

Aus dem Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika des
Universitätsklinikums Düsseldorf
Direktor: Herr Dr. med. Johannes Fischer
AG Leiter: Herr Prof. Dr. rer. nat. Markus Uhrberg

Wirkungsweise und Wirksamkeit des
monoklonalen anti-CD20-Antikörpers
Obinutuzumab in Non-Hodgkin-Lymphom
Patienten im Vergleich zu Rituximab

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Jannis H. W. Bodden
2021

Als Inaugural-dissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Markus Uhrberg

Zweitgutachterin: PD Dr. Judith Strapatsas

Für Inci

Zusammenfassung

Monoclonal antibodies (mAb) spielen eine fundamentale Rolle in der Therapie der Non-Hodgkin-Lymphome (NHL). Die Therapie der NHL wird durch neu entwickelte Wirkstoffe wie Obinutuzumab kontinuierlich vorangetrieben und bisherige Ergebnisse sind vielversprechend. Mit Obinutuzumab ist der erste Typ-2-*mAb* verfügbar, der die Schwächen des Vorgängers Rituximab über sein glykosyliertes *Crystallizable Fragment (Fc)* und die humane Peptidstruktur überkommen soll. Der *Fc*-Teil erzeugt eine höhere Affinität zum Immunglobulin G (IgG)-spezifischen *Fc*-Rezeptor *CD16* der NK-Zellen und erreicht darüber eine stärkere *Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC)*.

Die meisten vorliegenden Studien verwendeten als Effektorzellen standardisierte Effektorzelllinien, wodurch die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen begrenzt wird. Ziel dieser Arbeit war, die Wirkmechanismen der *mAbs* an Zellen von NHL-Patienten und gesunden Spenderzellen durchflusszytometrisch zu überprüfen und Interkohortenunterschiede herauszuarbeiten. Das zweite Ziel lag in Anbetracht der Heterogenität der NK-Zell-Populationen und des individuell unterschiedlichen NK-Zell-Repertoires darin, die subgruppenspezifische Aktivität und Zytokinproduktion der NK-Zellen zu analysieren. Insgesamt wurden im Rahmen dieser Studie 38 Patientenproben ausgewertet und in ihren Ergebnissen mit neun Kontrollproben verglichen.

Sowohl in der Analyse der spezifischen Zytotoxizität auf Zielzelleseite als auch in der Funktionsanalyse auf der Effektorseite wurden signifikant bessere Ergebnisse mit Obinutuzumab erzielt als mit dessen Vorgänger Rituximab. Bei der Analyse der NK-Zell-Populationen wurde demonstriert, dass die bessere Wirkung des Typ-2-*mAbs* Obinutuzumab vornehmlich auf eine verstärkte Aktivierung der *CD56^{dim}*-Population zurückzuführen ist – ein Nachweis, der nach bestem Wissen des Autors zuvor nicht erbracht wurde. Durch die verwendeten monoklonalen Antikörper wurde außerdem die unter Normalbedingungen hyporeaktive *CD56^{bright}*-Population für die NK-Zell-Antwort rekrutiert. Die Analyse auf Ebene der klonalen Rezeptorexpression zeigte, dass aus dem Humanen Leukozyten Antigen (HLA)-C und *Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor (KIR)*-Genotyp auf die Aktivierbarkeit der NK-Zell-Populationen durch monoklonale Antikörper rückgeschlossen werden kann. Außerdem wurde gezeigt, dass eine HLA-C1-bedingte Inhibition der *KIR2DL2/3⁺*-Population durch Obinutuzumab partiell überkommen werden kann.

Abstract

Monoclonal antibodies (mAbs) play a fundamental role in therapy of Non-Hodgkin's lymphomas (NHL). Therapy regimens evolve driven by new active ingredients, such as Obinutuzumab, and results from clinical studies are promising. Obinutuzumab, a type 2 antibody has been designed to overcome some of the weaknesses of its predecessor, Rituximab. Due to its glycosylated crystallizable fragment (Fc) portion, the mAb has superior affinity to the Natural Killer cell (NK-cell)-sided Immunglobulin G (IgG) specific Fc-receptor CD16 thus leading to an increased antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC).

Most previous studies investigating Obinutuzumab used standardized effector cell clones as effector cells, affecting the transferability of results on in-vivo settings in humans. Thus, the primary aim of this study was to investigate different modes of action of mAbs in NHL-patient derived cells, compared to healthy donor cells, using flow cytometry, to elucidate differences in responsiveness. Due to the heterogeneity of NK-cell subsets and individual repertoires of NK cell receptors, the secondary aim was to investigate the group specific activity and cytokine production of NK-cells. Altogether, 38 samples of NHL-patients were included in this study and compared to samples of nine healthy controls.

Obinutuzumab was found to be superior to its predecessor Rituximab, not only in target-sided cytotoxicity analyses, but also in effector-sided functional analyses of NK-cell activity and cytokine production. The analyses of NK-cell populations demonstrated, that the superior effects of Obinutuzumab are mainly caused by a greater activation of *CD56^{dim}* NK-cells – a finding that, to the author's best knowledge, has not been reported before. Moreover, findings demonstrated that using monoclonal antibodies recruiting *CD56^{bright}* NK-cells for cytotoxic activity is feasible. Clonal receptor-based analysis further showed, that mAb based activation of NK-cell clones may be anticipated determining genotypes of human leukocyte antigen (HLA)-C and Killer cell immunoglobulin like receptors (KIR). Moreover, inhibition of KIR2DL2/3⁺-clones, which was most likely due to HLA-C1, was found to be partially reversible using Obinutuzumab.

