Probanden (Proband 2) ließen sich nur sehr wenige CD8⁺CD20^{dim} memory Zellen sortieren, sodass in diesem Fall auf eine Sequenzierung verzichtet wurde (Vgl. Tab. 9).

Ergebnisse

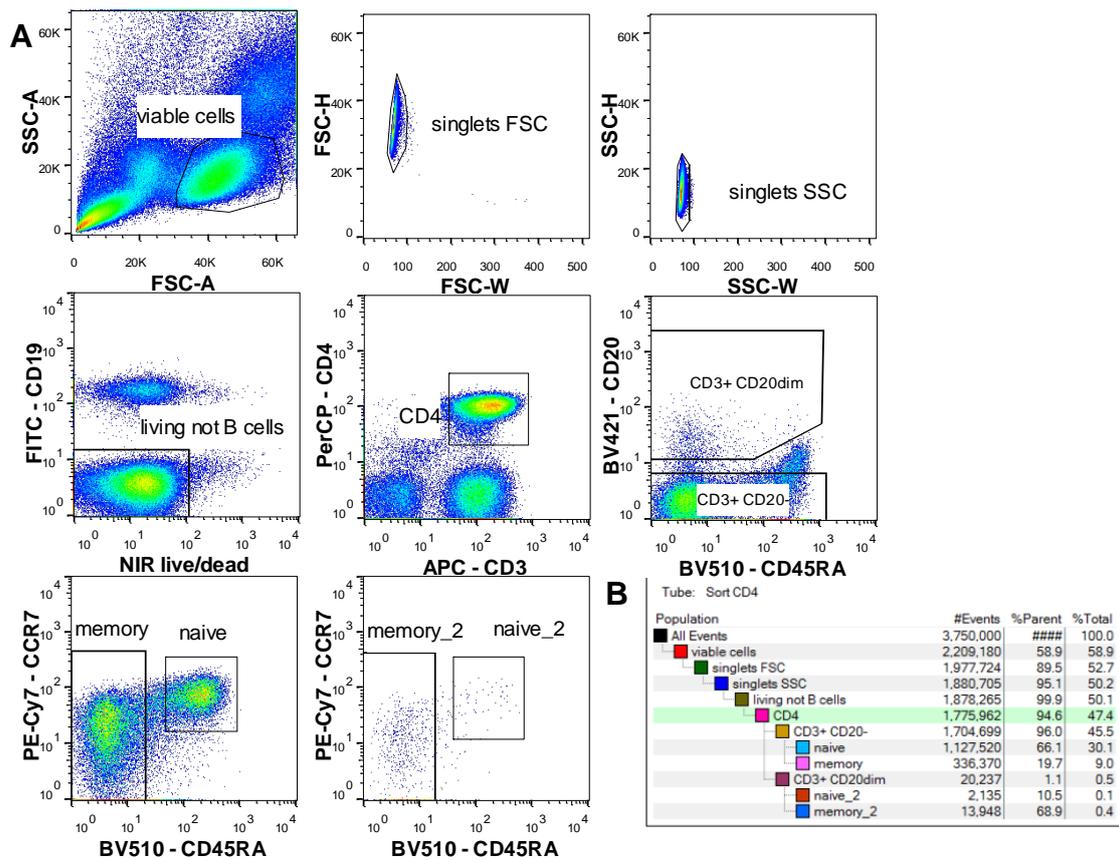


Abbildung 30: Gating-Strategie für FACS von PBMC für anschließende TCR-Sequenzierung.

(A) Repräsentatives Gating von PBMC auf Lymphozyten, Singlets in FSC und SSC, Ausschluss von toten Zellen und B-Zellen mittels CD19 und Totfarbstoff (NIR live/dead). Gating auf CD4⁺/CD8⁺ Zellen mittels zwei unterschiedlicher Färbungen, mit anti-CD4- bzw. anti-CD8-Antikörper in PerCP-Konjugation. Dann Gating auf CD20^{dim} und CD20^{neg} Zellen, sowie memory (CD45RA⁻) und naive (CD45RA⁺CCR7⁺) Zellen. Grenzwerte für CD20, CD45RA und CCR7 wurden mittels FMO bestimmt. (B) Übersicht über die Hierarchie der Gating-Populationen und Anzahl der Events absolut sowie prozentual während eines FACS von CD4⁺ Zellen.

Die weitere Probenbearbeitung zur Sequenzierung der TCR erfolgte am Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin, sowie die Auswertung der Daten in Kooperation mit Frau Dr. Caterina Curato und Dr. Katherina Siewert. Hierbei wurden im Mittel 1589 TCR-Sequenzen je Probe und Population (CD8/CD4, CD20^{dim}/CD20^{neg}, α -/ β -Kette) erhalten mit einer Anzahl an unterschiedlichen TCR-Sequenzen (*Clonotypes*) von im Mittel 849. Für alle Populationen zeigte sich ein hoher Shannon-Index der TCR-Sequenzen als Ausdruck einer hohen Diversität innerhalb einer Population, mit leicht niedrigeren Werten in CD8⁺ Zellen, wie erwartet. Zwischen CD20^{dim} und CD20^{neg} Zellen zeigte sich kein wesentlicher Unterschied im Shannon-Diversitätsindex (Tab. 9).

Ergebnisse

Tabelle 9: Anzahl der sortierten Zellen, der Gesamtanzahl an TCR-Sequenzen und unterschiedlichen TCR-Sequenzen (Clonotypes) pro Probe. Der Hieraus bestimmte Shannon-Diversitätsindex der TCR-Sequenzen in CD3⁺CD20^{dim} Zellen zeigte eine hohe Diversität in allen Populationen. Hierbei beschreibt 1 eine maximal diverse Population, und 0 eine maximal einheitliche Population. Auswertung, Interpretation und Darstellung erfolgten in Kooperation mit Frau Dr. Caterina Curato und Dr. Katherina Siewert, Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin.

Proband	CD4/CD8	CD20 ^{dim} /CD20 ^{neg}	Anzahl sortierter Zellen	α-/β-Kette	Anzahl TCR-Sequenzen	Anzahl unterschiedlicher TCR-Sequenzen (Clonotypes)	Shannon-Index
Proband 1	CD4	CD20 ^{dim}	20.000	α	619	359	0,98
				β	922	547	0,99
	CD8	CD20 ^{neg}	20.000	α	337	257	0,96
				β	454	351	0,96
	CD4	CD20 ^{dim}	20.000	α	520	239	0,93
				β	650	283	0,94
CD8	CD20 ^{neg}	20.000	α	1011	484	0,92	
			β	1206	614	0,89	
Proband 2	CD4	CD20 ^{dim}	2.320	α	766	510	0,99
				β	510	710	0,99
	CD8	CD20 ^{neg}	20.000	α	1747	1323	0,97
				β	1927	1490	0,94
Proband 12	CD4	CD20 ^{dim}	20.000	α	3987	1984	0,98
				β	5199	2340	0,98
	CD8	CD20 ^{neg}	20.000	α	3551	2394	0,95
				β	4570	3097	0,93
	CD4	CD20 ^{dim}	8.000	α	423	141	0,85
				β	568	150	0,87
CD8	CD20 ^{neg}	22.000	α	2762	861	0,80	
			β	3180	1026	0,79	
Proband 13	CD4	CD20 ^{dim}	20.000	α	976	569	0,98
				β	1408	803	0,98
	CD8	CD20 ^{neg}	20.000	α	1152	784	0,97
				β	1481	1062	0,96
	CD4	CD20 ^{dim}	20.000	α	743	265	0,88
				β	1097	298	0,81
CD8	CD20 ^{neg}	20.000	α	865	385	0,90	
			β	1250	447	0,84	

