

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und
klinische Immunologie der
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

CD22-gerichtete Therapie inhibiert die Signaltransduktion und
den Ca^{2+} -Fluss in humanen B-Lymphozyten

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Nadine Sieger

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Th. Dörner
 2. Prof. Dr. H.-P. Brezinschek
 3. Prof. Dr. med. H.-P. Tony

Datum der Promotion: 30.11.2012

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
1 Einleitung	6
1.1 B-Lymphozyten	7
1.1.1 Rolle der B-Lymphozyten in der erworbenen Immunantwort	7
1.1.2 Entwicklung der B-Lymphozyten	8
1.1.3 B-Lymphozyten und Autoimmunität	10
1.1.4 Systemische Autoimmunität und Autoimmunerkrankung	11
1.2 Signaltransduktion über den B-Zell-Rezeptor	13
1.2.1 B-Zell-Antigen-Rezeptor	14
1.2.2 Signalinitiierung und -fortleitung	16
1.2.3 Signalmodulation	19
1.3 Humanisierter monoklonaler CD22-Antikörper Epratuzumab	21
2 Zielsetzung	23
3 Material und Methoden	24
3.1 BCR-Stimulation humaner B-Lymphozyten unter Einfluss von Epratuzumab	24
3.1.1 Prinzip der Durchflusszytometrie	24
3.1.2 Isolierung mononukleärer Zellen (PBMCs) des peripheres Blutes	26
3.1.3 Analyse der CD22-Expression und Epratuzumab-Bindung an B-Lymphozyten..	27
3.1.4 BCR-Stimulation und Färbung von p-Syk	27
3.2 Analyse der basalen Syk und p-Syk (Y348)-Expression in B-Lymphozyten	30
3.3 Phosphorylierungskinetik von Syk und PLC- γ 2 unter BCR-Stimulation	31
3.4 Intrazelluläre Ca ²⁺ -Antwort in B-Lymphozyten	31
3.5 Kultivierung und BCR-Stimulation der B-Zell-NHL-Zelllinie Ramos	32
3.5.1 Zellkultivierung	32
3.5.2 Analyse der CD22-Oberflächenexpression auf Ramos-Zellen	33
3.5.3 BCR-Stimulation und intrazelluläre Färbung von p-Syk (Y348)	33
3.5.4 Testung des Einflusses von Epratuzumab auf die BCR-Signaltransduktion in Ramos-Zellen	35
3.6 Statistische Auswertung	35
3.7 Liste der eingesetzten Materialien	36
3.8 Zelllinie Ramos und Probanden	37
4 Ergebnisse	38
4.1 CD22-Ligation durch Epratuzumab inhibiert die Signaltransduktion unter BCR-Stimulation	38

4.1.1	BCR-Stimulation induziert ein intrazelluläres Rezeptorsignal	38
4.1.2	CD22-Ligation durch Epratuzumab inhibiert die Phosphorylierung von Syk nach BCR-Stimulation	40
4.1.3	Epratuzumab zeigt eine stärkere Bindung an naive CD27 ⁻ im Vergleich zu CD27 ⁺ B-Lymphozyten basierend auf der Expression von CD22.....	44
4.1.4	CD22-Ligation inhibiert die Phosphorylierung von Syk in der CD27 ⁻ und CD27 ⁺ Population der B-Lymphozyten	46
4.1.5	Syk ist höher in CD27 ⁺ als in CD27 ⁻ B-Zellen exprimiert.....	49
4.2	Die Inhibition der Syk-Phosphorylierung erfolgt unabhängig vom Fc-Fragment von Epratuzumab	50
4.3	Syk und PLC- γ 2 haben ein Aktivierungsmaximum nach 2-5 Minuten BCR-Stimulation	53
4.4	F(ab [‘]) ₂ -Epratuzumab inhibiert den BCR-induzierten intrazellulären Langzeit-Ca ²⁺ -Anstieg	55
4.5	Epratuzumab zeigt keinen Effekt auf die Syk-Phosphorylierung der humanen NHL-Zelllinie Ramos.....	57
4.5.1	BCR-Stimulation induziert eine Syk-Aktivierung in Ramos-Zellen.....	57
4.5.2	CD22-Expression auf Ramos	58
4.5.3	Epratuzumab induziert keinen inhibitorischen Effekt in der Ramos-Zelllinie	59
5	Diskussion	61
5.1	Untersuchungen zur Phosphorylierung von Syk	61
5.2	Inhibition des BCR-Signals nach CD22-Bindung durch Epratuzumab	64
5.3	BCR-Signalmodulation nach CD22-Ligation durch Epratuzumab innerhalb der CD27 ⁻ und CD27 ⁺ B-Zellpopulationen	66
5.4	Keine Inhibition des BCR-Signals via CD22 in der humanen Burkitt-Lymphom-Zelllinie Ramos.....	68
6	Zusammenfassung	71
7	Literaturverzeichnis	72
	Lebenslauf.....	77
	Publikationsliste	78
	Danksagung	79
	Eidesstattliche Erklärung.....	80

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
CD	cluster of differentiation; Differenzierungsmarker
BCR	B-Zell-Rezeptor
BSA	bovines Serumalbumin
Btk	Bruton´s tyrosine kinase
Blk	B lymphocyte tyrosine kinase
DAG	Diacylglycerol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRFZ	Deutsches Rheuma-Forschungszentrum
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Emab	Epratuzumab
ERK	extracellular signal-related kinase
Fab	fragment antigen binding
F(ab´) ₂	aus zwei Fab-Fragmenten aufgebaut, nach enzymatischer Spaltung eines Antikörpers gewonnen
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
Fc	fragment cristallizable
FCS	fetales Kälberserum
FDC	follikuläre dendritische Zelle
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FSC	forward light scatter; Vorwärtsstreulicht. „H“ in FSC-H entspricht „height“, „A“ in FSC-A entspricht „area“, entsprechendes gilt für SSC-H und –A
HD	healthy donor; gesunder Spender
hIgG ₁	humanes Immunglobulin G ₁
Ig	Immunglobulin
Indo-1 AM	Indo-1 acetoxymethyl
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM	immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
IvIg	intravenöses Immunglobulin
JNK	c-jun NH ₂ -terminal kinase
lpr	lymphoproliferativ
Kap.	Kapitel
MAPK	mitogen-activated protein tyrosine kinase
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
ns	nicht signifikant
PBMC	peripheral blood mononuclear cells; mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PeCy7	Phycoerythrin Cyanin 7
PerCp	Peridinin Chlorophyll-a Protein
PH	Pleckstrin-Homologie
PKC	Proteinkinase C
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PLC-γ2	Phospholipase C-γ2
p-Syk (Y348)	phosphoryliertes Syk an Tyrosinrest 348
PtdInsP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
rcf	relative Zentrifugalbeschleunigung
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	entspr. Roswell Park Memorial Institute, Ort der Erstentwicklung
SD	Standardabweichung
SH2	Src-homology 2
SHP-1	Src-homology phosphatase-1
SHIP	SH2-domain-containing inositol-5-phosphatase
Siglec	sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin
SLE	systemischer Lupus erythematodes
Src	sarcoma
SSC	sideward light scatter; Seitwärtsstreulicht
Syk	spleen tyrosine kinase

1 Einleitung

Monoklonale Antikörper, welche spezifisch gegen Oberflächenmoleküle der B-Zell-Reihe gerichtet sind, haben in der Therapie von B-Zell-Lymphomen und verschiedenen Autoimmunerkrankungen ihre Wirksamkeit bei akzeptablen Sicherheitsprofilen gezeigt. Im Jahre 1997 erteilte die Food and Drug Administration (FDA) in den USA die Genehmigung für den ersten therapeutischen Antikörper in der Behandlung von B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen, Rituximab. Dieser Antikörper richtet sich hochselektiv gegen den Zelloberflächenmarker CD20, der auf B-Lymphozyten und den meisten B-Zell-Lymphomen exprimiert wird. Er führt zur vollständigen B-Zelldepletion im peripheren Blut für circa 6-8 Monate bei offensichtlich unvollständiger Gewebedepletion. Rituximab wurde nach erfolgreichen klinischen Entwicklungsstudien im Jahre 2006 für die Therapie der rheumatoiden Arthritis nach Versagen von TNF-Blockern zugelassen.¹ Auch bei anderen Autoimmunerkrankungen konnte Rituximab bei Therapieversagen gegen konventionelle Therapien eine Verbesserung der Krankheitsindizes erreichen.² Der Erfolg der selektiven Anti-CD20-Therapie in der Tumorbehandlung als auch bei der rheumatoiden Arthritis und schubförmig verlaufenden multiplen Sklerose³ hat in den letzten zehn Jahren den Fokus auf B-Zell-gerichtete Therapien gelenkt und der Rolle der B-Lymphozyten in der Pathogenese, Diagnostik und Therapie einer ganzen Reihe von Autoimmunerkrankungen eine neue Gewichtung gegeben.

Nach weiteren Therapien mit anderen als gegen CD20 gerichteten B-Zell-spezifischen Zielen wird in diesem Zusammenhang intensiv gesucht, nicht zuletzt mit dem Ziel, das Nutzen-Risiko-Profil zu verbessern. Epratuzumab ist ein therapeutischer Antikörper, der sich derzeit in klinischen Phase-III-Studien befindet. Er richtet sich gegen CD22 als einem weiteren B-Zell-spezifischen Molekül. Die Wirkung des Antikörpers ist nicht vollständig geklärt, jedoch induziert Epratuzumab kaum bzw. nur partiell B-Zell-Depletionen im Vergleich zu Rituximab. Der Antikörper entfaltet daher vor allem immunmodulatorische Wirkungen, die über einen intrazellulären Einfluss auf das B-Zell-Rezeptorsignal vermittelt zu werden scheinen. Robuste Daten liegen dazu jedoch für den Menschen nicht vor. Zirkulierende B-Zellen blieben unter dieser Therapie weitgehend erhalten, wobei deutliche Abfälle der naiven B-Zellen im peripheren Blut nachweisbar waren.⁴ In den vorliegenden Daten früher klinischer Studien weist Epratuzumab auf eine signifikante klinische Verbesserung beim systemischen Lupus erythematoses (SLE)⁵ und beim Sjögren-Syndrom⁶ sowie eine Reduktion der Tumormasse bei

Non-Hodgkin-Lymphomen hin.⁷ Die Aufklärung des genauen Wirkmechanismus dieses humanisierten monoklonalen Anti-CD22-Antikörpers, der nicht von primär B-Zell-depletierender Natur ist, liegt zusammen mit der Rolle von CD22 auf humanen B-Zellen gegenwärtig im Brennpunkt des Interesses.

1.1 B-Lymphozyten

1.1.1 Rolle der B-Lymphozyten in der erworbenen Immunantwort

Im Rahmen der Infektabwehr unterscheidet man zwei Arten der Immunität. Die angeborene und die erworbene oder auch spezifische Immunantwort. B- und T-Lymphozyten spielen eine wichtige Rolle in der erworbenen Immunantwort, weil sie in der Lage sind, sich über ihre individuellen Rezeptoren spezifisch gegen Pathogene zu richten. Das Eingreifen des erworbenen Immunsystems ist vor allem dann notwendig, wenn die an der angeborenen oder auch unspezifischen Immunantwort beteiligten Zellen, darunter Makrophagen, neutrophile Granulozyten und natürliche Killerzellen, nicht in der Lage sind, die Pathogene hinreichend aus dem Organismus zu beseitigen. B- und T-Lymphozyten haben dann die besondere Fähigkeit, Teile von Pathogenen, die sogenannten Antigene, mithilfe ihres Rezeptors zu erkennen und auf ihrer Oberfläche zu binden.

Die antigenerkennenden Moleküle der B-Zellen sind Immunglobuline, die einerseits als B-Zell-Antigen-Rezeptoren membranständig auf der Zelloberfläche exprimiert werden und andererseits als Antikörper von den terminal ausdifferenzierten B-Zellen - den Plasmazellen - sezerniert werden. Das Antigen-Rezeptorrepertoire eines Individuums, das heißt die Gesamtheit aller Rezeptorspezifitäten eines Individuums, ist dabei so vielfältig, dass nahezu jedes Antigen erkannt werden kann. Ein Mechanismus der zufälligen Genumlagerung innerhalb der DNA-Sequenz von Schwer- und Leichtketten-Loci, welche die antigenerkennende Region - die variablen Regionen des Immunglobulins - kodiert, bedingen einen Teil der außerordentlichen Diversität des Ig-Rezeptorrepertoires.

Ein B-Lymphozyt, dessen Rezeptor die Spezifität für ein bestimmtes Antigen hat, bindet dieses und kann in der Folge aktiviert werden und in die klonale Expansion eintreten, so dass viele Kopien seiner Spezies als Effektorzellen generiert werden. Das Resultat der Expansionsphase ist die Entstehung von antikörpersezernierenden Plasmazellen und B-Gedächtnis-Zellen. Ein Bestand an B-Gedächtnis-Zellen, der gegen ein bestimmtes Antigen gerichtet ist, trägt zum immunologischen Gedächtnis des Organismus bei. Bei erneutem Kontakt mit demselben, nun

bekanntem Antigen (Sekundärreaktion), kann eine schnellere und effektivere Generierung von gegen das Pathogen gerichteten Effektorzellen erfolgen, als dies beim Erstkontakt - der Primärantwort - der Fall war.

Die sezernierten Antikörper, Hauptbestandteile der humoralen, d. h. über die Körperflüssigkeiten vermittelten Immunabwehr, haben zwei wichtige Wirkmechanismen. Mittels der variablen (V-) Region erkennen und binden sie spezifisch Antigen. Die konstante (C-) Region dagegen ist für die Effektorfunktion und somit Eliminierung von Pathogenen verantwortlich. Zu diesem Zweck werden wiederum Zellen des unspezifischen Immunsystems hinzugezogen. Phagozyten binden mithilfe der sogenannten Fc-Rezeptoren an die C-Region von Antikörpern. Die „Markierung“ von Bakterien und Viren durch Antikörper kann also Makrophagen und neutrophile Granulozyten zum Abbau des Fremdkörpers anregen oder auch zu dessen Zerstörung durch Komplement führen. Als ein weiterer Mechanismus kann die bloße Bindung eines Antikörpers an einen Fremdkörper schon dessen Anheftung an die Zielzelle verhindern, was dann als Neutralisationsmechanismus bezeichnet wird.

1.1.2 Entwicklung der B-Lymphozyten

B-Lymphozyten entwickeln sich aus den hämatopoetischen Zellen des Knochenmarks oder der fetalen Leber, die alle Blutzellen hervorbringen.⁸ Das Knochenmark gehört zu den zentralen lymphatischen Geweben. Hier vollziehen die B-Zellen neben ihrer Differenzierung in der Milz einen Großteil ihrer Entwicklung, während T-Lymphozyten für diesen Zweck zum Thymus, einem anderen zentralen lymphatischen Organ, wandern. Über das Stadium der multipotenten Vorläuferzelle, die nicht mehr selbsterneuernd ist, differenziert sich die hämatopoetische Stammzelle zur gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzelle. Entscheidend für den Ablauf des Entwicklungsprogramms und die Festlegung der Zellart, die als Resultat entstehen soll, ist die Mikroumgebung des Knochenmarks. Stromazellen binden über Adhäsionsmoleküle die sich entwickelnden Lymphozyten an sich und produzieren Zytokine, die deren Werdegang bestimmen. Die Pro-B-Zelle, die aus der gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzelle hervorgeht, ist die erste Zelle der B-Linie und von diesem Stadium an wird ihr Schicksal als B-Lymphozyt definitiv bestimmt. Dieses beginnt mit der Expression des B-Zell-spezifischen Oberflächenmoleküls CD19.⁹ Die Expression eines weiteren B-Zell-Oberflächenmarkers, CD20, mit vermutlich der Funktion eines Calciumionenkanals beginnt im Prä-B-Zell-Stadium und durchzieht sämtliche Reifungsstadien der B-Zelle bis hin zum Verlust der CD20-Expression im

Plasmazellstadium.¹⁰ Die Stadien der von Fremdartigen unabhängigen B-Zell-Entwicklung sind folgende: Pro-B-Zelle, Prä-B-Zelle, unreife B-Zelle und reife B-Zelle. Essentiell für die Entwicklung zur B-Zelle ist ein funktionstüchtiger B-Zell-Rezeptor, der zunächst noch nicht membranständig ist und dessen Entwicklung mit der Umlagerung der Immunglobulingene (V-Genrearrangement) beginnt. Der Rezeptor besteht aus zwei identischen schweren und zwei leichten Proteinketten. Zunächst erfolgen Umlagerungen der Gene für die schwere Kette und schließlich für die leichte Kette. Ist diese VH-Genumlagerung erfolgreich abgeschlossen, so tritt die B-Zelle in die nächste Phase der Entwicklung ein. Im Stadium der Prä-B-Zelle werden kurzzeitig membrangebundene schwere Immunglobulinketten als Prä-B-Zell-Rezeptoren auf der Zelloberfläche exprimiert, die, wie auch später der B-Zell-Rezeptor, mit akzessorischen Ketten Iga und Igβ assoziiert sind und somit erstmalig eine Signalübertragung ins Zellinnere ermöglichen. Charakteristisch für das Stadium des unreifen B-Lymphozyten ist die Expression eines intakten B-Zell-Rezeptors auf der Oberfläche.⁸ Diese Zelle ist nun befähigt, über das Blut in die peripheren lymphatischen Gewebe, darunter Lymphknoten, Milz, Tonsillen und die lymphatischen Gewebe der Schleimhäute, auszuwandern. Dort entwickelt sich ein Teil von ihnen zu reifen naiven B-Zellen. Wesentlich ist hier offenbar eine Wanderung durch die Milz, die wichtige Faktoren für die weitere Differenzierung bereithält.

Reife B-Lymphozyten gelangen über den Blutstrom in verschiedene Körperregionen und kommen dadurch mit Antigenen in Kontakt. Nach spezifischer Bindung von Antigenen an den B-Zell-Rezeptor werden sie auf zwei verschiedene Arten aktiviert. Zum einen werden Aktivierungssignale vom B-Zell-Rezeptor selbst in das Zellinnere geleitet und zum anderen werden B-Zellen im Rahmen der sogenannten thymusabhängigen Immunantwort von T-Zellen aktiviert, die sich bereits nach Kontakt mit demselben Antigen differenziert haben müssen. Die B-Zellen wandern mit ihren assoziierten T-Zellen in einen primären Lymphfollikel der peripheren lymphatischen Gewebe aus. Eine thymusunabhängige, d. h. von T-Zell-Hilfe unabhängige Aktivierung der B-Zellen wird ebenfalls beobachtet. Ausgehend von primären Lymphfollikeln bilden aktivierte B-Lymphozyten sogenannte Keimzentren als Fokus ihrer Zellteilung.

B-Zellen, welche die Keimzentrumsreaktion durchlaufen, erfahren zwei verschiedene Modifikationen der DNA: Die somatische Hypermutation der variablen Bereiche der Ig-Leicht- und Schwereketten, aus der gegenüber dem Antigen noch affinere B-Lymphozyten hervorgehen, und den Ig-Klassenwechsel. Alle naiven B-Zellen, d. h. B-Zellen, die noch nicht mit Antigenen in Kontakt gekommen sind, produzieren auf ihrer Oberfläche IgM.¹¹ Dieser Isotyp betrifft lediglich die C-Region, d. h. die Effektorfunktion des Immunglobulins. Als weiteres Resultat der

Keimzentrumsreaktion erfolgt die genetische Rekombination des konstanten Teils mit dem Wechsel von IgM zu IgG, IgA oder IgE.

B-Zellen der Keimzentrumsreaktion können zu antikörperproduzierenden Plasmazellen oder B-Gedächtnis-Zellen ausdifferenzieren. Letztere sind kaum zur Antikörperproduktion befähigt. Sie übernehmen das genetische Resultat der somatischen Hypermutation und die Genumlagerung des Klassenwechsels, die ihren Vorläuferzellen während der Keimzentrumsreaktion widerfahren ist. Ihre Aufgabe ist es, bei erneutem Befall mit dem bekannten Krankheitserreger im Rahmen einer sekundären Immunantwort schnell antigenspezifisch Antikörper zu sezernieren.

1.1.3 B-Lymphozyten und Autoimmunität

Die Tatsache, dass die Vorstufen der B- und T-Lymphozyten zunächst unabhängig von Antigenaktivierung durch einen zufallsgesteuerten Rekombinationsprozess ihre Bindungsrezeptoren generieren, macht es unausweichlich, dass potentiell auch solche entstehen, die körpereigene Antigene erkennen.

Nachdem sich der B-Lymphozyt im Knochenmark von der hämatopoetischen Stammzelle zur unreifen B-Zelle entwickelt hat, erfolgt das erste Mal eine Prüfung des Antigenrezeptors auf Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen (zentrale Toleranz-Checkpunkte). Das Stadium der unreifen B-Zelle ist auch jenes, in dem der Antigenrezeptor das erste Mal in Form von IgM auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Binden unreife B-Zellen Antigen, das körpereigen ist, so bezeichnet man sie als autoreaktiv und die möglichen Konsequenzen sind folgende: Apoptose der Zelle, Rezeptor-Editing, Anergie oder immunologische Ignoranz/Toleranz. Dass autoreaktive Zellen durch apoptotischen Untergang eliminiert werden, wurde bereits 1959 in Burnet's Theorie der klonalen Selektion postuliert.¹² Erst in jüngerer Zeit wurden zunehmend weitere Mechanismen der Kontrolle entdeckt. Bei dem Rezeptor-Editing legt die B-Zelle durch Neuerung oder Fortführen der Genumlagerungen in der Sequenz für die V-Region des B-Zell-Rezeptors ihre Autoreaktivität ab und tauscht diesen in einen nicht-autoreaktiven Rezeptor ein.¹³ Anergie und immunologische Ignoranz bzw. Toleranz sind Beobachtungen, die zeigen, dass nicht alle autoreaktiven B-Lymphozyten selektioniert werden. Anergisch kann eine autoreaktive B-Zelle werden, wenn sie etwa mit einem kleinen Autoantigen in Kontakt gerät, dessen quervernetzende Potenz gering ist. Anstatt zu sterben, wird die Zelle in einen Zustand mit blockierter Signalfunktion überführt, in dem sie nicht auf das Antigen reagieren kann. Immunologisch ignorante B-Zellen sind solche, die eine besonders geringe Affinität für ein

Autoantigen haben und bei denen ein Antigenkontakt, wenn dieser überhaupt im Knochenmark stattfindet, nur ein schwaches intrazelluläres Signal auslöst. Diese niedrig affinen autoreaktiven Lymphozyten, die normal ausreifen, werden als mögliche Auslöser von Autoimmunerkrankungen diskutiert, wenn man davon ausgeht, dass sie im Laufe ihrer Lebenszeit aktiviert werden und zu raumgreifenden Autoimmunreaktionen führen können.¹¹

Der unreife B-Lymphozyt befindet sich nun in einem Stadium, in dem er in die peripheren lymphatischen Gewebe auswandern kann. Nach der Prüfung der B-Zellen auf Autoreaktivität im Knochenmark, die mit dem Erwerb der sogenannten zentralen Toleranz einhergeht, erfolgt peripher eine ebensolche Prüfung. Hier befinden sich schließlich körpereigene Antigene, die gewebständig sind und im Kreislauf nur wenig vorhanden, so dass im Knochenmark noch kein Kontakt stattfinden konnte. Auch im Rahmen des sog. peripheren Toleranzprozesses kann eine autoreaktive Zelle durch Apoptose, Anergie oder die immunologische Ignoranz funktionell blockiert werden. Ein Rezeptor-Editing ist aufgrund des fortgeschrittenen Reifestadiums der B-Zelle peripher nahezu nicht mehr möglich, obgleich hinreichende Belege dafür fehlen.

1.1.4 Systemische Autoimmunität und Autoimmunerkrankung

Grundsätzlich muss zwischen den Begriffen Autoimmunität und Autoimmunerkrankung unterschieden werden. Autoimmunität geht mit der Produktion von Autoantikörpern und sogar der Aktivierung von T-Zellen und Reaktionen auf körpereigene Zellen einher. Autoimmune Prozesse im Körper sind nicht selten und können auch als Schutzfunktion durch Abräumung von Zellresten verstanden werden.

Eine Autoimmunerkrankung ist definiert als ein pathologischer Zustand, bei dem autoimmune Vorgänge Organ- und Gewebeschädigungen hervorrufen, und ist vergleichsweise zur Häufigkeit von Autoimmunreaktionen selten. Als ein Prototyp der systemischen Autoimmunerkrankungen wird der systemische Lupus erythematodes (SLE) angesehen. Der SLE geht mit der Produktion von Autoantikörpern sowie weiteren autoimmunologischen Reaktionen von T- und B-Zellen einher und kann zu Gewebsschäden der Haut, Gelenke, Niere, Gehirn, Serosa, Lunge, Herz und Blutgefäße führen. Das Krankheitsbild ist in Hinsicht auf Organmanifestationen und episodische Äußerung äußerst heterogen und betrifft mehrheitlich Frauen im gebärfähigen Alter bei einer Gesamtprävalenz von etwa 1:2000.¹⁴

Die Rolle der B-Lymphozyten in der Genese der Autoimmunerkrankungen wird seit längerer Zeit aufgrund der typischen Autoantikörperproduktion intensiv diskutiert. Die Erfolge der B-

Zell-gerichteten monoklonalen Antikörpertherapien erfordern neue Erklärungsansätze bezüglich der Frage, mit welchen Mechanismen B-Lymphozyten ursächlich an der Krankheitsentstehung beteiligt sind. Ein nach wie vor unumstrittener immunpathogenetischer Aspekt ist die Produktion von Autoantikörpern durch Plasmazellen. Anti-DNA-Antikörper sind dabei offensichtlich bei der SLE-Glomerulonephritis als auch bei der Vaskulitis beim SLE beteiligt. Anti-Cardiolipin-Antikörper rufen Thromboseereignisse und rezidivierende Aborte hervor, um einige charakteristische Beispiele aufzuführen. Bei SLE-Patienten beobachtete Abnormitäten in der Toleranzbildung und -prüfung der Zellen werden mit der Bildung dieser Autoantikörper in Zusammenhang gebracht. Genetisch veränderte MRL/lpr Mäuse entwickeln ein SLE-Syndrom, das mit seiner begleitenden Autoantikörperproduktion und sich manifestierenden Organschäden dem humanen SLE ähnelt, und dienen somit als Mausmodelle für die Erkrankung.¹⁵ Werden sie weiterhin so genetisch verändert, dass sie außerstande sind, Antikörper zu sezernieren, entwickeln sie dennoch eine Lupus-Nephritis und -Vaskulitis.¹⁶ In genetisch modifizierten Mäusen ohne B-Lymphozyten entwickeln diese keine Nephritis oder Vaskulitis. Es gibt also deutliche Hinweise darauf, dass B-Lymphozyten nicht nur als Vorläufer antikörperproduzierender Effektorzellen bei der Entstehung von Autoimmunkrankheiten beteiligt sind, sondern dass auch andere B-Zell-Funktionen Pathogenität vermitteln. Grundsätzlich haben B-Zellen neben ihrer Vorläuferfunktion für Plasmazellen verschiedene Aufgaben zu bewältigen: Sie präsentieren selbst Antigen und regulieren über ihre Zytokinproduktion Antigen-präsentierende Zellen, sie regulieren T-Zell-Aktivierung und -Differenzierung und steuern über ihr Instruktionpotential auf folliculäre dendritische Zellen (FDCs) die Organisation lymphatischer Gewebe. Jeglicher Kontrollverlust über einen dieser Prozesse kann grundsätzlich die Entstehung autoimmuner Prozesse fördern. Die Krankheitsentstehung beim SLE ist ein langandauernder Prozess. Man geht davon aus, dass bereits geringfügige Modifikationen in B-Zell-Funktionen über die ausreichende Zeitdauer die Erkrankung hervorrufen können. Bei SLE-Patienten sind Abnormitäten in der B-Zell-Aktivierung, im Signalverhalten und in der Migration der B-Zellen beobachtet worden.¹⁷ Eine gesteigerte Eigenproduktion von Zytokinen, die B-Zellen stimulieren, darunter IL-6 (Interleukin-6) oder Mangel an anti-inflammatorischem IL-10 wurde ebenso bei Patienten beobachtet, und kann die Hyperreaktivität der B-Lymphozyten erklären. Allerdings bleibt unklar, ob es sich hier um primäre oder sekundäre Veränderungen handelt.

