

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin II
Onkologie, Hämatologie, Klinische Immunologie, Rheumatologie
und Pulmologie

**Neutralisation des TNF-Familienmitglieds BAFF durch
Belimumab zur Verstärkung der Suszeptibilität von
CLL-Zellen gegenüber Therapie mit ABT-199**

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

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

vorgelegt von

Schmidt, Jonas

2019

Dekan:	Professor Dr. I. B. Authenrieth
1. Berichterstatter:	Professor Dr. H. R. Salih
2. Berichterstatter:	Professor Dr. K. Schulze-Osthoff
Tag der Disputation:	13.07.2017

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
1 Zusammenfassung	4
2 Einleitung.....	5
2.1 Chronisch Lymphatische Leukämie (CLL)	5
2.2 Die Tumor Nekrose Faktor (TNF)-Familie	12
2.3 Das TNF-Familienmitglied B cell activating factor (BAFF)	14
3 Material und Methoden	18
3.1 Material.....	18
3.2 Methoden.....	21
4 Ergebnisse.....	25
4.1 Einfluss von ABT-199 auf die Stoffwechsel- und Caspaseaktivität von CLL-Zellen	25
4.2 Einfluss von BAFF auf die Suszeptibilität von CLL-Zellen gegenüber der Behandlung mit ABT-199	27
4.3 Einfluss einer BAFF-Neutralisation mit Belimumab auf die Suszeptibilität von CLL-Zellen gegenüber der Behandlung mit ABT-199	31
5 Diskussion	36
6 Literaturverzeichnis.....	40
7 Anhang	48
7.1 Abkürzungsverzeichnis.....	48
7.2 Tabellenverzeichnis	50
7.3 Abbildungsverzeichnis	51
7.4 Erklärung zum Eigenanteil.....	52
7.5 Lebenslauf	53

1 Zusammenfassung

Die Chronisch Lymphatische Leukämie (CLL) ist bis heute durch medikamentöse Maßnahmen nicht kurativ behandelbar. Zu einem Wandel in der CLL-Therapie führte im Jahr 2014 die Einführung zielgerichteter Therapeutika (*small-molecule inhibitors*). Im Zentrum dieser Arbeit stand ihr neuester Vertreter ABT-199, ein selektiver Inhibitor des antiapoptotischen Proteins BCL-2. In der CLL wird BCL-2 typischerweise überexprimiert, was zum verlängerten Überleben der Tumorzellen beiträgt. Trotz der hohen Wirksamkeit von ABT-199 ist es wahrscheinlich, dass einige der behandelten Patienten im Laufe der Zeit ein schlechteres Therapieansprechen zeigen und Resistenzen entwickeln. Die zugrundeliegenden Mechanismen wurden bisher jedoch noch nicht erforscht. In dieser Arbeit konnte das TNF-Familienmitglied *B cell activating factor* (BAFF) als Faktor, welcher zu einem verminderten Ansprechen von CLL-Zellen gegenüber ABT-199 führt, identifiziert werden. BAFF wird hauptsächlich von Zellen myeloischen Ursprungs exprimiert und spielt eine wichtige Rolle für die Reifung und das Überleben peripherer B Zellen. Eine dysregulierte BAFF-Expression trägt zur Pathophysiologie von Autoimmunerkrankungen und B Zell-Malignomen bei. Im Rahmen der durchgeführten Experimente wurde festgestellt, dass BAFF der ABT-199-induzierten Reduktion metabolischer Aktivität entgegenwirkt und CLL-Zellen vor dem ABT-199-induzierten Zelltod schützt. Der Einsatz des zur Therapie des Systemischen Lupus Erythematoses (SLE) zugelassenen BAFF-Antikörpers Belimumab verhinderte diese protektiven Effekte und stellte die Suszeptibilität der CLL-Zellen gegenüber der Behandlung mit ABT-199 wieder her. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse erstens, dass BAFF in der Lage ist, Resistenz von CLL-Zellen gegenüber ABT-199 zu vermitteln. Zweitens liefern sie Hinweise darauf, dass der kombinierte Einsatz von Belimumab und ABT-199 einen Vorteil gegenüber der alleinigen Therapie mit ABT-199 darstellen könnte. Schlussfolgernd können die Ergebnisse dieser Arbeit als experimentelle Grundlage für die weitere Überprüfung der Wirksamkeit dieser Kombinationstherapie in zukünftigen klinischen Studien gesehen werden.

2 Einleitung

2.1 Chronisch Lymphatische Leukämie (CLL)

Die Chronisch Lymphatische Leukämie (CLL) ist eine Erkrankung des lymphatischen Systems und zählt gemäß der Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO) zur Gruppe der niedrig malignen Non-Hodgkin-Lymphome (NHL). Der Begriff CLL beschreibt laut WHO stets eine Neoplasie von B Zellen, während die ehemalige T-CLL heute als T-Prolymphocyten Leukämie (T-PLL) klassifiziert wird.¹ In den westlichen Ländern ist die CLL die häufigste leukämische Erkrankung des Erwachsenenalters. Sie macht ca. 30 % aller Leukämien und etwa 10 % aller NHL aus. In Deutschland erkranken jedes Jahr etwa fünf von 100.000 Personen an CLL. Männer sind häufiger als Frauen unter den Betroffenen (Verhältnis 2:1).² Das durchschnittliche Alter der Patienten beträgt bei Diagnosestellung 71 Jahre und nur etwa 25 % der Erstdiagnosen betreffen Patienten, die jünger als 65 Jahre sind.³ Somit ist die CLL eine Erkrankung des fortgeschrittenen Lebensalters. Hohes Alter birgt zugleich das größte Risiko für die Entstehung der Erkrankung. Typischerweise schreitet die CLL langsamer als andere Formen der Leukämie voran. Dennoch ist sie eine sehr heterogene Erkrankung, deren klinischer Verlauf Überlebenszeiten zwischen wenigen Monaten und Jahrzehnten umfasst.⁴

Die Pathogenese der CLL ist durch die klonale Expansion morphologisch reifer, funktionell jedoch inkompetenter B-Lymphozyten im Knochenmark und in sekundären lymphatischen Organen gekennzeichnet.⁵ Dabei kommt es zur Akkumulation der malignen Zellen in diesen Kompartimenten und der charakteristischen Lymphozytose im peripheren Blut, wobei letztere Manifestation die CLL als Leukämie definiert. Steht lediglich der Lymphknotenbefall im Vordergrund, spricht man von einem *small lymphocytic lymphoma* (SLL). Nahezu jeder CLL geht über längere Zeit eine klinisch asymptomatische Vermehrung monoklonaler B-Lymphozyten voraus. Dieser Befund wird als monoklonale B-Lymphozytose

(MBL) bezeichnet und besitzt alleine keinen Krankheitswert.⁶ Eine MBL kann bei ca. 5 % der über 60 Jährigen nachgewiesen werden. Ihr Progressionsrisiko zu einer therapiebedürftigen CLL liegt bei ca. 1 % pro Jahr.⁷

In ihrer Herkunft leiten sich CLL-Zellen von reifen B-Lymphozyten, die bereits Antigenkontakt hatten, ab. Dies konnte mithilfe von Genexpressionsanalysen gezeigt werden.⁸ Ein klinisch relevanter Unterschied besteht jedoch hinsichtlich der Keimzentrumsphase, in der dieser Antigenkontakt stattgefunden hat. Zwei Drittel der Patienten besitzen maligne Zellen mit einer Hypermutation der schweren Immunglobulinkette (IgVH) des B Zell Rezeptors (BCR). Diese CLL-Zellen sind auf B Zellen, die bereits das Keimzentrum des Lymphknotens (LK) durchwandert haben („mutierter Subtyp“), zurückzuführen. In einem Drittel der Fälle hingegen entstammen die malignen Zellen von Bereichen außerhalb des Keimzentrums und zeigen daher einen unmutierten IgVH-Status („unmutierter Subtyp“).⁹ Wie gezeigt werden konnte, besitzt der IgVH-Mutationsstatus einen deutlichen Einfluss auf die Überlebenszeit der Patienten.¹⁰ Der unmutierte Subtyp neigt eher zu einem aggressiven Krankheitsverlauf und korreliert außerdem mit dem Vorhandensein weiterer negativer prognostischer Faktoren, während der mutierte Subtyp in der Regel eher indolent verläuft.¹¹

Ein Charakteristikum vieler Tumorerkrankungen ist die Inhibition der Apoptose. Insbesondere im Fall der CLL gelingt dies den malignen Zellen über die Hochregulation des antiapoptotischen Proteins *B cell lymphoma 2* (BCL-2).¹² Es ist allerdings nicht geklärt, welche Mechanismen ursächlich hierfür sind. Im Gegensatz zum folliculären Lymphom kommt eine Translokation t(14;18), die das BCL-2-Protoonkogen mit dem Gen der schweren Immunglobulinkette auf einen gemeinsamen ablesbaren Bereich bringt, in äußerst seltenen Fällen vor.¹³ Ein Erklärungsversuch verschiedener Autoren ist der Verlust bestimmter mikroRNAs (miR-15a, miR-16-1), die normalerweise die BCL-2 Expression negativ regulieren.^{14, 15} Sicher ist, dass die BCL-2-Überexpression die verlängerte Lebenszeit und damit die Akkumulation der malignen Zellen begünstigt.

Weiterhin führt sie zum Defekt des stressinduzierten, intrinsischen Apoptose-Signalwegs, was zur Resistenz gegenüber Chemotherapie beiträgt.¹⁶

Aufgrund der eben dargelegten Eigenschaft von CLL-Zellen wird die CLL im klassischen Sinne als eine Erkrankung langlebiger und gering proliferierender Lymphozyten verstanden.¹⁷ Neuere Forschungsergebnisse legen allerdings nahe, dass dieses Bild nur einen Teil der Pathophysiologie widerspiegelt. Weitere wichtige pathophysiologische Elemente könnten diesen Erkenntnissen zufolge überlebens- und proliferationsfördernde Signale, ausgehend von Zellen des Mikromilieus, darstellen. So wurde beispielsweise von Messmer et al. gezeigt, dass ein nennenswerter Teil der sich im LK befindenden CLL-Zellen proliferative Aktivität besitzt.¹⁸ Schlussfolgernd sei die CLL keine rein statische Erkrankung akkumulierender, sondern vielmehr ein dynamisches Zusammenspiel sich teilender und sterbender Zellen. Bestätigt wurden diese Ergebnisse mithilfe vergleichender Genexpressionsanalysen zwischen CLL-Zellen des LK und jenen des peripheren Bluts. Dabei wurde gezeigt, dass erstere eine stärkere Aktivität des B Zell Rezeptors (BCR), des NF- κ B-Signalwegs und der Proliferation besitzen.¹⁹ Treibende Kraft für all diese Vorgänge sind die Interaktionen zwischen den Tumor- und den sie umgebenden Stromazellen des LK.²⁰ Insbesondere T Zellen und aus Monozyten abgeleitete *nurse-like cells* (NLCs) schützen die CLL-Zellen und fördern über die Stimulation des BCR und vermehrte Ausschüttung bestimmter Zytokine die Aktivität der Erkrankung.²¹ Die Unterbrechung dieser komplexen Interaktionen stellt aktuell ein vielversprechendes Ziel in der Forschung und Therapie der CLL und anderer B Zell-Malignome dar.

Aufgrund des in der Regel langsamen Krankheitsverlaufes wird die CLL häufig entweder zufällig im Rahmen von Blutbilduntersuchungen oder erst nach Jahren mit dem Auftreten von Beschwerden entdeckt. Das klinische Bild kann dabei zum einen durch eine typische B-Symptomatik in Form von Müdigkeit, Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsverlust geprägt sein. Zum anderen führt die Verdrängung immunkompetenter durch immundefiziente B Zellen zur Einschränkung der Immunabwehr und zu erhöhter Infektanfälligkeit. Mit fortschreitender Erkrankung

und zunehmender Akkumulation der Tumorzellen kommt es zu Lymphadenopathie, Spleno- und Hepatomegalie. Als Zeichen der Knochenmarksinfiltration treten weiterhin Anämie, Thrombozytopenie und Granulozytopenie in Erscheinung. Komplikationen bestehen nicht selten aus schweren bakteriellen Infektionen, die die Haupttodesursache für CLL-Patienten sind. Bei 5 bis 10 % der Patienten tritt im Verlauf der Erkrankung ein Übergang in ein aggressives NHL auf (Richter-Transformation).²²

Bei Verdacht auf CLL wird zunächst ein Differentialblutbild erstellt und ein zytologischer Blutaussstrich angefertigt. Hierbei kommt es beim Ausstreichen aufgrund der Fragilität der gestörten Lymphozyten oft zu ihrer Zerstörung. Ihr mikroskopisches Erscheinungsbild wird als „Gumprechtsche Kernschatten“ bezeichnet und gilt als charakteristisches Merkmal einer CLL. Zur weiteren Diagnostik wird mit Hilfe der Durchflusszytometrie eine Immunphänotypisierung durchgeführt. Charakteristischer Befund ist hier die Koexpression des T Zell-Antigens CD5 mit den B Zell-Antigenen CD19 und CD23. Typisch ist weiterhin die schwache Expression von CD79b, CD20 und Oberflächenimmunglobulin. Einen wichtigen Hinweis auf die Monoklonalität der Zellen erbringt der Nachweis der Leichtkettenrestriktion (kappa- oder lambda Typ). Die Diagnose CLL gilt als gesichert, wenn im Differentialblutbild eine Lymphozytose von über 5000 Zellen/ μ l besteht, bei gleichzeitigem Vorhandensein morphologischer Reifezeichen im Blutaussstrich und immunphänotypischer Oberflächenmarker.²³

Nach Diagnosestellung erfolgt die Stadieneinteilung mithilfe der Klassifikationen von Binet (**Tabelle 1**) oder Rai (**Tabelle 2**). Beide Systeme erfordern eine sorgfältige körperliche Untersuchung und eine Blutbildanalyse. In Europa ist die Anwendung der Binet-Klassifikation gebräuchlicher. Sie berücksichtigt die Lymphozyten- und Thrombozytenzahl, den Hämoglobinwert und die Anzahl betroffener Lymphknotenregionen.