Es fanden sich weiterhin teils deutliche Überlappungen in den TCR-Sequenzen zwischen CD20^{dim} und CD20^{neg} Zellen jeweils der CD4⁺ bzw. der CD8⁺ Populationen. So fanden sich bspw. die in der CD4⁺CD20^{dim}α bestimmten TCR-Clonotypes ebenfalls in einem Anteil von im Mittel 3,7% in den TCR-Sequenzen der CD4⁺CD20^{neg}α Population wieder. Die Überlappung zwischen CD20^{dim} und CD20^{neg} Populationen fiel in den CD8⁺-Populationen noch deutlicher aus (Vgl. 35% für TCR-Clonotypes der CD8⁺CD20^{dim}α in CD8⁺CD20^{neg}α Population). Um eine unspezifische Überlappung oder Kontamination der einzelnen Proben auszuschließen, wurden als negativ-Kontrolle die Sequenzen zwischen CD4⁺

Ergebnisse

und CD8⁺-Populationen verglichen, hier zeigte sich wie zu erwarten keine wesentliche Überlappung (Abb. 32).

Überlappung der TCR-Sequenzen: x % (Wert in einzelnen Zellen) der TCR-Clonotypes der links beschrifteten Population (Zeilen) finden sich ebenfalls in den TCR-Sequenzen der oben beschrifteten Population (Spalten)

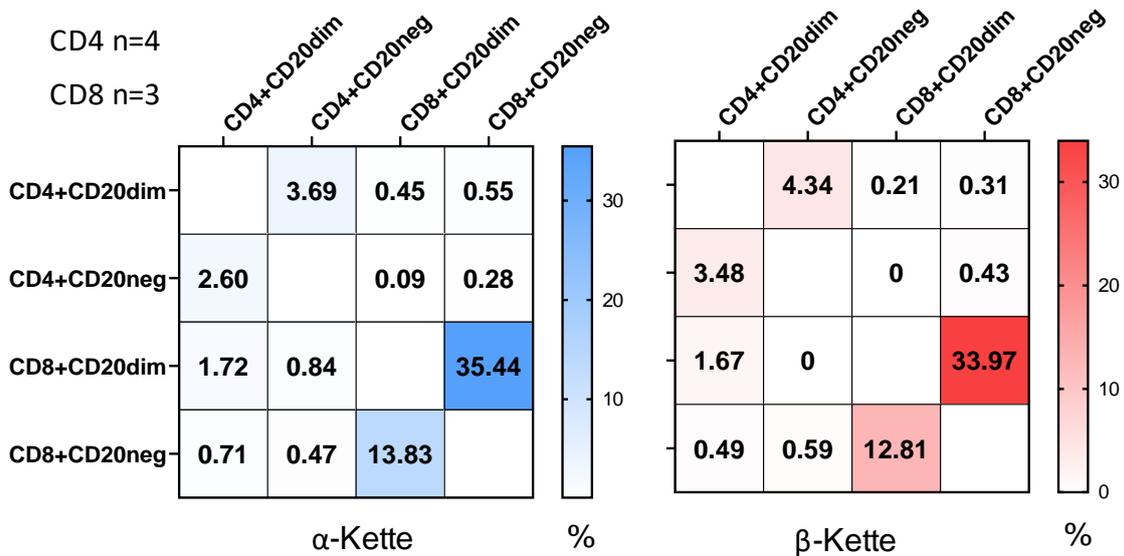


Abbildung 31: Deutliche Überlappung in den TCR-Sequenzen zwischen CD20^{dim} und CD20^{neg} Zellen.

Die TCR-Sequenzen von CD4⁺ und CD8⁺ memory T-Zellen wurden auf das Vorkommen unterschiedlicher TCR-Sequenzen (Clonotypes) sowohl in der CD20^{dim} als auch in der CD20^{neg} Fraktion untersucht. Das Ausmaß der sich überlappenden Sequenzen ist als Mittelwert in Prozent farblich abgestuft dargestellt, wobei die TCR-Clonotypes der links beschrifteten Populationen sich in einem Anteil, welcher in den einzelnen Zellen dargestellt ist unter den TCR-Sequenzen der oben beschrifteten Populationen wiederfindet. In der CD8⁺-Population (n=3) kann es zu einer stärkeren Überlappung der TCR-Sequenzen als in der CD4⁺-Population (n=4). Als negativ-Kontrolle findet sich so gut wie keine Überlappung zwischen CD4⁺- und CD8⁺-Populationen. Auswertung, Interpretation und Darstellung erfolgten in Kooperation mit Frau Dr. Caterina Curato und Dr. Katherina Siewert, Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin.

Die sich überlappenden Clonotypes fanden sich dabei weiterhin in sehr variablen Anteilen in den einzelnen Populationen. Exemplarisch ist für Proband 13 das gleichzeitige Vorkommen von vier α-TCR-Clonotypes in der CD8⁺CD20^{dim} und CD8⁺CD20^{neg} Population in unterschiedlicher Häufigkeit und Frequenz dargestellt (Tab. 10).

Ergebnisse

Tabelle 10: Variable Häufigkeit der sich überlappenden einzigartigen TCR-Sequenzen (Clonotypes) in den verglichenen CD20^{dim}/CD20^{neg} Populationen.

Die Kombination aus einer CDR3-Nukleotidsequenz, einem V- und J- Segment wurde als ein Clonotype definiert, und die Anzahl überlappender TCR-Sequenzen in den einzelnen Populationen exemplarisch an Proband 13 für die α -Kette und CD8 Zellen dargestellt (Vgl. Tab. 9 für Anzahl sortierter Zellen und TCR-Sequenzen). Auswertung, Interpretation und Darstellung erfolgten in Kooperation mit Frau Dr. Caterina Curato und Dr. Katherina Siewert, Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin.

CDR3-Nukleotidsequenz (α -Kette)	V-Segment	J-Segment	Häufigkeit des Clonotypes in der CD8 ⁺ CD20 ^{dim} Population	Häufigkeit des Clonotypes in der CD8 ⁺ CD20 ^{neg} Population
TGTGCAGCGCAT GCTGCAGGCAAC AAGCTAACTTTT	TRAV13-1	TRAJ17	47	4
TGTGCTGGGCAGC TTATACCTAATAACAA TGCCAGACTCATGTTT	TRAV35	TRAJ31	24	0
TGTGCAGCAAAG GGCACTGGGGTTAC CAGAAAGTTACCTTT	TRAV13-1	TRAJ13	23	3
TGTGCTTTCATGG GAGGTAGCAACTA TAAACTGACATTT	TRAV38-1	TRAJ53	18	118