Es gibt Hinweise dafür, dass die typischen Gene, welche Anti-DNA-Antikörper produzieren, beim SLE hochmutiert sind und höchstwahrscheinlich durch somatische Hypermutation ihre Autoreaktivität entwickelt haben.¹⁸ Diese gegen körpereigene DNA gerichteten Antikörper

müssen somit nicht das Resultat der ursprünglichen Interaktion zwischen einem naiven B-Lymphozyten mit Selbstantigen und darauffolgend der klonalen Expansion dieser Zelle sein, sondern die Autoreaktivität kann während der vielfachen Mutationen in der Keimzentrumsreaktion neu entstanden sein. In der Regel sollten B-Zellen mit autoreaktiven Immunglobulinmolekülen deletiert oder anerg gestellt werden. Eine generalisierte B-Zell-Hyperaktivität, wie sie bei SLE-Patienten beobachtet wird, und eine defekte Aussonderung autoreaktiver Zellen durch FDCs scheinen bei der Krankheitsentstehung von zentraler Bedeutung zu sein. Auch ein vermehrter Anfall oder eine verminderte Abräumung apoptotischer Debris kann eine Rolle spielen.

1.2 Signaltransduktion über den B-Zell-Rezeptor

Wichtig zum Verständnis der B-Zell-Hyperaktivität beim SLE ist ein Grundverständnis der BCR-Signalübertragung. Bindet ein Ligand an den B-Zell-Antigen-Rezeptor, so können in Abhängigkeit vom Reifestadium der Zelle Signalwege initiiert werden, die unter anderem zur Differenzierung, Proliferation oder Apoptose der B-Zelle führen. Neben der Signalübermittlung besteht eine weitere Funktion in der Internalisierung von Antigen, das zum Zweck der Präsentation gegenüber T-Zellen im Inneren der B-Zelle prozessiert und erneut auf die Zelloberfläche gebracht werden kann.

Der intakte B-Zell-Rezeptor stellt eine Voraussetzung für die antikörpervermittelte Immunabwehr dar. Infolge des Kontaktes eines reifen B-Lymphozyten mit einem Pathogen kommt es im Idealfall zur Vermehrung antigenspezifischer Effektorzellen. Man weiß jedoch, dass die Funktion des B-Zell-Rezeptor-Komplexes noch umfassender und komplexer ist. Das Überleben und die Genese der B-Zellen sind bereits in einem Stadium, in dem die Bindung fremden Antigens noch keine Rolle spielt, von seinem eigentlichen Vorhandensein abhängig. Depletiert man Ig β , einen Bestandteil des BCR-Komplexes, in Prä- und unreifen B-Zellen, so sind die Zellen nicht überlebensfähig.¹⁹ Auch reife B-Zellen überleben bei gezielter genetischer Ablation des B-Zell-Rezeptors nicht.²⁰ Das heißt, dass ein funktionell aktiver BCR kritisch für das Überleben von B-Zellen ist.

1.2.1 B-Zell-Antigen-Rezeptor

Der BCR besteht aus einem antigenbindenden, auf der Zelloberfläche befindlichen Immunglobulin, das mit den Proteinketten $Ig\alpha$ und $Ig\beta$ nicht-kovalent verbunden ist.¹¹ Das antigenbindende Immunglobulin dieses funktionellen Komplexes besitzt dieselbe Grundstruktur wie ein Antikörper, der die lösliche Form des BCR ist. Es besteht aus zwei transmembranen schweren Polypeptidketten (H-Ketten), die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind, und zwei mit den H-Ketten verknüpften leichten Ketten (L-Ketten). Die Aminosäuresequenzen beider H-Ketten bzw. L-Ketten eines Immunglobulins sind identisch. Es ergibt sich eine dreidimensionale Y-förmige Struktur mit einer beweglichen, bandförmigen Gelenkregion. Mithilfe proteolytischer Enzyme können Immunglobuline in drei Untereinheiten gespalten werden. Dabei entstehen zwei identische Fragmente, welche aufgrund ihrer antigenerkennenden Aktivität Fab-Fragmente (fragment antigen binding) bezeichnet werden, sowie ein Fc-Fragment (fragment crystallizable) ohne antigenbindende Aktivität.

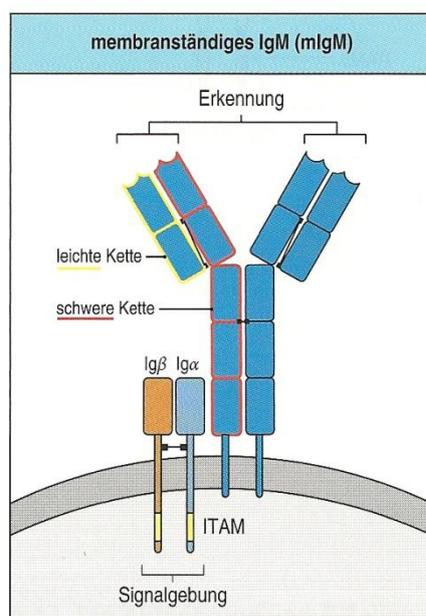


Abbildung 1.1. B-Zell-Rezeptor-Komplex.¹¹

Die exakte Antigenbindungsstelle befindet sich in der variablen Domäne des Immunglobulins und wird von den komplementaritätsbestimmenden Regionen (CDRs) gebildet, die zum Antigen komplementär sind. Sie machen jeden B-Zell-Rezeptor in seiner Antigen-spezifität einzigartig. Es ist bekannt, dass bereits eine geringe Menge spezifischen Antigens ausreicht, um intrazelluläre

Signale zu induzieren. Eine B-Zelle wird bereits aktiviert, wenn circa 20 B-Zell-Rezeptoren involviert sind.¹¹ Essentiell für die Aktivierung ist die Beschaffenheit des Antigens. In der natürlichen Situation besitzt es meist dank seiner Multivalenz die Fähigkeit, einen Rezeptor querverzernetzen. Zwei und mehr Rezeptormoleküle müssen infolge der Ligandenbindung ein Cluster bilden können, damit eine Signalübertragung initialisiert wird. In der experimentellen Situation reicht eine Bindung des BCR mittels monovalenter Fab-Fragmente von Antikörpern, die gegen Oberflächenimmunglobulin gerichtet sind, nicht aus, um die Zelle zu aktivieren. F(ab')₂-Fragmente, die zwei Bindungsstellen besitzen, können dagegen zwei Rezeptoren querverzernetzen und somit ein intrazelluläres Signal auslösen. F(ab')₂-Fragmente gehen aus Immunglobulinmolekülen nach proteolytischer Spaltung unterhalb der sogenannten Gelenkregion hervor. Der antigenbindende Teil des B-Zell-Rezeptors allein besitzt jedoch keine Funktion der Signalübertragung ins Zellinnere. Zu diesem Zweck ist er mit den einkettigen Proteinen Ig α und Ig β assoziiert. Diese bilden gemeinsam ein Heterodimer und sind mit den schweren Ketten eines Immunglobulinmoleküls des B-Zell-Rezeptors an der Zelloberfläche nichtkovalent verbunden. Jede Ig α - und jede Ig β -Kette enthält an ihrem zytoplasmatischen Bestandteil ein Sequenzmotiv, das für die Signalübertragung des Rezeptors nach intrazellulär zuständig ist. Das Sequenzmolekül nennt sich ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) und hat die Fähigkeit, Proteine von Signalkaskaden zu mobilisieren, wenn es infolge einer Antigen-Rezeptor-Bindung an seinen eigenen zwei Tyrosinresten phosphoryliert wurde.²¹ Ein ITAM besteht aus einer konservierten Aminosäuresequenz, YXXL/I, die sich im Abstand von sechs bis neun Aminosäuren einmal wiederholt. Y steht hierbei für Tyrosin, L für Leucin, I für Isoleucin und X steht für eine beliebige Aminosäure.

Man weiß heute, dass eine Generierung von Signalen, die vom B-Zell-Rezeptor-Komplex ausgeht, auch unabhängig von einer Ligandenbindung stattfindet. Der B-Zell-Rezeptor und auch der Prä-B-Zell-Rezeptor, der ja noch nicht zur Antigenbindung befähigt ist, induzieren sogenannte tonische oder Überlebenssignale, die für Differenzierungsprozesse und Existenz der B-Zelle relevant sind.²² Es wurde eine *de novo* Phosphorylierung von Signalkaskadenproteinen in Unabhängigkeit von stimulierendem Antigen nachgewiesen. Exemplarisch für dieses Phänomen ist die Beobachtung, dass das Protein Syk, ein Schlüssel-molekül in der Signalkaskade des B-Zell-Rezeptors, bei Einsatz von Pervanadat/H₂O₂ trotz Abwesenheit von Antigen phosphoryliert wird.²³ Pervanadat/H₂O₂ ist ein Inhibitor von inaktivierenden Protein-Tyrosinphosphatasen. Die Syk-übermittelte tonische Signalwirkung des B-Zell-Rezeptors ist auch das vermeintliche Angriffsziel eines therapeutischen Syk-Inhibitors, der für die Eliminierung von B-Zell-Lymphomen in klinischer Prüfung ist.²⁴ Das Zugrundegehen der Zelle

bekannt ist, dass das Fehlen von Lyn, aber nicht von Fyn und Blk, eine gestörtes BCR-Signalverhalten in der Zelle hervorruft.²⁸ Ligandenbindung an den BCR führt zu einer Phosphorylierung der ITAM-Sequenzen an den Proteinketten Ig α und Ig β , vermittelt durch Lyn.²⁵ Phosphorylierte ITAMs interagieren mit SH2-Domänen-enthaltenden Signalmolekülen. SH2 steht für Src-homology 2 und ist die Bezeichnung für eine Proteindomäne einer Länge von circa 100 Aminosäuren, welche die Fähigkeit hat, mit den phosphorylierten Tyrosinresten von ITAMs zu assoziieren.²¹ Syk (spleen tyrosine kinase) ist ein zytosolisches Signalprotein, das zwei SH2-Domänen enthält, und von phosphorylierten ITAM-Sequenzen des BCR-Komplexes herangezogen und daraufhin aktiviert wird. Syk ist ein Schlüsselmolekül in der BCR-Signalkaskade. Tyrosinkinase der Syk-Familie enthalten eine Kinase-Region C-terminal und N-terminal zwei hintereinandergeschaltete SH2-Domänen zur Bindung an phosphorylierte ITAMs. Zwischen der Kinase- und der SH2-Domänen-enthaltenden Region befindet sich eine Verknüpfungsdomäne, die mehrere Tyrosinreste besitzt, von denen die Tyrosinresiduen 348 und 352 eine herausragende Rolle spielen. Sie werden infolge der Rekrutierung von Syk an die ITAMs des BCR-Komplexes zum einen von Lyn phosphoryliert, zum anderen können diese autophosphorylieren. Die phosphorylierten Tyrosinreste 348 und 352 sind eine Voraussetzung für distale Signalkaskadenereignisse, wie zum Beispiel für die intrazelluläre Mobilisierung von Ca²⁺. Sie erhöhen sowohl die Kinaseaktivität von Syk, als auch fungieren sie als Bindungsstellen für weitere Signalproteine.²⁹

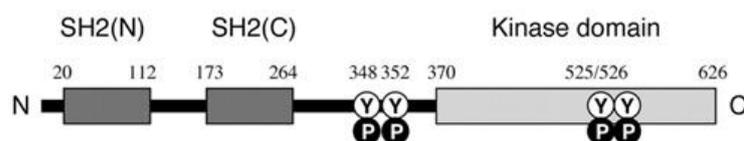


Abbildung 1.3. Spleen tyrosine kinase.²⁴

Syk ist eine Tyrosinkinase, die in allen hämatopoetischen Zellen exprimiert wird. Sie ist involviert in die Signaltransduktion von Rezeptoren des Immunsystems, darunter T-Zell- und B-Zell-Rezeptor, IgE-Rezeptoren basophiler Granulozyten und Mastzellen und Fc-Rezeptoren, die für den Fc-Teil von IgG spezifisch sind. Der letale Phänotyp mit Petechien *in utero*, Hämorrhagien und chylusartigem Aszites bei Syk-defizienten Mäusen deutet auf eine Funktion dieser Kinase in der Aufrechterhaltung der vaskulären Integrität hin.^{21,30} Syk ist essentiell für die Aktivierungskaskade des B-Zell-Rezeptorsignals. Mitogen-aktivierte Proteinkinase, die sogenannten MAP-Kinasen, spielen eine zentrale Rolle in der Überleitung von Signalen aus dem

Zytosol in den Nukleus und steuern Proliferation, Differenzierung oder Apoptose der B-Zelle. Die MAP-Kinasen ERK2 (extracellular signal-related kinase) und JNK1 (c-jun NH₂-terminal kinase), die jeweils zu einer der drei Subfamilien der MAP-Kinasen gehören, lassen sich infolge einer Stimulation des B-Zell-Rezeptors aktivieren. Ein Fehlen von Syk führt zur kompletten Aufhebung der Aktivierbarkeit von ERK2 und JNK1 infolge BCR-Vernetzung.³¹ Auch die Reifung der B-Lymphozyten ist bei Syk-Defizienz durch die Blockade der BCR-Signalwirkung betroffen. Syk-defiziente hämatopoetische Stammzellen wurden in vorhergehend bestrahlte Mäuse transplantiert, um die perinatale Letalität Syk-defizienter Mäuse zu umgehen. Die transplantierten Zellen persistierten während ihrer Entwicklung zum B-Lymphozyten im Pro-B-Zell-Stadium.^{30,32} Der Übergang vom Pro- in das Prä-B-Zell-Stadium benötigt einen intakten Prä-B-Zell-Rezeptor mit Signalfunktion. Der fehlende Übergang der Zellen in das Prä-B-Zell-Stadium bei Syk-Defizienz steht mit der Unentbehrlichkeit dieses Signalproteins innerhalb der Signalkaskade des Prä-B-Zell-Rezeptors in Übereinstimmung.

Syk und Lyn vermitteln die Aktivierung von Btk (Bruton's tyrosine kinase) der Tec-Familie der Tyrosinkinase, die auch SH₂-Domänen enthalten.³³ In Btk-defizienten B-Zelllinien wurde ebenso wie bei Syk-Defizienz eine Unterbrechung oder Abschwächung distal gelegener Aktivierungsereignisse der Signalkaskade beobachtet. Btk ist essentiell für die Aktivierung von JNK1 und notwendig für eine anhaltende Aktivierung von ERK2.³¹ Die Aktivierung von Btk ist zusätzlich abhängig von der Produktion spezifischer Phospholipide, die Btk und andere Proteine mit einer Kinasedomäne, der sogenannten Pleckstrin-Homologie Domäne (PH-Domäne), an die zytosolische Plasmamembran komplexieren. Die Produktion des für diesen Prozess benötigten Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphates (PtdInsP₃) ist abhängig von der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), die infolge BCR-Ligandenbindung aktiviert wird. Mäuse, die eine Punktmutation in der PH-Domäne des Btk-Moleküls und somit eine Störung in der Rekrutierung von Btk zu PtdInsP₃ haben, entwickeln die sogenannte X-chromosomale Immundefizienz (Xid) mit defekter Signalgebung und einer gestörten Entwicklung der B-Lymphozyten.³⁴

Syk und Btk aktivieren die Phospholipase C- γ 2 (PLC- γ 2), welche die Reaktion von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PtdInsP₂) zu Inositol-1,4,5-trisphosphat (InsP₃) und Diacylglycerol (DAG) katalysiert. InsP₃ und DAG werden für die Freisetzung intrazellulären Calciums und die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) benötigt. Diese beiden Vorgänge wiederum induzieren die Aktivierung der drei Subfamilien der MAP-Kinasen, ERK, JNK und p38 MAPK, und verschiedener Transkriptionsfaktoren, darunter NF- κ B (nuclear factor of κ light chain enhancer of activated B cells) und NFAT (nuclear factor of activated T cells).²⁵

Während p38 MAPK und JNK mit einer BCR-vermittelten Apoptose der Zelle in Verbindung gebracht werden,³⁵ ist der Transkriptionsfaktor NF- κ B entscheidend für das Überleben der B-Lymphozyten. Die Unterdrückung einer vorhandenen basalen NF- κ B Aktivierung führt zur Apoptose.³⁶ Die tonische Signalerzeugung durch den B-Zell-Rezeptor erhält unter anderem eine permanente Aktivierung von NF- κ B in den B-Lymphozyten aufrecht und bietet somit einen weiteren Aspekt, der die Zelle vor ihrem Untergang schützt.

Proximale Phosphorylierungsereignisse der Signalkette münden in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die unter anderem Überleben oder Zelltod vermitteln. Das Schicksal des B-Lymphozyten kann als ein Balanceakt zwischen Überlebens- und Todessignalen gesehen werden. Weiterhin initiiert der B-Zell-Rezeptor komplexe Vorgänge, die zu Proliferation, Anergie, Rezeptor-Editing bzw. Antigenprozessierung führen können. Die Beschaffenheit des stimulierenden Antigens, das Reifestadium der Zelle und der Einfluss ko-stimulatorischer und inhibitorischer Signale üben dabei einen direkten Einfluss auf die Entwicklung der B-Lymphozyten aus.

1.2.3 Signalmodulation

Regulatorische Oberflächenmoleküle beeinflussen Signalwege, die vom B-Zell-Rezeptor induziert werden. Ein positiver Regulator ist das BCR-assoziierte Molekül CD19. Es wird durch Lyn aktiviert und kann durch die Interaktion mit Lyn und anderen Molekülen der Src-Familie der Protein-Tyrosinkinasen deren Aktivität wiederum aufrechterhalten und fördern. Weiterhin rekrutiert und aktiviert phosphoryliertes CD19 unter anderem die PI3K und Btk. CD19-defiziente Mäuse sind immundefizient, während CD19-transgene Mäuse erhöhte Anti-DNA-Autoantikörper im Serum aufweisen.³⁷

Ein niedrig-affiner Rezeptor für den Fc-Teil von Immunglobulin G und inhibitorischer Korezeptor des B-Zell-Rezeptors ist Fc γ RIIB. Er besitzt eine ITIM-Region (immunoreceptor tyrosine based inhibitory motif), die von Lyn phosphoryliert wird. Die Rolle der Tyrosinkinase Lyn als positiver und negativer Modulator des BCR-Signals wird an dieser Stelle deutlich. Lyn-defiziente Mäuse haben zirkulierende Autoantikörper und entwickeln eine SLE-Glomerulonephritis.³⁸

ITIMs sind durch eine definierte Sequenz von Aminosäuren charakterisiert und können in phosphoryliertem Zustand inhibitorische Effektormoleküle von Signalkaskaden rekrutieren und aktivieren. In diesem Sinne rekrutiert und aktiviert phosphoryliertes Fc γ RIIB die Phosphatase

SHIP (SH2-containing inositol 5' phosphatase), die einen inhibitorischen Einfluss auf die BCR-abhängige Ca^{2+} -Mobilisierung hat, sowie eine Dephosphorylierung von CD19 bewirkt.³³ Neben der Rekrutierung von SHIP an $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ wurde auch die der Phosphatasen SHP-1 und SHP-2 (SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase) beobachtet, die weitere Substrate der BCR-Signalkaskade dephosphorylieren.³⁹

CD22 ist ein weiterer inhibitorischer Korezeptor des B-Zell-Rezeptors. Es handelt sich um ein transmembranes Protein der Siglec-Superfamilie (sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin) mit sieben Immunglobulin-ähnlichen Domänen. Der CD22-Rezeptor wird im Falle einer Vernetzung des B-Zell-Rezeptors an seinem zytoplasmatischen Ende von Lyn phosphoryliert.⁴⁰ Er findet sich in Assoziation mit membranständigem Immunglobulin auf der Zelloberfläche humaner B-Lymphozyten ab dem Prä-B-Zell-Stadium bis hin zum Stadium der aktivierten und Gedächtnis-B-Zelle.⁴¹ Im Rahmen der Differenzierung zur Plasmazelle kommt es zum Verlust der CD22-Expression. Der intrazelluläre Bestandteil des CD22-Moleküls besitzt sechs Tyrosinreste, von denen drei innerhalb von funktionell miteinander abgestimmten ITIM-Einheiten gelegen sind. Durch Lyn phosphoryliertes CD22 rekrutiert und aktiviert SHP-1, welches Substrate der B-Zell-Rezeptor-Signalkaskade dephosphoryliert und somit herunterreguliert, darunter $\text{Ig}\alpha$, $\text{Ig}\beta$, Syk, BLNK (B-cell linker protein), das die Interaktion zwischen Syk und Btk vermittelt, und CD22 selbst.⁴² Es befinden sich zusätzlich zu den ITIMs zwei ITAM-Sequenzen am zytoplasmatischen Ende des CD22-Moleküls.⁴³ Knockout-Versuche und funktionelle Tests deuten jedoch - im Hinblick auf die BCR-Signaltransduktion - auf ein Dominieren der inhibitorischen Funktion dieses Rezeptors hin. CD22-Defizienz in Mäusen und B-Zelllinien führt zur Steigerung der BCR-evozierten Ca^{2+} -Mobilisation.^{44,45} CD22-defiziente B-Zellen zeigen eine erhöhte Phosphorylierung von BCR-Signalproteinen.⁴⁶ Es konnte in bestimmten Mausexperimenten gezeigt werden, dass der Verlust der Expression dieses Rezeptors zu spontaner Autoantikörperproduktion führen kann. Man geht davon aus, dass CD22-Defizienz auf dem Boden eines prädestinierenden genetischen Hintergrundes in einigen Mäusen Autoimmunerkrankungen hervorruft.⁴⁰ Auf der anderen Seite determinieren CD22-Defekte in Lupus-Mausmodellen die Schwere der Erkrankung, was die biologische Rolle dieses inhibitorischen Rezeptors in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen beim Menschen zu einem interessanten Forschungsgegenstand macht.

1.3 Humanisierter monoklonaler CD22-Antikörper Epratuzumab

Epratuzumab ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper der Subklasse IgG₁. Er bindet hochspezifisch an CD22 und führt innerhalb weniger Minuten nach Rezeptoranbindung zur Internalisierung des Moleküls und zu dessen Phosphorylierung.⁴⁷ Epratuzumab befindet sich derzeit in klinischer Prüfung für die Therapie von aggressiven Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) und dem SLE als systemische Autoimmunerkrankung. In Phase I/II-Studien zur Therapie aggressiver NHL wurde eine Anti-Tumor-Aktivität in 20% der Patienten nachgewiesen.⁷

Immunsuppressive Therapeutika einschließlich Cyclophosphamid, Azathioprin und Glukokortikosteroide sind bislang unentbehrlich für die Beherrschung des Krankheitsbildes beim SLE, führen jedoch zur Zytotoxizität und weiteren substantiellen Nebenwirkungen. Daher ist die Suche nach neuen Therapien für den SLE notwendig und gerechtfertigt. In einer initialen klinischen Phase-II-Studie an einer an SLE erkrankten Patientengruppe mit moderater Krankheitsaktivität gemäß der BILAG Score (British Isles Lupus Assessment Group) konnte Epratuzumab eine signifikante Verbesserung der Symptome bei gutem Sicherheitsprofil erzielen.⁵ Epratuzumab wurde in einer Dosis von 360 mg/m² in Zwei-Wochen-Abständen viermal intravenös appliziert. Die BILAG Score als Maß für die SLE-Aktivität evaluiert acht Organsysteme, die von der Krankheit betroffen sind, von denen das mukokutane und muskuloskelettale System und der Allgemeinzustand unter Therapie die stärksten und frühzeitigeren Verbesserungen aufwiesen.

Eine weitere initiale Phase-I/II-Studie an Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom, einer systemischen Autoimmunerkrankung mit unter anderem entzündlicher Speichel- und Tränendrüsenaffektation, konnte erste Hinweise für klinische Effektivität von Epratuzumab beim Sjögren bestätigen.⁶

Unter Epratuzumab-Therapie und bis zu 12 Wochen nach der letzten i. v.-Gabe wurden um 35% erniedrigte B-Zell-Titer im peripheren Blut von SLE-Patienten beobachtet. Die CD22-Expression auf B-Lymphozyten war in diesem Zeitraum ebenfalls erniedrigt. Unsere Forschungsgruppe zeigte unter dem Einfluss von Epratuzumab eine verstärkte *in vitro* Migration der B-Lymphozyten gegen CXCL12, einem Chemokin, welches u. a. im Knochenmark exprimiert wird. Die Ergebnisse deuten auf einen wahrscheinlichen Effekt auf die Adhäsionsfunktion des CD22-Rezeptors im Zusammenhang mit der Migration hin. Ein weiterer *in vitro* Effekt von Epratuzumab auf isolierte B-Lymphozyten von SLE-Patienten war die Proliferationshemmung unter verschiedenen stimulatorischen Kulturbedingungen.⁴ Auch in NHL-Zelllinien wies eine andere Forschungsgruppe anti-proliferative Effekte nach. Es kam unter

dem Einfluss von Epratuzumab zu einer Reduktion der Anzahl überlebender Lymphom-Zellen sowohl mit als auch ohne BCR-Stimulation als Kulturkondition.⁴⁸ Ein Effekt auf das Überleben bzw. die Induktion von Apoptose durch Epratuzumab bei humanen B-Lymphozyten ist allerdings noch nicht hinreichend gesichert.

2 Zielsetzung

Aktuelle Studien belegen, dass die Gabe des monoklonalen CD22-Antikörpers Epratuzumab bei Patienten mit systemischen Autoimmunerkrankungen wie dem SLE (systemischer Lupus erythematodes) und Sjögren-Syndrom, die bekanntlich mit einer substantiellen Hyperreaktivität der B-Lymphozyten einhergehen, zu klinischen Verbesserungen führt. Das CD22-Oberflächenmolekül ist ein inhibitorischer Korezeptor des B-Zell-Rezeptors und gilt auf Grund der ausschließlichen Expression auf B-Lymphozyten als selektives Therapieziel. Allerdings sind Daten zur Rolle von CD22 nach BCR-Aktivierung im humanen System sehr limitiert. Eine spontane Differenzierung in autoantikörperproduzierende Plasmazellen, gesteigerte Zytokinproduktion und Immunantwort infolge Rezeptorstimulation sind Befunde einer B-Zell-Hyperaktivität beim SLE.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob der therapeutische Anti-CD22-Antikörper Epratuzumab neben bisher bekannten Wirkmechanismen (Inhibition der Proliferation, Veränderung von Migrationscharakteristika) eine spezifische Wirkung auf intrazelluläre BCR-Signale hat.

Zu diesem Zweck sollte ein *in vitro* Zellstimulationsmodell etabliert werden, welches die Untersuchung der proximalen Signalmoleküle Syk und PLC- γ 2 nach BCR-Stimulation erlaubt. Durchflusszytometrische Untersuchungen sollten den Phosphorylierungsstatus dieser Signalmoleküle in humanen B-Lymphozyten gesunder Probanden vor und nach Stimulation sowie unter Einfluss von Epratuzumab und F(ab')₂-Epratuzumab nachweisen. Darüber hinaus sollte das intrazelluläre Ca²⁺-Signaling nach BCR-Stimulation mit und ohne Einfluss des monoklonalen Anti-CD22-Antikörpers als Maß für die zelluläre Aktivierung analysiert werden.

Das zentrale Ziel dieser Arbeit war, den immunmodulatorischen Einfluss des Anti-CD22-Antikörpers auf intrazelluläre Signalwege nach BCR-Stimulation im humanen System nachzuweisen und somit einen weiteren Beitrag zu dessen Wirkmechanismus neben Proliferationshemmung und Migrationsänderungen zu leisten.

3 Material und Methoden

3.1 BCR-Stimulation humaner B-Lymphozyten unter Einfluss von Epratuzumab

3.1.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur gleichzeitigen Messung mehrerer physikalischer Parameter einer Zelle und zur Detektion von zelleigenen intrazellulären oder Oberflächenmolekülen. Dazu werden optische Messsysteme verwendet, die Streulicht- und Fluoreszenzsignale der Zellen analysieren. Die in einer Suspension vorliegenden Zellen werden mittels einer hydrodynamischen Fokussierung perlenkettenartig angeordnet und passieren einzeln einen Laserstrahl, den Analysepunkt des Gerätes (Abb. 3.1).