Stadium	Definition	Medianes Überleben
A	Hämoglobin ≥ 10 g/dl Thrombozyten $\geq 100.000/\mu\text{l}$ < 3 betroffene lymphatische Regionen	> 10 Jahre
B	Hämoglobin ≥ 10 g/dl Thrombozyten $\geq 100.000/\mu\text{l}$ ≥ 3 betroffene lymphatische Regionen	5 Jahre
C	Hämoglobin < 10g/dl oder Thrombozyten < 100.000/ μl	< 3,5 Jahre

Tabelle 1: Stadieneinteilung der CLL nach Binet, 1981.²⁴

Stadium	Definition	Medianes Überleben
0	Lymphozytose (> 15.000 / μl) und Knochenmarkinfiltration (> 40%)	> 10 Jahre
I	Lymphozytose und Lymphknotenvergrößerung	7 Jahre
II	Lymphozytose und Hepatomegalie und/oder Splenomegalie (mit/ohne Lymphknotenvergrößerung)	
III	Lymphozytose und Anämie (Hb < 11 g/dl) (mit/ohne Lymphknotenvergrößerung und/oder Organomegalie)	2 - 3,5 Jahre
IV	Lymphozytose und Thrombozytopenie (< 100.000/ μl) (mit/ohne Anämie, Lymphknotenvergrößerung, Organomegalie)	

Tabelle 2: Stadieneinteilung der CLL nach Rai, 1975.²⁵

Üblicherweise wird in der Klinik das festgelegte Stadium zum Abschätzen der Überlebenszeit der Patienten herangezogen. Doch weder Binet, noch Rai werden in ihrer Prognose dem sehr heterogenen Krankheitsverlauf der CLL gerecht.²⁶ Vor allem in den Frühstadien (Binet A bzw. Rai I und II) sind beide Systeme nicht in der Lage vorherzusagen, bei welchen Patienten die Krankheit gefährlich voranschreiten wird. Es besteht daher großes Interesse an der Bestimmung zuverlässiger Marker, um eine Therapie risikoadaptiert durchführen zu können. Mit der Durchführung von Genexpressionsanalysen wurden bereits wichtige prognostische Marker, die das Überleben negativ beeinflussen,

identifiziert (ZAP70, CD38, unmutierte IgHV).²⁷⁻²⁹ Darüber hinaus haben zytogenetische Analysen von Döhner et al. gezeigt, dass bei 82 % der CLL-Patienten Chromosomenaberrationen detektiert werden können.³⁰ Je nach Art dieser Störung wird die Überlebenszeit der Patienten unterschiedlich stark beeinflusst, was die Einteilung der Patienten in prognostische Subgruppen ermöglicht. Die schlechteste Prognose geht mit der Deletion des Chromosomenabschnittes 17p (del-17p) einher, da dies zum Verlust des Tumorsuppressorproteins p53 führt.³¹ Normalerweise wirkt p53 hemmend auf die Zellteilung und schützt damit vor unkontrollierter Zellvermehrung. Betroffene Patienten sprechen grundsätzlich schlecht auf Zytostatika an, sodass hier alternative Behandlungsstrategien angewendet werden müssen.³²

Bis heute ist die CLL durch medikamentöse Maßnahmen nicht heilbar. Die einzig kurative Behandlungsform ist die allogene Stammzelltransplantation. Sie ist jedoch wegen des Risikos immunologischer oder infektiöser Komplikationen und aufgrund des hohen Alters vieler Patienten oft keine Option. Bei Patientengruppen mit niedrigem Stadium (Binet A, B oder Rai I, II) und beim Fehlen krankheitsbedingter Beschwerden wird zunächst die sogenannte „watch and wait“-Strategie verfolgt. Indikation zur Therapie besteht erst im fortgeschrittenen Krankheitsstadium (Binet C) oder wenn in früheren Stadien (Binet A und B) bereits Symptome auftreten. Die Wahl eines geeigneten Therapieschemas orientiert sich z. B. an den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO) unter Berücksichtigung des Allgemeinzustandes und des zytogenetischen Befundes in Bezug auf eine del-17p.

Die Standardtherapie für körperlich fitte Patienten besteht zumeist in der Kombination aus den Chemotherapeutika Fludarabin und Cyclophosphamid mit dem CD20-Antikörper Rituximab (FCR-Schema).³³ Alternativ wird Bendamustin mit Rituximab (BR) zusammen eingesetzt. Letztere Kombination kann nach aktueller Studienlage aufgrund ihres günstigeren Toxizitätsprofils gegenüber dem FCR-Schema vor allem für fitte Patienten über 65 Jahre in Betracht gezogen

werden.³⁴ Trotz einer hohen Ansprechrate von ca. 90 % auf die Chemoimmuntherapie ist die progressionsfreie Zeit oft kurz. Erschwerend kommt hinzu, dass auch die toxischen Nebenwirkungen für viele ältere Patienten nicht tolerierbar sind.³⁵ Bis vor wenigen Jahren waren die weiteren Therapiemöglichkeiten der CLL sehr begrenzt, insbesondere in der Rezidivsituation und bei CLL mit del-17p. Interessanterweise ist die CLL gegenwärtig diejenige Tumorerkrankung, die die größte Dynamik in der Entwicklung und Zulassung wirkungsvoller Medikamente erfährt. Beispielsweise können seit 2014 Patienten in der Erstlinientherapie mit den optimierten CD20-Antikörpern Obinutuzumab und Ofatumumab behandelt werden. In klinischen Studien führte ihre jeweilige Anwendung in Kombination mit Chlorambucil im Vergleich zu Rituximab mit Chlorambucil zu einer Verlängerung der progressionsfreien Zeit von durchschnittlich einem Jahr.^{36, 37}

Zu einem Paradigmenwechsel in der Behandlung der CLL führte die Einführung der zielgerichteten Therapeutika Ibrutinib und Idelalisib, zwei sogenannte *small-molecule inhibitors*. Sie werden seit dem Jahr 2014 in der Zweitlinientherapie und bei aggressiver Erkrankung (del-17p) eingesetzt. Die Angriffspunkte von Ibrutinib und Idelalisib sind wichtige intrazelluläre Schaltstellen des BCR-Signalwegs. Ibrutinib vermittelt seine Wirkung dabei über die selektive Inhibition der Bruton-Tyrosinkinase (BTK), während Idelalisib die Phosphatidylinositol-3-Kinase delta angreift (PI3K δ).³⁸ Beide Mechanismen unterbrechen die BCR-vermittelte Interaktion zwischen CLL-Zellen und Zellen des Mikromilieus, was zum Wirkungsverlust bestimmter proliferations- und überlebensfördernder Signale führt.^{21, 39} Nach einiger Zeit kommt es dadurch zur Reduktion der Lymphadenopathie und der Tumorlast. In einer klinischen Studie (Phase Ib/II) bei vorbehandelter CLL lag die Gesamtansprechrate auf Ibrutinib bei 71 % und das progressionsfreie Überleben umfasste bei 75 % der Behandelten über 26 Monate.⁴⁰

Vor diesem Hintergrund konzentriert sich diese Arbeit auf das neueste *small-molecule* ABT-199, das im April 2016 von der amerikanischen Zulassungsbehörde FDA zur Therapie vorbehandelter CLL mit del-17p zugelassen wurde.

Der Wirkmechanismus von ABT-199 besteht in der Antagonisierung von BCL-2 zur Wiederherstellung der natürlichen Apoptosefähigkeit der Tumorzellen. Durch die Bindung des Medikaments an BCL-2 kommt es zur Freilassung des zuvor gefangenen pro-apoptotischen Proteins BIM. Freies BIM wiederum aktiviert die Proteine BAX/BAK, was zur Freisetzung von Cytochrom c führt und schließlich die Induktion von Apoptose einleitet.¹² Damit steht die direkte zytotoxische Wirkweise von ABT-199 im Kontrast zu der von Ibrutinib und Idelalisib. Bereits 2007 wurde gezeigt, dass CLL-Zellen aufgrund ihrer ausgeprägten Inaktivierung von BIM durch BCL-2 sehr empfänglich gegenüber dieser neuen Form der therapeutischen Intervention sind.⁴¹ In einer aktuellen Phase-I-Studie mit vorbehandelter CLL sprachen 79 % der Patienten auf die Therapie mit ABT-199 an. Bei 20 % der Behandelten kam es sogar zur kompletten Remission der Erkrankung.⁴² Ungeachtet des erfolgreichen Einsatzes der neuen Generation von *small-molecule inhibitors* ist es auch bei dieser Medikamentenklasse wahrscheinlich, dass viele der behandelten Patienten im Laufe der Zeit ein vermindertes Therapieansprechen zeigen, Resistenzen entwickeln und schließlich ein Rezidiv erleiden.⁴³ Im Falle von ABT-199 könnte hierfür beispielsweise die reaktive Hochregulation alternativer antiapoptotischer Proteine, wie BCL-XL, BCL-W, MCL-1 und BCL2A1, in Frage kommen.⁴⁴ Eine Strategie dieser klinischen Herausforderung zu begegnen besteht in der Erprobung geeigneter Kombinationstherapien, die die Effektivität bereits bestehender Therapien erhöhen und die Entwicklung von Resistenzen verhindern. In der vorliegenden Arbeit bildet diese Strategie die Grundlage der durchgeführten präklinischen Experimente.

2.2 Die Tumor Nekrose Faktor (TNF)-Familie

Die TNF-Familie umfasst ein komplexes System an Liganden und Rezeptoren, welche hauptsächlich von Zellen des Immunsystems exprimiert werden und eine entscheidende Rolle bei der Regulation immunologischer Prozesse einnehmen.⁴⁵ Das namensgebende Protein TNF wurde erstmals im Jahr 1975 beschrieben. Damals wurde beobachtet, dass der von Makrophagen produzierte

Signalstoff zur Lyse von Tumorzellen beiträgt.⁴⁶ Seither konnten über die Bestimmung von Sequenz- und Strukturhomologien zahlreiche weitere Liganden und Rezeptoren der TNF- bzw. TNFR-Familie identifiziert werden.⁴⁷ Die TNF-Liganden teilen einen gemeinsamen Aufbau im Bereich ihrer extrazellulären Domäne, die sogenannte *TNF homology domain* (THD). Mit dieser binden sie an Cystein-reiche Domänen (CRD) der TNF-Rezeptoren.⁴⁸ Jeder TNF-Ligand besitzt ein oder mehrere entsprechende Rezeptoren und umgekehrt. Mit Ausnahme von TNF- β werden alle Liganden als Typ-II-Transmembranproteine exprimiert und können anschließend von der Zelloberfläche abgespalten und als löslicher Faktor freigesetzt werden. In Lösung ordnen sich die TNF-Liganden typischerweise zu Homotrimeren an. Grundsätzlich vermitteln die TNF-Rezeptoren abhängig vom Aufbau ihres zytoplasmatischen Teils ihre Effekte über zwei unterschiedliche Signalwege. Meistens erfolgt die Rekrutierung intrazellulärer TRAF-Moleküle (*TNF-receptor associated factor*), falls der jeweilige Rezeptor ein TRAF-interagierendes Motif (TIM) besitzt. Die TRAF-Moleküle führen ihrerseits zur Aktivierung der Signalwege des Transkriptionsfaktors NF- κ B.⁴⁹ Seltener besitzt der TNF-Rezeptor eine zytoplasmatische Todesdomäne, die zur Aktivierung von *death domain* Proteinen (DD) und somit zur Weitergabe apoptotischer Signale führt.⁵⁰

Allgemein besitzt die TNF-Superfamilie über diese beiden intrazellulären Mechanismen einen bedeutenden Einfluss auf die Proliferation, das Überleben, die Differenzierung und die Apoptose von Immun-, aber auch von Tumorzellen.⁵¹ Viele der biologischen Vorgänge, die durch das TNF-System moderiert werden, sind von essentieller Bedeutung für den Organismus. Beispielsweise wird mithilfe der proinflammatorischen Wirkung von TNF die Entzündungsreaktion des Körpers eingeleitet und die Immunantwort auf Infektionen unterstützt. Nicht zuletzt sind viele TNF-Moleküle regulierend an der Entwicklung und Homöostase lymphatischer Gewebe des Körpers beteiligt.⁵¹

Auf der anderen Seite ist jedoch auch bekannt, dass ein aus dem Gleichgewicht geratenes TNF-System an der Pathophysiologie zahlreicher Erkrankungen

beteiligt ist. Beispielsweise wird durch die Überexpression einiger TNF-Liganden die Aktivität vieler chronisch-entzündlicher Systemerkrankungen angefeuert. Hierzu zählen die Rheumatoide Arthritis, Psoriasis, Colitis Ulcerosa oder Morbus Crohn.⁵² Vor diesem Hintergrund wurden bereits verschiedene Antikörper wie Infliximab, Adalimumab und Etanercept zur Neutralisation von TNF entwickelt. Diese sogenannten *Biologicals* gehören zur Gruppe der Immunsuppressiva und werden in der Klinik bei den genannten Erkrankungen im therapierefraktären Zustand eingesetzt. Obgleich TNF ursprünglich eine anti-tumorale Wirkung zugeschrieben wurde, ist heute bekannt, dass die TNF-Familie auch an Tumorerkrankungen mitbeteiligt ist.⁵³ Es wird angenommen, dass dies vor allem auf eine Überaktivierung von NF- κ B zurückzuführen ist und dass damit Gene aktiviert werden, welche das Überleben, die Proliferation, Metastasierung und Resistenz von Tumorzellen gegenüber Apoptose fördern.⁵⁴

2.3 Das TNF-Familienmitglied B cell activating factor (BAFF)

Das TNF-System nimmt Einfluss auf die gesamte Biologie von B-Lymphozyten. Besonders in der Erforschung von Erkrankungen der B Zellreihe sind daher neue Erkenntnisse über die Wirkung von TNF-Liganden auf B Zellen von enormer Bedeutung. Diese Arbeit widmet sich dem TNF-Familienmitglied B cell activating factor (BAFF), das unter den TNF-Mitgliedern die höchste Relevanz für die Reifung und das Überleben peripherer B Zellen besitzt.^{55, 56} Ferner ist BAFF an der Proliferation von B Zellen, der Differenzierung von Plasmazellen und an der *Class-switch recombination* (CSR) beteiligt.^{57, 58} Eine Vielzahl an Zelltypen ist in der Lage, BAFF zu exprimieren. Dazu gehören vor allem Zellen der myeloischen Reihe, wie Monozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen und neutrophile Granulozyten.⁵⁹ Des Weiteren wurde auch für T Zellen,⁶⁰ aktivierte murine B Zellen,⁶¹ sowie für einige nicht-hämatopoetische Zelllinien eine BAFF-Expression beschrieben.⁶² Wie die meisten TNF-Mitglieder wird BAFF als Typ II Transmembranprotein exprimiert und kann anschließend als löslicher Faktor freigesetzt werden.⁵⁹ In Lösung oligomerisiert BAFF zunächst zu Trimeren, bevor es seine Effekte vermittelt.