3.6 Nachweis von CD3⁺CD20^{dim} Zellen in einem Patienten mit Bruton-Syndrom

Im Rahmen des stationären Aufenthaltes eines Patienten mit Bruton-Syndrom in der Neurologischen Universitätsklinik Tübingen erklärte sich dieser damit einverstanden, dass PBMC von ihm auf das Vorkommen von CD3⁺CD20^{dim} Zellen untersucht werden dürfen. Hier zeigte sich unter den Lymphozyten im Blut ein komplettes Fehlen von CD19⁺ Zellen, bei gleichzeitigem Anteil von CD3⁺CD20^{dim} Zellen von 2,64% an T-Zellen, welche mit einem Hauptanteil von T_{EM}-Zellen (57,1%) eine ähnliche Häufigkeit und Verteilung wie in PBMC von gesunden Probanden zeigten.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurden CD3⁺CD20^{dim} Zellen in gesunden Probanden in einem Anteil von ca. 4-5% an T-Zellen nachgewiesen, weiterhin fanden sich CD20^{dim} Zellen auch in geringer Absolutzahl in NK-Zellen. Der Anteil von CD3⁺CD20^{dim} Zellen an T-Zellen ist mit Daten aus der Literatur vereinbar (26, 27, 36). Bei geringer Anzahl der CD20^{dim} NK-Zellen wurde für die weiteren Versuche der Fokus auf CD3⁺CD20^{dim} T-Zellen gelegt. In PBMC von Patienten mit MS vor Erstgabe Ocrelizumab (OCR) fanden sich ebenfalls CD3⁺CD20^{dim} Zellen, welche während des ersten Zyklus OCR nicht mehr nachweisbar waren. In der Literatur wurde dies bisher als eine Depletion der CD3⁺CD20^{dim} Zellen gewertet, wie sie für anti-CD20-Antikörper bei B-Zellen extensiv *in vitro* dokumentiert und durch Messung von CD19 bestätigt ist (47, 48). In dieser Promotionsarbeit wurde daher untersucht, ob der fehlende Nachweis von CD3⁺CD20^{dim} T-Zellen nach Therapie auch auf anderen Mechanismen beruhen kann, wie einer Internalisierung von Oberflächen-ständigem CD20 (für Klasse I Antikörper wie OCR beschrieben (49)) oder Maskierung (OCR entspricht dem Klon 2H7, welcher in vielen Studien zu CD3⁺CD20^{dim} Zellen für diagnostische anti-CD20-Antikörper verwendet wurde (19, 25, 26, 30, 35), und nach der Erst- und Zweitinfusion von OCR liegen zumindest über Wochen relevante Plasmakonzentrationen des Antikörpers *in vivo* vor (22, 73). Es zeigte sich jedoch, dass CD3⁺CD20^{dim} Zellen trotz deutlich geringerer CD20-Expression nach der ersten Gabe OCR tatsächlich depletiert werden, und dass der fehlende Nachweis dieser Zellen *ex vivo* nicht nur durch eine Maskierung oder Internalisierung des CD20-Moleküles durch OCR zustande kam. Ein Wirkprinzip von, in ihrer kompletten therapeutischen Wirkung in Autoimmunerkrankungen bisher nur gering verstandenen, anti-CD20-Antikörpern könnte somit auch auf einer Depletion der an der Pathophysiologie von MS (26, 33) und anderen Autoimmunerkrankungen (30) wahrscheinlich beteiligten CD3⁺CD20^{dim} Zellen beruhen.

Während B-Zellen nach Gabe von OCR und RTX im ersten wie auch späteren Therapiezyklen erwartungsgemäß durchgehend weitestgehend depletiert blieben, waren CD3⁺CD20^{dim} T-Zellen regelmäßig früh im Verlauf des

Diskussion

durchschnittlichen ersten Infusionszyklus von 6 Monaten nachweisbar. Diese zeigten zu Beginn auch eine niedrigere Dichte von CD20, gemessen an der mittleren Fluoreszenzintensität der CD3⁺CD20^{dim} Zellen. Da für B-Zellen bei längerer B-Zell-depletierender Therapie teils ein späteres Wiederauftreten beschrieben wird, untersuchten wir, ob die Repletion der CD3⁺ CD20^{dim} T-Zellen sich in späten (≥ 4 .) Zyklen RTX oder OCR im Vergleich zum ersten Zyklus verzögert. Dies war nicht der Fall und spricht somit nicht für eine zunehmende Depletion in tieferen Kompartimenten. Dies könnte darauf beruhen, dass CD3⁺CD20^{dim} T-Zellen in lymphatischen Kompartimenten – ähnlich wie für B-Zellen gezeigt – weniger anfällig für CD20-depletierende Antikörper sind und dort – im Gegensatz zu in PBMC – dann die geringere Oberflächendichte von CD20 auch in späteren Zyklen nicht mehr ausreicht.

Diese neu beobachtete Kinetik von CD3⁺CD20^{dim} Zellen warf die Frage der Entwicklung dieser Zellen auf. Für B-Zellen wird als ein möglicher Grund für eine langsame Repletion die frühe Expression von CD20 auf unreifen Vorläuferzellen angesehen, mit daraus resultierender nachhaltiger Depletion des B-Zell-Kompartimentes durch anti-CD20-Antikörper (74). Die schnellere Repopulation von CD3⁺CD20^{dim} Zellen wäre somit mit einem Erwerb von CD20 in späteren Entwicklungsstadien dieser Zellen vereinbar. Für eine Abspaltung der Zellgruppen nach Antigenkontakt, sowie für eine Verwandtschaft von CD3⁺CD20^{dim} und CD20-negativen T-Zellen spricht auch die deutliche Überlappung im TCR-Repertoire beider Zellen. Dies konnte in Kooperation mit Mitarbeitern des Bundesinstitutes für Risikobewertung, Berlin, insbesondere Frau Dr. Caterina Curato und Dr. Katherina Siewert, in 4 Probanden für CD3⁺CD20^{dim} und CD20-negative *memory* T-Zellen gezeigt werden. Hier zeigte sich einerseits ein hoher Shannon-Diversitätsindex der TCR-Sequenzen der CD3⁺CD20^{dim} Zellen ähnlich zu den CD3⁺CD20^{neg} Subpopulationen, mit leicht niedrigeren Werten in der CD8⁺ Subpopulation sowohl in der CD20^{dim} als auch CD20^{neg} Gruppe, wie in der Literatur für CD3⁺CD20^{neg} Zellen vorbeschrieben (65). CD3⁺CD20^{dim} Zellen bilden somit eine polyklonale Population. Weiterhin fanden sich im direkten Vergleich deutliche Überlappungen in den TCR-Sequenzen zwischen CD20^{dim} und CD20^{neg} Zellen in den jeweiligen respektiven CD4⁺/CD8⁺-

T-Zell-Populationen. Aufgrund der sehr hohen Anzahl verschiedener TCR in jedem Individuum (>100 Millionen einzigartige *clonotypes* bei jedem Menschen (64)) ist dabei jedoch von einem gewissen Sampling-Effekt auszugehen, sodass in jeder Probe nur ein kleiner Teil der tatsächlich vorhandenen TCR-Sequenzen analysiert werden kann. Um die maximal mögliche Überlappung zu bestimmen, könnten in weiteren Versuchen Replikate gleicher Subpopulationen analysiert werden. In jedem Fall spricht dieses gemeinsame Vorkommen von einzigartigen TCR-Sequenzen, respektive TCR-Klonen, in sowohl CD20^{dim} als auch CD20^{neg} Populationen für eine Verwandtschaft dieser Populationen, und lässt die Entstehung aus einem gemeinsamen Kompartiment bzw. einem gemeinsamen Vorläufer wahrscheinlich erscheinen. CD3⁺CD20^{dim} Zellen vereinen dabei mit ihrer Diversität, der Überlappung einzelner Klone, sowie in der Heterogenität des Phänotyps einzelner Klone Eigenschaften, wie sie als Plastizität für das TCR-Repertoire von Th1, Th2 und Th17 *memory* Zellen beschrieben sind (75).