Abkürzungsverzeichnis

μ l	Mikroliter
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
<i>ADCC</i>	<i>Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity</i>
APC	Allophycocyanin
<i>BV</i>	<i>Brilliant violet</i>
<i>CD</i>	<i>Cluster of Differentiation</i>
<i>CDC</i>	<i>Complement Dependent Cytotoxicity</i>
<i>CDR</i>	<i>Complementary Determining Region</i>
CFDA-SE	Carboxyfluoresceindiazetat-succinimidylester
CFSE	Carboxyfluorescein-succinimidyl
CHOP	Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednison
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
Cy	Cyanin
<i>DCD</i>	<i>Direct Cell Death</i>
<i>DLBCL</i>	<i>Diffuse Large B-Cell Lymphoma</i>
DMSO	Dimethyl-sulfoxid
<i>DNA</i>	<i>Desoxyribonucleic Acid</i>
<i>ECOG</i>	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
<i>Fab</i>	<i>Antigen-binding Fragments</i>
<i>FACS</i>	<i>Flourescence-Activated Cell Sorting</i>
<i>Fc</i>	<i>Crystallizable Fragment</i>
<i>FcgIIIIR</i>	<i>Crystallizable Fragment γIII-Receptor</i>
<i>FCS</i>	<i>Fetal Calf Serum</i>
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
h	Stunde(n)
HLA	Humanes Leukozytenantigen
<i>ICAM-1</i>	<i>Intercellular adhesion molecule-1</i>
IFN- γ	Interferon- γ
IFN-g-PE-Cy7	IFN- γ -Phycoerythrin-Cyanin 7
IL-2	Interleukin-2
<i>KIR</i>	<i>Killer Cell Immunoglobulin-like receptors</i>

<i>LFA-1</i>	<i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i>
<i>mAb</i>	<i>Monoclonal Antibody</i>
mg / ml	Milligramm / Milliliter
<i>MHC</i>	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
min	Minute(n)
ml	Milliliter
<i>MNC</i>	<i>Mononuclear Cells</i>
NHL	Non-Hodgkin-Lymphome
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
<i>PBS</i>	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
<i>PCR-SSP</i>	<i>polymerase chain reaction – sequence specific primers</i>
PE	Phycoerythrin
PET/CT	Positronen-Emissions- Tomographie/Computertomographie
PI	Propidiumiodid
R-CHOP	Rituximab, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednison
TNF- α -APC-Cy7	TNF- α -Allophycocyanin-Cyanin 7
TNF-a	Tumornekrosefaktor a
U / min	Umdrehungen / Minute
U / ml	Einheiten / Milliliter
<i>WHO</i>	<i>World Health Organization</i>

Inhaltsverzeichnis

1 Einführung in B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome und deren Therapie	1
1.1 B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome	1
1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie der Non-Hodgkin-Lymphome	1
1.1.2 Symptome und Klinik	2
1.1.3 Diagnostik und Therapieansätze	2
1.2 Natürliche Killerzellen	4
1.2.1 Funktion und Effektormechanismen der Natürlichen Killerzellen	4
1.2.2 Durchflusszytometrische Quantifizierung der Natürlichen Killerzell-Antwort	6
1.2.3 <i>KIR</i> - und <i>NKG2</i> -Rezeptoren der NK-Zellen und deren immunologische Bedeutung	7
1.3 Therapeutische Antikörper und ihr Stellenwert in der Therapie der Non-Hodgkin-Lymphome	11
1.3.1 Monoklonale Antikörper	11
1.3.2 Obinutuzumab als Vertreter der modernen monoklonalen Antikörper	14
1.4 Zielsetzung	16
2 Material und Methoden	17
2.1 Rahmenbedingungen und Kohorten	17
2.2 Zellseparation und -konservierung	17
2.2.1 Zellseparation	17
2.2.2 Kryokonservierung der Zellen und Auftauprozess	18
2.3 Kultivierung der Zelllinien und <i>Mononuclear cells</i>	19
2.4 CFDA-SE-Assay	20
2.5 <i>KIR</i>- und HLA-C-Typisierung	22
2.6 Funktionsanalyse der NK-Zellen: <i>CD107a</i>-, <i>TNF-α</i>, und <i>IFN-γ</i>-Assays	23
2.7 Definition der NK-Zell-Populationen	26
2.7 Statistische Auswertung	26
3 Ergebnisse	28

3.1 Kohortencharakteristika	28
3.2 Spezifische Zytolyse: CFDA-SE Assay	29
3.3 Aktivität und Zytokinproduktion der Natürlichen Killerzellen: <i>CD107a</i>-, TNF-α- und IFN-γ-Assays	32
3.3.1 Aktivität der Natürlichen Killerzellen in Gesamt-, Patienten- und Kontrollkohorte (<i>CD107a</i>)	32
3.3.2 Zytokinproduktion der Natürlichen Killerzellen in Gesamt-, Patienten- und Kontrollkohorte (TNF- α und IFN- γ)	35
3.3.3 Aktivität der Natürlichen Killerzell-Populationen <i>CD56^{dim}</i> und <i>CD56^{bright}</i> (<i>CD107a</i>)	38
3.3.4 Zytokinproduktion der Natürlichen Killerzell-Populationen <i>CD56^{dim}</i> und <i>CD56^{bright}</i> (TNF- α und IFN- γ)	41
3.3.5 Verteilung der HLA-C- und <i>KIR</i> -Genotypen	45
3.3.6 Vergleich der spezifischen Aktivität und Zytokinproduktion der Natürlichen Killerzellen in <i>KIR</i> -Genotyp 1 und 3	48
3.3.7 Vergleich der spezifischen Aktivität der Natürlichen Killerzell-Populationen NKG2A ⁺ , <i>KIR2DL1</i> ⁺ , <i>KIR2DL2/3</i> ⁺ und <i>triple negative</i>	52
3.3.8 Analyse der Ausreißer	55
4 Diskussion	59
Literaturverzeichnis	72

1 Einführung in B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome und deren Therapie

1.1 B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie der Non-Hodgkin-Lymphome

Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) sind eine Gruppe heterogener, maligner Erkrankungen der Zellen des adaptiven Immunsystems, welche nicht dem klassischen Hodgkin-Lymphom entsprechen [1, 2]. Neoplasien des lymphoiden Systems stellen in den Vereinigten Staaten von Amerika die sechsthäufigste maligne Erkrankung dar und die Inzidenz hat sich zwischen 1974 und 1995 annähernd verdoppelt [3]. B-Zell-NHL, die aus lymphoiden Zellen der B-Zellreihe hervorgehen, machen mit ca. 80% den Großteil der NHL aus [4]. Die Inzidenz der NHL-Typen unterliegt dabei einer hohen lokalen Variabilität: In Westeuropa und den Vereinigten Staaten von Amerika machen das *Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL)* und das Follikuläre Lymphom zusammen etwa 50-60% der NHL aus, während beispielsweise in Hong Kong das Follikuläre Lymphom weitaus seltener ist [5]. Die Geschlechterspezifische Inzidenz zeigt eine leicht erhöhte Erkrankungsrate der Männer verglichen mit Frauen [1, 6]. NHL sind eine Erkrankung der älteren Bevölkerung (Abb. 1). Die altersadjustierte Prävalenz über alle Altersgruppen hinweg lag 2015 bei 0.2%, wobei zwei Drittel der Erkrankten älter als 70 Jahre waren [7].