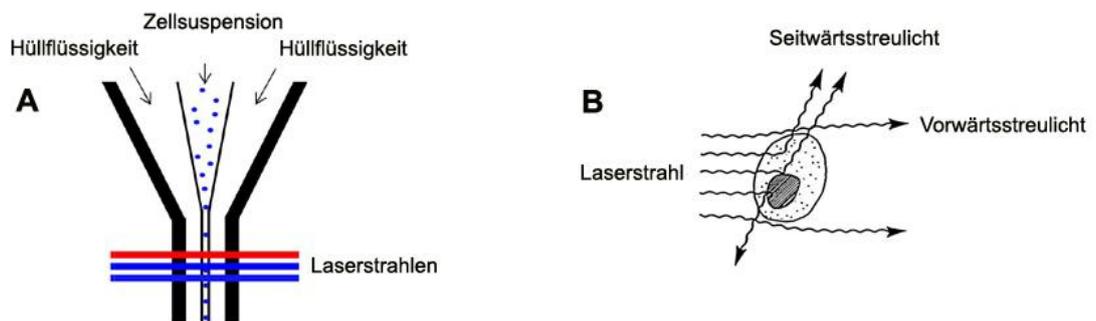


Abbildung 3.1. (A) Darstellung der hydrodynamischen Fokussierung von Zellen sowie (B) der Detektion des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichts als zelluläre Eigenschaften mittels Durchflusszytometrie.⁴⁹

Das eintreffende Licht wird aufgrund physikalischer Eigenschaften der Zelle mit unterschiedlicher Qualität und Quantität gestreut. Das Vorwärtsstreulicht (forward light scatter, FSC), dessen Intensität in einem Winkel von 0° zum Laserstrahl mittels eines Detektors ermittelt wird, ist abhängig von der Querschnittsfläche des beleuchteten Partikels und liefert Informationen über die Zellgröße. Das Seitwärtsstreulicht (sideward light scatter, SSC) wird in einem Winkel von 90° zum Laserstrahl gemessen und ist durch den Refraktionsindex des Partikels bedingt. Das SSC erlaubt Aussagen über die Granularität der Zelle. Mit Hilfe beider Parameter lassen sich die wichtigsten Leukozytenpopulationen, darunter Lymphozyten, Monozyten und neutrophile Granulozyten unterscheiden. Die erweiterte Form der

Durchflusszytometrie beruht zusätzlich auf der Messung von Fluoreszenzsignalen und ermöglicht eine quantitative Expressionsanalyse unter Nutzung ihrer spezifischen Expressionseigenschaften. Zellen werden dazu mit Antikörpern gefärbt, die sich spezifisch gegen membranständige oder intrazelluläre Moleküle richten, und die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind. Unter Fluoreszenz versteht man die Emission von Licht nach Anregung durch energiereiche Strahlung. Durch die Energie werden Elektronen auf ein höheres Energieniveau gehoben, welches sie nur für kurze Zeit halten, um dann bei Rückfall auf ein niedrigeres Niveau die aufgenommene Energie in Form von Licht abzugeben. Bei der Durchflusszytometrie werden Fluoreszenz-markierte Zellen durch monochromatisches Laserlicht einer bestimmten Wellenlänge angeregt. Die verschiedenen Farbstoffe emittieren Licht unterschiedlicher Wellenlängen, welche vom Gerät detektiert werden. Dabei wird die Intensität des emittierten Lichtes gemessen, die proportional zu der Menge an gebundenem Antikörper ist. Durch die gleichzeitige Färbung einer Zelle mit mehreren Fluoreszenzfarbstoffen, deren Emissionsmaxima sich unterscheiden, sowie durch den Einsatz verschiedener Laser, dichromatischer Spiegel- und optischer Filtersysteme und Detektoren kann die Expression mehrerer Moleküle einer Zelle simultan ermittelt werden.

In einem zweidimensionalen Koordinatensystem, der sog. „dot plot“-Darstellung (Abb. 3.2), werden im Rahmen der elektronischen Auswertung jeweils zwei Eigenschaften der untersuchten Zellen gegenüber gestellt, wobei ein Punkt einer Zelle entspricht. Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Computer-gestützten Verarbeitung der Zellinformationen ist das Eingrenzen elektronischer Fenster, das sogenannte „Gating“. Gating bezeichnet eine vom Anwender durchgeführte Selektion bestimmter Zellpopulationen. In diesem Sinne ist es möglich, durch ein elektronisches Fenster in der Darstellung aller Zellen im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht nur eine bestimmte Population, z. B. die Lymphozyten, in einer nachgeordneten Darstellung bzw. Analyse auf zwei verschiedene Fluoreszenzeigenschaften hin zu untersuchen.

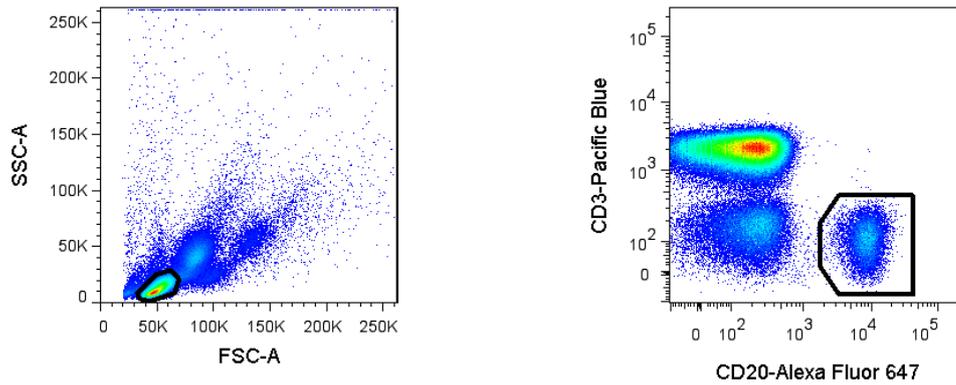


Abbildung 3.2. Dot Plot mit elektronischen Fenstern (Gates) zur Selektion von CD20⁺ Lymphozyten. Das elektronische Fenster der linken Abbildung enthält die überwiegende Anzahl der Lymphozyten. Nur die hier eingeschlossenen Zellen werden in der rechten Darstellung weiter untersucht. Die Abszisse der rechten Darstellung zeigt die gemessene Intensität des Fluoreszenzfarbstoffs Alexa Fluor 647, die Ordinate stellt die Intensität von Pacific Blue dar. Nur CD20⁺ Zellen wurden durch Einsatz des Anti-CD20-Alexa Fluor 647-Antikörpers mit diesem Farbstoff markiert. Der Anti-CD3-Pacific Blue-Antikörper (T-Zell-Marker) bindet nicht an CD20⁺ B-Lymphozyten, wodurch diese Zellpopulation sich abgrenzen lässt.

3.1.2 Isolierung mononukleärer Zellen (PBMCs) des peripheres Blutes

Zur Gewinnung peripherer mononukleärer Zellen (PBMCs) wurde gesunden Probanden 30 ml venöses Blut abgenommen und im Verhältnis 1:1 mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) versetzt. Dieses Gemisch wurde auf 15 ml Lymphozytenseparationsmedium geschichtet. Nach 20minütiger Zentrifugation bei 2200 rpm ohne Bremse bildete sich aufgrund der Dichteunterschiede oberhalb des Separationsmediums ein Zellring aus PBMCs mit Lymphozyten, Monozyten und NK-Zellen. Der Überstand, welcher hauptsächlich Plasma, Thrombozyten und lösliche Bestandteile enthielt, und sedimentierte Granulozyten und Erythrozyten wurden verworfen. Die mononukleären Zellen der Interphase oberhalb des Separationsmediums wurden in ein weiteres 50 ml Röhrchen überführt und mit PBS zweimal gewaschen. Die nun erhaltenen pelletierten Zellen wurden in der Neubauer-Zählkammer gezählt und unter Zugabe der entsprechenden Menge an PBS auf eine Konzentration von 20×10^6 Zellen/ml gebracht.

3.1.3 Analyse der CD22-Expression und Epratuzumab-Bindung an B-Lymphozyten

Zur Identifikation der CD22-Expression und Bindung von Epratuzumab an humane B-Lymphozyten wurden Färbungen mittels eines Anti-CD22-Antikörpers und Alexa 488-markiertem Epratuzumab durchgeführt. 10^6 PBMCs, die nach Waschen in PBS-BSA 0,2% pelletiert waren, wurden auf Eis gestellt, um eine Internalisierung des CD22-Moleküls nach Bindung des Antikörpers zu vermeiden. Die Inkubation auf Eis erfolgte für eine Dauer von 15 min. mit den in Tabelle 3.1 gelisteten Oberflächenantikörpern in der angegebenen Menge. Daraufhin wurden sie einmal gewaschen, in 400 μ l PBS-BSA resuspendiert und durchflusszytometrisch analysiert.

Tabelle 3.1. Pipettierschema der Oberflächenmarkierungen, PBMCs.

	Epratuzumab-Alexa 488-Färbung	CD22-Färbung
50 μ l	Zellsuspension (10^6 PBMCs)	Zellsuspension (10^6 PBMCs)
0,5 μ l	anti-CD3-Pacific Blue	anti-CD3-Pacific Blue
2,5 μ l	anti-CD20-PerCp	anti-CD20-PerCp
1 μ l	anti-CD19-PeCy7	anti-CD19-PeCy7
1 μ l	anti-CD27-Cy5	anti-CD27-Cy5
1 μ l	Epratuzumab-Alexa 488/hIgG ₁ -Alexa 488	anti-CD22-PE/hIgG ₁ -PE

3.1.4 BCR-Stimulation und Färbung von p-Syk

Die BCR-Stimulation erfolgte mittels $F(ab')_2$ -Fragmenten, welche sich gegen Immunglobulin M und G richteten. Diese Immunglobulintypen werden membranständig auf B-Lymphozyten als sogenannte B-Zell-Rezeptoren exprimiert. $F(ab')_2$ -Fragmente sind bivalent und somit in der Lage, zwei benachbarte B-Zell-Rezeptoren miteinander zu vernetzen und auf diese Weise ein intrazelluläres BCR-Signal auszulösen. Die Zellstimulation erfolgte gemäß dem Versuchsaufbau in Tabelle 3.2. Initiale Experimente wiesen auf eine detektierbare Induktion der Syk-Phosphorylierung infolge *in vitro* BCR-Stimulation hin und ebneten die Voraussetzungen dafür, den Einfluss des therapeutischen Antikörpers Epratuzumab auf das BCR-Signal zu testen. Zu diesem Zweck wurde eine 60minütige Präinkubationsphase vor der BCR-Stimulation etabliert. Diese wurde durch Zugabe von Epratuzumab bzw. humanem IgG₁ in verschiedenen Konzentrationen variiert (Tab. 3.3). Die Auswahl der Konzentrationen für dieses *in vitro* Stimulationsmodell war rechnerisch an der therapeutischen Dosis der initialen Phase IIa-Studie

von 360 mg/m² Epratuzumab bei SLE-Patienten orientiert, die in einer folgenden Phase IIb Studie bestätigt werden konnte.

Epratuzumab ist ein Antikörper der Subklasse IgG₁. Die Kontrolle mittels humanem IgG₁, welches in gleicher Weise wie Epratuzumab eingesetzt wurde, sollte dazu dienen, eine mögliche unspezifische Wirkung von Epratuzumab auf das intrazelluläre Signal aufzuzeigen. Der Einsatz von lediglich F(ab')₂-Fragmenten von Epratuzumab war von besonderem Interesse, da er einen Effekt ausschließen konnte, der auf den Fc-Teil des monoklonalen Antikörpers zurückzuführen wäre. Weiterhin wurde durch das Weglassen dieses Teils eine Komplexbildung zwischen Fc-Fragmenten der humanen Immunglobuline (Epratuzumab und hIgG₁) und F(ab')₂-anti-IgG ausgeschlossen.

Tabelle 3.2. BCR-Stimulation humaner B-Lymphozyten, Versuchsaufbau.

	Dauer
Inkubation von jeweils 100 µl Zellsuspension à 2 x 10 ⁶ PBMCs mit 100 µl PBS (bzw. Epratuzumab oder hIgG ₁ in verschiedenen Konzentrationen) in 2 ml Röhrchen auf einer 37°C Heizplatte	60 min.
Zentrifugierung (1500 rpm/470 rcf) bei Raumtemperatur	5 min.
Entfernung des Überstandes	
Zugabe von 100 µl F(ab') ₂ -Stimulationsgemisch bzw. PBS (unstimulierte Kontrolle), Vortexen	
Inkubation bei 37°C	8 min.
Beendigung der BCR-Stimulation und Fixierung des Phosphorylierungszustandes der Zellen durch Zugabe von 900 µl Lyse-Fixier-Puffer (37°C)	
Inkubation bei 37°C	10 min.
Zellen auf Eis, Überführung des Zellgemisches in 4 ml Durchflusszytometrie-Röhrchen	
Waschen: Zugabe von PBS, Zentrifugation (1500 rpm/470 rcf, 10 min.) und Verwerfen des Überstandes	
Permeabilisierung: Zugabe von 600 µl Permeabilisierungspuffer zum Zellpellet und Resuspension	
Inkubation auf Eis	30 min.
Waschen in PBS-FCS 1% (2mal)	
Färbung durch Zugabe von PE-markiertem p-Syk Antikörper und ggf. B-Zell-spezifischen Oberflächenmarkern gemäß Färbeschema (Tabelle 3.4) zu den pelletierten Zellen und Vortexen	
Inkubation dunkel bei Raumtemperatur	90 min.
Waschen in PBS-FCS 1%	
Zugabe von 300 µl PBS-FCS 1% zum Zellpellet, Resuspension	
Durchflusszytometrische Analyse	

Folgende Tabelle verdeutlicht das Pipettierschema für die Stimulation der PBMCs.

Tabelle 3.3. Schema der Stimulationskonditionen, PBMCs.

Kondition	Präinkubation (60 min.) von 100 µl Zellsuspension (2×10^6 PBMCs) mit:	BCR-Stimulation (8 min.) der präinkubierten Zellen mit:
1 unstimuliert	100 µl PBS	100 µl PBS
2 stimuliert	100 µl PBS	100 µl F(ab') ₂ -αIgM + -αIgG (13 µg/ml)
3 Emab 10 µg/ml	100 µl Emab in PBS (20 µg/ml)	“
4 Emab 20 µg/ml	100 µl Emab in PBS (40 µg/ml)	“
5 hIgG ₁ 10 µg/ml	100 µl hIgG ₁ in PBS (20 µg/ml)	“
6 hIgG ₁ 20 µg/ml	100 µl hIgG ₁ in PBS (40 µg/ml)	“
7 F(ab') ₂ -Emab 10 µg/ml	100 µl F(ab') ₂ -Emab in PBS (20 µg/ml)	“
8 F(ab') ₂ -Emab 20 µg/ml	100 µl F(ab') ₂ -Emab in PBS (40 µg/ml)	“

Die B-Zellen wurden in ihrem Verbund innerhalb der PBMCs durch zellspezifische Oberflächenantikörper angefärbt. Zur Identifikation der B-Lymphozyten wurde ein intrazellulärer Anti-CD20-Antikörper eingesetzt, der das CD20-Molekül an seiner zytoplasmatischen Domäne erkennt. Die klare Darstellbarkeit einer CD20⁺ Population diente gleichzeitig als Bestätigung für eine korrekt erfolgte Permeabilisierung der Zellen und für eine Evaluierbarkeit der P-Syk-gebundenen Fluoreszenzen. Intrazelluläre und Oberflächenantikörper wurden simultan eingesetzt. Ein Oberflächen-anti-CD27-Antikörper ermöglichte die Unterteilung der B-Lymphozyten in eine CD27⁻ und eine CD27⁺ B-Zell-Population. Ein Anti-CD3-Antikörper wurde zur Anfärbung bzw. nachfolgenden Ausgrenzung der T-Lymphozyten hinzugesetzt. Das intrazelluläre Protein Syk wurde durch spezifische Antikörper, die gegen phosphorylierte Tyrosinreste an Stelle Y348 und Y352 des Moleküls gerichtet waren, angefärbt.

Tabelle 3.4. Färbeschema für die BCR-Stimulation.

	p-Syk (Y348)	p-Syk (Y352)
45 µl	mononukleare Zellen	mononukleare Zellen
1 µl	anti-CD3-Pacific Blue	anti-CD3-Pacific Blue
10 µl	anti-CD20-Alexa Fluor 647	anti-CD20-Alexa Fluor 647
5 µl	anti-CD27-FITC	anti-CD27-FITC
10 µl	anti-p-Syk (Y348)-PE	anti-p-Syk (Y352)-PE

3.2 Analyse der basalen Syk und p-Syk (Y348)-Expression in B-Lymphozyten

In B-Lymphozyten aus Vollblutproben gesunder Spender wurde die Expression von Syk untersucht. Weiterhin wurde der Phosphorylierungszustand des Proteins an seinen Tyrosinen Y348 und Y352 ermittelt, welcher von *in vitro* BCR-Stimulation unabhängig war. Die Anfärbung der B-Lymphozyten mit einem Anti-CD27-Antikörper machte die differenzierte Analyse der Syk- und p-Syk-Expression in naiven gegenüber Gedächtnis-B-Lymphozyten möglich. Folgende Tabelle verdeutlicht den Versuchsaufbau.

Tabelle 3.5. Analyse der Syk-Expression in B-Lymphozyten aus Vollblut, Versuchsaufbau.

	Dauer
Inkubation von 1 ml Vollblut in 10 ml vorgewärmtem Lyse-Fixier-Puffer im 37°C Wasserbad	10 min.
Waschen: Zentrifugation bei 1500 rpm/470 rcf, Verwerfen des Überstandes	10 min.
Resuspension der pelletierten Zellen in 1 ml Permeabilisierungspuffer	
Inkubation auf Eis	30 min.
Waschen in PBS-FCS 1% (2mal)	
Färbung gemäß Pipettierschema in Tabelle 3.6	
Inkubation dunkel bei Raumtemperatur	60 min.
Waschen in PBS-FCS 1%	
Zugabe von 300 µl PBS-FCS 1%, Resuspension	
Durchflusszytometrische Analyse	

Folgende Tabelle listet die simultan eingesetzten intrazellulären und Oberflächenantikörper auf:

Tabelle 3.6. Pipettierschema der Zellfärbung, fixierte Zellen aus Vollblut.

	p-Syk (Y348)	p-Syk (Y352)
45 µl	Zellsuspension	Zellsuspension
1 µl	anti-CD3-Pacific Blue	anti-CD3-Pacific Blue
5 µl	anti-CD20-PerCp	anti-CD20-PerCp
2,5 µl	anti-CD27-APC	anti-CD27-APC
10 µl	anti-p-Syk (Y348)-PE	anti-p-Syk (Y352)-PE

3.3 Phosphorylierungskinetik von Syk und PLC- γ 2 unter BCR-Stimulation

Zur Erhebung einer Kinetik der Phosphorylierung von Syk und PLC- γ 2 unter BCR-Stimulation erfolgten Stimulationen von je 10^6 PBMCs pro Testsituation gemäß dem Versuchsschema in Tabelle 3.2. Die Stimulationen mit F(ab')₂-anti-BCR wurden in diesem Fall nach 0,10 und 30 Sekunden und nach 1, 2, 5, 8 und 30 Minuten durch Fixierung des Phosphorylierungszustandes der Zellen beendet. Eine 60minütige Vorbehandlung mit F(ab')₂-Epratuzumab verglichen mit einer Inkubation mit lediglich PBS-Medium sollte den Einfluss von Epratuzumab auf die Phosphorylierung der Signalmoleküle zu jedem gewählten Zeitpunkt aufzeigen. Die B-Lymphozyten wurden gemäß folgendem Schema an p-Syk (Y348) und p-PLC- γ 2 simultan angefärbt:

Tabelle 3.7. Färbeschema für eine Phosphorylierungskinetik von Syk und PLC- γ 2.

45 μ l	mononukleare Zellen
1 μ l	anti-CD3-Pacific Blue
5 μ l	anti-CD20-PerCp
2,5 μ l	anti-CD27-APC
10 μ l	anti-p-Syk (Y348)-PE
10 μ l	anti-p-PLC- γ 2 (Y759)-Alexa Fluor 488

3.4 Intrazelluläre Ca²⁺-Antwort in B-Lymphozyten

B-Lymphozyten wurden aus dem Verbund mononukleärer Zellen gesunder Probanden durch eine Negativselektion isoliert. In diesem Sinne wurden Nicht-B-Zellen mit biotinylierten Antikörpern markiert. Diese wurden wiederum mit magnetischen Anti-Biotin-Microbeads konjugiert. Die Zellsuspension wurde in magnetische MACS[®] Säulen gegeben, so dass alle bis auf die B-Zellen in dieser Säule haften blieben. Die B-Lymphozyten konnten nach Passage der Säule aufgefangen werden und für die durchflusszytometrische Ca²⁺-Fluss-Analyse gemäß dem Schema in Tabelle 3.8 vorbereitet werden.

Tabelle 3.8. Indo-1 AM-Beladung humaner B-Lymphozyten für die Ca²⁺-Fluss-Analyse.

	Dauer
B-Zell-Isolation	
Zweimaliges Waschen der B-Zellen in RPMI-1640 mit 10% FCS	
Entfernung des Überstandes	
Beladen der Zellen mit Indo-1 acetoxymethyl (AM) 2 µM bei 37°C in lichtdicht verschlossenen Tubes (10 ⁶ B-Zellen/ml RPMI), alle 10 min. Schwenken der Tubes	45 min.
Zentrifugation der beladenen B-Zellen (1200 rpm)	10 min.
Inkubation mit F(ab ^c) ₂ -Epratuzumab (10 µg/ml) vs. Medium (PBS) bei 37°C, 10 ⁵ B-Zellen/100 µl/Tube	60 min.
Lagerung der Zellen auf Eis	
Durchflusszytometrie: Je 1 min. vor der Analyse Aufwärmen des betroffenen Tubes auf 37°C im Wasserbad, Hinzugabe von 200 µl RPMI (37°C), Start der Analyse	

Indo-1 acetoxymethyl (AM) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, welcher in das Zellinnere eindringt. Ungebunden hat er einen Emissionspeak bei 475 nm. Sobald der Farbstoff im Zellzytosol an Calcium anbindet, shiftet sein Emissionspeak zu 405 nm, so dass Änderungen in der intrazellulären Calciumkonzentration anhand der Berechnung des Verhältnisses zwischen der Indo-1 AM-Emission bei 405 nm zur Emission bei 475 nm quantifiziert werden konnten. Eine Baseline-Ratio wurde über 40 Sekunden Dauer am Durchflusszytometer (Becton Dickinson LSR II flow cytometer) etabliert. Zur 40. Sekunde wurde F(ab^c)₂-anti-IgM und -IgG in einer Konzentration, welche für eine finale Konzentration von 12 µg/ml im Zellgemisch angepasst war, hinzugefügt. Die Ratio der Emission bei 405 nm/475 nm (Calcium-gebunden/ungebunden) wurde bis zur Vollendung der 10. Minute erfasst.

3.5 Kultivierung und BCR-Stimulation der B-Zell-NHL-Zelllinie Ramos

3.5.1 Zellkultivierung

Die humane Burkitt Lymphom Zelllinie Ramos wurde in Kulturflaschen bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und bei einer maximalen Dichte von 1,5 x 10⁶ Zellen/ml gehalten. Zu diesem Zweck erfolgte dreimal pro Woche eine Aufteilung (Splitting) der Zellen mit Neuzusatz von Nährmedium. Regelmäßig wurde ein kompletter Mediumswechsel durchgeführt, um eine Säuerung des Milieus sowie eine Anreicherung mit Zelldetritus zu vermeiden. Das Nährmedium bestand aus RPMI-1640 mit 10% FCS unter Zusatz von Glutamin, 2-Mercaptoethanol, Penicillin

und Streptomycin. Jeweils 42 Stunden vor einem Experiment wurden Ramos-Zellen bei einer Konzentration von $0,4 \times 10^6$ Zellen/ml ausgesät. Splittung und Aussaat der Zellen erfolgte stets unter sterilen Bedingungen. Jeweils 18 Stunden vor einem Versuch wurden die Zellen zentrifugiert (1500 rpm/470 rcf, 10 min.) und in RPMI-1640 ohne FCS als sog. „Hungermedium“ neu ausgesät.

3.5.2 Analyse der CD22-Oberflächenexpression auf Ramos-Zellen

Folgende Tabelle beschreibt das Färbeprotokoll auf der Zelloberfläche der Burkitt-Lymphom-Zelllinie:

Tabelle 3.9. Färbung von CD22 in Ramos-Zellen, Versuchsaufbau.

	Dauer
Herunterzentrifugieren der Zellen bei 1500 rpm/470 rcf	10 min.
Waschen in 4°C PBS-BSA 0,2% (phosphatgepufferte Salzlösung; bovines Serumalbumin) und Zentrifugation	
Zugabe von 1 µl Anti-CD22-PE/Epratuzumab-PE/IgG ₁ -PE zu jeweils 50 µl Zellsuspension (ca. 10^6 Ramos-Zellen), Vortexen	
Inkubation auf Eis	15 min.
Waschen in PBS-BSA 0,2%	
Resuspension der pelletierten Zellen in 400 µl PBS-BSA 0,2%	
Durchflusszytometrische Analyse	

3.5.3 BCR-Stimulation und intrazelluläre Färbung von p-Syk (Y348)

Für die BCR-Stimulation wurden die Ramos-Zellen zentrifugiert, nachdem sie zuvor 18 Stunden lang in sog. „Hungermedium“ inkubiert worden waren. Die pelletierten Zellen wurden in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Unter Zugabe von PBS wurde eine Konzentration von 10^7 Zellen/ml hergestellt und die Zellen auf Eis gelagert.

Die BCR-Stimulation der Zelllinie erfolgte mittels einer Lösung von F(ab')₂-Fragmenten, die gegen humanes IgM und IgG gerichtet waren (13 µg/ml), obwohl Ramos-Zellen nur den Immunglobulintyp M als BCR exprimieren und für IgG negativ sind. Somit wurde derselbe F(ab')₂-anti-BCR-Ansatz gewählt, wie auch bei der Stimulation humaner B-Lymphozyten gesunder Spender, die diese beiden Ig-Typen exprimieren.

Die Konzentration des Anti-p-Syk (Y348)- und (Y352)-Antikörpers wurde in Vorexperimenten optimiert (Abb. 3.3). Unstimulierte und BCR-stimulierte Ramos-Zellen wurden mit den Antikörpern in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert und auf p-Syk untersucht.

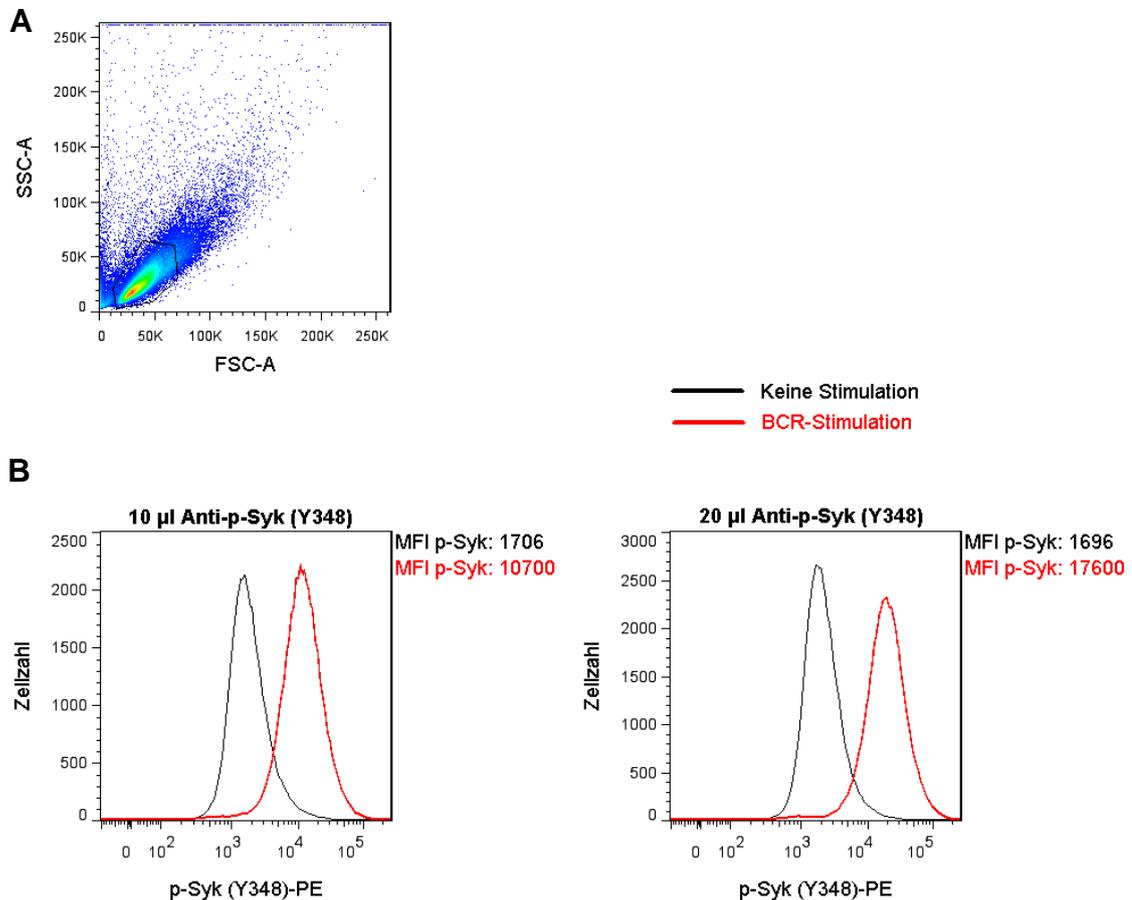


Abbildung 3.3. Titration des Anti-p-Syk (Y348)-Antikörpers, Phycoerythrin-gekoppelt. (A) Darstellung der Ramos-Zellen im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht. Das elektronische Fenster schließt die Zellen ein, welche in den Folgeabbildungen auf ihre Expression von p-Syk (Y348) infolge BCR-Stimulation analysiert werden. (B) Die Abszisse der Darstellungen stellt die Intensität des Fluoreszenzfarbstoffs Phycoerythrin (PE) dar (logarithmische Anzeige). Eine Überlagerung der Graphen für unstimulierte (schwarz) und stimulierte Zellen (rot) ist dargestellt. Eine gute Separation zwischen beiden Populationen deutet sowohl auf eine Induzierbarkeit eines BCR-Signals in Ramos-Zellen hin, als auch auf eine ausreichende Konzentration des Antikörpers bei Einsatz von bereits 10 µl. Die Titration des p-Syk (Y352)-Antikörpers (Graphen nicht angezeigt) zeigte ebenfalls eine gute Separation zwischen unstimulierten und stimulierten Zellen.