Um der vermuteten späten Abspaltung von CD3⁺CD20^{dim} Zellen aus dem T-Zell-Kompartiment nachzugehen, und da es sich bei CD3⁺CD20^{dim} Zellen zudem um eine aktivierte und leichter zu aktivierende T-Zell-Subpopulation handelt (26, 30), erschien eine Aktivierung von T-Zellen als möglicher Faktor in der Entstehung von CD3⁺CD20^{dim} Zellen plausibel. Bereits gezeigt werden konnte, dass CD3⁺CD20^{dim} *in vitro* über einen Beobachtungszeitraum von 48h ihren Phänotyp beibehalten (33). Eine *in vitro*-Stimulation von PBMC mit SEB führte zunächst zu einem erwarteten, deutlichen Anstieg von HLA-DR als Aktivierungsmarker auf T-Zellen, welcher auf CD3⁺CD20^{dim} Zellen deutlicher ausfiel, passend zu ihrer leichteren Aktivierbarkeit (30). Hier zeigten sich gleichzeitig jedoch Hinweise auf einen leichten Anstieg der Frequenz von CD3⁺CD20^{dim} Zellen v.a. an Tag 2-3 unter Stimulation im Vergleich zur Negativkontrolle mit PBS. Gegen Ende der Versuche fiel dieser leicht erhöhte Anteil CD3⁺CD20^{dim} Zellen wieder ab, was auf den im Verlauf stark zunehmenden Anteil an toten und apoptotischen CD3⁺CD20^{dim} Zellen aufgrund der erhöhten Apoptoseanfälligkeit dieser Zellen zurückzuführen sein kann. Um die Stimulation *in vitro* durch ein *in vivo* Paradigma zu ergänzen, wurde die Frequenz von CD3⁺CD20^{dim} Zellen in Patienten verschiedenen Arten einer Immunaktivierung, mit erhöhtem CRP, sowie in

Patienten unter *chimeric antigen receptor*-(CAR)-T-Zell-Therapie (als Zellpopulation welche bei Kontakt mit ihrem Zielantigen deutlich stimuliert wird (62)) untersucht. Der Anteil von CD3⁺CD20^{dim} Zellen in Patienten mit erhöhtem CRP waren jedoch nicht erhöht verglichen zu gesunden Probanden. Der breiteren Streuung der CD3⁺CD20^{dim} Zahlen mit teils hohen Werten in Patienten mit erhöhtem CRP könnte der höhere Altersdurchschnitt in dieser Population zugrunde liegen, und tatsächlich zeigte sich auch eine positive Korrelation der Frequenz von CD3⁺CD20^{dim} Zellen mit dem Patientenalter, vereinbar mit vorbeschriebenen Daten (32). Durchflusszytometrische Daten von Patienten mit B-Zell-Neoplasien unter Therapie mit CAR-T-Zellen in der Klinik für Hämatologie, Onkologie, klinische Immunologie und Rheumatologie Tübingen, wurden im Rahmen des Projektes einer weiteren Promotionsstudentin der Arbeitsgruppe, Frau Lena Beller, von ihr erhoben und von mir ausgewertet und interpretiert. Hier fand sich ebenfalls keine erhöhte Frequenz von CD3⁺CD20^{dim} Zellen an allen T-Zellen, in CAR-T-Zellen gestaltete sich der Nachweis von CD20^{dim} Zellen sogar besonders schwer. In den meisten Fällen konnte eine ausreichende Zellzahl an CAR-T-Zellen analysiert werden, welche die Detektion einer im Durchschnitt im unteren einstelligen Prozentbereich vorhandenen CD20^{dim} Population ermöglichen sollte. Trotzdem sind weiterführende Untersuchungen mit größerer Stichprobe, erhöhter untersuchter Zellzahl sowie weiteren Untersuchungszeitpunkten notwendig um genauere Aussagen zum Vorkommen von CD3⁺CD20^{dim} Zellen auf CAR-T-Zellen nach Transplantation treffen zu können. Möglicherweise handelte es sich hierin beiden Fällen um eine geringere Frequenz spezifischer T-Zellen, welche TCR-abhängig aktiviert wurde (im Gegensatz zur Aktivierung von ca. 2-20% der T-Zellen durch SEB (15)). Die beobachtete erhöhte Anfälligkeit von CD3⁺CD20^{dim} Zellen für Apoptose kann ebenfalls zu einer Unterschätzung der CD3⁺CD20^{dim} Zellzahl unter Stimulation führen, da diese nach Aktivierung vermehrt *activation induced cell death* zeigen (30). Um diese Differenz zwischen einer Tendenz zu höheren CD3⁺CD20^{dim} Frequenzen *in vitro* und dem Fehlen dessen *in vivo* weiter einzuordnen, und auch zwischen einer Zunahme der Zellzahl *in vitro* durch Induktion von CD20 auf CD20-negativen T-Zellen gegenüber einer vermehrten Proliferation von

Diskussion

CD3⁺CD20^{dim} Zellen unterscheiden zu können, planen wir weitere Versuche (u. a. *in vitro* Stimulation von mittels FACS in CD3⁺CD20^{dim} und CD20-negative T-Zellen-sortierte Populationen, sowie *single cell sorting* von einzelnen CD3⁺CD20^{dim} Zellen), die aufgrund des Umfanges nicht mehr innerhalb dieser Promotionsarbeit erfolgen konnten. Hier ist weiterhin auch ein Vergleich der Versuche mit Stimulation mit SEB mit weiteren T-Zell-Stimulantien mit unterschiedlichen Wirkmechanismen vorgesehen. Auf Kenntnis der aktuellen Daten scheint jedoch ein einzelner Antigenkontakt zumindest *in vivo* nicht der entscheidende Faktor für einen Anstieg der CD3⁺CD20^{dim} Zellzahl zu sein.

Andere Mechanismen der CD20-Regulation auf T-Zellen können derzeit nicht ausgeschlossen werden, als mögliche alternative Hypothese wurde eine Trogozytose von CD20 von B- auf T-Zellen diskutiert (31, 76). Zu den Argumenten dagegen und für eine genuine CD20-Expression in CD3⁺CD20^{dim} Zellen, wie die Expression von für das CD20-Protein kodierende mRNA in CD3⁺CD20^{dim} Zellen (26, 30), konnte in dieser Arbeit der Nachweis dieser Zellen in einem Patienten mit Bruton-Syndrom hinzugefügt werden. Durch Pathologien im Gen für die Bruton-Tyrosin-Kinase kommt es hierzu einer fehlerhaften Reifung von Vorläufer-B-Zellen zu adulten B-Zellen, mit deutlich geringeren Levels von B-Zellen in Patienten (77). Die hiernachgewiesenen CD3⁺CD20^{dim} Zellen stellten sich dabei in der Durchflusszytometrie morphologisch ähnlich wie in gesunden Probanden dar, hatten eine vergleichbare CD20-Expression und bildeten einen Anteil von ca. 2,64% aller T-Zellen bei fehlendem Nachweis von B-Zellen im Blut, von denen CD20 hätte transferiert werden können.