Es gibt drei verschiedene BAFF-Rezeptoren der TNFR-Familie: *BAFF receptor* (BAFFR), *transmembrane activator-calcium modulator and cyclophilin ligand interactor* (TACI) und *B-cell maturation antigen* (BCMA).⁶³ Alle drei werden von B Zellen exprimiert und führen zur Aktivierung der komplexen Signalwege des Transkriptionsfaktors NF- κ B.⁶⁴ BAFFR scheint der wichtigste Rezeptor für BAFF zu sein, wenn es um die Regulation des Überlebens von B Zellen geht.⁶⁵ Seine Signalgebung ist gemeinsam mit der des BCR essentiell in der Entwicklung von unreifen zu reifen B Zellen.⁶⁶ Mäuse, die defizient für BAFF oder BAFFR sind, zeichnen sich durch den Verlust eines Großteils peripherer B Zellen aus.⁶⁷ Mit Ausnahme von Plasmazellen des Knochenmarks exprimieren alle B Zell-Typen BAFFR.⁶⁸ Die Rolle von TACI wiederum ist komplizierter, da der Rezeptor NF- κ B sowohl aktivieren als auch inhibieren kann. Im Mausmodell sind TACI-defiziente Mäuse durch das Auftreten von B Zellhyperplasien, Autoimmunphänomenen und Lymphomen charakterisiert, weshalb TACI eher als negativer Regulator des Überlebens von B Zellen betrachtet wird.^{69, 70} Daneben beeinflusst TACI noch die CSR und die IgA-Produktion.⁷¹ Der Rezeptor BCMA wird hauptsächlich von Antikörper-produzierenden Zellen exprimiert und scheint eine wichtige Rolle für das Überleben von Plasmazellen zu spielen.⁷² BAFF besitzt nur eine geringe Affinität zu diesem Rezeptor.⁷³ Mit einer starken Affinität bindet BCMA das TNF-Mitglied *A Proliferation-Inducing Ligand* (APRIL), das eine hohe Sequenzhomologie zu BAFF aufweist.⁷⁴ Aus diesem Grund ist APRIL auch in der Lage, neben BCMA an TACI, nicht jedoch an BAFFR zu binden.⁷⁵ Hierüber vermittelt APRIL ähnliche Effekte wie BAFF, indem es beispielsweise die CSR stimuliert, die Proliferation fördert und das Überleben von Plasmablasten verbessert.^{57, 76, 77}

Kommt es zu einer Dysregulation des BAFF-Systems, so trägt dies zur Pathophysiologie von Autoimmunerkrankungen, B Zell-Malignomen und Infektionen bei.⁶² Bekanntheit erlangte BAFF vor allem aufgrund seiner Beteiligung an rheumatischen Erkrankungen, wie dem Systemischen Lupus Erythematoses (SLE), dem Sjögren Syndrom und der Rheumatoiden Arthritis.⁷⁸ Bei Patienten, die unter diesen Erkrankungen leiden, konnten erhöhte BAFF-Serumwerte festgestellt werden.⁷⁹⁻⁸¹ Im Tiermodell entwickeln transgene Mäuse, die BAFF

überexprimieren, einen SLE-ähnlichen Phänotyp. Dies ist sogar auch der Fall, wenn die Tiere T Zell-defizient sind.⁸² Darüber hinaus zeigten Studien an SLE-Patienten, dass erhöhte BAFF-Werte positiv mit der Krankheitsaktivität und dem Messwert an Autoantikörpern korrelieren.⁸³ Aufgrund dieser Beobachtungen kam es zur Entwicklung des BAFF-neutralisierenden Antikörpers Belimumab, der seit 2011 zur Behandlung des SLE zugelassen ist.⁸⁴ Belimumab bindet lösliches BAFF und führt damit zur verminderten Produktion an Autoantikörpern und zum Rückgang der Zahl peripherer B Zellen.^{84, 85} Neben der inzwischen anerkannten Rolle bei Autoimmunerkrankungen besitzt BAFF außerdem große Bedeutung in der Pathophysiologie von B Zell-Malignomen.⁸⁶ In einer Studie von Wang et al. wurde gezeigt, dass die BAFF-Serumwerte von Patienten mit Multiplem Myelom (MM) deutlich höher sind als die von gesunden Spendern.⁸⁷ BAFF könnte sich möglicherweise als Biomarker bei MM eignen, da seine Werte mit dem Voranschreiten der Erkrankung und der Knochenmarksinfiltration durch Plasmazellen korrelieren.⁸⁸ Weiterhin fanden Novak et al. heraus, dass auch im Falle des NHL erhöhte BAFF-Level mit der Krankheitsschwere, einem vermindertem Therapieansprechen und einer aggressiven Form des NHL zusammenhängen.⁸⁹

Auch für die CLL liegen bereits Daten über die Beteiligung von BAFF an der Erkrankung vor: Novak et al. beschrieben im Jahr 2002 als erstes die Expression von BAFF und seinen Rezeptoren von CLL-Zellen selbst.⁹⁰ Bestätigt wurden diese Ergebnisse 2004 von Kern et al., die zusätzlich eine BAFF-Expression auf der CLL-Zellmembran nachwiesen. Diese war bei normalen B Zellen nicht zu detektieren.⁹¹ Hinter dieser Beobachtung vermuteten die Autoren einen autokrinen Mechanismus, worüber die Tumorzellen selbst zu ihrem eigenen Überleben beitragen könnten. Weiterhin wurde von Zhang et al. gezeigt, dass Myc/BAFF-transgene Mäuse eine aggressive, CLL-ähnliche Erkrankung entwickeln.⁹² C-Myc ist ein von CLL-Zellen exprimiertes Protoonkogen, dessen Aktivität durch BAFF in diesen Experimenten deutlich gesteigert wurde. Allgemein spielt in der aktuellen Literatur das in dieser Arbeit bereits vorgestellte Konzept der Interaktion zwischen den CLL-Zellen und dem Mikromilieu eine

zentrale Rolle. Über die vermehrte Freisetzung von BAFF und/oder APRIL durch NLCs werden die Tumorzellen am Leben erhalten und die Krankheitsaktivität angefeuert.⁹³ Auch für andere Stromazellen wie *microvascular endothelial cells* (MVECs) wurde beobachtet, dass diese nach CD40/CD40L-vermittelter Interaktion mit CLL-Zellen vermehrt BAFF freisetzen.⁹⁴ Die Bedeutung dieser Überlebensfaktoren wird auch demonstriert durch den schnellen Tod isolierter CLL-Zellen *ex vivo*.

Aufgrund der Abhängigkeit maligner B Zellen von Überlebensfaktoren wie BAFF scheint es sinnvoll, dies als Angriffspunkt einer gezielten Therapie in Betracht zu ziehen. Wild et al. konnten zeigen, dass BAFF die Sensitivität von CLL-Zellen gegenüber der direkten und der durch den therapeutischen Antikörper Rituximab induzierten Lyse durch natürliche Killerzellen (NK-Zellen) verringert. Unter Einsatz von Belimumab konnte die BAFF-vermittelte Resistenz gegenüber der NK-Zelllyse neutralisiert und die Therapieempfindlichkeit der malignen Zellen gegenüber Rituximab wiederhergestellt werden.⁹⁵ Die vorliegende Arbeit knüpft an diese Ergebnisse an. Hier soll nun zum einen der Einfluss von BAFF auf die Suszeptibilität von CLL-Zellen gegenüber dem neuen Systemtherapeutikum ABT-199 untersucht werden. Zum anderen wird der Frage nachgegangen, ob der Einsatz des therapeutischen Antikörpers Belimumab zur Neutralisation von BAFF einen Nutzen in der ABT-199 Therapie darstellen könnte.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Brutschrank Heraecell	Heraeus, Hanau, Deutschland
Durchlichtmikroskop, Axiovert 25	Zeiss, Jena, Deutschland
ELISA-Reader, Sunrise	Tecan Trading AG, Switzerland
FACS BD FACS Canto™ II	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
GLO-Max® Microplate Luminometer	Promega, Madison, WI, USA
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim, Deutschland
Pipetteboy comfort	Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sterilbank Herasafe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Vortexer	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Wasserbad	Köttermann, München, Deutschland
Zentrifuge	Heraeus, Hanau, Deutschland

3.1.2 Verbrauchsmaterial

Cryoröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
	Nunc, Roskilde, Dänemark
Einmalspritzen	Braun, Wertheim, Deutschland
FACS-Röhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen	VWR, Darmstadt, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5; 1,5; 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Zellkulturflaschen	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA Nunc, Roskilde, Dänemark
Zellkulturplatten (96 well)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA Corning Inc., Corning, NY, USA
Zentrifugenröhrchen (15 ml; 50 ml)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zentrifugen-Filtereinheiten Amicon Ultra 15	Merck, Millipore, Billerica, MA, USA

3.1.3 Chemikalien & Reagenzien

Alle nicht aufgelisteten Reagenzien wurden von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) oder Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

7-AAD	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
ABT-199 (GDC-0199)	Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA
Ampuwa	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Caspase 3/7 TM Glo Reagent	Promega, Madison, WI, USA
CountBright absolute counting beads	Life technologies, Carlsbad, CA, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
EDTA Solution	Cambrex, Rockland, ME, USA
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Ficoll-Lösung	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Medium RPMI 1640	Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Penicillin/Streptomycin (P/S)	Lonza, Verviers, Belgien
PBS	PAA, Pasching, Österreich
Zellproliferationsreagenz WST-1	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

3.1.4 Antikörper und Zytokine

BAFF (rekombinant)	Immunotools, Friesoythe, Deutschland
Belimumab (Benlysta®)	GlaxoSmithKline, Brentford, UK
Bevacizumab (Avastin®)	Roche, Basel, Switzerland

Direkt-markierte FACS-Antikörper wurden von BD Pharmingen (San Diego, CA, USA) bezogen.

3.1.5 Medien, Puffer und Lösungen

Medium (Einfrieren)	RPMI 1640 + 20% FCS + 10% DMSO
Medium (Zellkultur)	RPMI 1640 + 10% FCS + 1% P/S

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologie

Die Inkubation sämtlicher Versuchsansätze erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 5,0% CO₂. Zur Ermittlung der Zellzahl wurden die Zellen mit Trypanblau zum Ausschluss toter Zellen angefärbt und anschließend in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Falls nicht anders angegeben, erfolgte die Zentrifugation der Zellen bei 1.500 rpm für 5min.

3.2.1.1 Spender primären Materials

Gemäß den Richtlinien der Ethikkommission und mit dem freiwilligen Einverständnis der Spender wurde Material zur Isolation mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) von Leukämiepatienten gewonnen. Das Patientenmaterial wurde zum Zeitpunkt der Diagnosestellung und vor Beginn der Therapie entnommen.

3.2.1.2 Isolation, Einfrieren und Auftauen des Spendermaterials

Abgenommenes Patientenblut wurde zur Gerinnungshemmung mit Heparin versetzt und direkt nach der Abnahme aufgearbeitet. Dies erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation, wofür eine isotonische Ficoll-Lösung (Ficoll-Hypaque) verwendet wurde. Sie enthält ein synthetisches, stark verzweigtes und vernetztes Polymer aus Saccharose und Epichlorhydrin (Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer) und besitzt eine Dichte von 1,077 g/ml. Diese Eigenschaft führt dazu, dass sich mononukleäre Zellen (Lymphozyten und Monozyten) bei der Fraktionierung aufgrund ihrer niedrigeren Dichte in der Interphase zwischen Plasma (enthält die Thrombozyten) und Ficoll-Lösung anreichern. Auf der anderen Seite durchdringen Zellen höherer Dichte (Erythrozyten und Granulozyten) die Ficoll-Lösung und bilden ein Sediment.

Die Blutprobe der Spender wurde im Verhältnis von ungefähr 1:3 mit PBS verdünnt. 35 ml dieser Verdünnung wurden anschließend auf 15 ml vorgelegte Ficoll-Lösung aufgeschichtet. Nach der ersten Zentrifugation (2.000 rpm für 18 min; ohne Bremse) wurden die mononukleären Zellen der Interphase abgenommen und mit PBS drei weitere Male zentrifugiert. Es folgte die fünfte Zentrifugation (800 rpm für 10 min) zur Entfernung der Thrombozyten. Daraufhin wurden die Zellen in PBS aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Zum Einfrieren wurden die Zellen ein weiteres Mal zentrifugiert, in Einfriermedium aufgenommen und mit einer Zelldichte von 1 oder 2×10^7 /ml in sterile Cryoröhrchen (je 1 ml) bei -80°C eingefroren. Die Zellen wurden innerhalb weniger Tage zur Langzeitlagerung in Stickstofftanks überführt. Beim Ansetzen der Versuche wurden die eingefrorenen Zellen im Cryoröhrchen im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, sofort in Medium resuspendiert, zentrifugiert und wieder in neuem Medium aufgenommen.

3.2.3 Bestimmung der Metabolischen Aktivität

Für die Messung metabolischer Aktivität von CLL-Zellen wurde der WST-1 Assay von Roche durchgeführt. Das Tetrazolium Salz WST-1 (4-[3-(4 Jodophenyl)-2-(4-Nitrophenyl)-2H-5-Tetrazolio]-1,3-Benzendisulfonat) wird von mitochondrialen Dehydrogenasen lebender Zellen in den löslichen Farbstoff Formazan enzymatisch umgesetzt. Die Menge an gebildetem Formazan korreliert direkt mit der Anzahl lebendiger Zellen in der Kultur. Sie kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm - 650 nm bestimmt werden.

In den beschriebenen Versuchen wurden CLL-Zellen zu je 2×10^6 in 100 μl Endvolumen in einer 96-well Flachbodenplatte für 72 h in An- oder Abwesenheit von ABT-199, BAFF, Belimumab oder einem Isotypkontrollantikörper kultiviert. Nach dieser Inkubationszeit wurde 10 μl WST-1 Reagenz hinzugefügt und die metabolische Aktivität nach 30 min, 1, 2, 3 und 4 h mit dem ELISA-Reader SunriseTM von Tecan gemessen. Alle dargestellten Ergebnisse entsprechen den erhaltenen Messwerten vier Stunden nach Zugabe des WST-1 Reagenz.