3.5.4 Testung des Einflusses von Epratuzumab auf die BCR-Signaltransduktion in Ramos-Zellen

Initiale Experimente (Abb. 3.3) wiesen auf eine detektierbare Induktion der Syk-Phosphorylierung infolge *in vitro* BCR-Stimulation in Ramos-Zellen hin. Die BCR-Stimulation mit und ohne Einfluss von Epratuzumab in unterschiedlichen Konzentrationen erfolgte nach den in Tabelle 3.2 für die B-Lymphozyten beschriebenen Abläufen. Tabelle 3.10 verdeutlicht das Pipettierschema.

Tabelle 3.10. Schema der Stimulationsbedingungen, Ramos.

Kondition	Präinkubation (60 min.) von 100 µl Zellsuspension (10^6 Ramos-Zellen) mit:	BCR-Stimulation (8 min.) der präinkubierten Zellen mit:
1 unstimuliert	100 µl PBS	100 µl PBS
2 stimuliert	100 µl PBS	100 µl F(ab') ₂ -αIgM + -αIgG (13 µg/ml)
3 Emab 1 µg/ml	100 µl Emab in PBS (2 µg/ml)	“
4 Emab 10 µg/ml	100 µl Emab in PBS (20 µg/ml)	“
5 Emab 100 µg/ml	100 µl hIgG ₁ in PBS (200 µg/ml)	“
6 hIgG ₁ 1 µg/ml	100 µl hIgG ₁ in PBS (2 µg/ml)	“
7 hIgG ₁ 10 µg/ml	100 µl Emab in PBS (20 µg/ml)	“
8 hIgG ₁ 100 µg/ml	100 µl Emab in PBS (200 µg/ml)	“

3.6 Statistische Auswertung

Die Analysen durchflusszytometrisch erhobener Daten erfolgte anhand der FlowJo™ Software. Die statistischen Analysen für die Bestimmung der Unterschiede von p-Syk (Y348) und p-Syk (Y352) in verschiedenen stimulierten Zellproben erfolgten mit dem gepaarten Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. Analysen der Unterschiede in der Expression von Oberflächen- und intrazellulären Merkmalen zwischen verschiedenen B-Lymphozytenpopulationen erfolgten mittels Mann-Whitney-Test. Die statistische Auswertung erfolgte mittels der GraphPad Prism 4.0 Software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). P-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet

3.7 Liste der eingesetzten Materialien

Antikörper

CD3-Pacific Blue [clone UCHT1 Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland]
 CD19-PeCy7 [clone SJ25C1, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland]
 CD20-Alexa Fluor 647 [clone H1 (FB1), Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland]
 CD20-PerCP-Cy 5.5 [clone H1 (FB1), Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland]
 CD20-PerCp [clone L27, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland]
 CD22-PE [clone S-HCL-1³, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland]
 CD27-APC [clone L128, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland]
 CD27-Cy5 [clone 2E4, AG Thiel, DRFZ Berlin, Deutschland]
 CD27-FITC [clone L128, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland]
 Epratuzumab-Alexa 488 [UCB, Brüssel, Belgien]
 Epratuzumab-PE [UCB, Brüssel, Belgien, gelabelt durch DRFZ, Berlin, Deutschland]
 IgG₁-Alexa 488 [UCB, Brüssel, Belgien]
 IgG₁-PE [clone MOPC-21, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland]
 IgG₁-PE [clone BALB/c, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland]
 Syk-FITC [clone 4D10, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland]
 p-Syk (Y348)-PE [clone I120-722, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland]
 p-Syk (Y352)-PE [clone 17a/P-ZAP70, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland]
 p-PLC- γ 2 (Y759)-Alexa Fluor 488 [clone K86-689.37, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland]
 Epratuzumab [UCB, Brüssel, Belgien]
 F(ab')₂ anti human IgG + IgM (H + L) [Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK]
 F(ab')₂-Epratuzumab [UCB, Brüssel, Belgien]
 IgG₁, Kappa, from human plasma [Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA]
 MACS[®] B-cell isolation kit II [Miltenyi Biotec, Deutschland]

Reagenzien

FCS [DRFZ, Berlin, Deutschland]
 Lymphocyte Separation Medium LSM 1077 [PAA Laboratories, Pasching, Österreich]
 Lyse/Fix Buffer [Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland]
 PBS-Dulbecco (1x) [Biochrom KG, Berlin, Deutschland]
 PBS-BSA 0,2% [DRFZ, Berlin, Deutschland]
 Perm Buffer II [Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland]
 RPMI 1640 + GlutaMAX [Invitrogen, Auckland, Neuseeland]
 RPMI 1640 + GlutaMAX mit 10 % FCS, 2-Mercaptoethanol (50 μ M), Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 μ g/ml) [DRFZ, Berlin, Deutschland]
 Indo-1 acetoxymethyl (AM) dye [Invitrogen, Eugene, Oregon, USA]

Gefäße, Zubehör

2 ml Eppendorf Röhren [Eppendorf, Hamburg, Deutschland]
 2 ml Well Platten [Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland]
 4 ml Durchflussszytometrie-Röhren [Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland]
 10 ml EDTA-Röhren BD Vacutainer [Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland]
 15 ml Cellstar Röhren [Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland]
 50 ml Falcon Röhren [Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland]
 Blutentnahmesystem BD Vacutainer [Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland]
 Kulturflaschen Cellstar [Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland]
 MACS[®] cell separation columns [Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland]

Geräte

BD FACSCanto II Durchflussszytometer [Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland]
 BD LSR II Durchflussszytometer [Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland]

Inkubator Heracell 240i CO₂ [Thermo Scientific, Deutschland]
Wasserbad [Memmert, Schwabach, Deutschland]
Wärmeplatte [Grant Instruments Shepreth, Cambridgeshire, England]
Zentrifuge Eppendorf 5415D [Eppendorf, Hamburg, Deutschland]
Zentrifuge Megafuge 1.0 [Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland]

3.8 Zelllinie Ramos und Probanden

Ramos

Die B-Zelllinie Ramos wurde vom Deutschen Rheuma-Forschungszentrum, Berlin, Deutschland bereitgestellt.

Probanden

Zur Untersuchung der p-Syk- und Syk-Expression in B-Lymphozyten unter verschiedenen Konditionen und zur Untersuchung der Bindung von Epratuzumab an diese Zellen war Probanden venöses Blut entnommen worden, bei denen keine immunologisch relevanten Erkrankungen bekannt waren. Die insgesamt 12 Probanden (9 weiblich, 3 männlich) waren im Alter von 20 und 53 Jahren bei einem Durchschnittsalter von 29 Jahren. Weiterhin wurden einmalig mononukleäre Zellen der Milz nach Splenektomie bei einem Patienten mit Autoimmunthrombozytopenie *in vitro* behandelt. Die Ethikkommission der Charité Berlin hat diesem Forschungsvorhaben zugestimmt und die schriftliche Zustimmung jedes einzelnen Probanden wurde nach einem Aufklärungsgespräch erhalten.

4 Ergebnisse

4.1 CD22-Ligation durch Epratuzumab inhibiert die Signaltransduktion unter BCR-Stimulation

4.1.1 BCR-Stimulation induziert ein intrazelluläres Rezeptorsignal

Die Spleen-Tyrosinkinase (Syk) hat im Rahmen der Signaltransduktion des B-Zell-Rezeptor-Komplexes eine zentrale Bedeutung.²¹ Unmittelbar nach Quervernetzung des BCRs assoziiert Syk als eines der proximal gelegenen Proteine in der intrazellulären Signalkaskade mit den BCR-Untereinheiten $Ig\alpha$ und β und wird phosphoryliert. In dem Zusammenhang kommt es bei einer Syk-Defizienz zur kompletten Blockierung der distalen Signalkette, unter anderem der Aktivierung der MAP-Kinasen.³¹ Zudem können Syk-defiziente B-Zellen nicht vom unreifen in das reife B-Zell-Stadium übergehen.⁵⁰

Initial wurde das Profil der BCR-Aktivierung in humanen B-Lymphozyten mittels Analyse der Phosphorylierung von Syk an den Tyrosinresten Y348 und Y352 evaluiert. P-Syk in BCR-stimulierten Zellen wurde mit unstimulierten B-Lymphozyten verglichen. $F(ab')_2$ -Fragmente, die gegen humanes IgM und IgG gerichtet sind, dienten der Aktivierung der BCRs auf der Oberfläche sowohl von naiven (IgM-exprimierenden/pre-switch), als auch von Gedächtnis- (IgG-exprimierenden/post-switch) B-Lymphozyten und wurden den PBMCs für 8 Minuten hinzugesetzt. Zur Beurteilung unstimulierter B-Lymphozyten wurden PBMCs für dieselbe Zeitdauer lediglich mit PBS inkubiert. Antikörper gegen p-Syk (Y348) und (Y352) ermöglichten eine durchflusszytometrische Analyse dieser Phosphorylierungsorte, die in der Verbindungsregion zwischen Kinase- und SH2-Domänen von Syk liegen und unmittelbar nach BCR-Aktivierung phosphoryliert werden. Mittels eines Anti-CD20-Antikörpers wurden die B-Lymphozyten innerhalb der PBMCs identifiziert (Abb. 4.1).

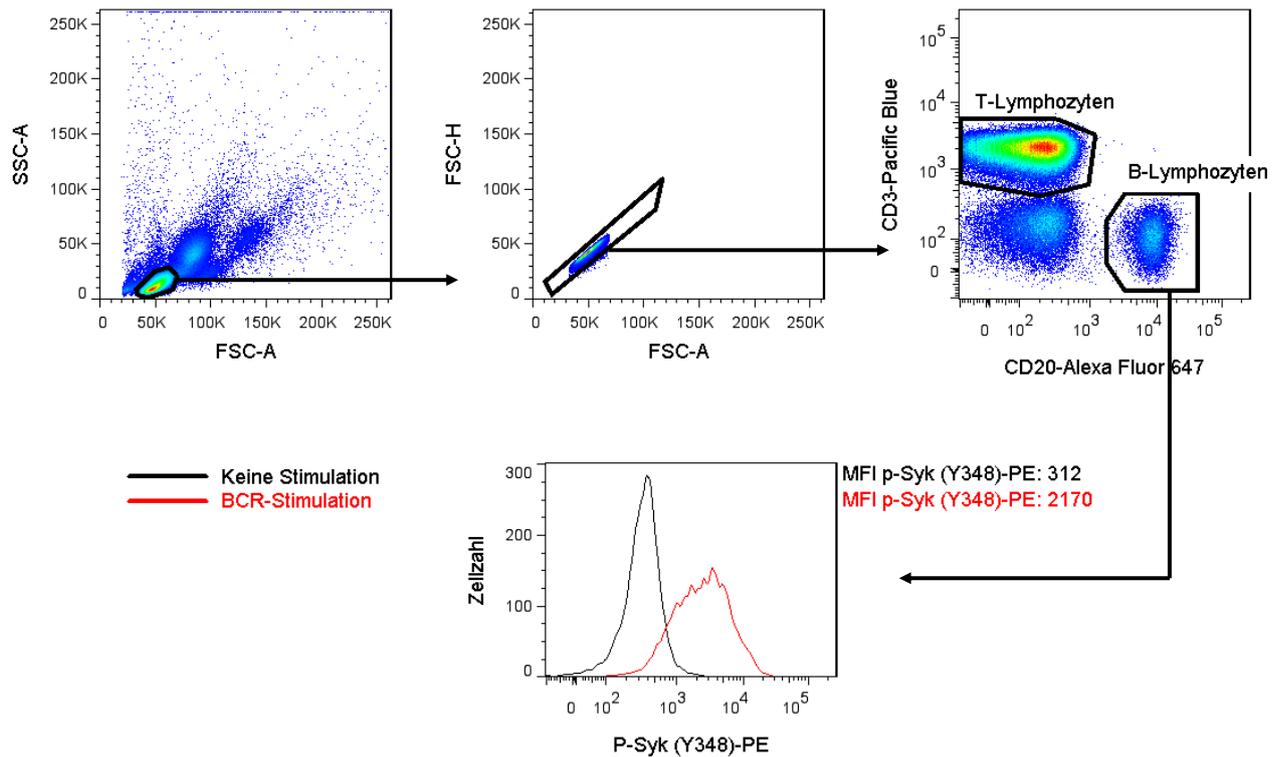


Abbildung 4.1. Durchflusszytometrische Untersuchung von B-Lymphozyten zur Analyse der Expression von p-Syk (Y348) vor und nach BCR-Stimulation. Das Gate des ersten Dot Plots umfasst den überwiegenden Anteil der Lymphozyten unter allen PBMCs. Das mittlere Dot Plot grenzt mögliche Zellaggregate (Dubletten) aus. B-Lymphozyten wurden durch einen Anti-CD20-Alexa Fluor 647-Antikörper markiert. Der intrazelluläre Anti-p-Syk (Y348)-Antikörper war PE-konjugiert. Die untere Darstellung zeigt exemplarisch Histogramme für unstimulierte (schwarz) und BCR-stimulierte (rot) B-Lymphozyten eines gesunden Spenders. Die Abszisse zeigt die Fluoreszenzintensität für PE an (logarithmische Skala). Am Histogramm sind die MFIs für p-Syk (Y348)-PE angegeben.

In der Histogrammdarstellung wurde die Fluoreszenzintensität des gebundenen Antikörpers gegen die Zellzahlen aufgetragen. Dadurch ergaben sich Kurven, die ihren Gipfel in dem Fluoreszenzbereich haben, in welchem sich die meisten Zellen der Population befinden. Verschiebungen entlang der Abszisse sind Ausdruck eines veränderten Phosphorylierungsprofils von Syk in der analysierten Population. Die p-Syk-Profile ließen sich durch Ermittlung der geometrischen mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) für PE quantifizieren, welches die Fluoreszenzkopplung der Anti-p-Syk-Antikörper reflektiert.

In vitro BCR-Simulationen führten interessanterweise bei allen Probanden zu einem Anstieg der Phosphorylierung von Syk (Y348) und (Y352). Bei allen Probanden war die MFI von p-Syk (Y348) in BCR-stimulierten Zellen gegenüber der MFI unstimulierter Zellen 3,5 bis 7fach erhöht. Im dargestellten Beispiel (Abb. 4.1) betrug die MFI 312 bei unstimulierten und 2174 bei stimulierten B-Lymphozyten. Bei Betrachtung von p-Syk (Y352) war die MFI BCR-stimulierter Zellen gegenüber der MFI unstimulierter Zellen 4,7 bis 6fach erhöht.

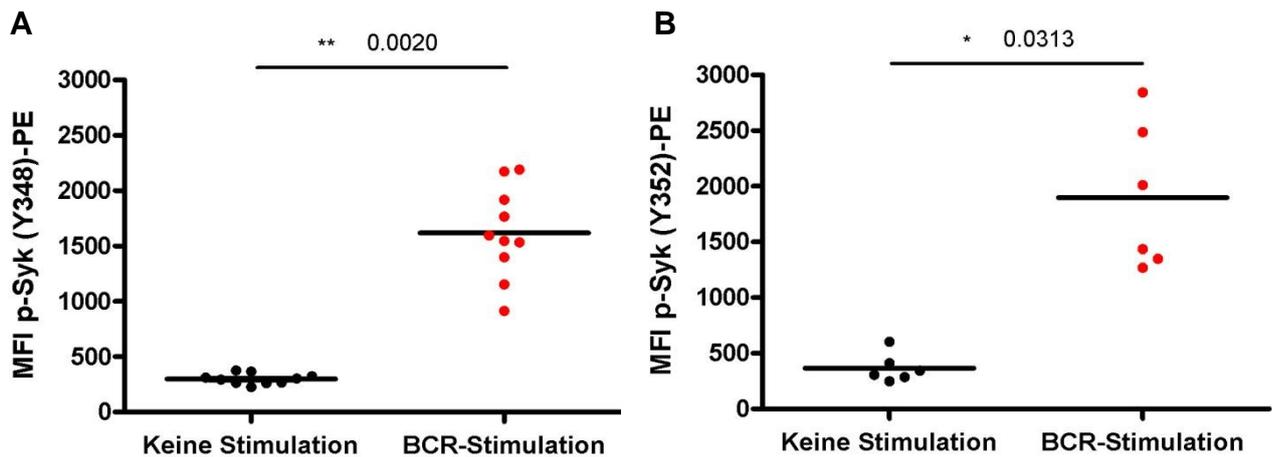


Abbildung 4.2. BCR-Stimulation induziert eine Phosphorylierung von Syk (Y348) und (Y352). Vergleich von (A) p-Syk (Y348)-PE (n = 10), sowie (B) p-Syk (Y352)-PE (n = 6) von unstimulierten (schwarz) versus mittels F(ab')₂-anti-IgM/IgG (13 µg/ml) stimulierten (rot) B-Lymphozyten. Die Analyse schließt alle CD20⁺ B-Lymphozyten ein. Statistische Analysen erfolgten anhand des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests. P-Werte < 0,05 galten als statistisch signifikant.

Der Unterschied zwischen unstimulierten und BCR-stimulierten B-Lymphozyten war hinsichtlich beider Phosphorylierungsorte signifikant unterschiedlich (Abb. 4.2). BCR-Stimulation bewirkte eine unterschiedlich starke Induktion der Syk-Phosphorylierung bei den Probanden. Zwischen dem geringsten p-Syk (Y348)-MFI-Wert (913) und dem höchsten Wert (2191) nach BCR-Stimulation lag eine vergleichsweise große Spannbreite. Der arithmetische Mittelwert der MFIs stimulierter Zellen betrug 1619 (SD ± 411) für p-Syk (Y348) und 1899 (SD ± 658) für p-Syk (Y352). Die MFIs für p-Syk (Y348) unstimulierter B-Zellen zeigten dagegen eine wesentlich geringere Standardabweichung. Unstimulierte B-Lymphozyten hatten für p-Syk (Y348) eine MFI von 299 (± 47) und für p-Syk (Y352) eine MFI von im Durchschnitt 367 (± 129). Abb. 4.2 fasst die ermittelten MFIs zusammen.

4.1.2 CD22-Ligation durch Epratuzumab inhibiert die Phosphorylierung von Syk nach BCR-Stimulation

Der humanisierte monoklonale Antikörper Epratuzumab vom IgG₁-Typ bindet an CD22, ein B-Zell-spezifisches Oberflächenmolekül. Es wurde gezeigt, dass es nach Bindung zur Phosphorylierung der intrazellulären CD22-Domäne und zur Internalisierung kommt.⁴⁷ Es ist bekannt, dass phosphoryliertes CD22 nachfolgend die Phosphatase SHP-1 aktiviert, welche p-Syk und weitere Substrate der BCR-Signaltransduktion deaktiviert. Um den Einfluss von Epratuzumab auf eine B-Lymphozytenaktivierung zu testen, wurden PBMCs mit Epratuzumab

in den Konzentrationen 10 und 20 $\mu\text{g/ml}$ für 60 Minuten vorbehandelt. Anschließend erfolgte eine BCR-Stimulation und die Signaltransduktion wurde anhand des Phosphorylierungsstatus von Syk (Y348) und (Y352) evaluiert.

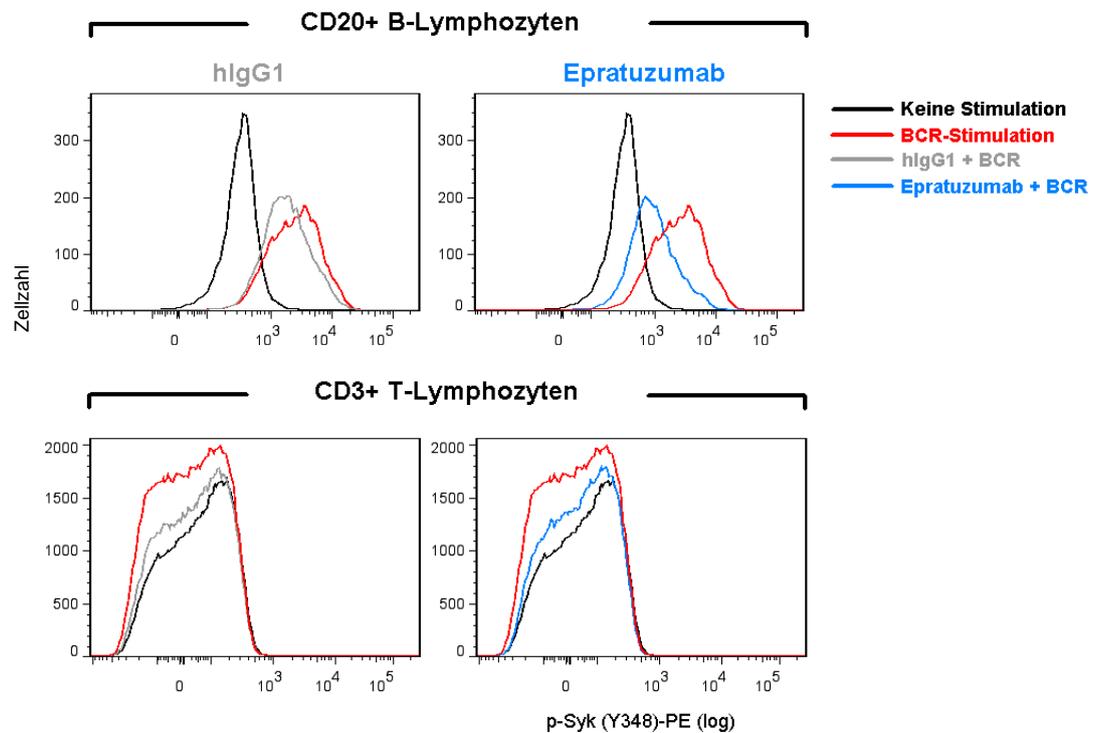


Abbildung 4.3. Auswirkungen von Epratuzumab auf humane B- und T-Lymphozyten. Histogrammdarstellung eines gesunden Spenders zum Vergleich der Phosphorylierung von Syk (Y348) in unstimulierten (schwarz) versus stimulierten B- bzw. T-Lymphozyten, die mit PBS (rot), humanem IgG₁ (grau) oder Epratuzumab (blau) in einer effektiven Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ vorinkubiert worden sind. Die Analyse schließt alle CD20⁺ B-Lymphozyten ein.

Es wurden zunächst alle B-Lymphozyten analysiert. Eine differenzierte Analyse der B-Zell-Subpopulationen erfolgt in Kapitel 4.1.4. Vorbehandlung mit Epratuzumab (10 bzw. 20 $\mu\text{g/ml}$) führte in den B-Lymphozyten aller Probanden zu einer reduzierten Syk-Phosphorylierung (Y348). Als Kontrolle dienten Zellen, die nicht vorbehandelt, d. h. lediglich mit PBS vorinkubiert und danach stimuliert worden waren. In einer weiteren Kontrolle wurden Zellen mit humanem IgG₁ (10 bzw. 20 $\mu\text{g/ml}$) vorinkubiert. Es fand sich unter Einsatz von 10 $\mu\text{g/ml}$ hIgG₁ bei 8 von 10 Probanden eine geringfügig reduzierte Syk-Phosphorylierung nach BCR-Stimulation. Unter 20 $\mu\text{g/ml}$ IgG₁ war bei allen Probanden eine mäßige Reduktion der Phosphorylierung nachweisbar. Allerdings war bei allen Proben die Syk-Phosphorylierung unter Einfluss des spezifischen Antikörpers Epratuzumab substantiell stärker verringert als unter hIgG₁. Der Unterschied war hoch-signifikant ($P = 0,002$ bei 10 $\mu\text{g/ml}$, $P = 0,0078$ bei 20 $\mu\text{g/ml}$). Abbildung 4.4 fasst die MFIs aller Probanden zusammen.

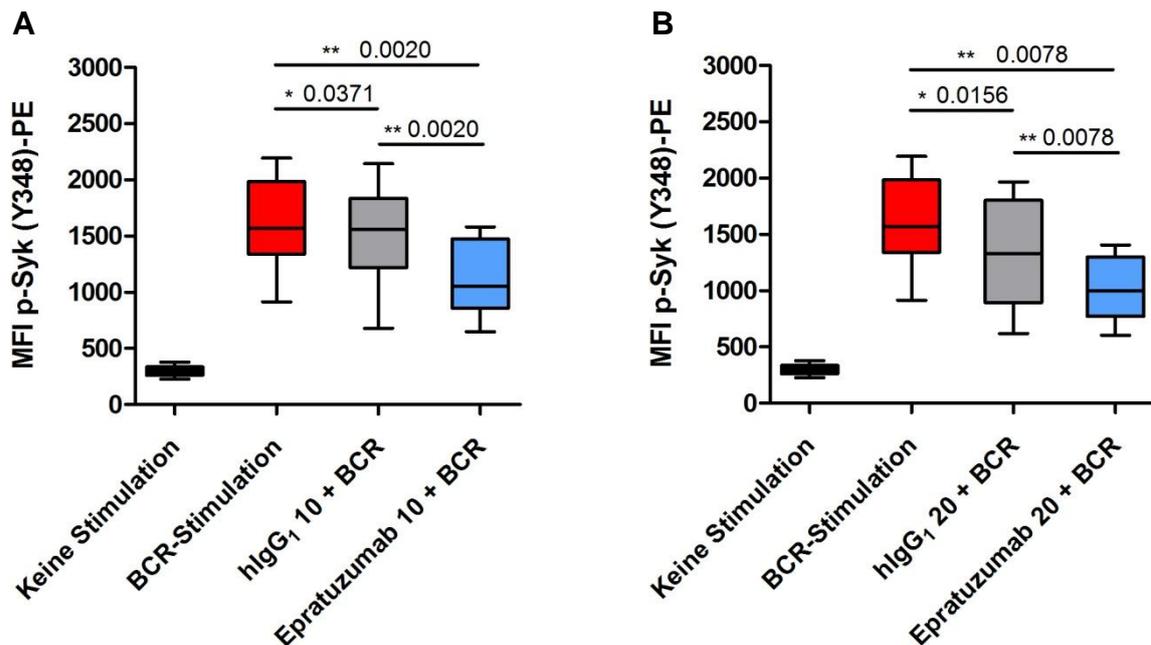


Abbildung 4.4. Epratuzumab und in wesentlich geringerem Umfang hIgG₁ inhibieren die Phosphorylierung von Syk (Y348) unter BCR-Stimulation. (A) Analyse der Unterschiede zwischen dem Einfluss von hIgG₁ (grau) und Epratuzumab (blau) in einer Konzentration von 10 µg/ml (n = 10) bzw. (B) 20 µg/ml (n = 8) auf BCR-stimulierte B-Lymphozyten, CD20⁺. Bei dem Box-Whisker-Plot handelt es sich um eine Darstellung der 50%-Daten innerhalb der Box sowie des Medians. Die Whiskers zeigen die Maximal- bzw. Minimalwerte. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test.

Epratuzumab-Vorinkubation bewirkte gegenüber PBS-Vorinkubation im Durchschnitt eine Verminderung von p-Syk (Y348) um 29% (\pm 16%) bei Einsatz von 10 µg/ml und um 37% (\pm 12%) bei 20 µg/ml. In dem Zusammenhang zeigte sich eine klare Dosis-Wirkungsbeziehung. Mit ansteigender Dosis war eine Verminderung der Standardabweichungen zu verzeichnen. 10 µg/ml humanes IgG₁ bewirkte eine Verringerung bzw. Veränderung der Syk-Phosphorylierung um 8% (\pm 11%), 20 µg/ml hIgG₁ verringerte p-Syk um 20% (\pm 19%). Durchschnittlich reduzierte hIgG₁ (10 µg/ml) die MFI um einen Wert von 118 (SD \pm 175). Epratuzumab (10 µg/ml) dagegen verringerte die MFI für p-Syk (Y348) um 490 (SD \pm 350) gegenüber PBS. Die Standardabweichungen waren bei Schwankungen zwischen den individuellen Spendern relativ hoch. In T-Lymphozyten wurde keine Induktion einer Syk-Phosphorylierung (Y348) durch BCR-Stimulation nachgewiesen (Abb. 4.3).

Im Folgenden wurde in PBMCs von sechs gesunden Probanden die Syk-Phosphorylierung am Tyrosinrest Y352 im Detail untersucht. Die PBMCs wurden mit Epratuzumab bzw. als Kontrollen hIgG₁ sowie PBS inkubiert und daraufhin am BCR stimuliert (Abb. 4.5).