Für den zeitlichen Verlauf fand sich für eine mittelfristige Beobachtungszeit (ca. 5 Monate) in 5 Probanden ein relativ konstanter Anteil von CD3⁺CD20^{dim} Zellen, vereinbar mit bereits publizierten Daten (27). Es zeigte sich hier auch eine weitgehende Konstanz der *naive/memory*-Phänotypen in CD3⁺CD20^{dim} Zellen. Dem stehen die sehr langfristigen Unterschiede zwischen Geburt und Senium in Frequenz und Phänotyp (niedrige Frequenz und vorwiegend *naive* in CBMC gegenüber T_{EM}-Phänotyp in Erwachsenen und steigender Frequenz mit höherem Alter) gegenüber. Tatsächlich fanden sich in dieser Arbeit bereits in 10 Proben CBMC aus Nabelschnurblut gesunder Neugeborener CD3⁺CD20^{dim} Zellen, hier

lag die Frequenz mit $1,23\% \pm 0,48\%$ über der zuvor bekannten Frequenz von Storie et al. mit $0,3\% \pm 0,1\%$ (32) (jeweils Mittelwert \pm SD). In dieser Promotionsarbeit wurde mittels FMO-Kontrollen für CD20 auf eine sichere durchflusszytometrische Darstellung der CD3⁺CD20^{dim} Zellen geachtet, unter Beachtung des Alters der Publikation (1995) kann auch der in der Zwischenzeit deutliche Fortschritt in der Technik von Durchflusszytometern, sowie neue Generationen an konjugierten Antikörpern und Fluorochromen zu einem nun sensitiveren Nachweis von CD3⁺CD20^{dim} Zellen beitragen. Die CD3⁺CD20^{dim} Population in CBMC unterschied sich mit überwiegend naiven Zellen deutlich in der Verteilung der *naive/memory*-Subpopulationen von gesunden erwachsenen Probanden, bei welchen vorwiegend ein T_{EM}-Phänotyp zu finden ist (26). Zwar fand sich in CBMC sowohl in der CD4⁺ als auch in der CD8⁺ Population im Verhältnis zu CD20-negativen T-Zellen ebenfalls ein höherer Anteil an T_{EM}-Zellen in CD3⁺CD20^{dim} Zellen, dieser nahm am Gesamtanteil der CD3⁺CD20^{dim} Zellen in CBMC jedoch nur einen geringen Teil ein. Zudem zeigten CD3⁺CD20^{dim} Zellen in CBMC nicht nur einen höheren Anteil an naiven Zellen, auch waren sie in der naiven Population in CBMC zusätzlich angereichert verglichen zu gesunden erwachsenen Probanden. Mit diesem höheren Anteil ging ein niedrigerer Anteil der *memory*-Population in CBMC einher, sodass CD3⁺CD20^{dim} Zellen mit einem anfänglich höheren naiven Anteil im Laufe des Lebens eine Differenzierung zu vermehrten *memory*-Zellen durchführen. Hieraus ergeben sich interessante weitere Fragen zur Entität dieser durchflusszytometrisch *naive* erscheinenden CD3⁺CD20^{dim} Zellen, auch im Kontext putativ naiver T-Zellen mit Funktionen von *memory*-Stammzellen (78), sowie als besonders geschütztes Kompartiment mit minimalst denkbarem Antigenkontakt *in utero* (auch wenn sich hierfür mitunter neuere, der lange bestehenden Vorstellung einer Umgebung ohne Antigenkontakt widersprechende, Studien finden (79)). Weitere Hypothesen, wie die Möglichkeit einer Induktion von CD3⁺CD20^{dim} Zellen aus einer CD20^{neg} T-Zell-Population, Mechanismen zu Antigen-unabhängigen Entstehungsmöglichkeiten von CD3⁺CD20^{dim} Zellen, einer Ausweitung der TCR-Sequenzierung auf naive CD3⁺CD20^{dim} T-Zellen und weiteren möglichen

Diskussion

Regulationsmechanismen von CD20 sollen ebenfalls in Folgearbeiten untersucht werden.

5 Zusammenfassung

CD20 wird oft als klassischer B-Zell-Marker bei Menschen verwendet. Jedoch findet sich eine etwas schwächere (*dim*) Expression auch auf Subpopulationen anderer nicht-B-Zelltypen, wie T- und NK-Zellen; hiervon machen CD3⁺CD20^{dim} T-Zellen den größten Anteil an Lymphozyten aus.

Diese CD3⁺CD20^{dim} Zellen bilden eine heterogene, sich im Phänotyp von CD20-negativen T-Zellen unterscheidende Zellpopulation, welche nach Stimulation vermehrt proinflammatorische Zytokine freisetzt und vermehrt HLA-DR als oberflächlichen Aktivierungsmarker trägt (26, 30). Eine mögliche pathologische Rolle wird diesen Zellen in Autoimmunerkrankungen (bspw. Multiple Sklerose, Rheumatoide Arthritis) zugeschrieben (19, 30, 34). In diesen Erkrankungen fiel gleichzeitig auf, dass nach Beginn einer Therapie mit anti-CD20-Antikörpern wie Rituximab (RTX) und Ocrelizumab (OCR) CD3⁺CD20^{dim} Zellen ähnlich B-Zellen fehlten, sodass eine Depletion auch dieser Zellen vermutet wurde (19, 25). Unklar blieb, ob die deutlich geringere CD20-Expression auf CD3⁺CD20^{dim} Zellen für eine Depletion durch OCR/RTX ausreicht.

In dieser Arbeit konnte jedoch nachgewiesen werden, dass CD3⁺CD20^{dim} Zellen nach der 1. Gabe OCR tatsächlich depletiert werden, und OCR nicht nur zu einer Maskierung oder Internalisierung des CD20-Moleküles führt. Unter der Therapie mit OCR kam es weiterhin wie erwartet zu einer langanhaltenden Depletion der B-Zellen, jedoch zu einem relativ raschen Wiederauftreten der CD3⁺CD20^{dim} Zellen im Blut, wobei das als mittlere Fluoreszenzintensität gemessene CD20-Signal auf CD3⁺CD20^{dim} Zellen in den ersten Monaten nach Beginn der Therapie geringer war als vor Therapie.

Diese neu beobachtete Kinetik von CD3⁺CD20^{dim} Zellen warf die Frage der Entwicklung dieser Zellen auf. Die relativ schnelle Repopulation parallel zu der bekannten Pharmakokinetik der abfallenden OCR-Plasmakonzentrationen nach Gabe (22, 73) ist vereinbar damit, dass CD20 erst relativ spät (z.B. auf reifen T-Zellen) induziert wird, und nicht bereits auf unreifen Vorläuferzellen wie in der B-Zell-Linie (74). Für eine Abspaltung der CD3⁺CD20^{dim} Zellen von CD20-negativen

Zusammenfassung

T-Zellen nach Antigenkontakt spricht auch die hier beobachtete starke Überlappung deren T-Zell-Rezeptor-(TCR)-Repertoires in *memory* T-Zellen. Passend hierzu fanden sich zunächst bei *in vitro*-Stimulation von PBMC mit dem Superantigen Staphylokokken Enterotoxin B (SEB), welches spenderabhängig ca. 2-20% der T-Zellen aktiviert (15), eine geringe, aber zu dieser Größenordnung passende, und reproduzierbare Zunahme des Anteils von CD3⁺CD20^{dim} Zellen an T-Zellen. In zwei untersuchten Paradigmen zur *in vivo*-Stimulation (Erwachsene mit erhöhtem CRP, Patienten unter *chimeric antigen receptor*-T-Zell-Therapie) konnte hingegen keine allgemeine Zunahme der CD3⁺CD20^{dim} Zellen beobachtet werden, möglicherweise weil hier (im Gegensatz zu SEB) nur eine sehr geringe Anzahl spezifischer T-Zellen TCR-abhängig aktiviert wurde. Hinzu kommt, dass die beobachtete erhöhte Anfälligkeit von CD3⁺CD20^{dim} Zellen für Apoptose, welche durch Stimulation weiterhin verstärkt wird, zu einer Unterschätzung der CD3⁺CD20^{dim} Zellzahl unter Stimulation führen kann. Auch um endgültig zwischen einer Zunahme der Zellzahl *in vitro* durch Induktion von CD20 auf CD20-negativen T-Zellen gegenüber einer reinen vermehrten Proliferation von CD3⁺CD20^{dim} Zellen unterscheiden zu können, planen wir weitere Versuche, die aufgrund des Umfangs nicht mehr innerhalb dieser Promotionsarbeit erfolgen konnten.