3.2.4 Bestimmung der Caspase 3/7 Aktivität

Zur Bestimmung apoptotischer Aktivität von CLL-Zellen wurde der Caspase-Glo 3/7® Assay von Roche durchgeführt. Die Spaltung der Aminosäuresequenz DEVD des beinhalteten Substrats erfolgt durch die Caspasen 3 und 7, wodurch es zur Freisetzung von Aminoluciferin kommt. Aminoluciferin wiederum dient als Substrat für das enthaltene Enzym Luciferase. Diese Umsetzung erzeugt ein fluoreszierendes Signal, dessen Stärke photometrisch bestimmt werden kann und proportional zur Höhe der Caspase-Aktivität in der Zelle ist.

Pro Versuchsansatz wurden CLL-Zellen zu je 1×10^5 in 100 μ l Endvolumen in An- oder Abwesenheit von ABT-199 in einer 96-well Flachbodenplatte für 6, 12, 24 und 48 h inkubiert. Der Proteinkinase C Inhibitor Staurosporin wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Anschließend wurden 100 μ l der auf RT gebrachten Caspase-Glo 3/7® Reagenz hinzugefügt, die Platte kurz geschüttelt und für weitere 30 min inkubiert. Die Messung erfolgte mit dem GLO-Max® Microplate Luminometer unter der Bedienung der beigesteuerten Caspase-Glo Software von Promega.

3.2.2 Durchflusszytometrie

Zur Bestimmung von Zelltod und absoluter Anzahl lebender CLL-Zellen, sowie der Identifizierung von Proteinen der Zelloberfläche (Cluster of Differentiation), wurde die Durchflusszytometrie durchgeführt. Hierbei wurden direkt fluoreszenzmarkierte Antikörper, die bei Färbung der Zellen spezifisch an ihr jeweiliges Zielmolekül binden, verwendet. Die Messung wurde mit dem BD FACS Canto™ II durchgeführt. Anschließend wurde zur Auswertung die integrierte Software bzw. das Analyse-Programm FlowJo vX.0.7 verwendet.

Das Prinzip der Durchflusszytometrie basiert auf der hydrodynamischen Fokussierung von Zellen mittels eines Hüllstroms, woraufhin die Zellen für die Messung einzeln durch einen gebündelten Laserstrahl geführt werden können. Dies führt zur Anregung der gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe und zur Entstehung eines Fluoreszenzsignals mit einer bestimmten Wellenlänge. Ein Detektor nimmt dieses für jeden Farbstoff spezifische Signal auf und wertet es

aus. Darüber hinaus lässt sich über das Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scatter) und das Seitwärtsstreulicht (SSC = Side Scatter) unabhängig von dem jeweiligen Färbe-Protokoll eine Aussage über Größe und Granularität der Zellen treffen.

3.2.2.1 Bestimmung der Anzahl lebender CLL-Zellen

In den beschriebenen Versuchen wurden CLL-Zellen zu je 1×10^6 in 125 μl Volumen in sterile FACS-Röhrchen gegeben und mit in jeweils 125 μl Volumen angesetztem BAFF, Belimumab oder einem Isotypkontrollantikörper behandelt. Zu den unbehandelten CLL-Zellen wurden 125 μl RPMI-Lösung hinzugegeben. Nach einer Inkubationsdauer von 24 h erfolgte die Behandlung mit ABT-199, das zu je 250 μl Volumen pro Probe angesetzt und hinzugegeben wurde. Die unbehandelte Gruppe erhielt 250 μl reine RPMI-Lösung, sodass in jeder Probe 500 μl Endvolumen vorlagen. Nach weiterer Inkubation über 24 h wurden zur Färbung direkt markierte Antikörper (CD19 FITC, CD5 APC) in einem Verhältnis von 1:200 eingesetzt. Im Anschluss wurden die Zellen im Dunkeln für 20 min bei RT inkubiert. Danach erfolgten die Zugabe von 7-AAD in einem Verhältnis von 1:200 und die weitere Inkubation für 10 min im Dunkeln bei RT. Vor der Messung wurde zu jeder Probe 20 μl *counting beads* hinzugegeben und vorsichtig, jedoch gründlich mit dem Vortexer geschüttelt. Die Berechnung der Gesamtzahl der sich in der Probe befindenden Zellen erfolgte nach Herstellerangaben (**Tabelle 3**).

$$\frac{A}{B} \times \frac{C}{D} = \text{Anzahl an Zellen}/\mu\text{l}$$

$$\text{Anzahl an Zellen}/\mu\text{l} \times D = \text{Gesamtzahl an Zellen in der Probe}$$

A = Anzahl lebender CLL-Zellen

B = Anzahl der gemessenen *beads*

C = angegebene Menge an *beads*/20 μl

D = Volumen der Probe

Tabelle 3: Berechnung der Anzahl lebender CLL-Zellen in der FACS-Probe

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss von ABT-199 auf die Stoffwechsel- und Caspaseaktivität von CLL-Zellen

4.1.1 Einfluss von ABT-199 auf die Stoffwechselaktivität von CLL-Zellen

Zur Identifizierung geeigneter Konzentrationen von ABT-199 für die *in vitro* Untersuchungen wurden zunächst Dosistitrationen durchgeführt und die zytotoxische Wirkung von ABT-199 anhand des Effekts auf die Stoffwechselaktivität von CLL-Zellen untersucht. Zu diesem Zweck wurde der WST-1 Assay ausgewählt. Nach Etablierung der Methode wurden CLL-Zellen von zehn verschiedenen Spendern mit ansteigenden Konzentrationen von ABT-199 behandelt und für 72 h inkubiert. Die eingesetzten Konzentrationen orientierten sich an der Erstbeschreibung von ABT-199 durch Souers et al.⁹⁶ Die anschließende Analyse ergab bei allen untersuchten Patienten-Zellen eine dosisabhängige ABT-199-induzierte Reduktion der metabolischen Aktivität (**Abbildung 1**).

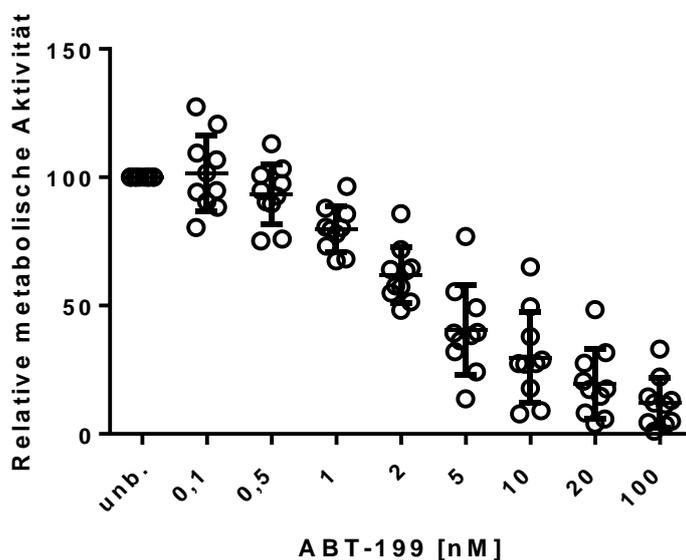


Abbildung 1: Dosistitration von ABT-199 mit primären CLL-Zellen im WST-1. PBMC von CLL-Patienten wurden unbehandelt belassen oder mit ansteigenden Konzentrationen ABT-199 (0,1-100 nM) inkubiert. Nach 72 h wurde mittels WST-1 Assay die Stoffwechselaktivität bestimmt. Dargestellt sind kombinierte Daten zehn verschiedener Patienten mit arithmetischem Mittel und Standardfehler als relative metabolische Aktivität bezogen auf unbehandelte CLL-Zellen, welche in jedem individuellen Datensatz auf 100% gesetzt wurden.

Zusätzlich wurde die halbmaximale letale Konzentration (LC_{50}) von ABT-199 mit dem Statistikprogramm Graphpad Prism 6 berechnet. Hierzu wurde die nicht-lineare Regressionsanalyse (NLR) *Sigmoidal, 4 PL* auf Basis der zuvor gemessenen Datenpunkte durchgeführt. Mithilfe der damit berechneten Dosis-Wirkungs-Kurve konnte für ABT-199 eine LC_{50} von 2,47 nM *in vitro* identifiziert werden (**Abbildung 2**).

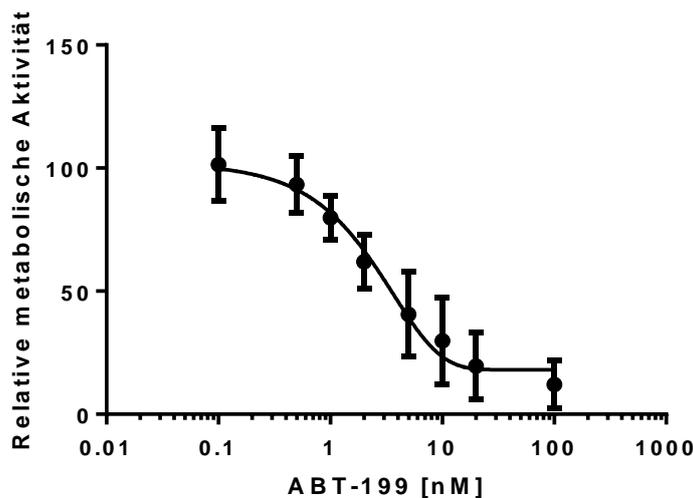


Abbildung 2: Bestimmung der LC_{50} von ABT-199 *in vitro*. Auf Basis der in Abbildung 1 dargestellten Datenpunkte wurde mithilfe von GraphPad Prism die NLR *Sigmoidal, 4 PL* durchgeführt. Mithilfe der berechneten Dosis-Wirkungs-Kurve konnte für ABT-199 eine mittlere letale Konzentration von 2,47 nM *in vitro* identifiziert werden.

4.1.2 Wirkung von ABT-199 auf die Caspase-Aktivität von CLL-Zellen

Darauffolgend wurde die Apoptose-induzierende Wirkung von ABT-199 anhand der zeitlichen Veränderung der Caspase-Aktivität nach Zugabe von ABT-199 analysiert. Zu diesem Zweck wurde der Caspase-Glo® Assay eingesetzt. Nach Etablierung der Methode wurden PBMC eines CLL-Patienten mit 10 nM ABT-199 behandelt. Die Aktivität der Caspasen 3 und 7 wurde anschließend zu unterschiedlichen Zeitpunkten (6-48 h) gemessen. Als Positivkontrolle wurde der Proteinkinase C Inhibitor Staurosporin verwendet. Es zeigte sich eine deutliche Erhöhung der Caspase-Aktivität nach Behandlung mit ABT-199. Sie erreichte ihr

Maximum nach 12 h und kehrte nach 48 h wieder auf das Niveau un behandelter CLL-Zellen zurück (**Abbildung 3**).

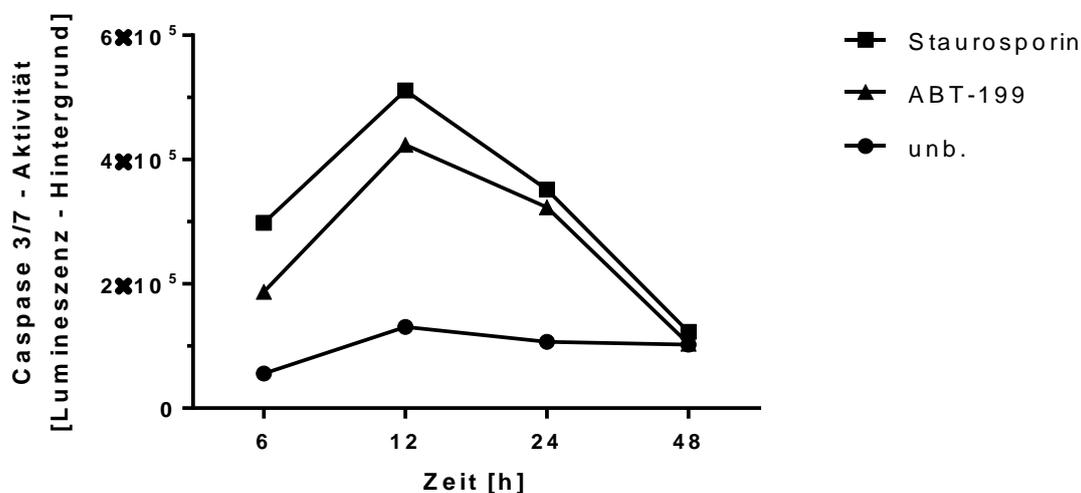


Abbildung 3: Einfluss von ABT-199 auf die Aktivität der Caspasen 3 und 7 von CLL-Zellen. PBMC eines CLL-Patienten wurden un behandelt belassen oder mit 10 nM ABT-199 inkubiert. Als Positivkontrolle wurden 2 μ M Staurosporin verwendet. Die Aktivität der Caspasen 3 und 7 wurde zu den angegebenen Zeitpunkten mithilfe des Caspase-Glo® Assay bestimmt. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis eines CLL-Patienten aus drei Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen.

4.2 Einfluss von BAFF auf die Suszeptibilität von CLL-Zellen gegenüber der Behandlung mit ABT-199

4.2.1 Einfluss von BAFF auf die Stoffwechselaktivität von CLL-Zellen

Die nächsten Experimente adressierten die Frage, welchen Einfluss BAFF auf die Suszeptibilität von CLL-Zellen gegenüber der Behandlung mit ABT-199 besitzt. Hierzu wurde zunächst der Effekt von BAFF alleine auf die metabolische Aktivität von CLL-Zellen untersucht. Primäre CLL-Zellen sechs verschiedener Spender wurden hierfür mit steigenden Konzentrationen (1-2000 ng/ml) von rekombinantem humanen BAFF (rhBAFF) für 72 h inkubiert. Die metabolische Aktivität wurde anschließend mittels WST-1 Assay bestimmt. In Analogie zu den Ergebnissen von Wild et al.⁹⁷ zeigte sich, dass BAFF die Stoffwechselaktivität primärer CLL-Zellen zumindest ab 100 ng/ml dosisabhängig steigerte (**Abbildung 4**).