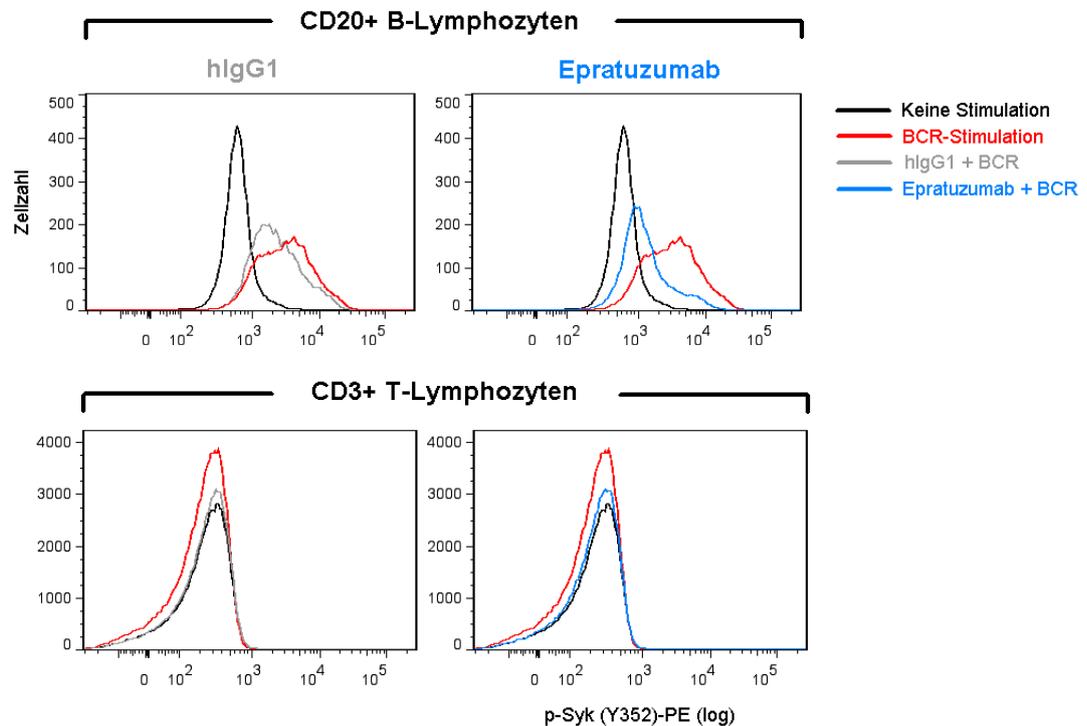


Abbildung 4.5. Auswirkungen von Epratuzumab und BCR-Stimulation auf p-Syk (Y352) in humanen B- und T-Zellen. Vergleich der Phosphorylierung von Syk (Y352) in unstimulierten (schwarz) versus stimulierten B-Lymphozyten, die mit PBS (rot), hIgG₁ (grau) oder Epratuzumab (blau) vorinkubiert worden sind. Der Anti-P-Syk (Y352)-Antikörper erkennt in T-Zellen das strukturell homologe Protein ZAP-70 der Syk-Familie (Zeta-chain-associated protein kinase 70) in seiner phosphorylierten Form, das in der Initiierung der T-Zell-Rezeptor-Signaltransduktion beteiligt ist. ZAP-70 ist nicht in peripheren B-Lymphozyten exprimiert.⁵¹

Epratuzumab (10 µg/ml) bewirkte gegenüber PBS eine statistisch signifikante Verringerung von p-Syk (Y352) ($P = 0,0313$) in B-Lymphozyten (Abb. 4.6). Ein inhibitorischer Effekt von hIgG₁ (10 µg/ml) wurde zwar numerisch bei einigen Probanden beobachtet, war aber statistisch nicht signifikant. Durch Einfluss von Epratuzumab fand sich durchschnittlich eine Reduktion der p-Syk (Y352)-MFI um 33% ($SD \pm 14\%$). Es gab keine Unterschiede in der Syk (Y352) bzw. ZAP-70-Phosphorylierung in CD3⁺ T-Zellen nach BCR- und simultaner Epratuzumab-Stimulation (Abb. 4.5).

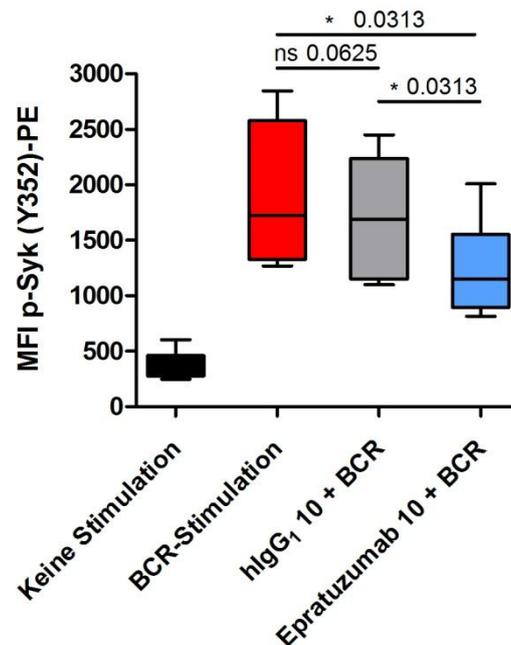


Abbildung 4.6. Epratuzumab inhibiert die Phosphorylierung von Syk (Y352) unter BCR-Stimulation. BCR-stimulierte PBMCs wurden mit PBS (rot), hlgG₁ (grau) oder Epratuzumab (blau) vorinkubiert und auf die Phosphorylierung von Syk (Y352) untersucht (n = 6). Die Analyse schließt alle CD20⁺ Zellen aus dem Lymphozytengate ein (Gating-Strategie s. Abb. 4.1). ns, nicht signifikant.

4.1.3 Epratuzumab zeigt eine stärkere Bindung an naive CD27⁻ im Vergleich zu CD27⁺ B-Lymphozyten basierend auf der Expression von CD22

Im Folgenden fand eine differenzierte Analyse des Einflusses von Epratuzumab auf unterschiedliche B-Zell-Subpopulationen statt. Diese wurden anhand des CD27-Oberflächenmoleküls klassifiziert, dessen Expression charakteristisch für die Unterscheidung von naiven versus Gedächtnis-B-Zellen sowie Plasmazellen ist.⁵² So sind naive B-Lymphozyten überwiegend CD27⁻, während Gedächtnis-B-Lymphozyten überwiegend CD27⁺ sind. Plasmazellen exprimieren sehr stark CD27.

Experimente zur CD22-Expression der beiden B-Lymphozytenpopulationen zeigten, dass naive CD27⁻ B-Lymphozyten signifikant mehr CD22 exprimieren als CD27⁺ Gedächtnis-B-Lymphozyten. In CD27⁻ B-Zellen war die CD22-Expression 1,9fach ($\pm 0,2$) erhöht (Abb. 4.7 A). Nun sollte die Bindung von Epratuzumab an B-Lymphozyten überprüft werden. Zu diesem Zweck wurde eine Färbung mit Fluoreszenz-gekoppeltem Epratuzumab durchgeführt. Es zeigte sich, dass CD27⁻ B-Zellen eine signifikant stärkere Epratuzumab-Bindung aufwiesen als CD27⁺ B-Zellen (Abb. 4.7 B).

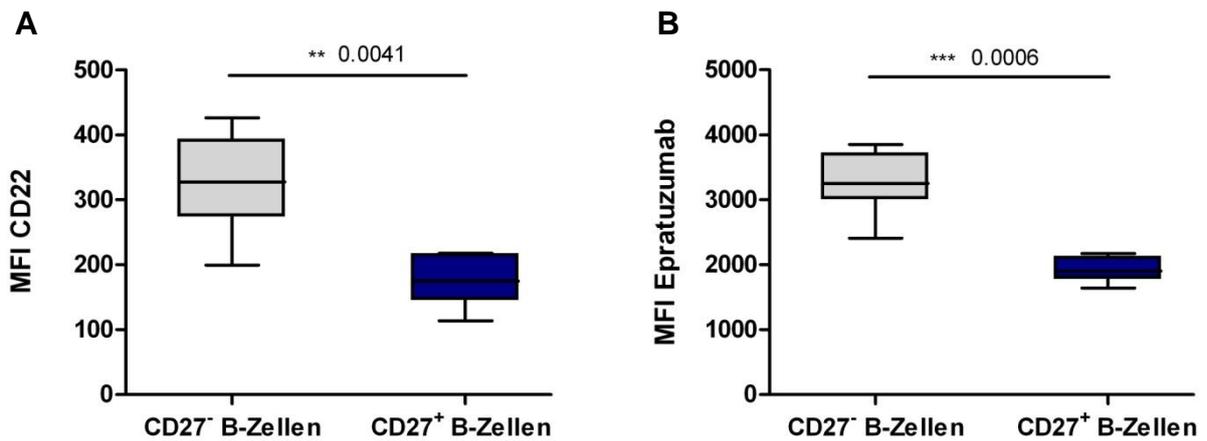


Abbildung 4.7. Vergleich der CD22-Expression von CD27⁻ und CD27⁺ B-Lymphozyten. PBMCs wurden mit einem Anti-CD20-, Anti-CD27- und (A) mit einem Anti-CD22-Antikörper gefärbt (n = 7). (B) PBMCs wurden mit Epratuzumab-Alexa 488 angefärbt (n = 7). Die Analysen schließen alle CD20⁺ B-Lymphozyten ein. Unterschiede zwischen den CD20⁺CD27⁻ und den CD20⁺CD27⁺ Populationen wurden anhand des Mann-Whitney-Tests untersucht.

Die Epratuzumab-Bindung war auf CD27⁻ gegenüber CD27⁺ B-Zellen durchschnittlich 1,7fach ($\pm 0,2$) stärker. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit der CD22-Expression dieser beiden B-Zell-Subpopulationen. Abbildung 4.8 verdeutlicht die quantitativen Unterschiede in der Epratuzumab-Bindung anhand eines Beispiels.

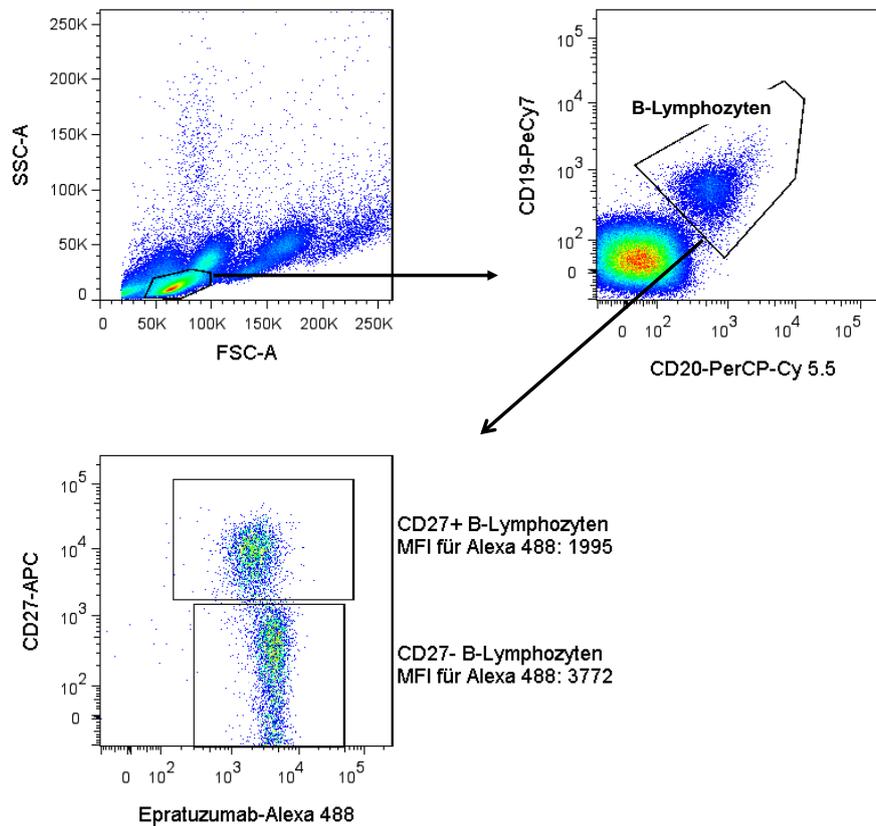


Abbildung 4.8. Epratuzumab bindet stärker an CD27⁻ naive B-Lymphozyten als an CD27⁺ Gedächtnis-B-Lymphozyten. B-Lymphozyten wurden innerhalb des Lymphozytengates gemäß ihrer CD19- und CD20-Expression gegatet. Ein CD27-Antikörper ermöglichte die quantitative Analyse der Epratuzumab-Bindung in CD27⁻ versus CD27⁺ B-Lymphozyten.

4.1.4 CD22-Ligation inhibiert die Phosphorylierung von Syk in der CD27⁻ und CD27⁺ Population der B-Lymphozyten

Bisherige Kenntnisse über Wirkmechanismen des therapeutischen CD22-Antikörpers (Migrationsänderung und Abnahme der zirkulierenden B-Lymphozyten) betrafen nur die CD27⁻ naive Subpopulation der B-Lymphozyten. In Kapitel 4.1.3 wurde erläutert, dass CD27⁻ B-Zellen deutlich stärker CD22 exprimieren und verstärkt Epratuzumab binden als vergleichsweise CD27⁺ B-Zellen. Basierend auf diesen Vorkenntnissen sollte das BCR-Signal dieser zwei B-Zell-Subpopulationen unter Einfluss von Epratuzumab differenziert untersucht werden.

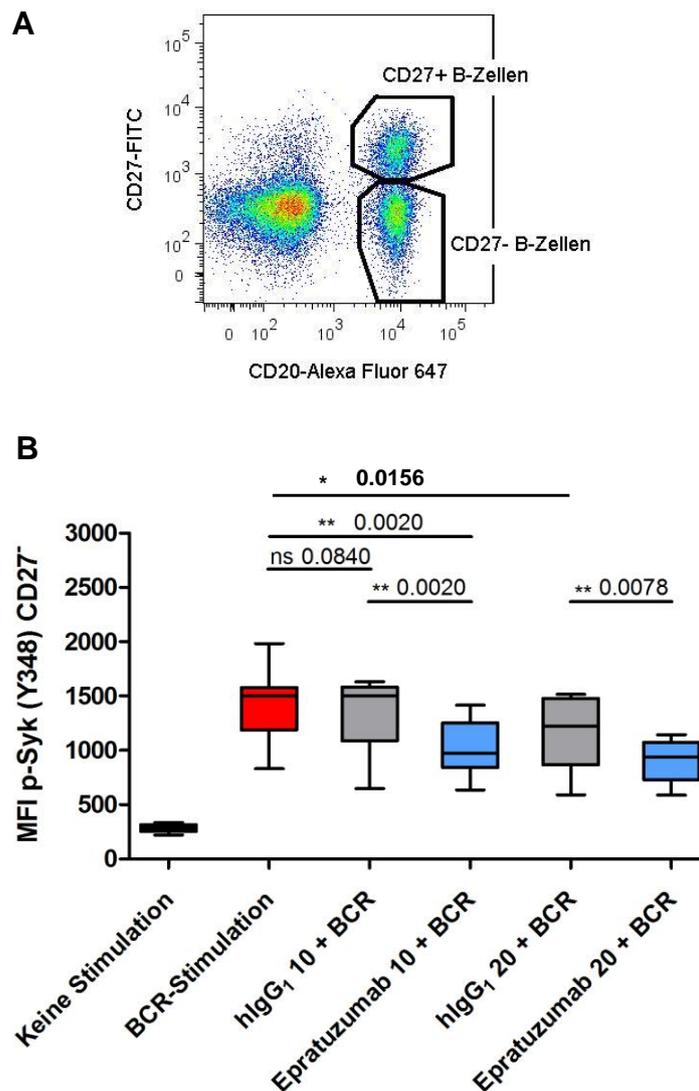


Abbildung 4.9. Epratuzumab inhibiert die BCR-Signaltransduktion von CD27⁻ B-Lymphozyten. (A) Innerhalb der CD20⁺ B-Lymphozytenpopulation wurden CD27⁻ und CD27⁺ B-Lymphozyten gated. (B) Analyse der CD20⁺CD27⁻ B-Zellen aller Probanden im Hinblick auf Unterschiede zwischen unstimulierten (schwarz) und stimulierten B-Lymphozyten unter dem Einfluss von PBS (rot), humanem hIgG₁ (grau) oder Epratuzumab (blau); n = 10 bei 10 µg/ml, n = 8 bei 20 µg/ml.

Naive B-Lymphozyten, die mit hIgG₁ in einer Konzentration von 10 µg/ml vorbehandelt und BCR-stimuliert worden waren, zeigten keine statistisch signifikante Reduktion von p-Syk (Y348) gegenüber der PBS-Kontrolle, wenngleich bei 7 von 10 Probanden die Phosphorylierung geringfügig gemindert war. Die Verringerung bzw. Veränderung von p-Syk (Y348) durch hIgG₁ (10 µg/ml) lag bei 7% (± 9%). In einer Konzentration von 20 µg/ml induzierte hIgG₁ eine statistisch signifikante Verringerung der Syk-Phosphorylierung gegenüber PBS (P = 0,0156). Epratuzumab (10 bzw. 20 µg/ml) bewirkte eine hoch-signifikante Inhibition der Syk-Phosphorylierung unter BCR-Stimulation sowohl verglichen mit der PBS-Kontrolle als auch mit der hIgG₁-Kontrolle. In naiven B-Zellen verringerte Epratuzumab (10 µg/ml) die Syk-

Phosphorylierung durchschnittlich um 26% ($\pm 14\%$) und in einer Konzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ um 34% ($\pm 11\%$).

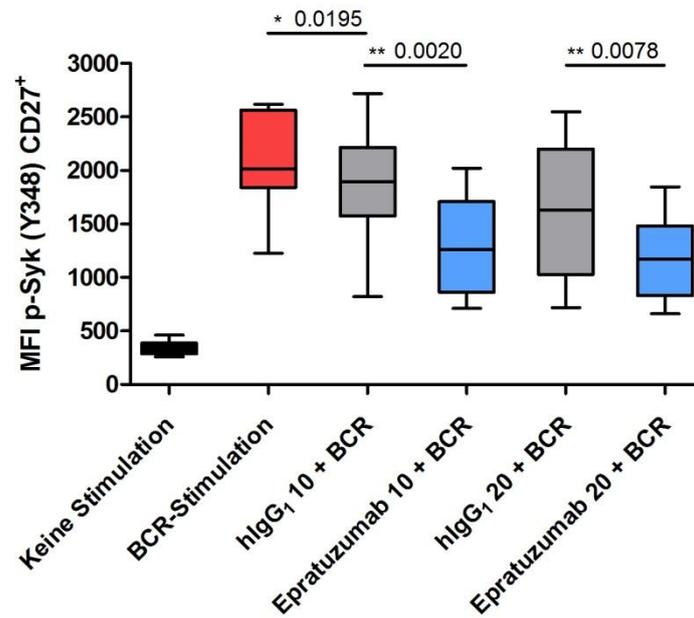


Abbildung 4.10. Epratuzumab inhibiert die BCR-Signaltransduktion von CD27⁺ B-Lymphozyten. Analyse der CD20⁺CD27⁺ B-Lymphozyten (n = 10 bei 10 $\mu\text{g/ml}$, n = 8 bei 20 $\mu\text{g/ml}$).

Das p-Syk (Y348)-Profil in CD27⁺ B-Zellen (Abb. 4.10) wies ein wesentlich höheres Baseline-Niveau als naive B-Zellen auf. Die MFI-Werte sowohl unstimulierter als auch stimulierter B-Zellen waren in CD27⁺ B-Zellen erhöht. Durch BCR-Stimulation erfuhren CD27⁺ B-Lymphozyten einen durchschnittlich 5,1fachen (± 1) Anstieg der MFIs für p-Syk (Y348). Stimulierte CD27⁺ B-Zellen hatten Probanden-abhängig MFI-Werte von 831 bis 1983. Stimulierte CD27⁺ B-Zellen hatten dagegen MFI-Werte zwischen 1226 bis 2619. Bei dieser Subpopulation war der Anstieg unter BCR-Stimulation durchschnittlich 6,1fach ($\pm 1,1$). Die Induzierbarkeit der Syk-Phosphorylierung durch BCR-Stimulation war daher bei CD27⁺ Zellen substantiell höher als bei CD27⁻ B-Zellen.

In CD27⁺ B-Zellen reduzierte Epratuzumab die Syk-Phosphorylierung unter BCR-Stimulation durchschnittlich um 35% ($\pm 17\%$) bei Einsatz von 10 $\mu\text{g/ml}$ und um 43% ($\pm 12\%$) bei 20 $\mu\text{g/ml}$. Somit war der Effekt ausgeprägter als in CD27⁻ B-Zellen. HIgG₁ hatte ebenfalls einen inhibitorischen Effekt auf p-Syk in CD27⁺ B-Zellen, Epratuzumab-behandelte Tests zeigten jedoch ein 2-3,5fach starkes inhibitorisches Potential. Die statistische Analyse zeigte eine signifikant stärkere Inhibition durch Epratuzumab gegenüber der hlgG₁-Kontrolle.

Zusammenfassend zeigte Epratuzumab einen negativ regulatorischen Effekt auf die Syk-Phosphorylierung in CD27⁻ und CD27⁺ B-Zellen. Der Epratuzumab-Effekt auf p-Syk war gegenüber hIgG₁ jeweils wesentlich stärker ausgeprägt.

4.1.5 Syk ist höher in CD27⁺ als in CD27⁻ B-Zellen exprimiert

Ein erhöhtes Fluoreszenzniveau für p-Syk (Y348) und p-Syk (Y352) in stimulierten CD27⁺ gegenüber CD27⁻ B-Lymphozyten ist in den vorangegangenen Stimulationsexperimenten beobachtet worden. In der weiteren Analyse wurde die Natur dieser Unterschiede genauer untersucht, insbesondere sollte eine veränderte Grundmenge an Syk in den einzelnen Zellen adressiert werden. Daher wurde die quantitative Expression von Syk in seiner Gesamtheit, phosphoryliert oder unphosphoryliert, in den B-Zell-Subpopulationen untersucht. Gleichzeitig wurde der basale Phosphorylierungsstatus von Syk festgehalten, der von experimentellen Stimuli weitgehend unbeeinflusst war. Zu diesem Zweck wurden Vollblutproben direkt fixiert, permeabilisiert und gefärbt. In den Proben wurden Gesamt-Syk und p-Syk (Y348) simultan angefärbt.

In CD27⁻ naiven B-Zellen lag die MFI für Syk durchschnittlich bei 1580 (\pm 356), in CD27⁺ B-Zellen lag sie bei 2413 (\pm 441). Das Molekül Syk war in CD27⁺ B-Zellen signifikant höher exprimiert als in CD27⁻ B-Zellen (Abb. 4.11 A).

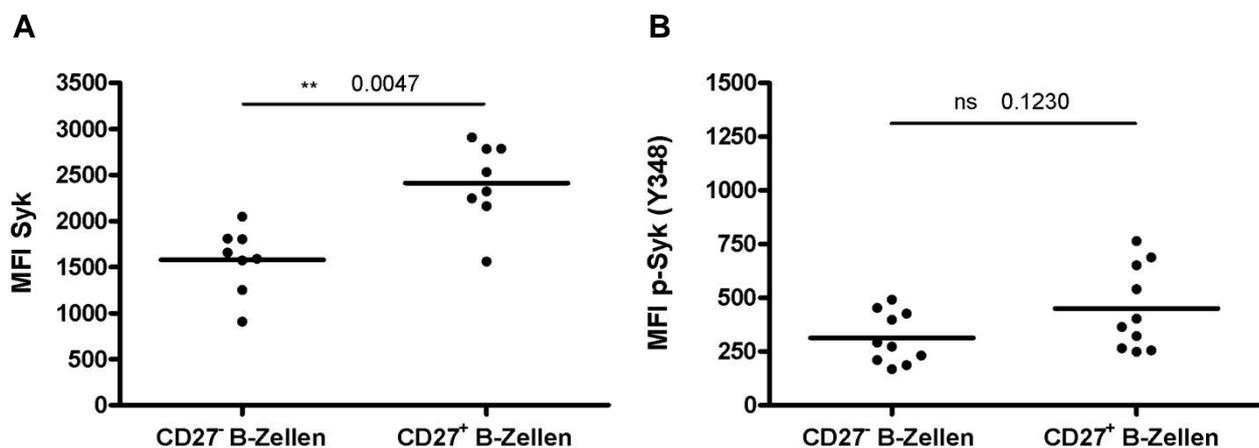


Abbildung 4.11. Die Gesamtausdrucksion von Syk ist höher in CD27⁺ als in CD27⁻ B-Lymphozyten. (A) Die Expression von Syk (n = 8) und (B) das basale p-Syk-Niveau (n = 10) in B-Lymphozyten wurden nach Fixierung von Vollblutproben ermittelt. Die Analysen beziehen sich auf CD20⁺ Lymphozyten. Statistische Unterschiede zwischen den B-Zell-Subpopulationen wurden mittels Mann-Whitney-Test ermittelt.

Die MFI für p-Syk (Y348) betrug bei der Analyse aller B-Lymphozyten durchschnittlich 353 (SD \pm 143). CD27⁺ zeigten gegenüber CD27⁻ B-Lymphozyten tendenziell erhöhte MFI-Werte für p-Syk (Y348). So zeigten die MFIs von naiven CD27⁻ B-Zellen Werte zwischen 168 und 492, die MFIs von CD27⁺ B-Zellen lagen im Bereich von 250 bis 764. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant (Abb. 4.11 B).

Das Verhältnis von p-Syk (348) zu Gesamt-Syk war zwischen den beiden B-Lymphozyten-Populationen nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 4.12).

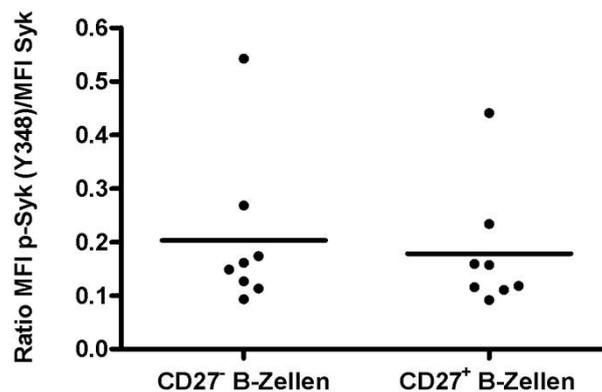


Abbildung 4.12. Keine signifikanten Unterschiede im relativen Phosphorylierungsniveau zwischen naiven und Gedächtnis-B-Zellen. In unbehandelten B-Zellen aus Vollblut wurde das Verhältnis von p-Syk (Y348) zu Gesamt-Syk berechnet (n = 8) und zwischen der CD27⁺ und CD27⁻ Population verglichen. Mann-Whitney-Test.

4.2 Die Inhibition der Syk-Phosphorylierung erfolgt unabhängig vom Fc-Fragment von Epratuzumab

In Kap. 4.1 erläuterte Ergebnisse haben gezeigt, dass Epratuzumab eine starke und humanes IgG₁ eine moderate inhibitorische Wirkung auf den Phosphorylierungsgrad von Syk (Y348) und (Y352) nach BCR-Stimulation ausübte. Die durch Epratuzumab (10 μ g/ml) erreichte Inhibition war dabei in allen durchgeführten Tests stärker und lag bezogen auf die Gesamtheit der B-Lymphozyten bei durchschnittlich 29% (Y348) bzw. 33% (Y352).

Der Korezeptor Fc γ RIIB des B-Zell-Rezeptors ist ein niedrig-affiner Rezeptor für den Fc-Teil von Immunglobulin G. Es ist bekannt, dass er eine inhibitorische Wirkung auf das BCR-Signal ausübt.³³ Um zu belegen, dass die inhibitorische Wirkung von Epratuzumab nicht bzw. nicht allein durch den Fc-Teil dieses IgG₁-Moleküls provoziert wurde, sondern durch die spezifische Anbindung des variablen Bereichs an CD22, wurden die PBMCs in einem weiteren Experiment

lediglich mit dem $F(ab')_2$ -Fragment dieses therapeutischen Antikörpers inkubiert. Daraufhin erfolgte die BCR-Stimulation und die durchflusszytometrische Analyse des p-Syk (Y348)-Niveaus entsprechend der vorherigen Experimente. Auch eine mögliche Komplexbildung zwischen $F(ab')_2$ -anti-IgG-Fragmenten und dem Fc-Teil von Epratuzumab und somit Neutralisierung des BCR-stimulierenden Agens konnte bei Einsatz von $F(ab')_2$ -Epratuzumab ausgeschlossen werden.