Andere Mechanismen der CD20-Regulation auf T-Zellen können derzeit nicht ausgeschlossen werden, jedoch konnte zu den Argumenten für eine genuine CD20-Expression auf CD3⁺CD20^{dim} Zellen (gegenüber einer diskutierten Übertragung von B-Zellen (31)) der Nachweis dieser Zellen in normaler Frequenz und CD20-Expression in einem Patienten mit Bruton-Syndrom (fehlerhafte B-Zell-Reifung mit nahezu vollständig fehlenden B-Zellen) hinzugefügt werden.

Weiterhin fanden sich bereits im Nabelschnurblut gesunder Neugeborener CD3⁺CD20^{dim} Zellen, wenn auch in geringerer Frequenz und im Gegensatz zu Erwachsenen vermehrt innerhalb der CD45RA⁺CCR7⁺ (putativ naiven, Antigen-unerfahrenen) T-Zellen. Hieraus ergeben sich interessante Fragen zu Entität dieser CD20^{dim} Zellen (78), nach einer möglichen auch Antigen-unabhängigen Entwicklung, und nach weiteren möglichen Regulationsmechanismen von CD20, die ebenfalls in Folgearbeiten untersucht werden sollen.

6 Literaturverzeichnis

- 1.Koch-Henriksen N, Sorensen PS. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *Lancet Neurol*. 2010;9(5):520–32.
- 2.Boström I, Callander M, Kurtzke JF, Landtblom A-M. High prevalence of multiple sclerosis in the Swedish county of Värmland. *Multiple Sclerosis Journal*. 2009;15(11):1253–62.
- 3.Leray E, Moreau T, Fromont A, Edan G. Epidemiology of multiple sclerosis. *Rev Neurol (Paris)*. 2016;172(1):3–13.
- 4.Sawcer S, Franklin RJ, Ban M. Multiple sclerosis genetics. *The Lancet Neurology*. 2014;13(7):700–9.
- 5.Alonso A, Hernán MA. Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis: a systematic review. *Neurology*. 2008;71(2):129–35.
- 6.Orton S-M, Herrera BM, Yee IM, Valdar W, Ramagopalan SV, Sadovnick AD, et al. Sex ratio of multiple sclerosis in Canada: a longitudinal study. *The Lancet Neurology*. 2006;5(11):932–6.
- 7.Debouverie M, Pittion-Vouyovitch S, Louis S, Roederer T, Guillemin F. Increasing incidence of multiple sclerosis among women in Lorraine, Eastern France. *Multiple sclerosis journal*. 2007;13(8):962–7.
- 8.Brønnum-Hansen H, Koch-Henriksen N, Hyllested K. Survival of patients with multiple sclerosis in Denmark: A nationwide, long-term epidemiologic survey. *Neurology*. 1994;44(10):1901–.
- 9.Olerup O, Hillert J. HLA class II-associated genetic susceptibility in multiple sclerosis: a critical evaluation. *Tissue antigens*. 1991;38(2):1–15.
- 10.Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Annals of neurology*. 2007;61(4):288–99.
- 11.Bjornevik K, Cortese M, Healy BC, Kuhle J, Mina MJ, Leng Y, et al. Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science*. 2022.
- 12.Belbasis L, Bellou V, Evangelou E, Ioannidis JP, Tzoulaki I. Environmental risk factors and multiple sclerosis: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *The Lancet Neurology*. 2015;14(3):263–73.
- 13.Kuhlmann T, Ludwin S, Prat A, Antel J, Bruck W, Lassmann H. An updated histological classification system for multiple sclerosis lesions. *Acta Neuropathol*. 2017;133(1):13–24.
- 14.Minagar A, Alexander JS. Blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*. 2003;9(6):540–9.
- 15.Murphy K, Weaver C. *Janeway's immunobiology*: Garland science; 2016. 612–3 p.
- 16.Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nature Reviews Immunology*. 2015;15(9):545–58.
- 17.Dobson R, Ramagopalan S, Davis A, Giovannoni G. Cerebrospinal fluid oligoclonal bands in multiple sclerosis and clinically isolated syndromes: a meta-analysis of prevalence, prognosis and effect of latitude. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013;84(8):909–14.
- 18.Hauser SL, Bar-Or A, Comi G, Giovannoni G, Hartung HP, Hemmer B, et al. Ocrelizumab versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis. *N Engl J Med*. 2017;376(3):221–34.
- 19.Palanichamy A, Jahn S, Nickles D, Derstine M, Abounasr A, Hauser SL, et al. Rituximab efficiently depletes increased CD20-expressing T cells in multiple sclerosis patients. *The Journal of Immunology*. 2014;193(2):580–6.
- 20.Krumbholz M, Derfuss T, Hohfeld R, Meinl E. B cells and antibodies in multiple sclerosis pathogenesis and therapy. *Nature Reviews Neurology*. 2012;8(11):613.
- 21.Kappos L, Wolinsky JS, Giovannoni G, Arnold DL, Wang Q, Bernasconi C, et al. Contribution of relapse-independent progression vs relapse-associated worsening to overall confirmed disability accumulation in typical relapsing multiple sclerosis in a pooled analysis of 2 randomized clinical trials. *JAMA neurology*. 2020;77(9):1132–40.
- 22.European Medicines Agency. Ocrevus – Assessment Report www.ema.europa.eu/1.01.2018 [cited 2020 13.06]. Available from https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/ocrevus-epar-public-assessment-report_en.pdf.
- 23.Montalban X, Hauser SL, Kappos L, Arnold DL, Bar-Or A, Comi G, et al. Ocrelizumab versus Placebo in Primary Progressive Multiple Sclerosis. *N Engl J Med*. 2017;376(3):209–20.
- 24.Stahnke AM, Holt KM. Ocrelizumab: A New B-cell Therapy for Relapsing Remitting and Primary Progressive Multiple Sclerosis. *Annals of Pharmacotherapy*. 2018;52(5):473–83.
- 25.Gingele S, Jacobus TL, Konen FF, Hümmert MW, Sühs K-W, Schwenkenbecher P, et al. Ocrelizumab depletes CD20+ T cells in multiple sclerosis patients. *Cells*. 2019;8(1):12.
- 26.Schuh E, Berer K, Mulazzani M, Feil K, Meinl I, Lahm H, et al. Features of human CD3+ CD20+ T cells. *The Journal of Immunology*. 2016;197(4):1111–7.
- 27.Hultin LE, Hausner MA, Hultin PM, Giorgi JV. CD20 (pan-B cell) antigen is expressed at a low level on a subpopulation of human T lymphocytes. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*. 1993;14(2):196–204.
- 28.Nagel A, Möbs C, Raifer H, Wiendl H, Hertl M, Eming R. CD3-positive B cells: a storage-dependent phenomenon. *PLoS one*. 2014;9(10):e110138.
- 29.Wilk E, Witte T, Marquardt N, Hennig C, Hansen G, Schmidt R, et al. CD3+ CD20+ cells may be an artifact of flow cytometry. Comment on the article by Wilk et al. *Arthritis & Rheumatism*. 2010;62(8):2563–5.
- 30.Wilk E, Witte T, Marquardt N, Horvath T, Kalippke K, Scholz K, et al. Depletion of functionally active CD20+ T cells by rituximab treatment. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*. 2009;60(12):3563–71.
- 31.de Bruyn M, Wiersma VR, Wouters MC, Samplonius DF, Klip HG, Helfrich W, et al. CD20(+) T cells have a predominantly Tc1 effector memory phenotype and are expanded in the ascites of patients with ovarian cancer. *Oncoimmunology*. 2015;4(4):e999536.