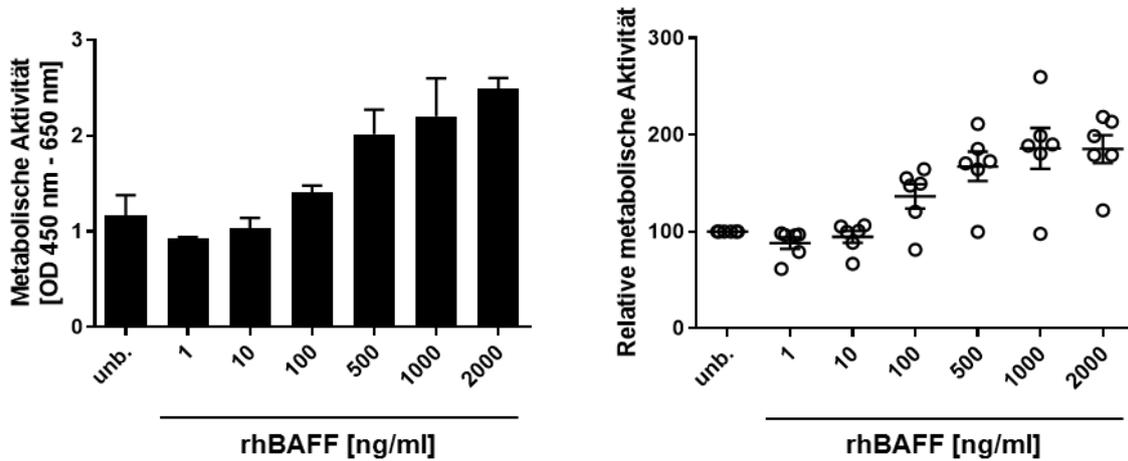


Abbildung 4: Einfluss von BAFF auf die Stoffwechselaktivität primärer CLL-Zellen. PBMC von CLL-Patienten wurden unbehandelt belassen oder mit ansteigenden Konzentrationen (1-2000 ng/ml) von rhBAFF inkubiert. Nach 72 h wurde mittels WST-1 Assay die Stoffwechselaktivität bestimmt. Links dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis eines CLL-Patienten mit arithmetischem Mittel und Standardabweichung aus Dreifachbestimmungen. Rechts dargestellt sind kombinierte Daten sechs verschiedener Patienten mit arithmetischem Mittel und Standardfehler als relative metabolische Aktivität bezogen auf unbehandelte CLL-Zellen, welche in jedem individuellen Datensatz auf 100% gesetzt wurden.

4.2.2 Einfluss von BAFF auf die durch ABT-199 vermittelte Reduktion der Stoffwechselaktivität von CLL-Zellen

Ausgehend von diesem Ergebnis wurde nun untersucht, inwiefern die für BAFF beobachteten Effekte im Rahmen der Behandlung mit ABT-199 zum Tragen kommen. Mithilfe der zu Beginn erstellten Titrationskurve wurden drei der sich in der Dosis-Wirkungs-Kurve befindenden Konzentrationen von ABT-199 (2, 5 und 10 nM) ausgewählt und primäre CLL-Zellen sechs verschiedener Spender behandelt. Gleichzeitig wurde innerhalb jeder dieser Behandlungsgruppen eine BAFF-Titration (1-500 ng/ml) durchgeführt. Nach 72 h Inkubationszeit wurde die Stoffwechselaktivität der Zellen mittels WST-1 Assay bestimmt. In diesen Versuchen wurde beobachtet, dass BAFF konzentrationsabhängig der ABT-199-induzierten Reduktion der metabolischen Aktivität entgegenwirkt. Der protektive Effekt von BAFF zeigte sich bei jeder eingesetzten ABT-199-Konzentration und nahm bei niedrig werdender Konzentration von ABT-199 an Stärke zu. Der Median der Behandlungsgruppe mit 2 nM ABT-199 und 500 ng/ml BAFF lag auf dem Niveau unbehandelter CLL-Zellen (**Abbildung 5**).

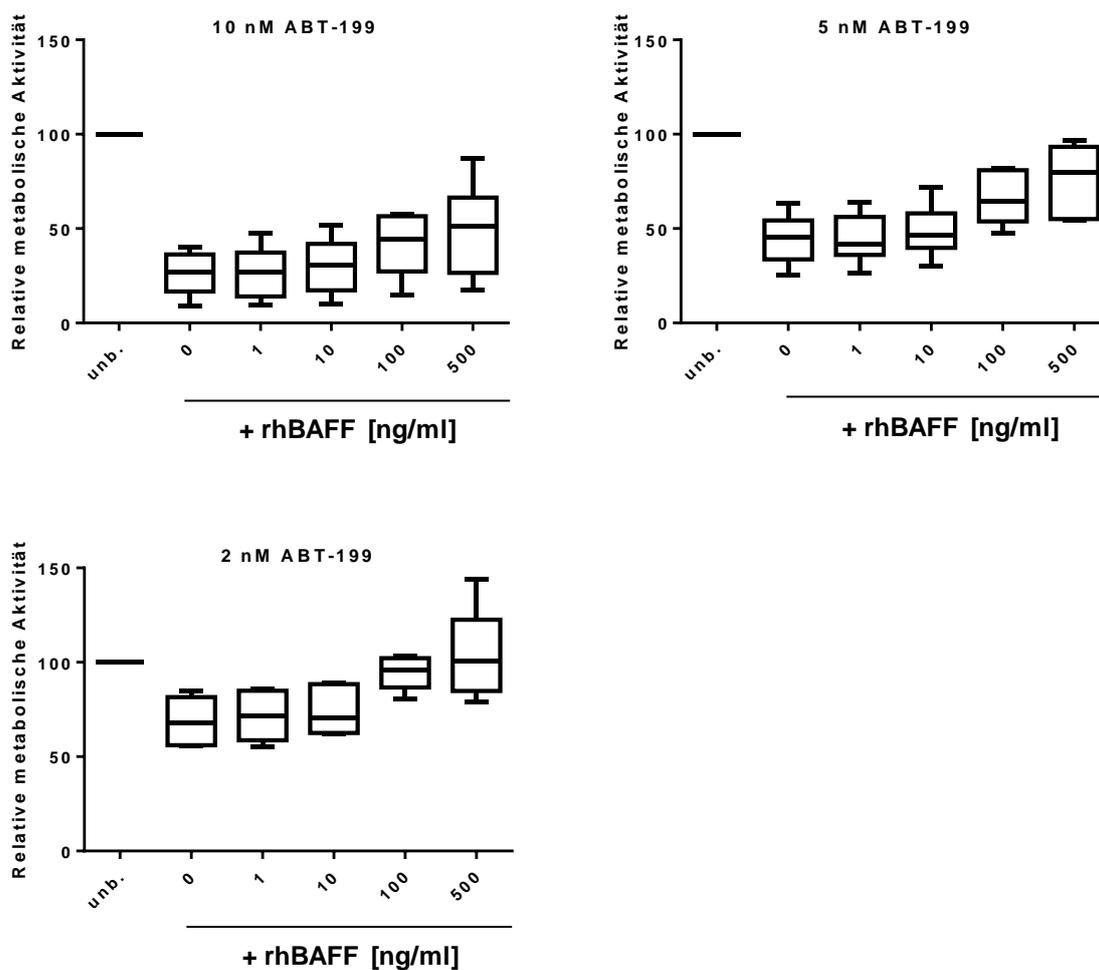


Abbildung 5: Einfluss von BAFF auf die Suszeptibilität von CLL-Zellen für eine Behandlung mit ABT-199. PBMC von sechs verschiedenen CLL-Patienten wurden unbehandelt belassen oder mit drei verschiedenen Konzentrationen von ABT-199 (10, 5, 2 nM) inkubiert. BAFF wurde in aufsteigenden Konzentrationen (0-500 ng/ml) hinzugegeben und die Stoffwechselaktivität wurde nach 72 h mittels WST-1 Assay bestimmt. Dargestellt sind kombinierte Daten sechs verschiedener Patienten als relative metabolische Aktivität bezogen auf unbehandelte CLL-Zellen, welche in jedem individuellen Datensatz auf 100 % gesetzt wurden.

4.2.3 Einfluss von BAFF auf den ABT-199-vermittelten Zelltod von CLL-Zellen

Als nächstes wurde durchflusszytometrisch überprüft, welchen Einfluss BAFF auf den ABT-199-vermittelten Zelltod von CLL-Zellen besitzt. Nach Etablierung der Methode wurden zu diesem Zweck CLL-Zellen unbehandelt belassen oder mit

einer BAFF-Konzentration von 500 ng/ml vorinkubiert. Nach 24 h wurde ABT-199 in zwei Konzentrationen (2 und 10 nM) hinzugegeben und die Zellen wurden für weitere 24 h inkubiert. Anschließend wurde die absolute Zahl lebender CD5+/CD19+ CLL-Zellen durchflusszytometrisch mittels der Verwendung von Quantifizierungsbeads bestimmt. Tote CLL-Zellen wurden hierbei durch das Hinzufügen von 7-AAD identifiziert. Die Ergebnisse zeigten, dass ABT-199 zu einer Reduktion lebender CLL-Zellen führte und dass BAFF die CLL-Zellen vor dem durch ABT-199-induzierten Zelltod schützte. Dies traf auf beide eingesetzten Konzentrationen von ABT-199 zu. In der niedrigeren Behandlungsstufe (2 nM ABT-199) konnte in Anwesenheit von BAFF eine höhere Zahl lebender Zellen als in der unbehandelten Gruppe festgestellt werden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass BAFF die CLL-Zellen auch vor ihrem spontanen Zelltod schützte (**Abbildung 6**).

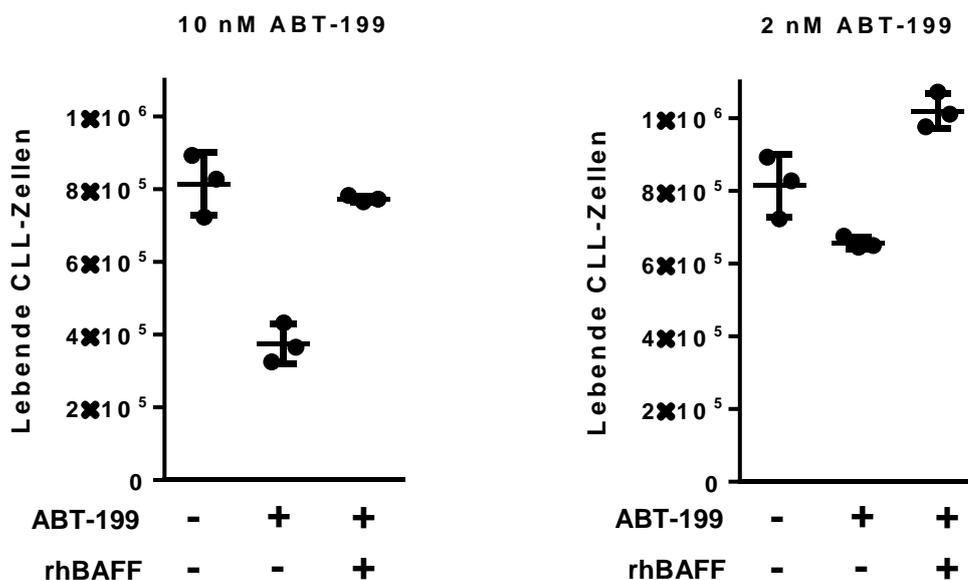


Abbildung 6: Einfluss von BAFF auf den ABT-199-vermittelten Zelltod primärer CLL-Zellen. PBMC eines CLL-Patienten wurden alleine oder mit rhBAFF (500 ng/ml) für 24 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit ABT-199 (10, 2 nM) behandelt und für weitere 24 h inkubiert. Im FACS wurden die CLL-Zellen anschließend als CD19+/CD5+ identifiziert und die absolute Zahl lebender CLL-Zellen mittels 7-AAD und Quantifizierungsbeads bestimmt. Gezeigt ist ein exemplarisches Ergebnis eines CLL-Patienten mit arithmetischem Mittel und Standardfehler aus Dreifachbestimmungen.

4.3 Einfluss einer BAFF-Neutralisation mit Belimumab auf die Suszeptibilität von CLL-Zellen gegenüber der Behandlung mit ABT-199

4.3.1 Einfluss von Belimumab auf die BAFF-vermittelte Steigerung metabolischer Aktivität primärer CLL-Zellen

Bisher wurde gezeigt, dass BAFF die Suszeptibilität von CLL-Zellen gegenüber einer ABT-199-induzierten Reduktion metabolischer Aktivität mindert und vor dem ABT-199-induziertem Zelltod schützt. Nun sollte untersucht werden, inwiefern der BAFF-neutralisierende Antikörper Belimumab in der Lage ist, CLL-Zellen für die Behandlung mit ABT-199 zu sensitivieren. Zur Untersuchung der Wirkung von Belimumab wurden primäre CLL-Zellen verschiedener Spender mit BAFF in An- oder Abwesenheit von Belimumab oder einer Isotypkontrolle für 72 h inkubiert. Danach wurde die Stoffwechselaktivität der CLL-Zellen mittels WST-1 bestimmt. Es wurde, wiederum in Analogie zu den Ergebnissen zu Wild et al.,⁹⁷ festgestellt, dass der Einsatz von Belimumab den BAFF-vermittelten Anstieg der metabolischen Aktivität verhinderte, während die Isotypkontrolle keinen Effekt vermittelte (**Abbildung 7**).

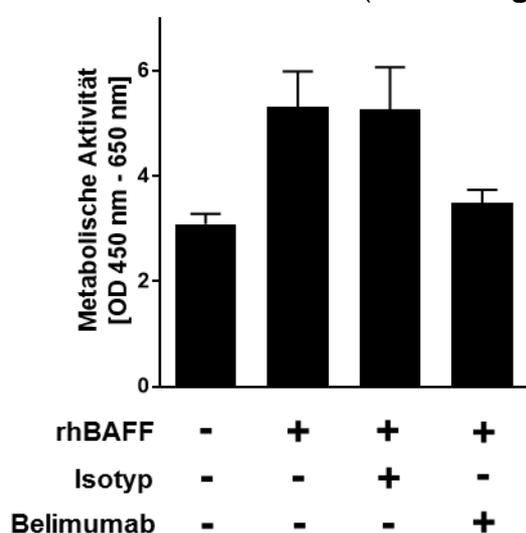


Abbildung 7: Einfluss einer BAFF-Neutralisation mittels Belimumab auf die Stoffwechselaktivität primärer CLL-Zellen. PBMC von CLL Patienten wurden wie angegeben mit oder ohne rhBAFF (500 ng/ml), Belimumab (10 µg/ml) oder einer Isotypkontrolle inkubiert. Nach 72 h wurde mittels WST-1 Assay die Stoffwechselaktivität bestimmt. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis eines CLL-Patienten mit arithmetischem Mittel und Standardabweichung aus Dreifachbestimmungen aus drei Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen.