$F(ab')_2$ -Epratuzumab (10 $\mu\text{g/ml}$) bewirkte in naiven $CD27^-$ B-Zellen eine Herunterregulation von p-Syk (Y348) um durchschnittlich 34% ($\pm 10\%$). In $CD27^+$ B-Zellen verminderte $F(ab')_2$ -Epratuzumab p-Syk um 33% ($\pm 12\%$). Abb. 4.13 fasst die MFIs der Spender zusammen. Bei diesem Experiment war somit der modulierende Effekt von $F(ab')_2$ -Epratuzumab auf $CD27^-$ und $CD27^+$ B-Lymphozyten vergleichbar hoch. Dahingegen wies der Einsatz des kompletten Epratuzumab-Moleküls (10 $\mu\text{g/ml}$) eine stärkere Verminderung der Syk-Phosphorylierung in $CD27^+$ (35%) als in $CD27^-$ (26%) B-Zellen auf (Kap. 4.1.4).

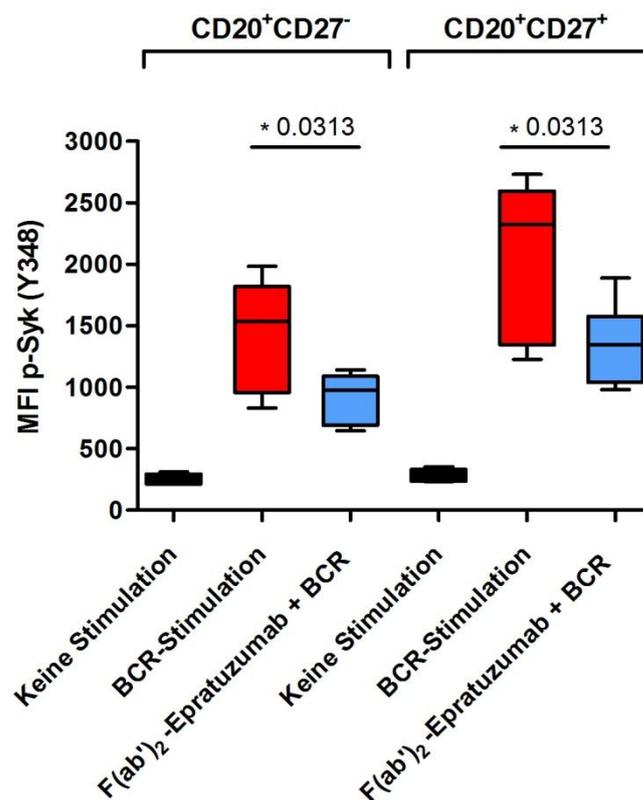


Abbildung 4.13. $F(ab')_2$ -Epratuzumab inhibiert die Phosphorylierung von Syk (Y348) unter BCR-Stimulation. BCR-stimulierte PBMCs wurden mit PBS (rot) oder $F(ab')_2$ -Epratuzumab (blau) vorinkubiert und auf die Phosphorylierung von Syk (Y348) untersucht (n = 6). Effekt in $CD20^+CD27^-$ und $CD20^+CD27^+$ B-Lymphozyten.

In einem folgenden Experiment wurde die Menge an $F(ab')_2$ -anti-IgM/IgG titriert. In diesen Ansätzen sollte bestätigt werden, dass mit der Wahl der Konzentration von 13 $\mu\text{g/ml}$ eine maximal starke Induktion eines intrazellulären BCR-Signals - gemessen an der Syk-Phosphorylierung - erzielt wurde, wie sie im Rahmen der stimulatorischen Potenz quervernetzender $F(ab')_2$ -Fragmente möglich ist. Die mononukleären Zellen dieses Experiments sind nach therapeutischer Splenektomie aus der Milz eines Patienten mit Autoimmunthrombozytopenie isoliert worden. Einer Inkubationsphase mit PBS versus $F(ab')_2$ -Epratuzumab (10 $\mu\text{g/ml}$) schloss sich eine BCR-Stimulation mit $F(ab')_2$ -anti-BCR in unterschiedlichen Konzentrationen an.

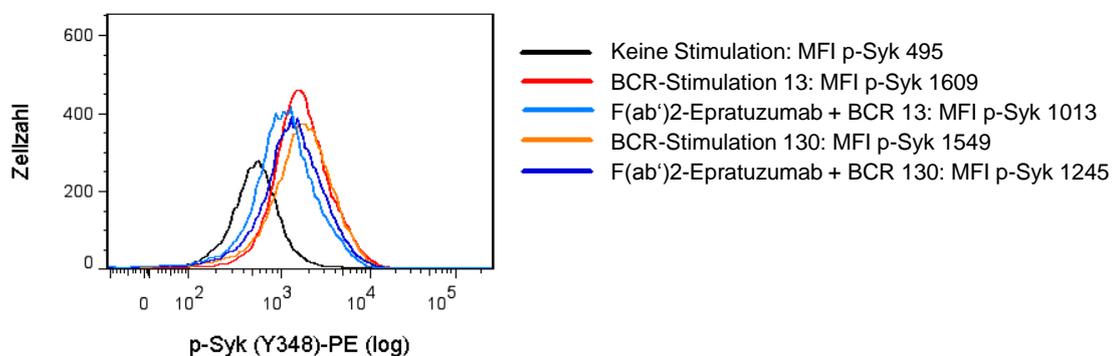


Abbildung 4.14. Titration von $F(ab')_2$ -anti-IgM/IgG zur Optimierung der BCR-Stimulation. Analyse aller $CD20^+$ B-Lymphozyten. BCR-Stimulation mittels 13 $\mu\text{g/ml}$ und 130 $\mu\text{g/ml}$ $F(ab')_2$ -anti-IgM/IgG-Fragmente induzierte eine gleichermaßen starke Phosphorylierung von Syk (Y348). Darstellung des Einflusses einer 60minütigen Vorinkubation mit $F(ab')_2$ -Epratuzumab (blau und dunkelblau) oder PBS (rot und orange).

$F(ab')_2$ -anti-IgM/IgG in einer Konzentration von 13 $\mu\text{g/ml}$ erzeugte einen Anstieg der p-Syk-MFI auf 1609. Der Einsatz von 130 $\mu\text{g/ml}$ erhöhte im Vergleich zu 13 $\mu\text{g/ml}$ die p-Syk-MFI nicht. $F(ab')_2$ -Epratuzumab bewirkte in B-Lymphozyten humaner Milz eine 37%ige Verminderung von p-Syk unter BCR-Stimulation mittels 13 $\mu\text{g/ml}$ $F(ab')_2$ -anti-BCR. Bei Einsatz von 130 $\mu\text{g/ml}$ $F(ab')_2$ -anti-IgM/IgG war die inhibitorische Wirkung von $F(ab')_2$ -Epratuzumab verringert und betrug nur noch 20%.

4.3 Syk und PLC- γ 2 haben ein Aktivierungsmaximum nach 2-5 Minuten BCR-Stimulation

Die Phospholipase C- γ 2 wird durch Syk und die Bruton's tyrosine kinase (Btk) aktiviert und katalysiert daraufhin die Produktion der second messenger Inositol-1,4,5-trisphosphat (InsP₃) und Diacylglycerol (DAG) aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PtdInsP₂). Dies führt u. a. zur Mobilisation intrazellulären Calciums.²⁵

Für die Darstellung einer Aktivierungskinetik von Syk (Y348) und PLC- γ 2 wurde der Phosphorylierungsstatus dieser Moleküle nach 0, 10 und 30 Sekunden sowie 1, 2, 5, 8, 30 Minuten anhaltender BCR-Stimulation fixiert. Auch für dieses Experiment wurden PBMCs gesunder Probanden getestet und insbesondere CD20⁺ B-Zellen auf deren intrazelluläre Syk- und PLC- γ 2-Phosphorylierungen untersucht.

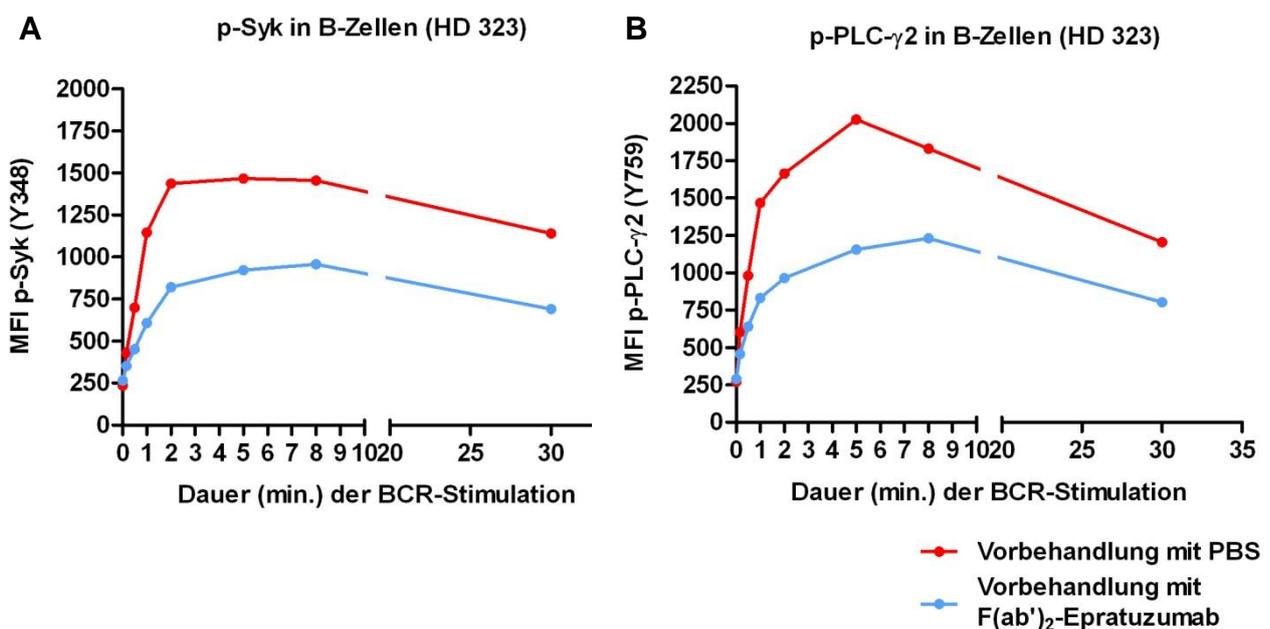


Abbildung 4.15. Syk und PLC- γ 2 können durch Vorbehandlung mit F(ab')₂-Epratuzumab nicht voll aktiviert werden. Phosphorylierungskinetik bei Gesunden (HD 323 = healthy donor 323). Humane PBMCs wurden mit F(ab')₂-anti-IgM und -IgG für die angezeigte Dauer stimuliert und anschließend fixiert, so dass der Phosphorylierungsstatus von (A) Syk und (B) PLC- γ 2 nach 0/10/30 Sekunden und 1/2/5/8/30 Minuten BCR-Stimulation registriert werden konnte. Die rote Kurve zeigt die Phosphorylierung in CD20⁺ B-Zellen, welche 60 min. mit Medium inkubiert worden waren, die blaue zeigt die Phosphorylierung nach Inkubation mit F(ab')₂-Epratuzumab (10 μ g/ml).

Die Zellen wurden nach Stimulation, Fixierung und Permeabilisation simultan für p-Syk und p-PLC- γ 2 angefärbt. Syk zeigte eine Tendenz für ein Aktivierungsmaximum nach 2 Minuten, PLC- γ 2 hatte ein Maximum nach 5 Minuten BCR-Aktivierung. Die MFI von p-Syk stieg im

angezeigten Beispiel der Abb. 4.15 A nach 10 Sekunden von 236 (unstimulierte Zellen) auf 430 an. Nach einminütiger Stimulation stieg diese auf 1146 an, nach 5 Minuten auf 1467. Die MFI für phosphoryliertes PLC- γ 2 in B-Zellen stieg nach 10 Sekunden konstitutiver BCR-Aktivierung von 271 auf 602, nach 1 Minute auf 1468 und nach 5 Minuten auf ein Maximum von 2025 an. Bemerkenswerterweise reduzierte eine CD22-Ligation der Zellen durch F(ab')₂-Epratuzumab die Phosphorylierung von Syk und PLC- γ 2 zu jedem registrierten Zeitpunkt. Nach 5 Minuten BCR-Aktivierung betrug am Beispiel der Abb. 4.15 die partielle Reduktion der Syk-Phosphorylierung 37% und die Reduktion von p-PLC- γ 2 43%. Zusammengefasst fand sich zwischen dem Zeitraum von 30 Sekunden bis 30 Minuten BCR-Aktivierung durch Vorbehandlung mit F(ab')₂-Epratuzumab eine Reduktion von p-Syk um 35-47% und eine Reduktion von p-PLC- γ 2 um 33-43% gegenüber unbehandelten Zellen. Bei einem weiteren Spender zeigte das Experiment eine ähnliche Kinetik (Abb. 4.16).

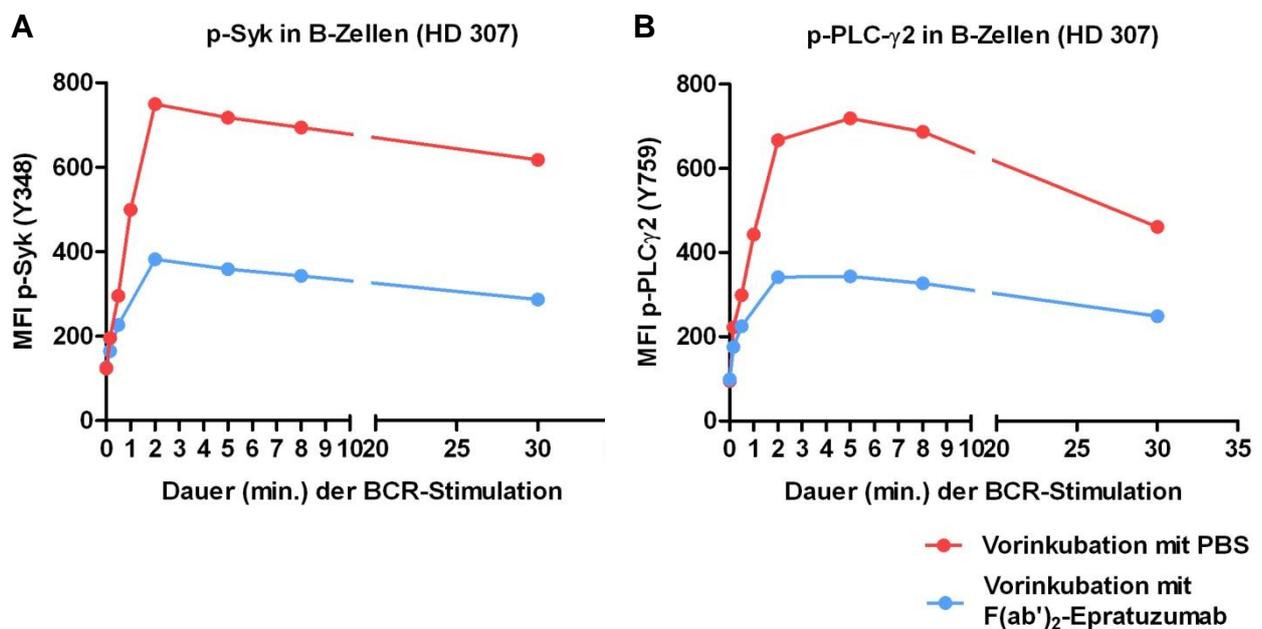


Abbildung 4.16. Phosphorylierungskinetik von Syk und PLC- γ 2 unter BCR-Stimulation. (A) P-Syk (Y348) bzw. (B) p-PLC- γ 2 in CD20⁺ B-Zellen wurde nach 60 min. Vorinkubation mit Medium (rot) bzw. 10 μ g/ml F(ab')₂-Epratuzumab (blau) zu angezeigten Zeitpunkten der BCR-Stimulation gemessen.

4.4 F(ab')₂-Epratuzumab inhibiert den BCR-induzierten intrazellulären Langzeit-Ca²⁺-Anstieg

Die Syk-Phosphorylierung unter BCR-Stimulation resultiert in der Mobilisierung intrazellulären Calciums. Folgende Analysen sollten testen, ob eine CD22-Ligation durch F(ab')₂-Epratuzumab Änderungen in der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration bewirken konnten. Zu diesem Zweck wurden humane isolierte B-Lymphozyten mit dem Fluoreszenzfarbstoff Indo-1 AM beladen, welcher im Zellinneren durch Bindung an Calcium bei der durchflusszytometrischen Bestimmung ein verändertes Emissionsmaximum gegenüber ungebundenem Indo-1 AM hat. Durch die Berechnung und das Monitoring der Ratio zwischen gebundenem und ungebundenem Fluoreszenzfarbstoff konnten Aussagen über die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration und deren Veränderung über die Zeit getroffen werden.

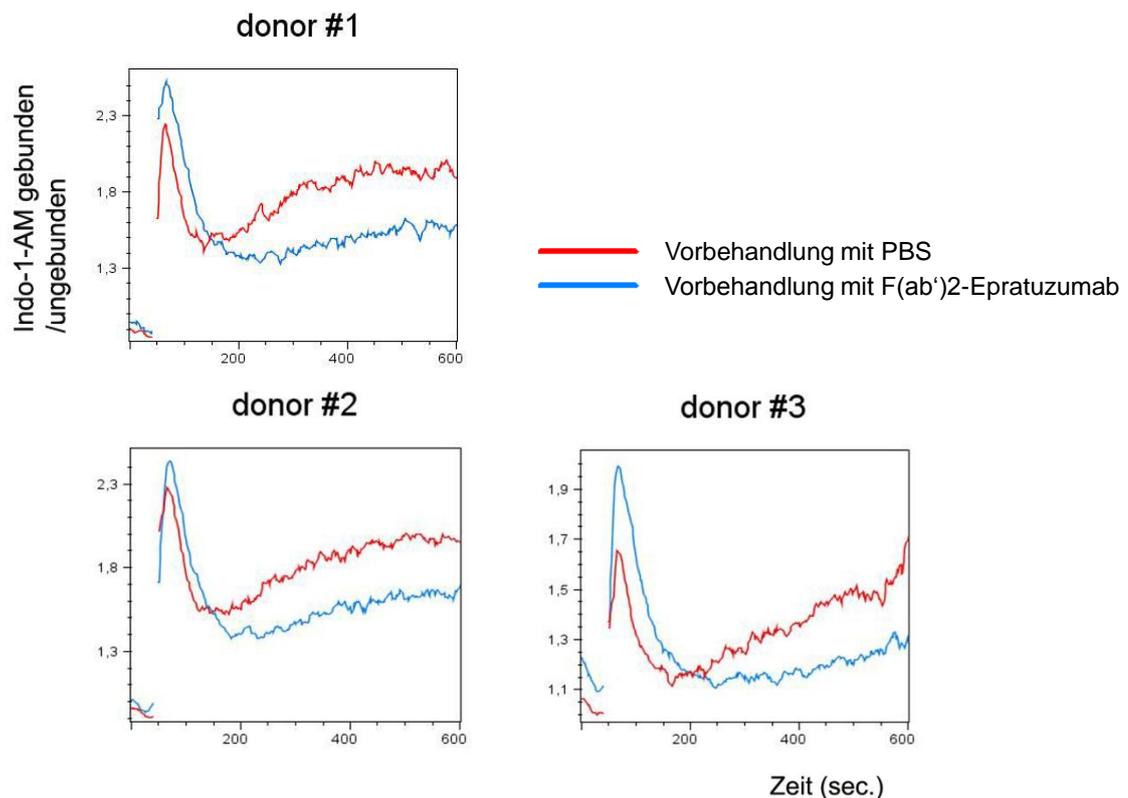


Abbildung 4.17. F(ab')₂-Epratuzumab inhibiert das intrazelluläre Langzeit-Ca²⁺-Signal unter BCR-Stimulation. Die Histogramme vergleichen das Verhältnis zwischen Ca²⁺-gebundenem und ungebundenem Indo-1 AM in B-Zellen, die 60 min. mit Medium (rot) bzw. F(ab')₂-Epratuzumab (blau) inkubiert worden sind. Start der BCR-Stimulation nach 40 sec. Die Histogramme repräsentieren drei verschiedene Experimente und Probanden. Jedes Experiment wurde in Triplikaten durchgeführt.

Nach einer Baseline-Messung der Ratio in unstimulierten B-Zellen über 40 Sekunden wurde durch Zugabe von F(ab')₂-anti-IgM und -IgG eine BCR-Stimulation induziert und über weitere

9:20 Minuten bis zur vollendeten 10. Minute gemessen. Die BCR-Stimulation bewirkte einen initialen raschen Calciumanstieg mit einem Maximum zur 16. Sekunde nach Stimulation (Abb. 4.17, Donor 1). Vorbehandlung mit F(ab')₂-Epratuzumab bewirkte eine moderate Erhöhung des Ca²⁺ während dieser Phase der Aktivierung. Nach dem initialen Ca²⁺-Peak wurde ein weiterer andauernder Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration beobachtet, welcher in unbehandelten Zellen circa ab der 90. Sekunde nach Beginn anhaltender BCR-Stimulation begann und sich bis zum Ende des Monitorings fortsetzte. Interessanterweise konnte in vorbehandelten Zellen eine starke Reduktion dieses langanhaltenden Ca²⁺-Anstiegs, sowie eine Verzögerung des Anstiegs um ca. 100 Sekunden beobachtet werden. Alle getesteten Probanden präsentierten ähnliche Kinetiken. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Bindung des CD22-Rezeptors durch Epratuzumab in der Lage ist, die intrazelluläre Ca²⁺-Homöostase unter BCR-Stimulation zu beeinflussen.

4.5 Epratuzumab zeigt keinen Effekt auf die Syk-Phosphorylierung der humanen NHL-Zelllinie Ramos

4.5.1 BCR-Stimulation induziert eine Syk-Aktivierung in Ramos-Zellen

Das *in vitro* BCR-Stimulationsmodell wurde für Analysen der Syk-Phosphorylierung in der Burkitt-Lymphom-Zelllinie Ramos etabliert. In sieben unabhängigen Experimenten wurden die BCRs der Zelloberfläche mittels F(ab')₂-anti-BCR aktiviert und die Signalüberleitung in das Zellinnere anhand der Syk-Phosphorylierung evaluiert. Abb. 4.18 zeigt die Gating-Strategie an, die zur Ermittlung der MFIs für p-Syk in den unterschiedlich stimulierten Ramos-Zellen angewandt wurde.

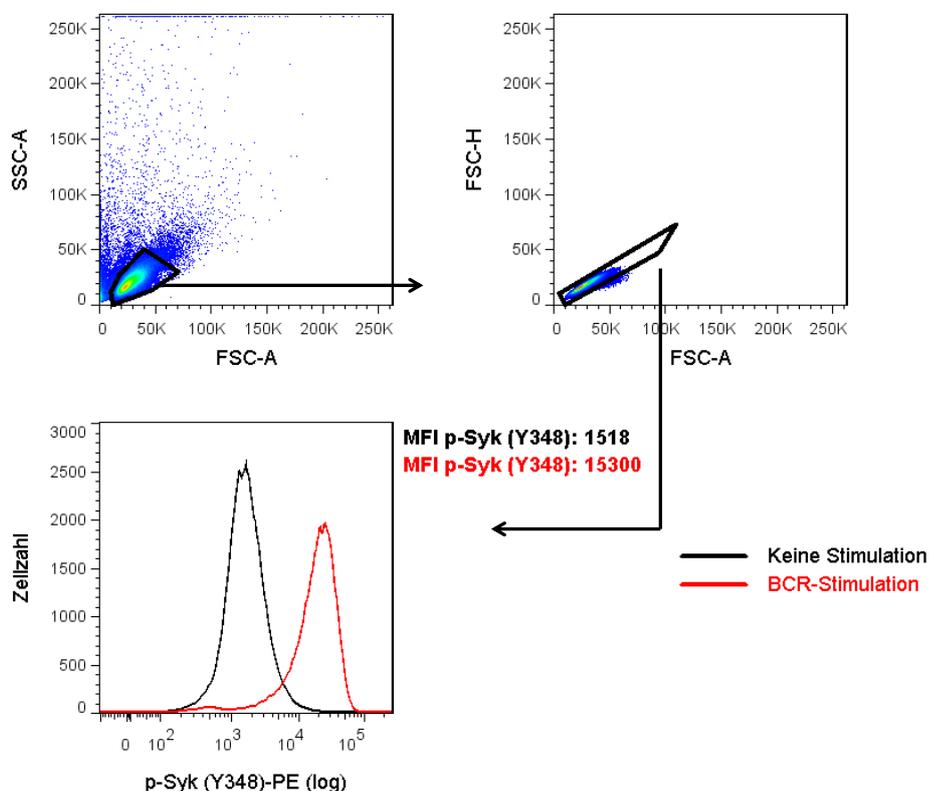


Abbildung 4.18. Gating-Strategie Ramos-Zellen. Ein großzügiges Gate im ersten Dot-Plot schließt den überwiegenden Anteil der Ramos-Zellen ein. Darauffolgend werden mögliche Dubletten ausgegrenzt. Das Histogramm der unteren Reihe zeigt eine Überlagerung der Graphen für unstimulierte (schwarz) und BCR-stimulierte (rot) Ramos-Zellen.

Unstimulierte Ramos-Zellen zeigten eine geringe Varianz in der Syk-Phosphorylierung. MFIs für p-Syk (Y348) lagen durchschnittlich bei 1583 mit einer geringen Standardabweichung von ± 108 . Auffällig innerhalb der Experimente war, dass BCR-stimulierte Ramos-Zellen von Experiment zu Experiment eine unterschiedlich hohe Induktion der Syk-Phosphorylierung

zeigten. Die entsprechenden MFI-Werte reichten von 4096 bis 15307. Die Zunahme an p-Syk (Y348) infolge BCR-Stimulation war durchschnittlich 4,7fach ($\pm 2,7$) und bemerkenswerterweise waren MFI-Werte dieser Lymphomzellen für p-Syk deutlich höher als in humanen B-Lymphozyten. Abb. 4.19 zeigt den signifikanten Anstieg von p-Syk (Y348) nach BCR-Aktivierung.

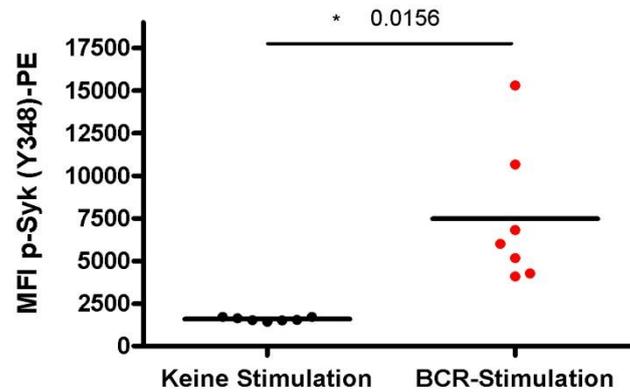


Abbildung 4.19. BCR-Stimulation induziert eine Phosphorylierung von Syk (Y348) in Ramos-Zellen. Das p-Syk (Y348)-Profil wurde nach 8minütiger Inkubation mit PBS (schwarz) bzw. mit F(ab')₂-anti-IgM und -IgG (rot) fixiert (n = 7). Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test.

4.5.2 CD22-Expression auf Ramos

Eine weitere, detaillierte Studie zur CD22-Oberflächenexpression von Ramos-Zellen war notwendig, um sicher zu stellen, dass der therapeutische Anti-CD22-Antikörper Epratuzumab ein hinreichend exprimiertes Zielmolekül aufweist. Die Zellen wurden daher mit einem Anti-CD22-PE-Antikörper bzw. mit Epratuzumab-PE gefärbt. Beide Antikörper wiesen eine deutliche Bindung an Ramos-Zellen auf (Abb. 4.20).

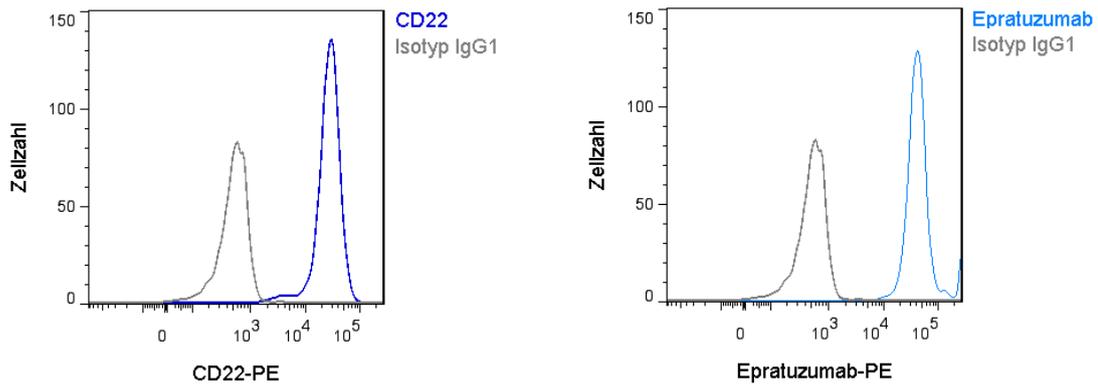


Abbildung 4.20. Analyse der CD22-Oberflächenexpression auf Ramos-Zellen. (A) CD22 (dunkelblau) wird auf dieser Zelllinie deutlich exprimiert. (B) PE-markiertes Epratuzumab (blau) zeigt analog eine Bindung an Ramos-Zellen.