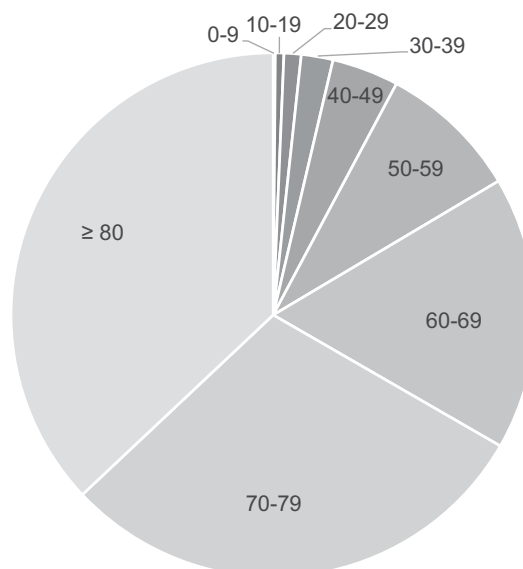


Abb. 1: Altersverteilung der an einem Non-Hodgkin-Lymphom erkrankten Personen. Einzelwerte (Altersgruppen in Jahren, nach SEER Cancer Statistics Review 1975-2015 [8]): 0-9: 0.1%; 10-19: 0.5%; 20-29: 1.1%; 30-39: 2.0%; 40-49: 4.1%; 50-59: 8.7%; 60-69: 16.9%; 70-79: 29.7%; ≥ 80: 36.9%

Es besteht eine enge Beziehung zwischen Beeinträchtigungen des Immunsystems und der Entwicklung eines Non-Hodgkin-Lymphoms. Infektionen mit dem Humanen Immundefizienz-Virus, dem Humanen T-Lymphotropen Virus 1, dem Humanen Herpesvirus-8 oder dem Epstein-Barr-Virus sind mit erhöhten Erkrankungsraten vergesellschaftet [9, 10]. Darüber hinaus zeigen Autoimmundefekte, wie chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, Assoziationen zu *Mucosa Associated Lymphoid Tissue*-Lymphomen [11-13].

Die zuletzt 2016 erneuerte Klassifikation der *World Health Organization (WHO)* für lymphoide Neoplasien basiert auf dem aktuellen Konsens der Hämatopathologie, Humangenetik und klinischen Medizin [3, 14]. Sie unterteilt Lymphome in Neoplasien reifer B-Zellen und T-Zellen, Natürliche-Killerzell-Neoplasien, das klassische Hodgkin-Lymphom, *posttransplant lymphoproliferative disorders* und Neoplasien der histiozytären sowie der dendritischen Zellreihe.

1.1.2 Symptome und Klinik

Als klassische Symptomtrias ist sowohl für die Non-Hodgkin-Lymphome als auch für das Hodgkin-Lymphom die B-Symptomatik bestehend aus

- ungewolltem Gewichtsverlust von mehr als 10% in den letzten 6 Monaten
- einer anderweitig nicht erklärbaren Erhöhung der Körpertemperatur auf über 38°C
- und Nachtschweiß

bekannt [15]. In der Regel kommt es darüber hinaus im Rahmen der Lymphoproliferation zu einem Wachstum der Lymphknoten einzelner oder mehrerer Lymphknotenstationen. Auch die Milz oder andere Organe mit lymphatischem Gewebe sowie extralymphatische Organe können betroffen sein. Findet die Lymphoproliferation im Knochenmark statt, kommt es regelhaft über die Verdrängung der blutbildenden Zellen zu einer Anämiesymptomatik sowie einer Blutungs- oder Infektneigung [1, 16].

1.1.3 Diagnostik und Therapieansätze

Zur Einordnung in die *WHO*-Klassifikation ist die Gewinnung einer Probe und deren histopathologische Aufarbeitung unerlässlich [17]. Aufgrund der unterschiedlichen Befallsmuster der Lymphome innerhalb des Lymphknotens ist hierbei die

Lymphknotenexstirpation, also die operative Entfernung eines vollständigen Lymphknotens, Goldstandard. Andere Arten der Probengewinnung - beispielsweise eine CT-gesteuerte Punktion, bergen hingegen das Risiko, die diagnostisch relevante, befallene Zone des Lymphknotens zu verfehlen [18]. Für das *Staging* wird mit zunehmender Häufigkeit die Positronen-Emissions-Tomographie/Computertomographie (PET/CT) eingesetzt, mittels derer die einzelnen Lymphknotenstationen sowie die Milz und andere Organe beurteilt werden [17, 19, 20].

Die Ann-Arbor-Klassifikation fasst diagnostische Ergebnisse und die vorliegende Symptomatik zusammen (Tabelle 1) [15]. Neben der Kodierung des Befallsmusters wird auch die B-Symptomatik einbegriffen.

Der *International Prognostic Index* fasst Ann-Arbor-Stadium, den *Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) Performance Status*, das Patientenalter und die Lactat-Dehydrogenase-Konzentration im Serum als Marker für den Zellumsatz zusammen und korreliert stark mit der Prognose des Patienten [21, 22].

Tabelle 1: Die Ann-Arbor-Klassifikation zur Einteilung der Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphome

Stadienkodierung	Bedeutung
I / I _E	Befall einer Lymphknotenstation (I); eine extranodale Manifestation / extralymphatische Organmanifestation (I _E)
II / II _E	Befall einseitig des Zwerchfells. II: mindestens zwei betroffene Lymphknotenstationen; II _E : extranodale Manifestation und mindestens eine Lymphknotenstation
III / III _{S/E/SE}	Befall beidseitig des Zwerchfells. III: ohne extranodale Manifestation; III _E : mit extranodaler Manifestation; III _{S/SE} : zusätzliche Milzbeteiligung
IV	Diffuse Ausbreitung. Extralymphatische Organe betroffen, mit oder ohne assoziierte Lymphknotenvergrößerung. Manifestationsorte werden zusätzlich kodiert.

Nach der Definition von Carbone PP, et al. von 1971 [15].