Literaturverzeichnis

32. STORIE I, WILSON GA, GRANGER V, BARNETT D, REILLY JT. Circulating CD20^{dim} T-lymphocytes increase with age: evidence for a memory cytotoxic phenotype. *Clinical & Laboratory Haematology*. 1995;17(4):323–8.
33. von Essen MR, Ammitzbøll C, Hansen RH, Petersen ERS, McWilliam O, Marquart HV, et al. Proinflammatory CD20⁺ T cells in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Brain*. 2019;142(1):120–32.
34. Holley JE, Bremer E, Kendall AC, de Bruyn M, Helfrich W, Tarr JM, et al. CD20⁺ inflammatory T-cells are present in blood and brain of multiple sclerosis patients and can be selectively targeted for apoptotic elimination. *Multiple sclerosis and related disorders*. 2014;3(5):650–8.
35. Sabatino JJ, Jr., Wilson MR, Calabresi PA, Hauser SL, Schneck JP, Zamvil SS. Anti-CD20 therapy depletes activated myelin-specific CD8⁺ T cells in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(51):25800–7.
36. Eggleton P, Bremer E, Tarr JM, de Bruyn M, Helfrich W, Kendall A, et al. Frequency of Th17 CD20⁺ cells in the peripheral blood of rheumatoid arthritis patients is higher compared to healthy subjects. *Arthritis research & therapy*. 2011;13(6):1–15.
37. Niu J, Zhai Z, Hao F, Zhang Y, Song Z, Zhong H. Dissection of a circulating CD3⁺ CD20⁺ T cell subpopulation in patients with psoriasis. *Clinical & Experimental Immunology*. 2018;192(2):206–12.
38. Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:683–747.
39. Feldmann M, Maini R. The role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)*. 1999;38:3–7.
40. Green DR, Droin N, Pinkoski M. Activation-induced cell death in T cells. *Immunological reviews*. 2003;193(1):70–81.
41. Eisenberg R, Looney RJ. The therapeutic potential of anti-CD20: what do B-cells do? *Clinical immunology*. 2005;117(3):207–13.
42. Cragg MS, Walshe CA, Ivanov AO, Glennie MJ. The biology of CD20 and its potential as a target for mAb therapy. *B cell trophic factors and B cell antagonism in autoimmune disease*. 8: Karger Publishers; 2005. p. 140–74.
43. Bubien JK, Zhou L-J, Bell PD, Frizzell RA, Tedder TF. Transfection of the CD20 cell surface molecule into ectopic cell types generates a Ca²⁺ conductance found constitutively in B lymphocytes. *Journal of Cell Biology*. 1993;121(5):1121–32.
44. Valentine M, Meier K, Rossie S, Clark E. Phosphorylation of the CD20 phosphoprotein in resting B lymphocytes. Regulation by protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry*. 1989;264(19):11282–7.
45. Tedder T, Klejman G, Disteché C, Adler D, Schlossman S, Saito H. Cloning of a complementary DNA encoding a new mouse B lymphocyte differentiation antigen, homologous to the human B1 (CD20) antigen, and localization of the gene to chromosome 19. *The Journal of Immunology*. 1988;141(12):4388–94.
46. O'Keefe TL, Williams GT, Davies SL, Neuberger MS. Mice carrying a CD20 gene disruption. *Immunogenetics*. 1998;48(2):125–32.
47. Glennie MJ, French RR, Cragg MS, Taylor RP. Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies. *Molecular immunology*. 2007;44(16):3823–37.
48. Klein C, Lammens A, Schäfer W, Georges G, Schwaiger M, Mössner E, et al., editors. *Epitope interactions of monoclonal antibodies targeting CD20 and their relationship to functional properties*. MABs; 2013: Taylor & Francis.
49. Beers SA, French RR, Chan HT, Lim SH, Jarrett TC, Vidal RM, et al. Antigenic modulation limits the efficacy of anti-CD20 antibodies: implications for antibody selection. *Blood*. 2010;115(25):5191–201.
50. Boross P, Leusen JH. Mechanisms of action of CD20 antibodies. *American journal of cancer research*. 2012;2(6):676.
51. Beers SA, Chan CH, James S, French RR, Attfield KE, Brennan CM, et al. Type II (tositumomab) anti-CD20 monoclonal antibody outperforms type I (rituximab-like) reagents in B-cell depletion regardless of complement activation. *Blood*. 2008;112(10):4170–7.
52. Teeling JL, Mackus WJ, Wiegman LJ, van den Brakel JH, Beers SA, French RR, et al. The biological activity of human CD20 monoclonal antibodies is linked to unique epitopes on CD20. *The Journal of Immunology*. 2006;177(1):362–71.
53. Mason D, Comans-Bitter W, Cordell J, Verhoeven M, Van Dongen J. Antibody L26 recognizes an intracellular epitope on the B-cell-associated CD20 antigen. *The American journal of pathology*. 1990;136(6):1215.
54. van Meerten T, van Rijn RS, Hol S, Hagenbeek A, Ebeling SB. Complement-induced cell death by rituximab depends on CD20 expression level and acts complementary to antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Clinical cancer research*. 2006;12(13):4027–35.
55. Kakinoki Y, Hashiguchi J, Ishio T, Chiba K, Niino D, Ohshima K. CD20-positive primary gastric T-cell lymphoma poorly responding to initial treatment with rituximab plus CHOP, and a literature review. *International journal of hematology*. 2015;102(6):702–8.
56. Serra-Peinado C, Grau-Expósito J, Luque-Ballesteros L, Astorga-Gamaza A, Navarro J, Gallego-Rodríguez J, et al. Expression of CD20 after viral reactivation renders HIV-reservoir cells susceptible to rituximab. *Nature communications*. 2019;10(1):1–15.
57. Marrack P, Kappler J. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science*. 1990;248(4956):705–11.
58. Peavy DL, Adler WH, Smith RT. The mitogenic effects of endotoxin and staphylococcal enterotoxin B on mouse spleen cells and human peripheral lymphocytes. *The Journal of Immunology*. 1970;105(6):1453–8.
59. Kruisbeek AM, Shevach E, Thornton AM. *Proliferative Assays for T Cell Function*. *Current Protocols in Immunology*. 2004;60(1):3.12.1–3.20.
60. Förster F, Singla A, Arora SK, Schmidt RE, Jacobs R. CD20⁺ T cell numbers are decreased in untreated HIV-1 patients and recover after HAART. *Immunology Letters*. 2012;146(1–2):74–8.
61. Murayama Y, Mukai R, Sata T, Matsunaga S, Noguchi A, Yoshikawa Y. Transient expression of CD20 antigen (pan B cell marker) in activated lymph node T cells. *Microbiology and immunology*. 1996;40(6):467–71.
62. Chen P-H, Lipschitz M, Weirather JL, Jacobson C, Armand P, Wright K, et al. Activation of CAR and non-CAR T cells within the tumor microenvironment following CAR T cell therapy. *JCI insight*. 2020;5(12).