4.3.2 Einfluss einer BAFF-Neutralisation mit Belimumab auf die ABT-199 vermittelte Reduktion der Stoffwechselaktivität von CLL-Zellen

Ausgehend von diesem Ergebnis sollte nun analysiert werden, inwiefern eine BAFF-Neutralisation mit Belimumab die Empfindlichkeit von CLL-Zellen gegenüber der Therapie mit ABT-199 wiederherstellen kann. Hierfür wurden CLL-Zellen vier verschiedener Spender mit drei Konzentrationen ABT-199 (2, 5 und 10 nM) behandelt. Gleichzeitig wurde BAFF in An- oder Abwesenheit von Belimumab oder einer Isotypkontrolle hinzugegeben. Nach 72 h wurde die Stoffwechselaktivität mittels WST-1 ermittelt. Wie bereits zuvor beobachtet wurde, führte BAFF zunächst zu einer verminderten Reduktion der metabolischen Aktivität durch ABT-199. Der Einsatz von Belimumab hingegen stellte die Reduktion der Stoffwechselaktivität der CLL-Zellen durch ABT-199 wieder her. Dies wurde für jede ABT-199-Konzentration beobachtet und zeigte sich am deutlichsten bei den beiden niedrigeren Konzentrationen (2 und 5 nM) (**Abbildung 8**).

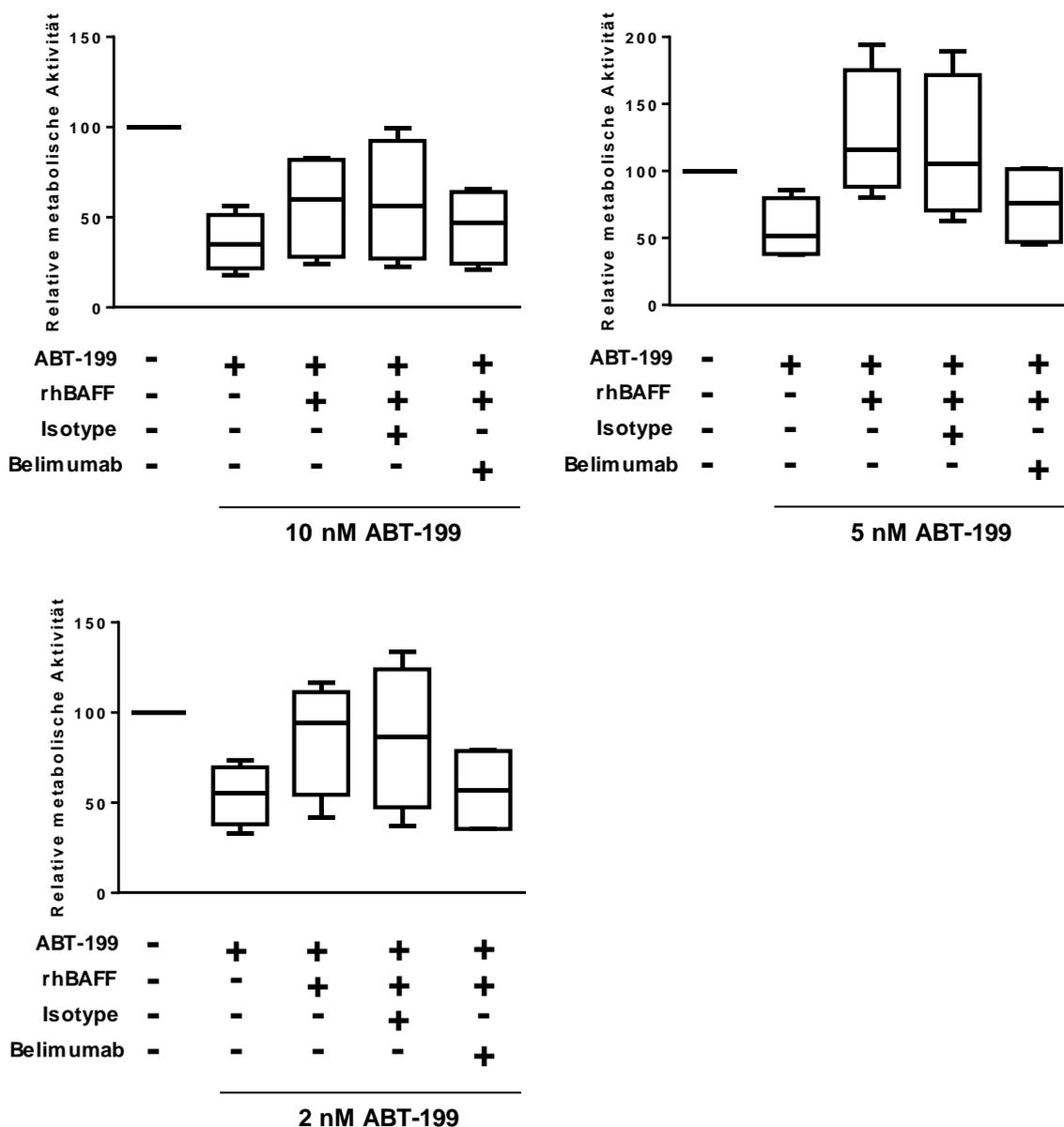


Abbildung 8: Einfluss einer BAFF-Neutralisation mit Belimumab auf die Sensitivität primärer CLL-Zellen für eine Behandlung mit ABT-199. PBMC von CLL-Patienten wurden unbehandelt belassen oder mit drei Konzentrationen ABT-199 (10, 5, 2 nM) inkubiert. Zusätzlich wurde (wie in der Abbildung gekennzeichnet) rhBAFF (500 ng/ml), Belimumab (10 µg/ml) oder eine Isotypkontrolle hinzugegeben. Nach 72 h wurde im WST-1 Assay die Stoffwechselaktivität bestimmt. Gezeigt sind kombinierte Daten vier verschiedener Patienten als relative metabolische Aktivität bezogen auf unbehandelte CLL-Zellen, welche in jedem individuellen Datensatz auf 100% gesetzt wurden.

4.3.2 Einfluss einer BAFF-Neutralisation mittels Belimumab auf den ABT-199-induzierten CLL-Zelltod

Schließlich sollte die Wirkung einer BAFF-Neutralisation mittels Belimumab auch anhand der Analyse der absoluten Anzahl lebender Zellen mithilfe der Durchflusszytometrie untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden primäre CLL-Zellen entweder unbehandelt belassen, oder mit BAFF in An- oder Abwesenheit von Belimumab oder einer Isotypkontrolle für 24 h vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen mit zwei Konzentrationen ABT-199 (2 und 10 nM) für weitere 24 h inkubiert. Erneut wurde die absolute Anzahl lebender CD5+/CD19+ CLL-Zellen durchflusszytometrisch mithilfe von Quantifizierungsbeads bestimmt. Tote CLL-Zellen wurden dabei unter Verwendung von 7-AAD identifiziert. Die Ergebnisse zeigten, dass Belimumab die ABT-199-vermittelte Reduktion lebender CLL-Zellen in der Behandlungsstufe von 10 nM ABT-199 ganz und bei 2 nM ABT-199 teilweise wiederherstellte (**Abbildung 9**).

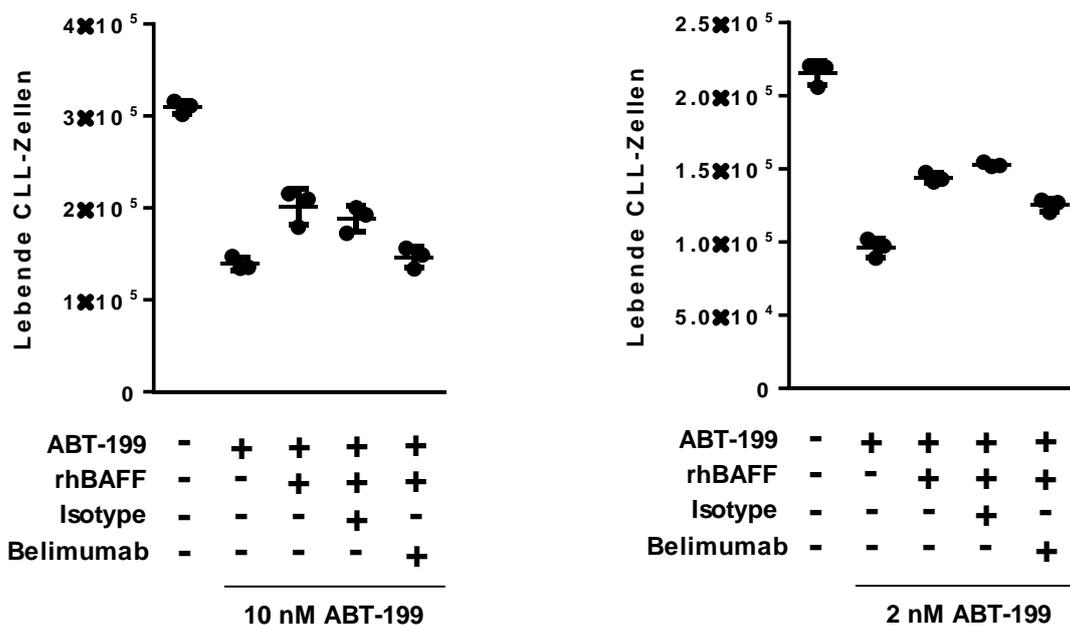


Abbildung 9: Einfluss einer BAFF-Neutralisation mittels Belimumab auf das Überleben primärer CLL-Zellen. PBMC eines CLL-Patienten wurden wie angegeben mit oder ohne rhBAFF (500 ng/ml), Belimumab (10 µg/ml) oder einer Isotypkontrolle für 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit ABT-199 (10, 2 nM) behandelt und für weitere 24 h kultiviert. Im FACS wurden die CLL-Zellen anschließend als CD19+/CD5+ selektiert und die absolute Zahl lebender CLL-Zellen mittels 7-AAD und Quantifizierungsbeads bestimmt. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis eines CLL-Patienten mit arithmetischem Mittel und Standardfehler aus Dreifachbestimmungen.

Zusammenfassend demonstrieren die vorliegenden Ergebnisse erstens, dass BAFF CLL-Zellen vor der Therapie mit ABT-199 schützt und zweitens, dass der Einsatz des BAFF-neutralisierenden Antikörpers Belimumab imstande ist, die Suszeptibilität der CLL-Zellen gegenüber der Therapie mit ABT-199 zu erhöhen.

5 Diskussion

Bis heute ist die CLL als häufigste Leukämieerkrankung des Erwachsenenalters durch medikamentöse Maßnahmen nicht kurativ behandelbar. Die Standardtherapie der CLL, bestehend aus Chemo- (Fludarabin/Cyclophosphamid) und Immuntherapie (Rituximab), ist aufgrund ihres ungünstigen Toxizitätsprofils und des hohen Alters vieler Patienten darüber hinaus oft keine Option. Vor allem in der Rezidivsituation und bei aggressiver CLL mit Verlust des Genabschnittes 17p waren die Therapieoptionen bis vor wenigen Jahren sehr begrenzt. Zu einem Paradigmenwechsel in der Behandlung der CLL führte im Jahr 2014 die Einführung einer neuen Gruppe zielgerichteter Therapeutika (*small-molecule inhibitors*). Ihr Erfolg beim Einsatz in der Zweitlinientherapie und bei del-17p könnte zukünftig sogar das Ende der Chemotherapie in der CLL-Behandlung herbeiführen.⁹⁸ Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand der neueste Vertreter dieser Medikamentenklasse: ABT-199, das im April 2016 in den USA zur Therapie vorbehandelter CLL mit del-17p zugelassen wurde. ABT-199 ist ein selektiver Inhibitor des antiapoptotischen Proteins BCL-2. In der CLL ist BCL-2 typischerweise hochreguliert und trägt als einer der *hallmarks of cancer* zur Resistenz der Tumorzellen gegenüber Apoptose bei.⁹⁹ Das Grundprinzip hinter ABT-199 ist damit die Wiederherstellung der natürlichen Apoptose-Fähigkeit von Tumorzellen. Zur Überprüfung der Wirksamkeit von ABT-199 und zur Identifizierung geeigneter Konzentrationen für die geplanten *in vitro* Versuche wurden zu Beginn dieser Arbeit Dosistitrationen durchgeführt und der Effekt auf die Stoffwechselaktivität von CLL-Zellen mittels WST-1 Assay untersucht. Der WST-1 Assay analysiert die Aktivität der Atmungskette und eignet sich daher gut zur Charakterisierung der Zytotoxizität einer Substanz. In den Titrationsversuchen zeigte sich den Erwartungen entsprechend bei allen untersuchten Spendern eine dosisabhängige Reduktion der Zellviabilität nach Behandlung mit ABT-199. Dies stimmt überein mit den Untersuchungen anderer Autoren, die bereits von einer hohen Empfänglichkeit von CLL-Zellen für ABT-199 berichteten.^{16, 96, 100} Ungeachtet der Effektivität von ABT-199 und anderer