Die Determinanten der Prognose und Therapie der NHL sind das initiale Stadium und der NHL-Typ. Aufgrund eines initial häufig inapparenten Verlaufs befinden sich viele Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, insbesondere bei indolenten Lymphomen wie dem Follikulären Lymphom, in einem fortgeschrittenen Stadium mit

Befall der Milz, der Leber oder des Knochenmarks [23, 24]. Als Strategie zur Therapie des Follikulären Lymphoms wird in diesem Stadium häufig *watch and wait* verfolgt, allerdings wird auch eine frühzeitige Therapie mit dem *Monoclonal Antibody (mAb)* Rituximab zunehmend angewendet [24-26]. Spätestens eine auftretende Symptomatik indiziert die Anwendung einer Kombinationschemotherapie, ergänzt um den Rituximab.

Durch die Zulassung des chimären *mAb* Rituximab wurde die Therapie der NHL revolutioniert. Zahlreiche Arbeiten belegen seit dessen Einführung eine signifikant höhere initiale Ansprechrate, eine deutliche Verlängerung des progressionsfreien Überlebens und schließlich auch eine Verlängerung des Gesamtüberlebens der Patienten [27]. Das relative Risiko eines Versagens der Therapie des Follikulären Lymphom wurde durch die Ergänzung des gängigen Chemotherapie-Schemas aus Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, und Prednison (CHOP) um Rituximab (zu R-CHOP) um 60% gesenkt [28]. Darüber hinaus wurde die initiale Ansprechrate von 90% auf 96% erhöht und die Remissionsdauer verlängert [28]. Bei einer Therapie, welche nicht durch Rituximab ergänzt wird, kann im Gegenzug trotz therapeutischen Erfolgs letztlich kein verlängertes Gesamtüberleben festgestellt werden [29]. Nicht zuletzt wird Rituximab deshalb auch in der Erhaltungsphase der Therapie angewendet [30].

1.2 Natürliche Killerzellen

1.2.1 Funktion und Effektormechanismen der Natürlichen Killerzellen

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) nehmen einen besonderen Platz im Immunsystem ein: Einerseits zählen sie aufgrund ihrer Funktion zum angeborenen Immunsystem, andererseits gehen sie aus der lymphoiden Zellreihe hervor und bilden somit das funktionelle Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunität [31]. NK-Zellen sind über das Fehlen des T-Zellmarkers *Cluster of Differentiation (CD) 3* und über die Expression des *CD56* definiert [32].

Bei *CD56* handelt es sich um ein *Neural Cell Adhesion Molecule*, dessen Funktion nicht abschließend geklärt ist [33]. Anhand der durchflusszytometrisch messbaren *CD56*-Expressionsdichte werden NK-Zellen in zwei funktionell unterschiedliche Subgruppen unterteilt [34]: NK-Zellen mit niedriger *CD56*-Expressionsdichte (*CD56^{dim}*) machen in etwa 90% der NK-Zellen aus [35, 36]. *CD56^{bright}* weisen eine deutlich höhere Expressionsdichte der membranständigen *CD56*-Moleküle auf [37].

Die *CD56*-Populationen unterscheiden sich in der Art ihrer Zellantwort: Aktivierung der *CD56^{bright}* resultiert in einer Zytokinproduktion und -ausschüttung, während *CD56^{dim}* mit zytotoxischer Aktivität reagieren [38]. *CD56^{dim}* zeigen darüber hinaus eine wesentlich größere Expressionsdichte des *CD16*, des *Crystallizable Fragment γ III-Receptors (Fc γ IIIr)*, über den die NK-Zelle antikörpermarkierte Ziele erkennt [39]. Bei Aktivierung des *CD16* wird die *Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC)* eingeleitet, die zu einer Lyse der antikörpermarkierten Zelle führt [40].

Im Rahmen des *ADCC* setzen NK-Zellen zytotoxische Granula frei, die Granzym und Perforin enthalten und einen sauren pH-Wert aufweisen [41]. Im sauren Milieu sind die jeweiligen Inhibitoren, nämlich Serglycin für Granzym B und Calreticulin für Perforin, an die Enzyme gebunden und halten diese inaktiv [42]. Die Membran der Granula wird dabei durch lysosomale Proteine wie *CD107a* stabilisiert, wodurch die NK-Zelle vor einer intrazellulären Freisetzung der Enzyme geschützt wird [43, 44]. Die Lysosomen fusionieren mit der NK-Zell-Membran und die zytotoxischen Substanzen werden freigesetzt. Hierbei tritt *CD107a*, welches sich auf der Innenseite der zytotoxischen Granula befindet, an die Oberfläche der NK-Zelle [45, 46].

Die Effektmechanismen des Perforins und Granzyms sind umstritten [43]. Einerseits wird eine Kanalbildung des Perforins in der Zellmembran der Zielzelle diskutiert, durch die Granzym B in das Zellinnere gelangt und dort die Apoptose über die Caspase-Kaskade aktiviert [43, 47]. Als alternativer Mechanismus wird eine endozytotische Aufnahme von Granzym B und Perforin diskutiert [43, 48]: Hier bildet Perforin innerhalb der Zelle Kanäle in der Endosomenmembran, über die aufgrund des Konzentrationsgefälles Wasserstoffionen aus den Endosomen in das Zytosol übertreten. Durch den Verlust des sauren Milieus verloren wird das Endosom wird instabil, kollabiert und setzt das enthaltene Granzym B frei. Andere Autoren gehen davon aus, dass die durch Perforin gebildeten Poren in der Endosomenmembran deutlich größer sind und Granzym B darüber direkt in das Zytosol der Zielzelle freigesetzt wird [43]. Allen Theorien ist jedoch gemein, dass letztlich das im Zytosol aktive Granzym B den Caspase-Signalweg initiiert, der zur Apoptose der Zielzelle führt.

Die Zytokinfreisetzung bildet einen weiteren wichtigen Mechanismus der NK-Zellen. Über verschiedene Interleukinen, Interferon- γ (IFN- γ) oder Tumornekrosefaktor α (TNF- α) wird einerseits direkt die Zytolyse der Zielzellen

induziert, andererseits werden auch weitere Zellen des Immunsystems für die Immunantwort rekrutiert und aktiviert [49]. TNF- α und IFN- γ induzieren in den Zielzellen unter Beteiligung von NF- κ B eine vermehrte Expression und Präsentation des *Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)*. Die NK-Zellen binden ihrerseits über das Integrin *Lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1)* an die Zielzelle, wodurch eine positive Rückkopplung der NK-Zell-Antwort resultiert, die in einer Lyse der Zielzelle mündet [50, 51].