Literaturverzeichnis

63. Maher J, Brentjens RJ, Gunset G, Rivière I, Sadelain M. Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCR ζ /CD28 receptor. *Nature biotechnology*. 2002;20(1):70–5.
64. Robins HS, Campregher PV, Srivastava SK, Wacher A, Turtle CJ, Kohn O, et al. Comprehensive assessment of T-cell receptor β -chain diversity in $\alpha\beta$ T cells. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2009;114(19):4099–107.
65. Li HM, Hiroi T, Zhang Y, Shi A, Chen G, De S, et al. TCR β repertoire of CD4+ and CD8+ T cells is distinct in richness, distribution, and CDR3 amino acid composition. *Journal of leukocyte biology*. 2016;99(3):505–13.
66. Corneth OB, Verstappen GM, Paulissen SM, de Bruijn MJ, Rip J, Lukkes M, et al. Enhanced Bruton's tyrosine kinase activity in peripheral blood B lymphocytes from patients with autoimmune disease. *Arthritis & Rheumatology*. 2017;69(6):1313–24.
67. Lan K, Verma SC, Murakami M, Bajaj B, Robertson ES. Isolation of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs). *Current Protocols in Microbiology*. 2007;6(1):A.4C.1–A.4C.9.
68. Yin Y, Mitson-Salazar A, Prussin C. Detection of Intracellular Cytokines by Flow Cytometry. *Current Protocols in Immunology*. 2015;110(1):6.24.1–6.24.18.
69. Maciorowski Z, Chattopadhyay PK, Jain P. Basic Multicolor Flow Cytometry. *Current Protocols in Immunology*. 2017;117(1):5.4.1–5.4.38.
70. Aparicio-Soto M, Riedel F, Leddermann M, Bacher P, Scheffold A, Kuhl H, et al. TCRs with segment TRAV9-2 or a CDR3 histidine are overrepresented among nickel-specific CD4+ T cells. *Allergy*. 2020;75(10):2574–86.
71. Britanova OV, Putintseva EV, Shugay M, Merzlyak EM, Turchaninova MA, Staroverov DB, et al. Age-related decrease in TCR repertoire diversity measured with deep and normalized sequence profiling. *The Journal of Immunology*. 2014;192(6):2689–98.
72. Shannon CE. A mathematical theory of communication. *The Bell system technical journal*. 1948;27(3):379–423.
73. Fischer SK, Yang J, Anand B, Cowan K, Hendricks R, Li J, et al., editors. The assay design used for measurement of therapeutic antibody concentrations can affect pharmacokinetic parameters: case studies. *MAbs*; 2012: Taylor & Francis.
74. Krumbholz M, Derfuss T, Hohlfeld R, Meinl E. B cells and antibodies in multiple sclerosis pathogenesis and therapy. *Nature Reviews Neurology*. 2012;8(11):613–23.
75. Becattini S, Latorre D, Mele F, Foglierini M, De Gregorio C, Cassotta A, et al. Functional heterogeneity of human memory CD4⁺ T cell clones primed by pathogens or vaccines. *Science*. 2015;347(6220):400–6.
76. Chen Q, Yuan S, Sun H, Peng L. CD3(+)CD20(+) T cells and their roles in human diseases. *Hum Immunol*. 2019;80(3):191–4.
77. Conley ME, Rohrer J, Minegishi Y. X-linked agammaglobulinemia. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2000;19(2):183–204.
78. Gattinoni L, Speiser DE, Lichterfeld M, Bonini C. T memory stem cells in health and disease. *Nature medicine*. 2017;23(1):18–27.
79. Rastogi D, Wang C, Mao X, Lendor C, Rothman PB, Miller RL. Antigen-specific immune responses to influenza vaccine in utero. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(6):1637–46.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Universitätsklinik für Neurologie und dem Hertie-Institut für klinische Hirnforschung unter Betreuung von PD Dr. med. Markus Krumbholz durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit PD Dr. med. Markus Krumbholz. Sämtliche Versuche, mit Ausnahme der Versuche zum Vorkommen von CD20 auf CAR-T-Zellen (Kapitel 2.3.6, 3.5), sowie der TCR-Sequenzierung (Kapitel 2.6, 3.6), wurden nach Einarbeitung durch Labormitglieder (PD Dr. med. Markus Krumbholz, Constanze Kemmerer, Evelyn Dubois, Matthias Scholl) von mir eigenständig durchgeführt.

Für die Versuche zum Vorkommen von CD20 auf CAR-T-Zellen wurde die Probenbearbeitung (Gewinnung von PBMC, Färbung mit konjugierten Antikörpern) sowie die durchflusszytometrische Verarbeitung von einer weiteren Promotionsstudentin der Arbeitsgruppe, Lena Beller, durchgeführt. Die Interpretation und Auswertung der Versuche erfolgten eigenständig.

Für die Versuche zur TCR-Sequenzierung wurde die Vorbereitung, die Probenbearbeitung (Gewinnung von PBMC, Färbung mit konjugierten Antikörpern) sowie das Sortieren der Zellen mittels FACS von mir mit Unterstützung der *flow cytometry core facility* Tübingen durchgeführt. Die TCR-Sequenzierung erfolgte durch Mitarbeiter des Bundesinstitutes für Risikobewertung, Berlin. Die Auswertung, Interpretation und Darstellung der hier gewonnenen Daten erfolgten in Kooperation mit Frau Dr. Caterina Curato und Dr. Katherina Siewert, Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin.

Die Interpretation und Auswertung aller weiteren Versuche erfolgten eigenständig. Die statistische Auswertung erfolgte nach Beratung durch Frau Dr. Feng des Instituts für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie der Universität Tübingen durch mich.

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

Erklärung zum Eigenanteil

Tübingen, den 22.12.2022

Michael Schlotterbek

Danksagung

8 Danksagung

Ich bedanke mich für die Bereitstellung des Promotionsprojektes durch PD Dr. med. Markus Krumbholz, sowie durch die Betreuung und Unterstützung während der Arbeit. Weiterhin möchte ich mich für die Einarbeitung und technische Unterstützung insbesondere durch Evelyn Dubois, Constanze Kemmerer, Matthias Scholl bedanken.

Bei dieser Arbeit wurde die methodische Beratung des Instituts für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie der Universität Tübingen in Anspruch genommen. Für die Unterstützung möchte ich mich bei Frau Dr. Feng herzlich bedanken. Ebenfalls möchte ich mich bei den Mitarbeitern der *flow cytometry core facility* Tübingen für die Bedienung des FACS beim Sortieren von PBMC bedanken (Kapitel 2.3.5).