zielgerichteter Therapeutika ist es wahrscheinlich, dass viele der behandelten CLL-Patienten (vergleichbar zur Chemotherapie) im Laufe der Zeit ein vermindertes Therapieansprechen zeigen, Resistenzen entwickeln und letztlich ein Rezidiv erleiden.⁴³ Die genauen Mechanismen, die zur Resistenz gegenüber ABT-199 in der CLL führen könnten, wurden jedoch bisher noch nicht beschrieben. Nach aktuellen Erkenntnissen der CLL-Forschung halten vor allem protektive Faktoren des die Tumorzellen umgebenden Mikromilieus die Krankheitsaktivität aufrecht und sorgen so für ein reduziertes Therapieansprechen.¹⁰¹ Eine besonders kritische Rolle spielt unter diesen Faktoren das TNF-Mitglied BAFF, da es einen entscheidenden Einfluss auf das Überleben von gesunden und malignen B Zellen besitzt und in der CLL interessanterweise sowohl von den Tumorzellen selbst als auch von NLCs und MVECs vermehrt exprimiert wird.^{91, 93, 94} Belimumab ist ein neutralisierender BAFF-Antikörper, der im Jahr 2011 zur Therapie des SLE zugelassen wurde. Von Wild et al. wurde bereits der Einsatz von Belimumab im Kontext der CLL untersucht und gezeigt, dass die Neutralisation von BAFF mittels Belimumab die Sensitivität von CLL-Zellen gegenüber der Rituximab-induzierten NK-Zellyse wiederherstellt.⁹⁵ An diese Ergebnisse knüpfte die vorliegende Arbeit an und stellte erstens die Frage, inwiefern die protektiven Effekte von BAFF auch im Rahmen der Behandlung mit ABT-199 zum Tragen kommen. Darauf aufbauend sollte zweitens untersucht werden, ob auch hier das Konzept einer Kombinationstherapie mit Belimumab einen Nutzen darstellt. In anderen Studien wurde bereits beobachtet, dass die Zugabe von exogenem BAFF CLL-Zellen vor der Behandlung mit Chlorambucil oder Flavopiridol schützt.^{90, 91} Tatsächlich konnte in dieser Arbeit im WST-1 Assay festgestellt werden, dass BAFF konzentrationsabhängig der zytotoxischen Wirkung von ABT-199 entgegenwirkt. Bestätigt wurde dieser protektive Effekt darüber hinaus in der FACS-Analyse über die Bestimmung der absoluten Anzahl lebender Zellen in der Probe. Hier schützte BAFF die CLL-Zellen vor dem ABT-199-induzierten Zelltod. Zur Interpretation dieser Beobachtungen könnten die Erkenntnisse von Woodland et al. hilfreich sein. Die Arbeitsgruppe stellte fest, dass BAFF in B Zellen die Expression des antiapoptotischen Proteins MCL-1 erhöht und dass interessanterweise unter Abwesenheit von MCL-1 kein BAFF-

abhängiges Überleben vermittelt wird.¹⁰² In den Beobachtungen von Kitada et al. zeigten CLL-Zellen mit hoher MCL-1 Expression außerdem eine verminderte Chemosensitivität gegenüber Fludarabin oder Chlorambucil.¹⁰³ Da MCL-1 nicht von ABT-199 angegriffen wird, könnte eine reaktive MCL-1-Hochregulation nach BAFF-Stimulation ein erklärender Mechanismus für das beobachtete, schlechte Therapieansprechen der CLL-Zellen gegenüber ABT-199 sein. Es ist jedoch wichtig zu beachten, dass BAFF über seine Aktivierung von NF- κ B noch viele weitere Mechanismen, die das Überleben der Zellen fördern und von Relevanz sein könnten, in Gang setzt. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde im zweiten Teil dieser Arbeit überprüft, ob die BAFF-vermittelte Resistenz durch Belimumab überwunden werden kann. Tatsächlich wurde in den weiteren Untersuchungen sowohl im WST-1 Assay als auch in der FACS-Analyse festgestellt, dass der Einsatz von Belimumab die Suszeptibilität von CLL-Zellen für die Behandlung mit ABT-199 wiederherstellt. Diese Daten stimmen nicht nur mit den Ergebnissen von Wild et al. überein, sie werden auch gestützt von einer Phase 1b klinischen Studie mit Atacicept, ein gegen BAFF und seinen nahen Verwandten APRIL gerichtetes TACI-Ig Fusionsprotein. CLL-Patienten, die mit hohen Dosen Atacicept behandelt wurden, erfuhren eine Stabilisierung der Erkrankung, während die Verwendung niedriger Dosierungen zu einer Progression führte.¹⁰⁴

Zusammengefasst liefert diese Arbeit Hinweise darauf, dass die Kombination von Belimumab und ABT-199 in der CLL-Therapie einen Vorteil gegenüber der alleinigen Therapie mit ABT-199 darstellen könnte. Um diese Schlussfolgerung jedoch genauer zu überprüfen, sind zukünftige klinische Studien notwendig. Dies ist nicht zuletzt deshalb wichtig, da die *in vitro* vorherrschenden Bedingungen nur begrenzt die Komplexität der physiologischen CLL abbilden können. Schwierigkeiten bei der Interpretation der präsentierten Ergebnisse könnten sich beispielsweise durch die Überlegung ergeben, dass die eingesetzten BAFF-Konzentrationen vermutlich höher sind, als die tatsächlichen, *in vivo* vorliegenden Konzentrationen. Dies könnte zu einer Überschätzung des beobachteten Einflusses von BAFF auf das Überleben von CLL-Zellen führen. Weiterhin ist zu erwähnen, dass trotz der kritischen Rolle von MCL-1 und BCL-2 in der CLL noch

einige weitere antiapoptotische Moleküle (u.a. BCL-XL, BCL-W) zu einer Therapieresistenz gegenüber der ABT-199-Behandlung beitragen könnten.^{43, 105} Ihre Hochregulation könnte durch den Einsatz von Belimumab nicht verhindert werden. Es kommt komplizierend hinzu, dass es neben BAFF noch zahlreiche weitere Faktoren und Mechanismen gibt, über die verschiedene Zelltypen des Mikromilieus die Krankheitsaktivität unterstützen.¹⁰¹ Hierzu zählen beispielsweise die Signalwege des BCR, bestimmte Chemokinrezeptoren oder Adhisionsmoleküle.¹⁰⁶ Sie alle gehören zu weiteren interessanten Angriffspunkten in der aktuellen CLL-Forschung. Den enormen Erkenntnisgewinnen der letzten Jahre ist es geschuldet, dass sich vor diesem Hintergrund derzeit viele Ansatzpunkte anbieten, um die Effektivität konventioneller oder neuer Behandlungsformen zu erhöhen. Diese Arbeit hat gezeigt, dass die Kombination von Belimumab und ABT-199 in der CLL-Therapie einen Nutzen darstellen könnte. Welchen Stellenwert die Inhibition von BAFF jedoch in Konkurrenz zu anderen therapeutischen Konzepten zukünftig einnehmen wird, kann erst mithilfe von Ergebnissen klinischer Studien hinreichend beurteilt werden. Diese befinden sich, basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit, gegenwärtig in Planung.

6 Literaturverzeichnis

1. Catovsky, D., H.K. Müller-Hermelink, and E. Ralfkiaer, T-cell prolymphocytic leukemia. *Who Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*, 2008: p. 270-271.
2. Rozman, C. and E. Montserrat, Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 1995. 333(16): p. 1052-7.
3. Howlader, N., et al. SEER Cancer Statistics Review. 1975-2013.
4. Scarfò, L., A.J.M. Ferreri, and P. Ghia, Chronic lymphocytic leukaemia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2016. 104: p. 169-182.
5. Zhang, S. and T.J. Kipps, The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Annu Rev Pathol*, 2014. 9: p. 103-18.
6. Shanafelt, T.D., et al., Monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL): biology, natural history and clinical management. *Leukemia*, 2010. 24(3): p. 512-20.
7. Rawstron, A.C., et al., Monoclonal B-Cell Lymphocytosis and Chronic Lymphocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 2008. 359(6): p. 575-583.
8. Klein, U., et al., Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med*, 2001. 194(11): p. 1625-38.
9. Gaidano, G., R. Foa, and R. Dalla-Favera, Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest*, 2012. 122(10): p. 3432-8.
10. Damle, R.N., et al., Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 1999. 94(6): p. 1840-7.
11. Dighiero, G., CLL biology and prognosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2005: p. 278-84.
12. Choudhary, G.S., et al., MCL-1 and BCL-xL-dependent resistance to the BCL-2 inhibitor ABT-199 can be overcome by preventing PI3K/AKT/mTOR activation in lymphoid malignancies. *Cell Death Dis*, 2015. 6: p. e1593.
13. Dyer, M.J., et al., BCL2 translocations in leukemias of mature B cells. *Blood*, 1994. 83(12): p. 3682-8.

14. Calin, G.A., et al., MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. 105(13): p. 5166-71.
15. Cimmino, A., et al., miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(39): p. 13944-9.
16. Khaw, S.L., et al., Both leukaemic and normal peripheral B lymphoid cells are highly sensitive to the selective pharmacological inhibition of prosurvival Bcl-2 with ABT-199. *Leukemia*, 2014. 28(6): p. 1207-15.
17. Dameshek, W., Chronic lymphocytic leukemia--an accumulative disease of immunologically incompetent lymphocytes. *Blood*, 1967. 29(4): p. Suppl:566-84.
18. Messmer, B.T., et al., In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Journal of Clinical Investigation*, 2005. 115(3): p. 755-764.
19. Herishanu, Y., et al., The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 2011. 117(2): p. 563-74.
20. Opezzo, P. and G. Dighiero, "Role of the B-cell receptor and the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia". *Blood Cancer J*, 2013. 3: p. e149.
21. ten Hacken, E. and J.A. Burger, Molecular pathways: targeting the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia--focus on the B-cell receptor. *Clin Cancer Res*, 2014. 20(3): p. 548-56.
22. Parikh, S.A., N.E. Kay, and T.D. Shanafelt, How we treat Richter syndrome. *Blood*, 2014. 123(11): p. 1647-1657.
23. Hallek, M., et al., Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*, 2008. 111(12): p. 5446-56.
24. Binet, J.L., et al., A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*, 1981. 48(1): p. 198-206.
25. Rai, K.R., et al., Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 1975. 46(2): p. 219-34.
26. Butler, T. and J.G. Gribben, Biologic and clinical significance of molecular profiling in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood Rev*, 2010. 24(3): p. 135-41.

27. Orchard, J.A., et al., ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet*, 2004. 363(9403): p. 105-11.
28. Rassenti, L.Z., et al., ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 2004. 351(9): p. 893-901.
29. Ibrahim, S., et al., CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 2001. 98(1): p. 181-6.
30. Dohner, H., et al., Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 2000. 343(26): p. 1910-6.
31. Dohner, H., et al., p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood*, 1995. 85(6): p. 1580-9.
32. el Rouby, S., et al., p53 gene mutation in B-cell chronic lymphocytic leukemia is associated with drug resistance and is independent of MDR1/MDR3 gene expression. *Blood*, 1993. 82(11): p. 3452-9.
33. Hallek, M., et al., Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet*, 2010. 376(9747): p. 1164-1174.
34. Eichhorst, B., et al., First-line chemoimmunotherapy with bendamustine and rituximab versus fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab in patients with advanced chronic lymphocytic leukaemia (CLL10): an international, open-label, randomised, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet Oncol*, 2016. 17(7): p. 928-42.
35. Fischer, K., et al., Bendamustine in combination with rituximab for previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia: a multicenter phase II trial of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *J Clin Oncol*, 2012. 30(26): p. 3209-16.
36. Goede, V., et al., Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. *N Engl J Med*, 2014. 370(12): p. 1101-10.
37. Laurenti, L., et al., New developments in the management of chronic lymphocytic leukemia: role of ofatumumab. *Onco Targets Ther*, 2016. 9: p. 421-9.
38. Sanford, D.S., et al., Three newly approved drugs for chronic lymphocytic leukemia: incorporating ibrutinib, idelalisib, and obinutuzumab into clinical practice. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 2015. 15(7): p. 385-91.
39. Lamanna, N., New oral small molecules in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*, 2015. 121(12): p. 1917-26.

40. Byrd, J.C., et al., Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 2013. 369(1): p. 32-42.
41. Del Gaizo Moore, V., et al., Chronic lymphocytic leukemia requires BCL2 to sequester prodeath BIM, explaining sensitivity to BCL2 antagonist ABT-737. *J Clin Invest*, 2007. 117(1): p. 112-21.
42. Roberts, A.W., et al., Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*, 2016. 374(4): p. 311-22.
43. Woyach, J.A. and A.J. Johnson, Targeted therapies in CLL: mechanisms of resistance and strategies for management. *Blood*, 2015. 126(4): p. 471-7.
44. Youle, R.J. and A. Strasser, The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. 9(1): p. 47-59.
45. Hehlgans, T. and K. Pfeffer, The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology*, 2005. 115(1): p. 1-20.
46. Carswell, E.A., et al., An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1975. 72(9): p. 3666-3670.
47. Ware, C.F., The TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2003. 14(3-4): p. 181-4.
48. Bodmer, J.L., P. Schneider, and J. Tschopp, The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem Sci*, 2002. 27(1): p. 19-26.
49. Wajant, H., M. Grell, and P. Scheurich, TNF receptor associated factors in cytokine signaling. *Cytokine Growth Factor Rev*, 1999. 10(1): p. 15-26.
50. Fesik, S.W., Insights into programmed cell death through structural biology. *Cell*, 2000. 103(2): p. 273-82.
51. Locksley, R.M., N. Killeen, and M.J. Lenardo, The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, 2001. 104(4): p. 487-501.
52. Gaur, U. and B.B. Aggarwal, Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochemical Pharmacology*, 2003. 66(8): p. 1403-1408.
53. Aggarwal, B.B., Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*, 2003. 3(9): p. 745-56.
54. Garg, A. and B.B. Aggarwal, Nuclear transcription factor-kappaB as a target for cancer drug development. *Leukemia*, 2002. 16(6): p. 1053-68.

55. Schneider, P., et al., BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. *J Exp Med*, 1999. 189(11): p. 1747-56.
56. Moore, P.A., et al., BLyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator. *Science*, 1999. 285(5425): p. 260-3.
57. Litinskiy, M.B., et al., DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL. *Nat Immunol*, 2002. 3(9): p. 822-9.
58. Mackay, F., et al., Mice Transgenic for Baff Develop Lymphocytic Disorders along with Autoimmune Manifestations. *The Journal of Experimental Medicine*, 1999. 190(11): p. 1697-1710.
59. Mackay, F. and P. Schneider, Cracking the BAFF code. *Nat Rev Immunol*, 2009. 9(7): p. 491-502.
60. Mackay, F. and H. Leung, The role of the BAFF/APRIL system on T cell function. *Semin Immunol*, 2006. 18(5): p. 284-9.
61. Chu, V.T., et al., In vitro and in vivo activation induces BAFF and APRIL expression in B cells. *J Immunol*, 2007. 179(9): p. 5947-57.
62. Vincent, F.B., et al., The BAFF/APRIL system: emerging functions beyond B cell biology and autoimmunity. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2013. 24(3): p. 203-15.
63. Bossen, C. and P. Schneider, BAFF, APRIL and their receptors: structure, function and signaling. *Semin Immunol*, 2006. 18(5): p. 263-75.
64. Treml, J.F., et al., The BLyS Family: Toward a Molecular Understanding of B Cell Homeostasis. *Cell biochemistry and biophysics*, 2009. 53(1): p. 1-16.
65. Mackay, F., et al., B-cell stage and context-dependent requirements for survival signals from BAFF and the B-cell receptor. *Immunol Rev*, 2010. 237(1): p. 205-25.
66. Batten, M., et al., BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes. *J Exp Med*, 2000. 192(10): p. 1453-66.
67. Schiemann, B., et al., An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. *Science*, 2001. 293(5537): p. 2111-4.
68. Darce, J.R., et al., Regulated expression of BAFF-binding receptors during human B cell differentiation. *J Immunol*, 2007. 179(11): p. 7276-86.