1.2.2 Durchflusszytometrische Quantifizierung der Natürlichen Killerzell-Antwort

Die Antwort der NK-Zellen kann sowohl auf NK-Zell-Seite, als auch auf Seite der Zielzellen durchflusszytometrisch quantifiziert werden. Bei der durchflusszytometrischen Messung werden eingefärbte Zellen mit Laserstrahlen unterschiedlicher Wellenlängen bestrahlt [52]. Durch die Laser werden fluoreszierende Farbstoffe angeregt, welche Licht eines spezifischen Wellenlängenbereichs emittieren. Das emittierte Lichtspektrum sowie die Brechung des Lichts wird durch das Durchflusszytometer registriert und gemessen [52].

Bei Carboxyfluoresceindiazetat-succinimidylester (CFDA-SE) handelt es sich um ein Molekül, welches über die Zellmembran in das Zellinnere diffundiert und dort durch intrazelluläre Esterasen zu Carboxyfluorescein-succinimidylester (CFSE), einem durchflusszytometrisch messbaren Farbstoff, abgebaut wird [53]. Da nur in vitalen Zellen die Esterasen in ausreichender Konzentration vorliegen, um CFDA-SE zu CFSE zu spalten, lässt sich aus der CFSE-Färbung auf die Vitalität der Zellen zu Versuchsbeginn rückschließen. Propidiumiodid (PI) ist ein durchflusszytometrisch messbarer Farbstoff, der die Membran vitaler Zellen nicht durchdringen kann und somit nur untergegangene Zellen anfärbt [54]. Er färbt sowohl die bereits zu Versuchsbeginn apoptotischen Zellen an als auch die Zellen, welche während des Versuchs untergegangen sind.

Mit Hilfe einer Bandbreite hochspezifischer, antikörpergekoppelter Farbstoffe lassen sich darüber hinaus beispielsweise Zellpopulationen identifizieren oder über intrazelluläre Färbungen Zytokine, wie IFN- γ oder TNF- α , anfärben [52]. Auch *CD107a* ist durch Extrazellulärfarbstoffe quantifizierbar [45, 46].

1.2.3 KIR- und NKG2-Rezeptoren der NK-Zellen und deren immunologische Bedeutung

NK-Zellen sind aufgrund ihrer diversen Rezeptorklassen im Gegensatz zu den rein lymphatischen T- und B-Zellen auch ohne Antikörpermarkierung dazu in der Lage, virusinfizierte oder fremde Zellen zu identifizieren und anzugreifen [36, 37, 55, 56]. Sie besitzen dazu eine Vielzahl an Rezeptoren, anhand derer sie sich in Populationen einteilen lassen. Binden die Rezeptoren an einen geeigneten Liganden, modulieren sie die NK-Zell-Antwort. Im Folgenden soll näher auf die verschiedenen Rezeptorklassen eingegangen werden [57].

Zu der NKG2-Familie gehören fünf Rezeptortypen, von denen lediglich NKG2A den inhibitorischen Rezeptoren zuzuordnen ist. NKG2A bindet an das humane Leukozytenantigen (HLA) E, ein nicht klassisches Mitglied der Familie des *Major Histocompatibility Complex (MHC)* Klasse 1 [58]. *MHC*-Klasse-1-Moleküle dienen der Präsentation zelleigener Peptidfragmente gegenüber Immunzellen [59, 60]. Alterierte Peptidketten, welche beispielsweise im Rahmen einer Virusinfektion von der betroffenen Zelle gebildet werden, werden über *MHC*-Klasse-1-Moleküle präsentiert, wodurch eine Infektion der Zelle durch das Immunsystem erkannt wird [61]. Bei HLA-E handelt es sich um ein *MHC*-Klasse-1-Molekül, welches ausschließlich Peptidketten anderer *MHC*-Klasse-1-Moleküle, nämlich HLA-A, HLA-B und HLA-C präsentiert.

Die NK-Zelle ist allerdings nicht in der Lage, zwischen den präsentierten HLA-Fragmenten zu unterscheiden [62]. Sie erkennt über NKG2A lediglich, ob HLA durch die Zielzelle exprimiert wird, und ob sich die HLA-Expressionsdichte auf einem normalen Niveau bewegt [58, 62]. Ein weiterer Vertreter der NKG2-Familie, der stimulatorische NKG2C-Rezeptor, bindet ebenfalls an HLA-E, jedoch mit geringerer Affinität als NKG2A [62]. Daraus resultiert eine Inhibition der NK-Zelle gegenüber HLA-E tragenden Zellen.

Die *Killer Cell Immunoglobulin-like receptors (KIR)* bilden die zweite Rezeptorgruppe und spielen eine essentielle Rolle in der Modulation der NK-Zell-Antwort. Es gibt 15 verschiedene *KIR*-Gene, die auf allelischer Ebene einem hohen Polymorphismus unterliegen [63-65]. Allen verschiedenen Haplotypen gemein sind dabei vier *KIR*-Gene [66]. Anhand der *KIR* lässt sich eine Population in zwei Haplotyp-Gruppen einteilen: Gruppe A ist definiert durch sechs exprimierte *KIR*-Typen, nämlich *KIR2DL1*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2* und *KIR2DS4* [67, 68].

Gruppe B hingegen ist dadurch definiert, dass die *KIR*-Zusammensetzung von der des A-Haplotyps abweicht.

Im diploiden Organismus ergeben sich auf dieser Basis zunächst drei verschiedene *KIR*-Genotypgruppen, nämlich A/A, A/B und B/B. *KIR*-Genotypgruppe A/A ist homozygot für die oben genannten *KIR*-Gene, während *KIR*-Genotypgruppe A/B alle *KIR*-Gene der Gruppe A und mindestens ein weiteres *KIR*-Gen besitzt [67, 68]. *KIR*-Genotypgruppe B/B fehlt hingegen mindestens eines der Gruppe-A-Gene. Die Vielzahl der unterschiedlichen *KIR*-Genotypen, welche in die Gruppen A/B und B/B fallen, sind Großteils definiert, nummeriert und werden fortlaufend untersucht [69].