4.5.3 Epratuzumab induziert keinen inhibitorischen Effekt in der Ramos-Zelllinie

Die Induktion eines intrazellulären Signals infolge BCR-Aktivierung konnte in Ramos-Zellen gezeigt werden. Diese Zellen exprimieren CD22 und es konnte eine Epratuzumab-Bindung an die Zelloberfläche nachgewiesen werden. Unter BCR-Stimulation wurde ein inhibitorischer Effekt von Epratuzumab auf die Syk-Phosphorylierung humaner B-Lymphozyten bei ausnahmslos allen Probanden beobachtet. Es war somit in diesen Experimenten von großem Interesse, die Wirkung von Epratuzumab auf Ramos-Zellen detaillierter zu analysieren, da bekannt ist, dass die Expression von SHP-1 in diesen Zellen substantiell verringert ist.^{53,54} SHP-1 ist eine Phosphatase, die durch phosphoryliertes CD22 aktiviert wird und verantwortlich für die Deaktivierung von Syk und Substraten der BCR-Signalkette ist.

Ramos-Zellen wurden durch Quervernetzung der B-Zell-Rezeptoren stimuliert. Während der Präinkubationsphase wurde der Einfluss von Epratuzumab in unterschiedlichen Konzentrationen (1, 10 und 100 µg/ml) ausgetestet. In keiner der untersuchten Konzentrationen bzw. Versuchsansätze konnten durch Epratuzumab reproduzierbare Veränderungen in der Phosphorylierung von Syk in der Ramos-Zelllinie nachgewiesen werden (Tabelle 4.1). Die MFI-Werte stimulierter Zellen zeigten innerhalb der unterschiedlichen Testbedingungen Varianzen, welche keine einheitliche Tendenz der Wirkung von Epratuzumab oder hIgG₁ auf die Syk-Phosphorylierung durch Epratuzumab erkennen ließen. Insgesamt müssen die Schwankungen der MFI-Werte zu dem sehr starken Fluoreszenzprofil der Tumorzellen in Verhältnis gesetzt werden.

Tabelle 4.1. MFI-Werte für p-Syk (Y348) in sechs Ramos-Experimenten.

Versuch	#1	#2	#3	#4	#5	#6
Keine Stimulation	1520	1431	1547	1714	1641	1518
BCR-Stimulation	4096	4368	6816	5163	6002	15300
hIgG ₁ 1 µg/ml + BCR		3624	5340	6053	7261	13700
hIgG ₁ 10 µg/ml + BCR	4147	2913	5574	5265	7484	15400
hIgG ₁ 100 µg/ml + BCR		1240	5372	6719	8434	
Epratuzumab 1 µg/ml + BCR		4262	5317	5613	7855	16300
Epratuzumab 10 µg/ml + BCR	5097	5633	4766	5556	9216	16100
Epratuzumab 100 µg/ml + BCR		3903	6014	5380	9033	

Im angezeigten Beispiel der Abb. 4.21 betrug die MFI für p-Syk in PBS-inkubierten Ramos-Zellen 15300, in hIgG₁-inkubierten Zellen (10 µg/ml) 15400 und in Epratuzumab-inkubierten Zellen (10 µg/ml) 16100. Die Unterschiede waren somit nicht wesentlich.

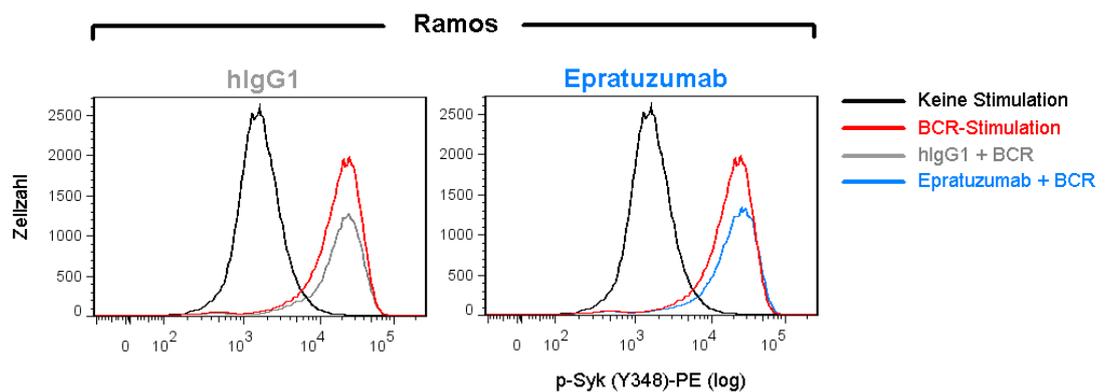


Abbildung 4.21. Epratuzumab zeigt keinen Einfluss auf p-Syk (Y348) unter BCR-Stimulation in Ramos-Zellen. Exemplarische Darstellung eines Experiments, bei dem Ramos-Zellen 60 Minuten lang mit Epratuzumab (10 µg/ml) inkubiert und daraufhin 8 Minuten lang BCR-stimuliert worden war. Die Graphen zeigen die Fluoreszenzmaxima unstimulierter (schwarz) und stimulierter Zellen unter dem Einfluss von PBS (rot), Epratuzumab (blau) und hIgG₁ (grau).

5 Diskussion

Die Phosphorylierung der Tyrosinkinase Syk ist ein frühes und für die Signalweiterleitung unentbehrliches Ereignis innerhalb der B-Zell-Rezeptor-Signalkaskade. Die Aktivierung von Syk und nachfolgend dem Signalmolekül PLC- γ 2, sowie eine charakteristische Induktion des intrazellulären Ca^{2+} -Flusses kann experimentell durch Stimulation des BCR mittels Anti-Immunglobulin-Antikörpern, die sich gegen den vom jeweiligen B-Lymphozyten exprimierten Isotypen richten, induziert werden. Unter dem *in vitro* Einsatz von Epratuzumab, einem monoklonalen therapeutischen CD22-Antikörper, konnte eine Modulation der quantitativen Syk- und PLC- γ 2-Phosphorylierung und des Ca^{2+} -Flusses unter BCR-Stimulation nachgewiesen werden. Die hier gezeigten Untersuchungen zu diesem B-Zell-gerichteten Medikament bestätigen und spezifizieren eine gegenwärtig vermutete immunmodulatorische Wirkweise des monoklonalen Antikörpers als mögliche Alternative bzw. Ergänzung zur Anti-CD20-Therapie bei Autoimmunerkrankungen.

5.1 Untersuchungen zur Phosphorylierung von Syk

Für die Fragestellung sollte zunächst das Phosphorylierungsprofil von Syk unter BCR-Stimulation analysiert werden. Hierzu bot sich die Durchflusszytometrie unter Verwendung Fluoreszenz-markierter Antikörper an. Neuartige phosphospezifische Antikörper haben sich innerhalb der letzten Jahre etabliert und ermöglichten den Vergleich zwischen unstimulierten und stimulierten B-Lymphozyten in ihrer quantitativen Phosphorylierung von Syk. Die verwendeten intrazellulären Antikörper sind hochspezifisch für die Phosphorylierungsorte Y348 und Y352 dieses Proteins und wurden in dieser Arbeit für die Analysen etabliert.

BCR-Stimulation führt zur Phosphorylierung der assoziierten $\text{Ig}\alpha$ und $\text{Ig}\beta$ -Untereinheiten des BCR-Komplexes an seinen ITAMs. In der Folge wird Syk an den BCR-Komplex angelagert und nimmt eine offene und aktive Konformation ein. Durch seine Assoziation mit dem membrangebundenen BCR-Rezeptor kann Syk verstärkt an seinen Tyrosinresten autophosphorylieren und phosphoryliert werden. Die Phosphorylierungsorte Y348 und Y352 erfüllen dabei wichtige, positiv regulatorische Funktionen in der Weiterleitung von BCR-Signalen. Ihre Elimination führt zur erheblichen Herabsetzung nachgeordneter Signale wie der Phosphorylierung von PLC- γ 2 und der Mobilisierung von Ca^{2+} . Zusätzlich fungieren sie in ihrer phosphorylierten Form als Bindungspartner für weitere Signalmoleküle. Aufgrund dieser

funktionellen Relevanz war es von Interesse, gerade diese beiden benachbarten Phosphorylierungsorte zu untersuchen und durchflusszytometrisch zu messen.

Eine 8 Minuten andauernde BCR-Stimulation induzierte eine 3,5 bis 7fach erhöhte Phosphorylierung von Syk (Y348) und eine 4,7 bis 6fache Erhöhung von Syk (Y352) in B-Lymphozyten unterschiedlicher Probanden. Die quantitative Syk-Phosphorylierung wurde anhand der mittleren Fluoreszenzintensität evaluiert. Diese lag nach BCR-Stimulation bezüglich p-Syk (Y348) bei durchschnittlich 1619 (SD \pm 411) und für p-Syk (Y352) bei 1899 (SD \pm 658). Die Induzierbarkeit von p-Syk zeigte zwischen den Probanden somit starke interindividuelle Unterschiede. Dies bestätigt interessanterweise die Vermutung, dass unterschiedliche Probanden charakteristische Aktivierungspotentiale haben, welche in ihrer Höhe deutlich variieren.

In unstimulierten B-Lymphozyten betrug die MFI von p-Syk (Y348) durchschnittlich 299 (\pm 47) und bezüglich p-Syk (Y352) 367 (\pm 129). Es stellt sich hierbei die Frage, ob dieses Fluoreszenzprofil tatsächlich einer basalen Syk-Phosphorylierung von unstimulierten B-Lymphozyten entspricht. Das akzeptierte Konzept einer tonischen Signalgebung des BCR, die von Ligandenbindung unabhängig ist, geht von einer Basisphosphorylierung aus. Dies konnte durch Untersuchungen bestätigt werden, die *de novo* Phosphorylierungen von Protein-Tyrosinkinasen der BCR-Signalkaskade ohne Einwirkung durch stimulierende Antigene beobachtet haben.²³ Ablationen der signalgebenden Iga- und Igβ-Untereinheiten des BCR-Komplexes bewirken einen Abbruch des BCR-Signals und in der Folge einen Verlust der peripheren B-Lymphozytenpopulation.^{19,55} Eine tonische Signalwirkung ist überlebensnotwendig für B-Lymphozyten. Das Equilibriums-Modell von Monroe beschreibt die Interaktion zwischen Rezeptor-assoziierten Protein-Tyrosinkinasen und Tyrosinphosphatasen. Auf der einen Seite führen Iga- und Igβ-vermittelte BCR-Signale zur ständigen Phosphorylierung von Syk und somit zur Signalinitiierung, auf der anderen Seite bewirken CD22-vermittelte Signale die Rekrutierung von SHP-1 und die Terminierung der BCR-Signalgebung. Das Resultat dieser Interaktion wird als tonische Signalwirkung bezeichnet.²²

In den hier beschriebenen Experimenten waren die B-Lymphozyten vor Beginn der BCR-Stimulation physikalischen und chemischen Reizen, darunter der Exposition mit Lymphozytenseparationsmedium, Dichtegradientenzentrifugation und Lagerung auf Eis, ausgesetzt. Die p-Syk-MFIs unstimulierter Zellen zeigten eine äußerst geringe Standardabweichung zwischen den Probanden. Es ist unwahrscheinlich, dass in diesem Stimulationsmodell die gemessenen MFIs für p-Syk (Y348) und (Y352) der unstimulierten Proben ein physiologisches tonisches BCR-Signal repräsentieren. Im Wesentlichen diente die

unstimulierte Probe jedoch als Ausgangspunkt, der die Induzierbarkeit der Phosphorylierung von Syk durch BCR-Stimulation verdeutlichen sollte.

Der therapeutische Antikörper Epratuzumab zeigte in unseren Experimenten keinerlei Einfluss auf die Syk-Phosphorylierung unstimulierter B-Zellen (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise konnte von Chen et al. durchflusszytometrisch eine tonische Syk-Phosphorylierung in malignen B-Zelllinien gezeigt werden. Darüber hinaus wurde eine Reduktion der Basisphosphorylierung durch Behandlung mit dem Syk-Inhibitor R406 nachgewiesen.²⁴ In B-Zell-Lymphomen ist die tonische Signalbildung im Verhältnis zu humanen B-Lymphozyten pathologisch erhöht und gilt sogar als wichtiger Schrittmacher für die erhöhte Proliferation dieser Zellen.

Das Equilibriums-Modell von Monroe gab Anlass zu weiteren Experimenten. Eine Phosphorylierung von Syk in unstimulierten B-Zellen sollte detektiert werden und als Indiz für die tonische Generierung von Signalen durch den B-Zell-Rezeptor dienen. Das hier diskutierte Experiment sollte den Phosphorylierungsstatus von Syk unter möglichst physiologischen Bedingungen detektieren. Vollblut gesunder Probanden wurde nach Entnahme direkt fixiert und lysiert und der p-Syk (Y348)-Status gemessen. Dieser war in diesem Fall mit einer durchschnittlichen MFI von 353 ($SD \pm 143$) erhöht und die Streuung wesentlich stärker als in unstimulierten PBMCs des Vorexperimentes. Somit wurde im Gegensatz zum Stimulationsexperiment hier eine Varianz zwischen den Probanden im basalen p-Syk-Profil beobachtet. Dies steht im Einklang mit der Vorstellung, dass die tonische Signalgebung bei verschiedenen Spendern ein unterschiedlich hohes Niveau hat.

Simultan wurde in den B-Lymphozyten die Gesamtheit des Proteins Syk - phosphoryliert und unphosphoryliert - angefärbt. Die MFI von Syk war in den $CD27^+$ B-Zellen gegenüber den $CD27^-$ B-Zellen signifikant erhöht. Dies hängt jedoch möglicherweise mit der Zellgröße zusammen. Lokalisiert man die selektierte $CD27^+$ B-Zell-Population im forward sideward scatter, so liegen diese Zellen auf der X-Achse (Vorwärtsstreulicht) weiter rechts als die naive $CD27^-$ B-Zell-Population, d. h. sie sind größer. $CD27^+$ B-Zellen haben folglich mehr absolutes Syk, jedoch in Relation zu ihrer Zellgröße vermutlich nicht mehr Syk als $CD27^-$ B-Zellen. P-Syk war in $CD27^+$ B-Zellen tendenziell, aber nicht statistisch signifikant erhöht. Die Relation zwischen phosphoryliertem Syk und Gesamt-Syk war in den beiden B-Zell-Subpopulationen etwa gleich. Daraus lässt sich folgern, dass $CD27^+$ Gedächtnis-B-Zellen kein verstärktes tonisches BCR-Signal haben, obwohl diese gemäß unseren Stimulationsexperimenten stärker aktivierbar sind.

5.2 Inhibition des BCR-Signals nach CD22-Bindung durch Epratuzumab

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Epratuzumab einen negativ regulatorischen Effekt auf die Syk-Phosphorylierung unter BCR-Stimulation ausübt. Eine Behandlung der B-Lymphozyten mit dem monoklonalen CD22-Antikörper führte zu einer deutlichen Reduktion der induzierbaren Phosphorylierung von Syk und der nachgeschalteten Tyrosinkinase PLC- γ 2 sowie zur Reduktion des intrazellulären Ca^{2+} -Flusses.

CD22 ist ein B-Zell-spezifisches Oberflächenmolekül der Siglec-Familie, d. h. es gehört zu der Superfamilie der Sialinsäure-bindenden Lektine. Es besteht aus 7 extrazellulären Immunglobulin-ähnlichen Domänen, von denen die N-terminale Domäne die Fähigkeit besitzt, 2,6-Sialinsäure-Gruppe enthaltende Liganden zu binden. Zu diesen potentiellen Liganden zählen u. a. verschiedene hämatopoetische und nicht-hämatopoetische Zellen und Glykoproteine, die dem CD22-Rezeptor eine Bedeutung für Zell-Zell-Interaktionen geben. Ligandenbindung an CD22 direkt oder an den B-Zell-Rezeptor führt zur Phosphorylierung von Tyrosinresiduen am zytoplasmatischen Ende von CD22. Das Resultat der CD22-Phosphorylierung ist bekanntlich eine negative Regulation des BCR-Signals. Die Rolle der Ligandenbindung für die CD22-Funktion *in vivo* ist ungeklärt. Es ist jedoch nachgewiesen worden, dass die CD22-Phosphorylierung, die Rekrutierung von SHP-1 und die negative Wirkung auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Mobilisierung nach BCR-Ligation keine CD22-Liganden erfordern.⁵⁶ Neuere, noch unveröffentlichte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass die Sialinsäurebindung an den CD22-Rezeptor für dessen inhibitorische Wirkung auf das BCR-Signal entbehrlich ist, jedoch das Entfernen der Sialinsäurereste von CD22 die inhibitorische Wirkung abschwächt.

Es ist bekannt, dass Epratuzumab innerhalb kurzer Zeit nach Bindung an CD22 als Rezeptor-Antikörper-Komplex in die Zelle internalisiert wird und zur intrazellulären Phosphorylierung des Rezeptors führt.⁴⁷ Da sich am intrazellulären Ende von CD22 neben vier ITIMs (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs) auch zwei ITAMs (activation motifs) befinden, stellte sich bislang die Frage, ob Epratuzumab auch positiv regulatorische Signale amplifizieren kann. Phosphorylierte ITIMs rekrutieren Tyrosinphosphatasen wie SHP-1, welche Substrate des BCR-Signalweges, darunter Syk, inaktivieren. ITAMs dagegen enthalten potentiell Bindungsstellen für Kinasen der Syk-Familie und der Src-Familie der Tyrosinkinasen. Während die negativ regulatorische Wirkung des Rezeptors auf das Signalverhalten und die Proliferation von B-Lymphozyten in der gegenwärtigen Literatur mehrfach bestätigt ist, zeigt die Datenlage hinsichtlich einer positiv regulatorischen Funktion bislang keine hinreichenden Belege, insbesondere für das humane System. So zeigte sich, dass der infolge BCR-Verlinkung

auftretende Ca^{2+} -Einstrom durch CD22 abgeschwächt wird. Versuche an CD22-defizienten Mäusen und B-Zellen zeigten ein erhöhtes und prolongiertes BCR-abhängiges Ca^{2+} -Signal.^{40,57} Signalmoleküle wie Vav-1, CD19 und BLNK sind in CD22-defizienten B-Zelllinien und Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen stärker phosphoryliert.^{46,58,59} Aktuelle Daten zeigen, dass der monoklonale CD22-Antikörper Epratuzumab die Proliferation humaner B-Lymphozyten in Kultur mit IL-2, IL-10 und $\text{F(ab}')_2$ -Fragmenten, die gegen Ig gerichtet sind, signifikant inhibiert.⁴ Dieser Effekt ließe sich damit erklären, dass Epratuzumab als CD22-phosphorylierender Antikörper eine inhibitorische Komponente dieses Rezeptors verstärkt. Wie im Ergebnisteil beschrieben, wurde eine 29% Herunterregulation von p-Syk (Y348) durch Inkubation mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Epratuzumab vor BCR-Stimulation und ein ähnlicher Effekt für p-Syk (Y352) beobachtet. Somit kann ein Inhibitionseffekt gestützt werden. Vergleicht man die Tyrosinreste Y348 und Y352 so waren sie hinsichtlich ihres quantitativen Phosphorylierungsmusters infolge BCR-Stimulation und Epratuzumab-Exposition ähnlich. Dies geht mit einer Überschneidung in der Funktionalität dieser beiden Tyrosinresiduen einher.

Die CD22-spezifische Wirkweise von Epratuzumab wurde in weiteren wichtigen Experimenten bestätigt, in welchen lediglich die $\text{F(ab}')_2$ -Fragmente dieses Antikörpers für die Präinkubation eingesetzt wurden. Im Zuge der BCR-Aktivierung wird neben CD22 ein weiterer inhibitorischer Korezeptor, $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$, von der Tyrosinkinase Lyn phosphoryliert.³³ $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ ist ein niedrig-affiner Rezeptor für den Fc-Teil von IgG und besitzt ITIMs, welche die Phosphatasen SHIP, SHP-1 und SHP-2 aktivieren können. Die moderate Beeinflussung der Syk-Phosphorylierung in CD27^+ B-Zellen durch unspezifisches IgG_1 resultiert wahrscheinlich aus einer $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ -Interaktion. Der Einsatz von $\text{F(ab}')_2$ -Epratuzumab konnte eine Immunkomplexbindung mit $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ -Rezeptoren ausschließen. Es kann nun behauptet werden, dass die erzielte Inhibition der Syk-Phosphorylierung um 34% bei CD27^- und um 33% bei CD27^+ B-Zellen gänzlich CD22-spezifisch und höchstwahrscheinlich über den SHP-1-Signalweg vermittelt war.

Die Syk- und $\text{PLC-}\gamma 2$ -Phosphorylierung wurde über einen Zeitraum von 30 Minuten BCR-Stimulation mit Fixierung des Phosphorylierungsstatus an unterschiedlichen Zeitpunkten registriert. Es zeigte sich eine Reduktion der Phosphorylierung dieser Signalmoleküle durch Vorbehandlung mit $\text{F(ab}')_2$ -Epratuzumab zu jedem gemessenen Zeitpunkt, genaugenommen ab 30 Sekunden bis 30 Minuten dauernder Aktivierung um 35-47% (Syk) und 33-43% ($\text{PLC-}\gamma 2$). Ein Phosphorylierungsmaximum zeigten Syk und $\text{PLC-}\gamma 2$ zwischen 2 und 5 Minuten BCR-Aktivierung mit einer Tendenz für ein früheres Aktivierungsmaximum von Syk bei 2 Minuten und einem späteren für $\text{PLC-}\gamma 2$ bei 5 Minuten. Bei intrazellulären Ca^{2+} -Messungen zeigte sich

ein rascher Peak mit Maximum innerhalb der ersten Sekunden der BCR-Aktivierung, welcher vermutlich als unabhängig vom intrazellulären BCR-Signalweg zu werten ist, da die Kinetik der proximalen Signalmoleküle Syk und PLC- γ 2 zu diesem frühen Zeitpunkt eine nur geringe Aktivierung zeigten und deren volle Aktivierung erst zu einem späteren Zeitpunkt beobachtet wurde. Ein Monitoring des intrazellulären Ca^{2+} -Flusses über 10 Minuten zeigte einen kontinuierlichen Anstieg ab 1,5-3 Minuten BCR-Stimulation, welches als das Resultat einer konstanten Syk- und PLC- γ 2-Aktivierung interpretiert werden kann. Der langandauernde Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration zeigte in B-Zellen, welche durch F(ab')₂-Epratuzumab vorbehandelt waren, einen weit flacheren Kurvenverlauf und war um ca. 100 Sekunden verzögert.

Zusammengefasst konnte beobachtet werden, dass eine CD22-Ligation durch Epratuzumab zur Inhibierung von komplexen BCR-Signalereignissen führte. Diese Modulationen beeinflussen möglicherweise das Outcome von B-Lymphozyten z. B. im Sinne einer Proliferationshemmung, wie sie in Kultur mit Epratuzumab beobachtet wurde.⁴

5.3 BCR-Signalmodulation nach CD22-Ligation durch Epratuzumab innerhalb der CD27⁻ und CD27⁺ B-Zellpopulationen

Jacobi et al. konnten bei SLE-Patienten *in vivo* eine Verminderung der zirkulierenden B-Zellzahl nach Gabe von Epratuzumab registrieren. Betroffen waren hierbei vor allem CD27⁻ B-Lymphozyten, während die Anzahl peripherer CD27⁺ Gedächtnis-B-Lymphozyten nicht signifikant verändert war.⁴ Weitere Experimente konnten zeigen, dass das *in vitro* Migrationsverhalten gegen den Gradienten CXCL12 infolge Epratuzumab-Inkubation vorwiegend bei CD27⁻ B-Zellen gesteigert war, in CD27⁺ B-Zellen blieb es dagegen unverändert.⁶⁰ Die Reduktion der zirkulierenden CD27⁻ B-Zellen wird als die Folge einer verstärkten Migration in lymphatische Organe interpretiert. Inwiefern die Pathogenese bei Autoimmunerkrankungen durch diesen Wirkmechanismus gehemmt wird, ist derzeit noch unklar.

Die in dieser Arbeit vorliegenden Daten belegen erstmals, dass die BCR-Signaltransduktion durch Epratuzumab inhibiert wird und weiterhin, dass die modulatorische Wirkung auch die CD27⁺ B-Zellen beeinflusst. Die MFI von p-Syk (Y348) war durch 10 $\mu\text{g/ml}$ Epratuzumab-Vorbehandlung in stimulierten CD27⁻ B-Zellen um durchschnittlich 26% gegenüber Mediumvorbehandelten Zellen vermindert, in CD27⁺ B-Zellen um 35%. Während bei Einsatz des ganzen

Antikörpermoleküls die CD27⁺ Population um 9% stärker inhibierbar war als die CD27⁻ B-Zell-Population, beeinflusste F(ab')₂-Epratuzumab beide untersuchten B-Zell-Populationen bemerkenswerterweise gleichermaßen. Dies zeigt, dass der BCR-Signalweg in CD27⁺ B-Zellen über den Rezeptor CD22 ebenso stark inhibierbar ist wie in CD27⁻ B-Zellen. Es besteht die Möglichkeit, dass in den Stimulationsexperimenten ohne Ausschluss des Fc-Teils in geringem Ausmaß Immunkomplexe zwischen Epratuzumab und F(ab')₂-αIgG zustande kommen, welche zur FcγRIIB-Interaktion fähig sind. Andererseits könnte der Stimulus für die BCR-Aktivierung - F(ab')₂-αIgG - geringfügig neutralisiert werden. Diese beiden Aspekte können erklären, dass CD27⁺ Zellen, die ja nach Immunglobulinklassenwechsel großenteils IgG exprimieren, in ihrer Syk-Phosphorylierung durch die Epratuzumab-Inkubation stärker reduziert sind als CD27⁻ B-Zellen und auch ein Grund für die 10% Reduktion der Syk-Phosphorylierung durch unspezifisches IgG₁ (10 µg/ml) in CD27⁺ B-Lymphozyten.

In jüngster Zeit wurde gezeigt, dass Sialinsäure-enthaltendes Immunglobulin innerhalb eines Pools von IvIg (intravenöses Immunglobulin), das therapeutisch eingesetzt wird, ein direkter Ligand von CD22 sein kann.⁶¹ Innerhalb des IvIg-Pools haben circa 5% der Immunglobuline einen Sialinsäure-haltigen Rest an ihrem Fc-Teil. Séité et al. konnten weiterhin zeigen, dass eine Präinkubation mit 20 mg/ml IvIg vor BCR-Stimulation die Phosphorylierung von CD22 in humanen B-Lymphozyten verstärkte und die Aktivierung von CD19 abschwächte. Die Signalmoleküle Lyn, BLNK und PLC-γ2 waren nach BCR-Stimulation bei IvIg-Anwendung reduziert phosphoryliert. Somit stellte die Forschungsgruppe mit ihren Ergebnissen zu CD22 eine neue Erklärung für den Wirkmechanismus von intravenösem Immunglobulin bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen vor. Eine der etabliertesten Erklärungen für die Suppression von Entzündung durch IvIg bleibt noch immer die Wirkweise über inhibitorische Fc-Rezeptoren. Séité et al. setzten 20 mg/ml ein und näherten sich somit den hohen Konzentrationen der IvIg-Therapie an, bei der 1-2 g/kg Körpergewicht verabreicht werden. Nur bei diesen hohen Konzentrationen konnte eine Bindung mit CD22 detektiert werden. In dieser Arbeit wurden die Zellen dagegen mit 10-20 µg/ml Epratuzumab bzw. IgG₁ vorbehandelt. So dürfte hier eine unspezifische Bindung von Sialinsäure-haltigem Fc-Fragment an CD22 nicht erfassbar bzw. nicht relevant sein.

Interessanterweise ist die CD22-Expression auf CD27⁻ B-Zellen wesentlich höher als auf CD27⁺ B-Zellen. Im Zuge der Differenzierung zu Plasmazellen verlieren die B-Zellen ihre CD22-Expression, B-Gedächtniszellen tragen weniger CD22 als naive.⁶² In dieser Arbeit zeigte sich, dass p-Syk (Y348) in CD27⁺ B-Zellen durch BCR-Stimulation verhältnismäßig stärker ansteigt als in CD27⁻ B-Zellen. Die Phosphorylierung von Syk (Y348) erreichte in CD27⁺ B-

Lymphozyten einen Anstieg um das 6,1fache. In CD27⁻ B-Zellen war dieser nur 5,1fach. CD27⁺ B-Lymphozyten sind folglich bei gleicher Konzentration stimulierender F(ab')₂-Fragmente stärker aktivierbar als CD27⁻ B-Zellen. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit funktionellen Eigenschaften von Gedächtnis-B-Zellen, die als Antwort auf Antigenstimulation *in vitro* stärker proliferieren und schneller Ig-sezernierende Zellen generieren als naive B-Zellen.^{63,64} *In vivo* ist bekanntermaßen die Kinetik der Sekundärantwort auf Antigenexposition schneller und stärker ausgeprägt als bei primärem Antigenkontakt mit naiven B-Zellen. Sekundärer Antigenkontakt resultiert in einer frühen und starken Proliferation antigenspezifischer Gedächtnis-B-Zellen und Differenzierung zu Plasmazellen.⁶⁵ Die hier gezeigten funktionellen Ergebnisse bestätigen die Theorie, dass die CD22-Expression mit steigender Reaktionsbereitschaft sich differenzierender Zellen sinkt.