69. Yan, M., et al., Activation and accumulation of B cells in TACI-deficient mice. *Nat Immunol*, 2001. 2(7): p. 638-43.
70. Seshasayee, D., et al., Loss of TACI causes fatal lymphoproliferation and autoimmunity, establishing TACI as an inhibitory BlyS receptor. *Immunity*, 2003. 18(2): p. 279-88.
71. Lied, G.A. and A. Berstad, Functional and clinical aspects of the B-cell-activating factor (BAFF): a narrative review. *Scand J Immunol*, 2011. 73(1): p. 1-7.
72. Avery, D.T., et al., BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells. *J Clin Invest*, 2003. 112(2): p. 286-97.
73. Day, E.S., et al., Selectivity of BAFF/BlyS and APRIL for binding to the TNF family receptors BAFFR/BR3 and BCMA. *Biochemistry*, 2005. 44(6): p. 1919-31.
74. Dillon, S.R., et al., An APRIL to remember: novel TNF ligands as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov*, 2006. 5(3): p. 235-46.
75. Bossen, C., et al., TACI, unlike BAFF-R, is solely activated by oligomeric BAFF and APRIL to support survival of activated B cells and plasmablasts. *Blood*, 2008. 111(3): p. 1004-12.
76. Belnoue, E., et al., APRIL is critical for plasmablast survival in the bone marrow and poorly expressed by early-life bone marrow stromal cells. *Blood*, 2008. 111(5): p. 2755-64.
77. Yu, G., et al., APRIL and TALL-1 and receptors BCMA and TACI: system for regulating humoral immunity. *Nat Immunol*, 2000. 1(3): p. 252-6.
78. Mackay, F., et al., The BAFF/APRIL system: an important player in systemic rheumatic diseases. *Curr Dir Autoimmun*, 2005. 8: p. 243-65.
79. Stohl, W., B lymphocyte stimulator protein levels in systemic lupus erythematosus and other diseases. *Curr Rheumatol Rep*, 2002. 4(4): p. 345-50.
80. Cheema, G.S., et al., Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. *Arthritis Rheum*, 2001. 44(6): p. 1313-9.
81. Mariette, X., et al., The level of BlyS (BAFF) correlates with the titre of autoantibodies in human Sjögren's syndrome. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2003. 62(2): p. 168-171.
82. Groom, J.R., et al., BAFF and MyD88 signals promote a lupuslike disease independent of T cells. *J Exp Med*, 2007. 204(8): p. 1959-71.

83. Petri, M., et al., Association of plasma B lymphocyte stimulator levels and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 2008. 58(8): p. 2453-9.
84. Dennis, G.J., Belimumab: a BLyS-specific inhibitor for the treatment of systemic lupus erythematosus. *Clin Pharmacol Ther*, 2012. 91(1): p. 143-9.
85. Baker, K.P., et al., Generation and characterization of LymphoStat-B, a human monoclonal antibody that antagonizes the bioactivities of B lymphocyte stimulator. *Arthritis Rheum*, 2003. 48(11): p. 3253-65.
86. Mackay, F. and S.G. Tangye, The role of the BAFF/APRIL system in B cell homeostasis and lymphoid cancers. *Curr Opin Pharmacol*, 2004. 4(4): p. 347-54.
87. Wang, P., et al. BlyS: a potential hallmark of multiple myeloma. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 2013. 18, 324-331 DOI: 10.2741/4103.
88. Alexandrakis, M.G., et al., Relationship between circulating BAFF serum levels with proliferating markers in patients with multiple myeloma. *Biomed Res Int*, 2013. 2013: p. 389579.
89. Novak, A.J., et al., Expression of BLyS and its receptors in B-cell non-Hodgkin lymphoma: correlation with disease activity and patient outcome. *Blood*, 2004. 104(8): p. 2247-53.
90. Novak, A.J., et al., Aberrant expression of B-lymphocyte stimulator by B chronic lymphocytic leukemia cells: a mechanism for survival. *Blood*, 2002. 100(8): p. 2973-9.
91. Kern, C., et al., Involvement of BAFF and APRIL in the resistance to apoptosis of B-CLL through an autocrine pathway. *Blood*, 2004. 103(2): p. 679-88.
92. Zhang, W., et al., B-cell activating factor and v-Myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (c-Myc) influence progression of chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. 107(44): p. 18956-60.
93. Nishio, M., et al., Nurselike cells express BAFF and APRIL, which can promote survival of chronic lymphocytic leukemia cells via a paracrine pathway distinct from that of SDF-1alpha. *Blood*, 2005. 106(3): p. 1012-20.
94. Cols, M., et al., Stromal endothelial cells establish a bidirectional crosstalk with chronic lymphocytic leukemia cells through the TNF-related factors BAFF, APRIL, and CD40L. *J Immunol*, 2012. 188(12): p. 6071-83.

95. Wild, J., et al., Neutralization of (NK-cell-derived) B-cell activating factor by Belimumab restores sensitivity of chronic lymphoid leukemia cells to direct and Rituximab-induced NK lysis. *Leukemia*, 2015. 29(8): p. 1676-83.
96. Souers, A.J., et al., ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat Med*, 2013. 19(2): p. 202-8.
97. Wild, J., Rolle des TNF-Familienmitgliedes BAFF und seiner Neutralisation durch Belimumab für die Suszeptibilität von CLL-Zellen gegenüber NK-Zellyse und Systemtherapie. 2016, *Dissertation Universität Tübingen*.
98. Cheson, B.D., CLL and NHL: the end of chemotherapy? *Blood*, 2014. 123(22): p. 3368-70.
99. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011. 144(5): p. 646-74.
100. Cang, S., et al., ABT-199 (venetoclax) and BCL-2 inhibitors in clinical development. *J Hematol Oncol*, 2015. 8: p. 129.
101. Burger, J.A., Nurture versus nature: the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2011. 2011: p. 96-103.
102. Woodland, R.T., et al., Multiple signaling pathways promote B lymphocyte stimulator dependent B-cell growth and survival. *Blood*, 2008. 111(2): p. 750-60.
103. Kitada, S., et al., Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with In vitro and In vivo chemoresponses. *Blood*, 1998. 91(9): p. 3379-89.
104. Kofler, D.M., et al., Phase 1b trial of atacicept, a recombinant protein binding BLyS and APRIL, in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 2012. 26(4): p. 841-4.
105. Gandhi, V., K. Balakrishnan, and L.S. Chen, Mcl-1: the 1 in CLL. *Blood*, 2008. 112(9): p. 3538-40.
106. Burger, J.A. and J.G. Gribben, The microenvironment in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and other B cell malignancies: insight into disease biology and new targeted therapies. *Semin Cancer Biol*, 2014. 24: p. 71-81.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

APRIL	<i>a proliferation inducing ligand</i>
BAFF	<i>B cell activating factor</i>
BAFFR	<i>BAFF receptor</i>
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCMA	<i>B cell maturation antigen</i>
BCR	<i>B-cell receptor</i>
BR	Bendamustin/Rituximab
BTK	Bruton-Tyrosin Kinase
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CLL	Chronisch Lymphatische Leukämie
CRD	Cystein-reiche Domäne (<i>cysteine-rich domain</i>)
CSR	<i>Class-switch recombination</i>
DC	Dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
DD	Todesdomäne (<i>death domain</i>)
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FC	Fludarabin/Cyclophosphamid
FCR	Fludarabin/Cyclophosphamid/Rituximab
Ig	Immunglobulin
IgVH	<i>Immunoglobulin heavy-chain variable-region gene</i>
LK	Lymphknoten
MM	Multiplere Myelom
MVEC	Mikrovaskuläre Endothelzelle
MBL	Mononukleäre B-Lymphozytose
NF-κB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NLC	Nurse-like Cells

NLR	Nicht-lineare Regressionsanalyse
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PI3K δ	Phosphatidylinositol-3-Kinase delta
RT	Raumtemperatur
rh	recombinant human
SLE	Systemischer Lupus Erythematoses
SLL	<i>small lymphocytic lymphoma</i>
TACI	<i>transmembrane activator and CAML interactor</i>
THD	<i>TNF homology domain</i>
TIM	<i>TRAF interacting motif</i>
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNFR	Tumor-Nekrose Faktor Rezeptor
TRAF	<i>TNF-receptor associated factor</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>
7-AAD	<i>7-Amino-Actinomycin</i>

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadieneinteilung der CLL nach Binet, 1981. ²⁴	9
Tabelle 2: Stadieneinteilung der CLL nach Rai, 1975. ²⁵	9
Tabelle 3: Berechnung der Anzahl lebender CLL-Zellen in der FACS-Probe...	24

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Dosistitration von ABT-199 mit primären CLL-Zellen im WST-1 ..	25
Abbildung 2: Bestimmung der LC ₅₀ von ABT-199 in vitro.....	26
Abbildung 3: Einfluss von ABT-199 auf die Aktivität der Caspasen 3 und 7 von CLL-Zellen	27
Abbildung 4: Einfluss von BAFF auf die Stoffwechselaktivität primärer CLL-Zellen.....	28
Abbildung 5: Einfluss von BAFF auf die Suszeptibilität von CLL-Zellen für eine Behandlung mit ABT-199.....	29
Abbildung 6: Einfluss von BAFF auf den ABT-199-vermittelten Zelltod primärer CLL-Zellen	30
Abbildung 7: Einfluss einer BAFF-Neutralisation mittels Belimumab auf die Stoffwechselaktivität primärer CLL-Zellen.....	31
Abbildung 8: Einfluss einer BAFF-Neutralisation mit Belimumab auf die Sensitivität primärer CLL-Zellen für eine Behandlung mit ABT-199.....	33
Abbildung 9: Einfluss einer BAFF-Neutralisation mittels Belimumab auf das Überleben primärer CLL-Zellen	34

7.4 Erklärung zum Eigenanteil

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

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

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Frau Dr. Julia Wild von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Einarbeitung durch Frau Dr. Julia Wild eigenständig durch mich.

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

Tübingen, den

7.5 Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum und -ort: 15.01.1991 in Malsch

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung

03/2014 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 1,5)

Seit 04/2012 Studium der Humanmedizin an der Universität Tübingen

09/2011 - 01/2012 Studium der Politikwissenschaften in Mannheim

09/2001 - 07/2010 Wilhelm-Hausenstein-Gymnasium in Durmersheim

06/2010 Allgemeine Hochschulreife am Wilhelm-Hausenstein-Gymnasium Durmersheim (Note 1,1)

Berufliche Erfahrungen

09/2016 - 10/2016 Famulatur am Städtischen Klinikum Karlsruhe (Kinderklinik)

02/2016 - 03/2016 Famulatur in der Neurologie am ZKM Karlsruhe

03/2015 - 10/2015 Freisemester als Doktorand in der Abteilung „Klinische Kooperationseinheit Translationale Immunologie“ des Deutschen Konsortiums für Translationale Krebsforschung (DKTK) am Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) am Partnerstandort Tübingen in der Medizinische Klinik II unter Betreuung von Prof. Dr. Helmut R. Salih

09/2014 - 10/2014 Famulatur am Universitätsklinikum Tübingen (Kardiologie)

03/2013 - 04/2013 Pflegepraktikum an den St. Vincentius-Kliniken Karlsruhe (Unfallchirurgie)

08/2012 - 09/2012	Pflegepraktikum am Städtischen Klinikum Karlsruhe (Gefäßchirurgie)
03/2012 - 04/2012	Pflegepraktikum am Universitätsklinikum Mannheim (Strahlentherapie)
09/2010 - 05/2011	Zivildienstleistender im Bereich Rettungsdienst/ Krankentransport beim DRK-Kreisverband Rastatt e.V.
09/2010	Ausbildung zum Rettungshelfer an der Landesrettungsschule Bühl

Auszeichnungen

10/2015	Abstract Achievement Award, ASH Meeting 2015
04/2015 - 09/2015	MD Scholarship Holder der Integrated Research Training Group (IRTG) beim SFB685 Tübingen
03/2014	HOBBIT-Urkunde des physiologischen Instituts Tübingen
06/2010	e-fellows.net Online-Stipendium für herausragende Leistungen
05/2010	1. Kyu-Grad im Judo (brauner Gürtel)

Sprachkenntnisse

Englisch	sehr gut
	04/2014 - 07/2014: Medical English (B2/C1) Kurs des D.A.I.-Tübingen
Spanisch	gut
Französisch	gut

Engagement

04/2016 – 07/2016	Tutorenstelle im DocLab Tübingen für die Kurse „Basiskurs“ und „FamFit“ der Inneren Medizin
10/2014 - 12/2014	Tutorenstelle im Kursus der Makroskopischen Anatomie am Anatomischen Institut Tübingen

01/2013 - 02/2014	Tutorenstelle im Rahmen des HOBBIT-Programms des Instituts für Physiologie
10/2013 - 12/2014	Tutorenstelle im Kursus der Makroskopischen Anatomie am Anatomischen Institut Tübingen
01/2000 - 12/2014	aktives Mitglied beim Judo-Club Elchesheim-Illingen e.V. 1997, darunter Trainerassistenz im Bereich der Gruppen mit geistiger und/ oder körperlicher Behinderung, ADS/ADHS und Gehörlosigkeit
08/2010 - 09/2011	Gitarrenunterricht (verschiedene Kurse)
05/2008 - 09/2011	Nachhilfeunterricht in den Fächern Mathematik, Englisch und Französisch
09/2008 - 06/2010	Jahrgangsstufensprecher am WHG

Kongressteilnahmen

12/2015	Poster bei der Jahresversammlung der „American Society of Hematology“ in Orlando, FL, USA
---------	--