Ähnlich wie bei der Familie der NKG2 gibt es inhibitorische und stimulatorische *KIR*, jedoch sind *KIR* im Gegensatz zu NKG2-Rezeptoren hochspezifisch für bestimmte HLA-Klasse-1-Epitope (Tabelle 2).

Tabelle 2: *KIR*-Typen mit zugeordneten Liganden und Funktion.

<i>KIR</i> -Typ	Ligand	Funktion
<i>KIR2DL1</i>	HLA-C2	inhibitorisch
<i>KIR2DL2</i>	HLA-C1/2	inhibitorisch
<i>KIR2DL3</i>	HLA-C1/2	inhibitorisch
<i>KIR2DL4</i>	HLA-G	inhibitorisch und stimulatorisch
<i>KIR2DL5A</i>	unbekannt	inhibitorisch
<i>KIR2DL5B</i>	unbekannt	inhibitorisch
<i>KIR3DL1</i>	HLA-Bw4	inhibitorisch
<i>KIR3DL2</i>	HLA-A*03 und A*11	inhibitorisch
<i>KIR3DL3</i>	unbekannt	inhibitorisch
<i>KIR2DS1</i>	HLA-C2	stimulatorisch
<i>KIR2DS2</i>	HLA-C1	stimulatorisch
<i>KIR2DS3</i>	HLA-C1	stimulatorisch
<i>KIR2DS4</i>	HLA-C	stimulatorisch
<i>KIR2DS5</i>	unbekannt	stimulatorisch
<i>KIR3DS1</i>	unbekannt	stimulatorisch

Die Liganden der *KIR2DL5A*, *KIR2DL5B* und *KIR3DL3* sind bislang unbekannt [70-76]. *KIR*: Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor; HLA: humanes Leukozytenantigen

Inhibitorische *KIR* zeigen ähnlich zu der NKG2-Familie eine größere Affinität zu ihren Liganden als stimulatorische *KIR* [76]. Dies resultiert in dem Schutz der HLA-Klasse-1-exprimierenden Zellen vor der Lyse durch NK-Zellen. Auf Basis dieser Erkenntnisse wurde die Theorie des *missing self* postuliert [56].

Laut *missing self*-Theorie identifizierten NK-Zellen eine Zelle als Ziel, wenn sie diese nicht als körpereigen erkennen [56]. Die Erkennung läuft dabei über HLA-Klasse-1 Moleküle und die zugehörigen *KIR* und NKG2-Rezeptoren ab. In Anlehnung daran wurde in der Folge die *at least one*-Theorie entwickelt, die besagt, dass jede NK-Zelle im Rahmen der Toleranzbildung mindestens einen inhibitorischen HLA-Rezeptor exprimieren muss, um eine Identifikation körpereigener Zellen zu gewährleisten [68, 77]. Zwischenzeitig wurden allerdings auch NK-Zellen mit fehlenden inhibitorischen Rezeptoren sowie NK-Zellen, denen die zum HLA-Typ kompatiblen *KIR* fehlen, nachgewiesen [78]. Bei diesen Zellen wurde in der funktionellen Analyse eine verminderte Zytotoxizität festgestellt, sodass eine verstärkte Autoreaktivität ausblieb [79].

Im Rückschluss wird davon ausgegangen, dass NK-Zellen eine *Education* (*Licensing*) durchlaufen müssen, um ihre Zytotoxizität zu erlangen [80-82]. Der zelluläre Mechanismus des *Licensings* verbleibt bislang unklar. Diskutiert werden mehrere Ansätze, von denen einer die Lizenzierung im Sinne des *Arming*s nach Kim et al. ist [80]. Nach dem Modell des *Arming*s erhalten NK-Zellen erst durch das Erkennen der HLA-Klasse-1-Moleküle ihre Funktionalität (Abb. 2).

Im Gegensatz hierzu steht die Theorie des *Disarming*s, die besagt, dass NK-Zellen ohne kompatiblen, inhibierenden *KIR* durch permanente Aktivierung eine Überstimulation erfahren, durch welche sie anergisch werden [83].

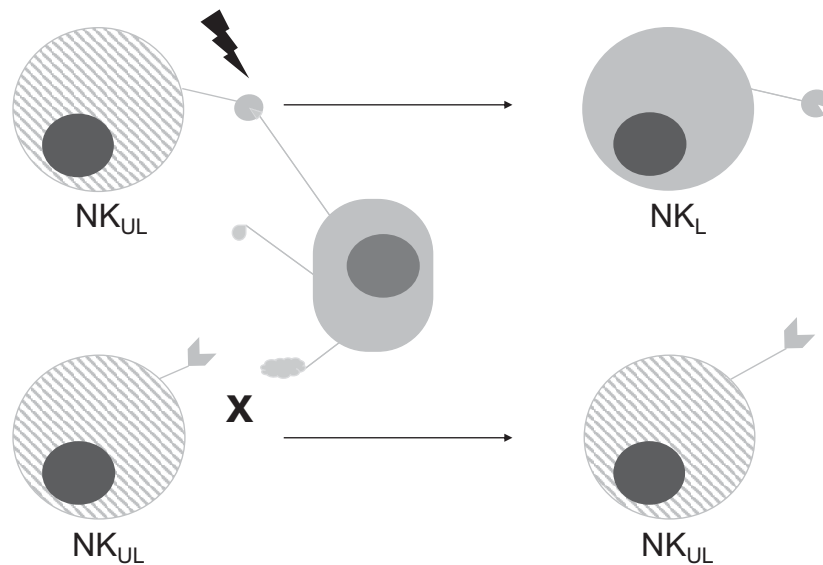


Abb. 2: Modell der NK-Zell-Lizenzierung nach dem Modell des *Arming* nach Kim, et al., 2005. NK-Zellen durchlaufen die Lizenzierung von links nach rechts. Oben: Eine unlicenzierte NK-Zelle (schraffiert, NK_{UL}) trifft auf eine körpereigene Zelle und erkennt deren HLA über *KIR*, wodurch die NK-Zelle lizenziert wird und ihre zytotoxische Potenz erhält (solide, NK_L). Unten: Eine unlicenzierte NK-Zelle (NK_{UL}) trifft auf eine körpereigene Zelle und kann deren HLA über die vorhandenen *KIR* nicht erkennen. Die Zelle verbleibt unlicenziert (NK_{UL}). NK-Zelle: Natürliche Killerzelle