Trotz verminderter CD22-Expression und stärkerer Aktivierbarkeit von CD27⁺ B-Zellen gab es keinen Anhalt für ein vermindertes oder erhöhtes Ansprechen auf den CD22-Antikörper Epratuzumab. CD27⁺ B-Zellen wurden durch F(ab')₂-Epratuzumab bezüglich ihres BCR-Signalverhaltens verhältnismäßig gleich stark inhibiert wie CD27⁻ naive B-Zellen.

5.4 Keine Inhibition des BCR-Signals via CD22 in der humanen Burkitt-Lymphom-Zelllinie Ramos

Ramos ist eine Non-Hodgkin-Lymphom-Zelllinie und ist als Burkitt-Lymphom nach WHO-Klassifikation der Untergruppe der reifen B-Zell-Lymphome zugeordnet. Ramos-Zellen sind gemäß der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) CD19⁺, CD20⁺, CD38⁺, sie weisen zytoplasmatisch CD79a (Igα) auf und exprimieren membranständiges IgM, jedoch kein IgG. Zusätzlich wurde durchflusszytometrisch eine starke CD22-Expression und Epratuzumab-Bindung der Zellen nachgewiesen. Es konnte durch BCR-Stimulation eine Phosphorylierung von Syk (Y348) induziert werden, die im Durchschnitt 4,7fach im Vergleich zu unstimulierten Zellen war. Es ist somit davon auszugehen, dass die Zelllinie über einen intakten proximalen BCR-Signalweg verfügt.

Burkitt-Lymphom-Zellen haben den Phänotypen der Zentroblasten des Keimzentrums.⁶⁶ Dieser Zelltyp exprimiert den Keimzentrumsmarker CD38 und kann *in vitro* zur Mutation seiner Immunglobulingene stimuliert werden.⁶⁷ Hoch CD38-positive humane Keimzentrums-B-Zellen weisen nur 20% der Konzentration an SHP-1 auf wie CD38⁻ Mantelzonen-B-Zellen. Es wurde eine inverse Relation zwischen CD38-Expression und SHP-1-Konzentration in diesen B-Zellen

gezeigt.⁵³ Einhergehend mit vermindertem SHP-1 verfügen B-Lymphozyten des Keimzentrums über eine besonders niedrige Aktivierungsschwelle und antworten möglicherweise hypersensitiv auf Antigen und Wachstumsfaktoren. Im Zuge der Differenzierung zu Gedächtnis-B-Zellen steigt auch die SHP-1-Konzentration der Zelle wieder an. In der Zelllinie Ramos beträgt der SHP-1-Gehalt $< 0,001\%$ des Gesamtproteins, während er in normalen CD38⁻ B-Lymphozyten ca. 0,1% beträgt.⁵³

CD22 und Fc γ RIIB rekrutieren SHP-1. Durch die unmittelbare Nachbarschaft zum B-Zell-Rezeptor kann SHP-1 die BCR-Signalkaskade durch Dephosphorylierung von u. a. Ig α , Ig β und Syk inhibieren. Es ist davon auszugehen, dass Epratuzumab über SHP-1 die Phosphorylierung von Syk inhibiert. Die hier erläuterten Ergebnisse zeigen, dass die Zelllinie Ramos weder durch Behandlung mit Epratuzumab noch mit unspezifischem humanem IgG₁ eine reproduzierbare Signalmodulation erfährt. Bei vorhandenem intaktem BCR und CD22-Expression ist dies ein Hinweis darauf, dass der Mangel an SHP-1 sehr wahrscheinlich hierfür verantwortlich ist und eine Bestätigung, dass Epratuzumab tatsächlich über den SHP-1-Signalweg wirkt. Weiterhin könnte man daraus ableiten, dass Epratuzumab in Zellen, in welchen SHP-1 drastisch erniedrigt ist, keinen Effekt aufweisen sollte.

SHP-1 wird als Tumorsuppressorgen diskutiert, da das Protein ein Antagonist von Tyrosinkinase ist, die potentiell das Tumorwachstum fördern. In die Ramos-Zelllinie und in weitere Tumorzelllinien transfiziertes SHP-1 supprimiert das Zellwachstum.⁵⁴ Es ist bekannt, dass die Expression von SHP-1 außer in Ramos-Zellen auch in vielen weiteren Leukämie- und Lymphom-Zelllinien vermindert oder nicht vorhanden ist. Derzeit befindet sich Epratuzumab entweder in Monotherapie oder in Kombination mit dem CD20-gerichteten Antikörper Rituximab in klinischen Phase-I/II-Studien für die Behandlung von Non-Hodgkin-Lymphomen.⁶⁸ Die in die Studie eingeschlossenen Patienten waren bereits mehrfach chemotherapeutisch vorbehandelt und hatten Lymphomrezidive. Die Untersuchungen zeigten bei den zwei häufigsten reifen B-Zell-Lymphomen, dem folliculären (FL) und diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom (DLBCL), in 24% bzw. 15% der Fälle ein Ansprechen auf Epratuzumab. Durch die Kombinationstherapie mit Rituximab konnte diese Rate auf etwa das Doppelte erhöht werden. Hier stellt sich die Frage, ob das Ansprechen der Non-Hodgkin-Lymphome auf Epratuzumab von dem SHP-1-Gehalt der Tumorzellen abhängig ist. Weiterhin ist zu vermuten, dass das Therapieansprechen mit dem Vorhandensein eines intakten BCR-Komplexes assoziiert ist. Chen et al. definierten DLBCL-Zelllinien als „BCR-Typ“, wenn sie *in vitro* auf eine Syk-Inhibitor-Therapie ansprachen. Dies ging u. a. mit dem Vorhandensein eines oberflächenständigen Immunglobulinrezeptors, der Induzierbarkeit einer Syk-Phosphorylierung

durch BCR-Stimulation und einer tonischen Syk-Phosphorylierung einher.²⁴ Im Gegensatz dazu wurden DLBCL-Zelllinien identifiziert, die nicht über eine intakte BCR-Signalgebung verfügten und gleichzeitig nicht auf eine Syk-Inhibitor-Therapie ansprachen. Die Epratuzumab-Therapie dürfte daher zum einen nur für sogenannte „BCR-Typ“-Tumoren geeignet sein und zum anderen nur für Lymphome, die nicht in ihrer SHP-1-Expression vermindert sind. Die Entwicklung von Methoden, die relevante Tumormerkmale identifizieren und daraus einen Therapieerfolg ableiten können, sollte deshalb angestrebt werden.

Der orale Syk-Inhibitor R788 (Fostamatinib Disodium) befindet sich gerade in klinischen Phase-II-Studien in der Behandlung von Non-Hodgkin-Lymphomen und rheumatoider Arthritis.⁶⁹⁻⁷¹ In der onkologischen Therapie wird die Unterbrechung der tonischen und Antigen-stimulierten BCR-Signalübermittlung als Wirkmechanismus von R788 gesehen. In primären DLBCL und DLBCL-Zelllinien wird aufgrund dessen eine erwünschte Apoptose der Zellen induziert. Der Wirkmechanismus in Autoimmunerkrankungen dagegen ist bisher unklar. Die Frage nach der komplexen Wirkweise ist aktuell nicht erschöpfend zu beantworten, denn Syk spielt eine Rolle in hämatopoetischen Immun- und auch in nicht-hämatopoetischen Zellen sowie in der vaskulären Integrität. Syk befindet sich außer in B-Lymphozyten u. a. in natürlichen Killerzellen, Osteoklasten und auch den Fibroblasten-ähnlichen Synoviozyten im Gelenkspalt. Es ist zudem involviert in Integrin- und Fc-Rezeptor-Signalwege in neutrophilen Granulozyten und Makrophagen.⁷² Nebenwirkungen des Syk-Inhibitors R788 sind relativ unspezifischer Natur, beobachtet wurden Durchfälle, reversible Neutropenie, Blutdruckanstieg und Schwindel.⁷¹ Ausgehend davon, dass ein Hauptmechanismus des Syk-Inhibitors die Durchbrechung des BCR-Signals ist, sind genauere Untersuchungen zur Entwicklung der peripheren B-Lymphozytenpopulationen unter R788-Therapie von Interesse. Sollte ein Großteil der B-Zellen apoptotisch werden, so stellt sich die Frage, inwiefern die Immunkompetenz der Patienten erhalten bleibt oder ob es Einschränkungen der Immunabwehr wie in der Therapie mit dem B-Zell-depletierenden CD20-Antikörper Rituximab gibt.

Mit Epratuzumab wird ein Medikament entwickelt, welches selektiv die Syk-Aktivierung im BCR-Signalweg inhibiert ohne sie komplett zu blockieren und unter dem die Mehrzahl der zirkulierenden B-Lymphozyten erhalten bleibt. Kenntnisse über die Eigenschaften von CD22 ließen bereits eine immunmodulatorische Wirkung von Epratuzumab vermuten. In dem Zusammenhang sprechen die Ergebnisse der Untersuchungen zu Tyrosinkinasen und Ca^{2+} -Fluss in dieser Arbeit dafür, dass durch Epratuzumab eine pathologisch erhöhte Reaktivität des Immunsystems auf der Ebene der B-Zellen in Autoimmunerkrankungen gezielt ausgeglichen wird.

6 Zusammenfassung

B-Lymphozyten gelten für eine Vielzahl von Autoimmunerkrankungen als zentrale Vermittler der Pathogenese. Der Anti-CD20-Antikörper Rituximab hat daher via B-Zelldepletion bei gutem Sicherheitsprofil zur Verbesserung der klinischen Symptomatik nach Versagen von TNF-Blockern bei der rheumatoiden Arthritis und der ANCA-assoziierten Vaskulitiden geführt. Epratuzumab als monoklonaler humanisierter Antikörper, der das B-Zell-spezifische Oberflächenmolekül CD22 hochselektiv bindet, verfolgt eine andere Wirkstrategie. Anders als bei einem B-Zell-depletierenden Medikament werden immunmodulatorische Effekte unter Erhalt eines Großteils der zirkulierenden B-Zellen vermittelt. Es wird aus Tierversuchen vermutet, dass Epratuzumab nach Anbindung an CD22 über intrazelluläre Mechanismen eine inhibierende Wirkung auf die Signaltransduktion des B-Zell-Rezeptors (BCR) ausübt. Für das humane System waren dazu bisher keine hinreichenden Daten verfügbar.

In dieser Arbeit wurden die BCRs von humanen B-Lymphozyten gesunder Probanden *in vitro* stimuliert und die induzierten Phosphorylierungen der Spleen-Tyrosinkinase (Syk) und Phospholipase C- γ 2 (PLC- γ 2) sowie der intrazelluläre Ca^{2+} -Fluss unter dem Einfluss von Epratuzumab gemessen. Durch Vorinkubation mit dem Antikörper bzw. $\text{F(ab}')_2$ -Epratuzumab reduzierte sich die Phosphorylierung von Syk unter BCR-Stimulation sowohl der CD27^- als auch der CD27^+ B-Lymphozyten. Ein zeitliches Monitoring belegte eine Verminderung von p-Syk und p-PLC- γ 2 um 33-47% nach Vorbehandlung mit $\text{F(ab}')_2$ -Epratuzumab. Gleichzeitig wurde eine Reduktion und ein verzögerter Eintritt des langanhaltenden intrazellulären Ca^{2+} -Anstiegs, welcher unter konstitutiver BCR-Stimulation charakteristisch ist, durch $\text{F(ab}')_2$ -Epratuzumab belegt.

Die Gesamtheit der Daten weist darauf hin, dass Epratuzumab via Bindung an CD22 die BCR-Signaltransduktion in B-Lymphozyten substantiell inhibieren kann und weist auf die Möglichkeit hin, dass eine Hyperreaktivität von B-Lymphozyten bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen so begrenzt werden könnte. Zudem ist festzuhalten, dass die Signaltransduktion in humanen B-Lymphozyten nach Epratuzumab keinesfalls komplett blockiert wird, so dass eine verbleibende Immunkompetenz für den Organismus zu erwarten ist. Die in dieser Arbeit erweiterten Kenntnisse zu *in vitro* Wirkmechanismen des Anti-CD22-Antikörpers bedürfen jetzt einer Bestätigung durch laufende Phase-III-Studien beim SLE.

7 Literaturverzeichnis

1. Edwards JCW, Szczepanski L, Szechinski J, et al. Efficacy of B-Cell-Targeted Therapy with Rituximab in Patients with Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med* 2004;350:2572-81.
2. Gürcan HM, Keskin DB, Stern JNH, Nitzberg MA, Shekhani H, Ahmed AR. A review of the current use of rituximab in autoimmune diseases. *International Immunopharmacology* 2009;9:10-25.
3. Hauser SL, Waubant E, Arnold DL, et al. B-Cell Depletion with Rituximab in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 2008;358:676-88.
4. Jacobi AM, Goldenberg DM, Hiepe F, Radbruch A, Burmester GR, Dörner T. Differential effects of epratuzumab on peripheral blood B cells of patients with systemic lupus erythematosus versus normal controls. *Ann Rheum Dis* 2008;67:450-7.
5. Dörner T, Kaufmann J, Wegener WA, Teoh N, Goldenberg DM, Burmester GR. Initial clinical trial of epratuzumab (humanized anti-CD22 antibody) for immunotherapy of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 2006;8:R74-R85.
6. Steinfeld S, Tant L, Burmester G, et al. Epratuzumab (humanised anti-CD22 antibody) in primary Sjogren's syndrome: an open-label phase I/II study. *Arthritis Res Ther* 2006;8:R129.
7. Leonard JP, Coleman M, Ketas JC, et al. Epratuzumab, a Humanized Anti-CD22 Antibody, in Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma. *Clinical Cancer Research* 2004;10:5327-34.
8. Rajewsky K. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 1996;381:751-8.
9. Burrows PD, Cooper MD. B cell development and differentiation. *Current Opinion in Immunology* 1997;9:239-44.
10. Nadler LM, Ritz J, Hardy R, Pesando JM, Schlossman SF, Stashenko P. A unique cell surface antigen identifying lymphoid malignancies of B cell origin. *The Journal of Clinical Investigation* 1981;67:134-40.
11. Murphy K, Travers P, Walport M. *Janeway Immunologie*. Spektrum, Akad Verl Heidelberg 2009;7. Aufl.
12. Burnet FM. *The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity*. Cambridge Univ Press, Cambridge 1959.
13. Nemazee D. Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance. *Nat Rev Immunol* 2006;6:728-40.
14. Kotzin BL. Systemic Lupus Erythematosus. *Cell* 1996;85:303-6.
15. Cohen PL, Eisenberg RA. Lpr and gld: Single Gene Models of Systemic Autoimmunity and Lymphoproliferative Disease. *Annual Review of Immunology* 1991;9:243-69.

16. Chan OTM, Hannum LG, Haberman AM, Madaio MP, Shlomchik MJ. A Novel Mouse with B Cells but Lacking Serum Antibody Reveals an Antibody-independent Role for B Cells in Murine Lupus. *The Journal of Experimental Medicine* 1999;189:1639-48.
17. Lipsky PE. Systemic lupus erythematosus: an autoimmune disease of B cell hyperactivity. *Nat Immunol* 2001;2:764-6.
18. Grammer AC, Dörner T, Lipsky PE. Abnormalities in B cell activity and the immunoglobulin repertoire in human systemic lupus erythematosus. *Mol Pathol Autoimmune Dis* 2001;2:282-318.
19. Meffre E, Nussenzweig MC. Deletion of immunoglobulin beta in developing B cells leads to cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002;99:11334-9.
20. Lam KP, Kühn R, Rajewsky K. In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell* 1997;90:1073-83.
21. Turner M, Schweighoffer E, Colucci F, Di Santo JP, Tybulewicz VL. Tyrosine kinase SYK: essential functions for immunoreceptor signalling. *Immunology Today* 2000;21:148-54.
22. Monroe JG. ITAM-mediated tonic signalling through pre-BCR and BCR complexes. *Nat Rev Immunol* 2006;6:283-94.
23. Wienands J, Larbolette O, Reth M. Evidence for a preformed transducer complex organized by the B cell antigen receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996;93:7865-70.
24. Chen L, Monti S, Juszczynski P, et al. SYK-dependent tonic B-cell receptor signaling is a rational treatment target in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2008;111:2230-7.
25. Niiro H, Clark EA. Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat Rev Immunol* 2002;2:945-56.
26. Burkhard AL, Brunswick M, Bolen JB, Mond JJ. Anti-immunoglobulin stimulation of B lymphocytes activates src-related protein-tyrosine kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991;88:7410-4.
27. Campbell MA, Sefton BM. Association between B-lymphocyte membrane immunoglobulin and multiple members of the Src family of protein tyrosine kinases. *Mol Cell Biol* 1992;12:2315-21.
28. Texido G, Su IH, Mecklenbrauker I, et al. The B-Cell-Specific src-Family Kinase Blk Is Dispensable for B-Cell Development and Activation. *Mol Cell Biol* 2000;20:1227-33.
29. Geahlen RL. Syk and pTyr'd: Signaling through the B cell antigen receptor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 2009;1793:1115-27.
30. Turner M, Mee PJ, Costello PS, et al. Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase Syk. *Nature* 1995;378:298-302.

31. Jiang A, Craxton A, Kurosaki T, Clark EA. Different Protein Tyrosine Kinases Are Required for B Cell Antigen Receptor-mediated Activation of Extracellular Signal-Regulated kinase, c-Jun NH₂-terminal Kinase 1, and p38 Mitogen-activated Protein Kinase. *The Journal of Experimental Medicine* 1998;188:1297-306.
32. Cheng A, Rowley B, Pao W, Hayday A, Bolen JB, Pawson T. Syk tyrosine kinase required for mouse viability and B-cell development. *Nature* 1995;378:303-6.
33. Dal Porto JM, Gauld SB, Merrell KT, Mills D, Pugh-Bernard AE, Cambier J. B cell antigen receptor signaling 101. *Molecular Immunology* 2004;41:599-613.
34. Takata M, Kurosaki T. A Role for Bruton's Tyrosine Kinase in B Cell Antigen Receptor-mediated Activation of Phospholipase C-gamma 2. *J Exp Med* 1996;184:31-40.
35. Graves JD, Draves KE, Craxton A, Saklatvala J, Krebs EG, Clark EA. Involvement of stress-activated protein kinase and p38 mitogen-activated protein kinase in mIgM-induced apoptosis of human B lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996;93:13814-8.
36. Bureau F, Vanderplassen A, Jaspar F, et al. Constitutive nuclear factor-kappaB activity preserves homeostasis of quiescent mature lymphocytes and granulocytes by controlling the expression of distinct Bcl-2 family proteins. *Blood* 2002;99:3683-91.
37. Tedder TF, Inaoki M, Sato S. The CD19-CD21 Complex Regulates Signal Transduction Thresholds Governing Humoral Immunity and Autoimmunity. *Immunity* 1997;6:107-18.
38. Hibbs ML, Tarlinton DM, Armes J, et al. Multiple defects in the immune system of Lyn-deficient mice, culminating in autoimmune disease. *Cell* 1995;83:301-11.
39. Famiglietti SJ, Nakamura K, Cambier JC. Unique features of SHIP, SHP-1 and SHP-2 binding to FcγRIIb revealed by surface plasmon resonance analysis. *Immunology Letters* 1999;68:35-40.
40. Nitschke L. CD22 and Siglec-G: B-cell inhibitory receptors with distinct functions. *Immunological Reviews* 2009;230:128-43.
41. Leprince C, Draves KE, Geahlen RL, Ledbetter JA, Clark EA. CD22 associates with the human surface IgM-B-cell antigen receptor complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993;90:3236-40.
42. Tamir I, Dal Porto JM, Cambier JC. Cytoplasmic protein tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2: regulators of B cell signal transduction. *Current Opinion in Immunology* 2000;12:307-15.
43. Sato S, Tuscano JM, Inaoki M, Tedder TF. CD22 negatively and positively regulates signal transduction through the B lymphocyte antigen receptor. *Seminars in Immunology* 1998;10:287-97.
44. Nitschke L, Carsetti R, Ocker B, Köhler G, Lamers MC. CD22 is a negative regulator of B-cell receptor signalling. *Current Biology* 1997;7:133-43.

45. Nadler MJ, McLean PA, Neel BG, Wortis HH. B cell antigen receptor-evoked calcium influx is enhanced in CD22- deficient B cell lines. *J Immunol* 1997;159:4233-43.
46. Gerlach J, Ghosh S, Jumaa H, et al. B cell defects in SLP65/BLNK-deficient mice can be partially corrected by the absence of CD22, an inhibitory coreceptor for BCR signaling. *European Journal of Immunology* 2003;33:3418-26.
47. Carnahan J, Wang P, Kendall R, et al. Epratuzumab, a humanized monoclonal antibody targeting CD22: characterization of in vitro properties. *Clinical Cancer Research* 2003;9:3982S-90S.
48. Carnahan J, Stein R, Qu Z, et al. Epratuzumab, a CD22-targeting recombinant humanized antibody with a different mode of action from rituximab. *Molecular Immunology* 2007;44:1331-41.
49. BD FACSAria User's Guide. Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland 2006.
50. Turner M, Gulbranson-Judge A, Quinn ME, Walters AE, MacLennan IC, Tybulewicz VL. Syk Tyrosine Kinase is required for the positive selection of immature B cells into the recirculating B cell pool. *J Exp Med* 1997;186:2013-21.
51. Chan AC, van Oers NS, Tran A, et al. Differential expression of ZAP-70 and Syk protein tyrosine kinases, and the role of this family of protein tyrosine kinases in TCR signaling. *J Immunol* 1994;152:4758-66.
52. Maurer D, Holter W, Majdic O, Fischer GF, Knapp W. CD27 expression by a distinct subpopulation of human B lymphocytes. *European Journal of Immunology* 1990;20:2679-84.
53. Delibrias CC, Floettmann JE, Rowe M, Fearon DT. Downregulated expression of SHP-1 in Burkitt lymphomas and germinal center B lymphocytes. *J Exp Med* 1997;186:1575-83.
54. Wu C, Guan Q, Wang Y, Zhao ZJ, Zhou GW. SHP-1 suppresses cancer cell growth by promoting degradation of JAK kinases. *Journal of Cellular Biochemistry* 2003;90:1026-37.
55. Kraus M, Alimzhanov MB, Rajewsky N, Rajewsky K. Survival of Resting Mature B Lymphocytes Depends on BCR Signaling via the Ig α / β Heterodimer. *Cell* 2004;117:787-800.
56. Poe JC, Fujimoto Y, Hasegawa M, et al. CD22 regulates B lymphocyte function in vivo through both ligand-dependent and ligand-independent mechanisms. *Nat Immunol* 2004;5:1078-87.
57. Sato S, Miller AS, Inaoki M, et al. CD22 Is Both a Positive and Negative Regulator of B Lymphocyte Antigen Receptor Signal Transduction: Altered Signaling in CD22-Deficient Mice. *Immunity* 1996;5:551-62.
58. Sato S, Jansen PJ, Tedder TF. CD19 and CD22 expression reciprocally regulates tyrosine phosphorylation of Vav protein during B lymphocyte signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997;94:13158-62.
59. Fujimoto M, Bradney AP, Poe JC, Steeber DA, Tedder TF. Modulation of B Lymphocyte Antigen Receptor Signal Transduction by a CD19/CD22 Regulatory Loop. *Immunity* 1999;11:191-200.

60. Daridon C, Blassfeld D, Reiter K, et al. Epratuzumab targeting of CD22 affects adhesion molecule expression and migration of B-cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Reserach and Therapy* 2010;12:R204.
61. Séité JF, Cornec D, Renaudineau Y, Youinou P, Mageed RA, Hillion S. IVIg modulates BCR signaling through CD22 and promotes apoptosis in mature human B lymphocytes. *Blood* 2010;116:1698-704.
62. Dorken B, Moldenhauer G, Pezzutto A, et al. HD39 (B3), a B lineage-restricted antigen whose cell surface expression is limited to resting and activated human B lymphocytes. *J Immunol* 1986;136:4470-9.
63. Tangye SG, Good KL. Human IgM+CD27+ B Cells: Memory B Cells or "Memory" B Cells? *J Immunol* 2007;179:13-9.
64. Tangye SG, Avery DT, Deenick EK, Hodgkin PD. Intrinsic Differences in the Proliferation of Naive and Memory Human B Cells as a Mechanism for Enhanced Secondary Immune Responses. *J Immunol* 2003;170:686-94.
65. Frolich D, Giesecke C, Mei HE, et al. Secondary Immunization Generates Clonally Related Antigen-Specific Plasma Cells and Memory B Cells. *J Immunol*;185:3103-10.
66. Gregory CD, Tursz T, Edwards CF, et al. Identification of a subset of normal B cells with a Burkitt's lymphoma (BL)-like phenotype. *J Immunol* 1987;139:313-8.
67. Denépoux S, Razanajaona D, Blanchard D, et al. Induction of Somatic Mutation in a Human B Cell Line In Vitro. *Immunity* 1997;6:35-46.
68. Leonard JP, Schuster SJ, Emmanouilides C, et al. Durable complete responses from therapy with combined epratuzumab and rituximab. *Cancer* 2008;113:2714-23.
69. Friedberg JW, Sharman J, Sweetenham J, et al. Inhibition of Syk with fostamatinib disodium has significant clinical activity in non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Blood*;115:2578-85.
70. Weinblatt ME, Kavanaugh A, Genovese MC, Musser TK, Grossbard EB, Magilavy DB. An Oral Spleen Tyrosine Kinase (Syk) Inhibitor for Rheumatoid Arthritis. *New England Journal of Medicine*;363:1303-12.
71. Weinblatt ME, Kavanaugh A, Burgos-Vargas R, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with a syk kinase inhibitor: A twelve-week, randomized, placebo-controlled trial. *Arthritis & Rheumatism* 2008;58:3309-18.
72. Jakus Z, Simon E, Balázs B, Mócsai A. Genetic deficiency of Syk protects mice from autoantibody-induced arthritis. *Arthritis & Rheumatism*;62:1899-910.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationen und Kongressbeiträge

Sieger N, Fleischer S, Mei HE, Reiter K, Shock A, Burmester GR, Daridon C and Dörner T. *CD22 ligation inhibits downstream B-cell receptor signaling and Ca²⁺ flux upon activation.*
Eingereicht.

Annual Scientific Meeting des American College of Rheumatology, Chicago, 5.-9.11.2011:
Sieger N, Reiter K, Mei HE, Shock A, Daridon C and Dörner T. *Epratuzumab inhibits upstream B-cell receptor (BCR) signaling and modulates Ca²⁺ flux upon activation.*

EULAR Annual European Congress of Rheumatology, Berlin, 6.-9.6.2012: Sieger N, Fleischer S, Mei HE, Reiter K, Shock A, Burmester GR, Daridon C and Dörner T. *Inhibition of B-cell receptor signaling with Epratuzumab and the effects of alpha-2,6-sialic acid removal.*

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Thomas Dörner für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung dieser Arbeit. Die intensive Begleitung, stetige Motivation, aber auch Freiheiten, die mir im wissenschaftlichen Arbeiten gelassen wurden, waren mir eine große Hilfe bei der Wegfindung.

Frau Dr. rer. nat. Capucine Daridon danke ich für die enge Zusammenarbeit am Thema, für Anregung und Kritik. Ihr verdanke ich auch den Einstieg in den labortechnischen Teil der wissenschaftlichen Praxis.

Ich danke allen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe „B-Zell-Gedächtnis“ des Deutschen Rheuma Forschungszentrums und der Charité Berlin für die fachliche Unterstützung und Zusammenarbeit und für viele fröhliche gemeinsame Stunden auch außerhalb des Labors, vor allem danke ich Karin Reiter, Dr. rer. nat. Henrik Mei, M. Sc. Claudia Giesecke, Dipl.-Ing. Daniela Frölich und Dipl.-Ing. Sarah Fleischer.

Ich danke im Besonderen Herrn Prof. Franco de‘ Clari in Lugano für Kritik und Anregung.

Herrn Dr. rer. nat. Hyun-Dong Chang danke ich von ganzem Herzen für die Unterstützung als Cousin und Kollege und für die Sichtung dieser Arbeit.

Meinen Eltern Ok Lan und Dr. Dipl.-Ing. Hans-Hermann Sieger und meiner Schwester Beatrice gilt mein größter Dank, immer.

Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Nadine Sieger, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *CD22-gerichtete Therapie inhibiert die Signaltransduktion und den Ca²⁺-Fluss in humanen B-Lymphozyten* selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 16. Januar 2012