Darüber hinaus ist der Einfluss der HLA-Klasse-1-Typen auf die exprimierten *KIR*-Subtypen Gegenstand aktueller Forschung und es existieren deutliche Hinweise darauf, dass das *KIR*-Repertoire durch die anwesenden HLA-Klasse-1-Subtypen moduliert wird. Schönberg et al. zeigten in einer Kohorte von 150 Probanden, dass bei *KIR*-A-Haplotypen je nach HLA-Klasse-1 des C-Typs entweder HLA-C1-spezifische *KIR2DL3* oder HLA-C2-spezifische *KIR2DL1* verstärkt exprimiert wurden [84]. Bei Haplotypgruppe B wurde eine entsprechende Adaption nicht festgestellt, was auf den bispezifischen *KIR2DL2* zurückgeführt wurde, welcher sowohl das HLA-C1- als auch das HLA-C2-Epitop erkennt. Hierdurch scheint die Expression des *KIR2DL1* unterdrückt zu werden.

1.3 Therapeutische Antikörper und ihr Stellenwert in der Therapie der Non-Hodgkin-Lymphome

1.3.1 Monoklonale Antikörper

Im Jahr 1975 gelang es der Forschungsgruppe um Milstein und Köhler erstmals, einen *mAb* zu synthetisieren und für ihre Arbeit erhielten sie neun Jahre später den Nobelpreis für Medizin oder Physiologie [85, 86]. Die Herstellungsmethode der Antikörper basiert auf murinen B-Zellen, welche den zu einem spezifischen Antigen passenden Antikörper bilden. Die B-Zellen werden mit Myelom-Zellen zu Hybridzellen fusioniert, welche letztlich identische Klone eines einzelnen Antikörpers produzieren.

Bei den meisten in der Krebstherapie verwendeten *mAb* handelt es sich um IgG-Moleküle, die aus zwei Leichtketten und zwei schweren Ketten bestehen (Abb. 3). Funktionell gliedern sich *mAb* in zwei *Antigen-binding Fragments (Fab)* und die *Crystallizable Fragment (Fc)*-Domäne, die aus zwei parallel liegenden schweren Ketten besteht [87]. Der Teil der variablen Domänen, der für die Antigenbindung zuständig ist, besitzt die Zusatzbezeichnung *Complementary Determining Region (CDR)* [88]. Da die im Herstellungsprozess der Antikörper verwendeten Zellen murinen Ursprungs sind, wiesen die ersten Antikörper murine Peptidketten auf, die mitunter in Menschen schwere Immunreaktionen auslösen [89]. Über verschiedene Verfahren und schließlich die Kreierung transgener Mäuse wurde der murine Anteil der Antikörper sukzessive verringert [90].

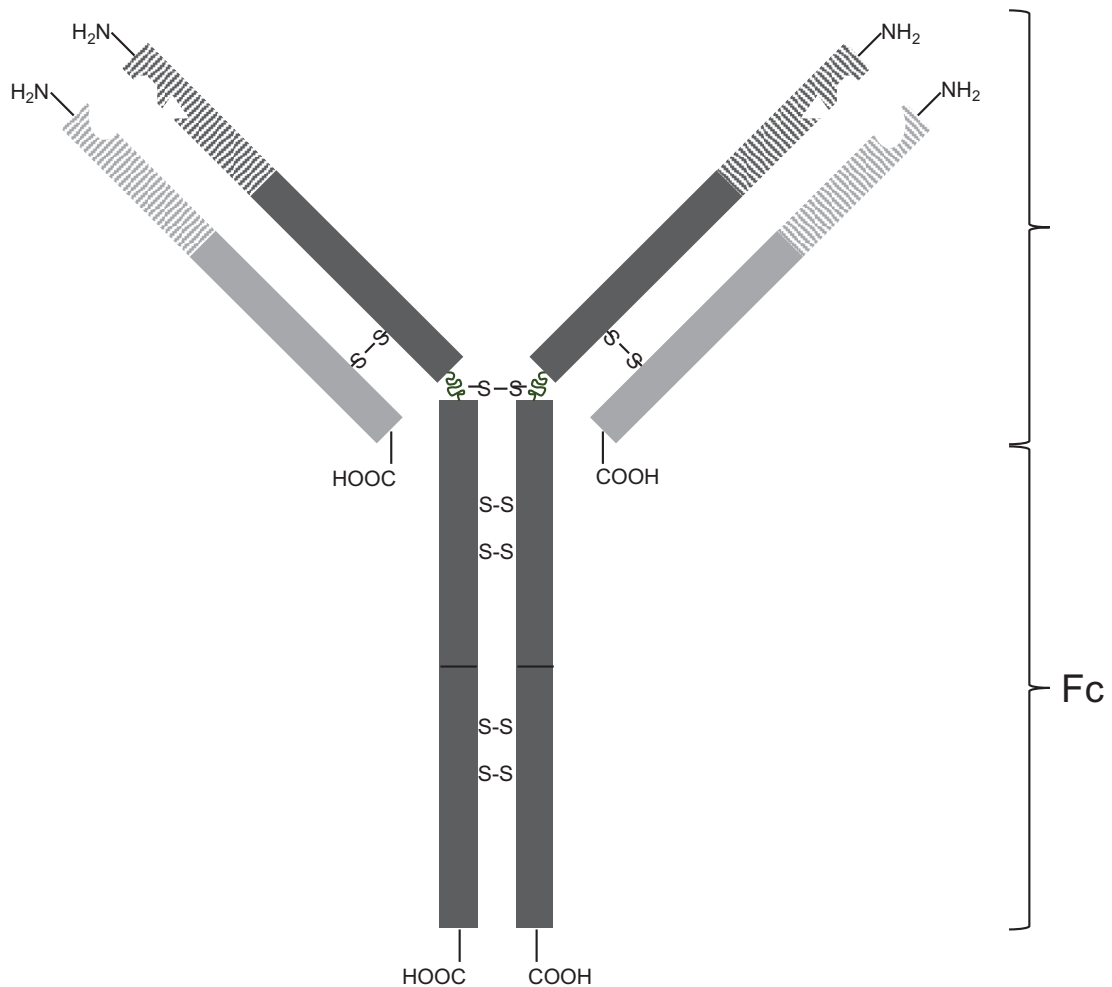


Abb. 3: Aufbau eines IgG-*mAb*. Der Antikörper besteht aus zwei symmetrischen Anteilen, welche über eine zentrale Disulfidbrücke (S-S) und multiple Disulfidbrücken im kristallisierbaren Fragment (*Fc*) miteinander verbunden sind [87]. Der linke und rechte Anteil der *Fc*-Domäne besteht aus jeweils zwei konstanten Domänen der schweren Kette (dunkelgrau, solide). Diese sind mit der dritten konstanten Domäne der schweren Kette (dunkelgrau, solide) des antigenbindenden Fragments (*Fab*) verknüpft. Hieran gliedert sich die variable Domäne der schweren Kette (dunkelgrau, schraffiert) mit der *complementary determining region*, durch Aussparungen dargestellt. Der äußere Anteil der *Fab*-Domäne besteht aus der leichten Kette, welche sich ebenso aus einem konstanten (hellgrau, solide) und einem variablen (hellgrau, schraffiert) Anteil zusammensetzt. Die leichte Kette besitzt ebenfalls eine *complementary determining region*, dargestellt durch Aussparungen. Die leichten und schweren Ketten des antigenbindenden Fragments sind beidseits über Disulfidbrücken miteinander verbunden. COOH: Carboxylgruppe; NH₂: Aminogruppe; IgG: Immunglobulin G; *mAb*: *Monoclonal Antibody*

Dieser Wandel spiegelt sich in der Nomenklatur der zugelassenen Wirkstoffe wider, in der verschiedene Endungen den Anteil muriner und humaner Peptidketten des Antikörpers anzeigen (Abb. 4) [91]. Während ein muriner *mAb* vollständig aus Peptidketten murinen Ursprungs besteht, ist der murine Anteil im chimären Antikörper auf die variablen Domänen reduziert. Humanisierte Antikörper bestehen bis auf die CDR

vollständig aus humanen Peptidketten. Humane Antikörper bilden den Gegenpol zu murinen Antikörpern und bestehen vollständig aus Peptidketten humanen Ursprungs [92].

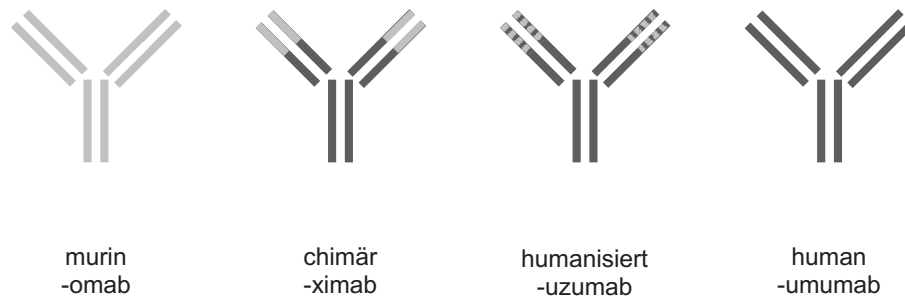


Abb. 4: Nomenklatur der Antikörper [91]. Links: Vollständig murine Antikörper enden auf -omab. Mitte links: Chimäre Antikörper, bei denen der murine Anteil auf die variablen Domänen reduziert ist, enden auf -ximab. Mitte rechts: Humanisierte Antikörper (Endung: -uzumab) besitzen lediglich murine Anteile in der complementary determining region. Rechts: Humane Antikörper (-umumab) bestehen vollständig aus humanen Proteinen.

Die CDR, welche auf dem variablen Teil der *Fab*-Domäne lokalisiert ist, bildet die Bindungsstelle des Antikörpers für sein Zielantigen [88]. Um unbeabsichtigte Bindungen zu vermeiden, wird das Zielantigen möglichst spezifisch für das Tumorgewebe gewählt und sollte nicht frei im Blutplasma vorliegen.

Bei der Erstellung therapeutischer Antikörper ist darüber hinaus zu beachten, dass die Antikörperwirkung durch Abwehrmechanismen der Zelle limitiert werden kann. Ein Abwehrmechanismus der Zielzellen liegt darin, das Zielantigen nach Bindung eines Antikörpers zu internalisieren, wodurch die *Fc*-Domäne des Antikörpers für eine Erkennung durch Immunzellen unerschikbaar ist [88, 93].

Die erste Säule der Wirkungsentfaltung der *mAb* bildet *ADCC* [40, 88, 94]. Bindet ein Antikörper über seine *Fab*-Domänen an ein Zielantigen, bleibt seine *Fc*-Domäne zunächst ungebunden. Verschiedene Immunzellen können die *Fc*-Domäne mittels ihrer *Fc*-Rezeptoren erkennen und Abwehrmechanismen einleiten. NK-Zellen erkennen Antikörper der Immunglobulin G (IgG) Klassen 1 und 3 über ihren *FcγRIII* und werden hierüber aktiviert [40].

Die *Complement Dependent Cytotoxicity (CDC)* bildet den zweiten Effektweg. IgG-*mAb* können den Komplementfaktor C1 über den freien *Fc*-Teil binden und so die Komplementkaskade aktivieren [88]. Die Komplementkaskade mündet schließlich in der Lyse der markierten Zelle.

Der dritte Wirkmechanismus liegt in der direkten Induktion der Apoptose der Zielzelle durch den Antikörper ohne weiteren Effektor, den *Direct Cell Death (DCD)*. Der zugrundeliegende Mechanismus wird auf eine Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Konzentration zurückgeführt [95].

1.3.2 Obinutuzumab als Vertreter der modernen monoklonalen Antikörper

Aufgrund der positiven Effekte, die Rituximab auf die Therapie der NHL hat, sind anti-*CD20-mAb* ein Gebiet mit ständigen Neuerungen. Die Gründe hierfür sind vielfältig: Bei Rituximab handelt es sich um einen chimären Antikörper, der aufgrund seiner murinen Anteile nicht zu vernachlässigende Immunreaktionen bei Patienten verursachen kann [89]. Darüber hinaus existieren verschiedene Subtypen des NK-zellseitigen *Fc*-Rezeptors, welche sich in ihrer Ansprechbarkeit durch den Antikörper unterscheiden [88, 96]. Außerdem kommt es bei zahlreichen Lymphompatienten im Verlauf der Therapie, beispielsweise durch eine Rituximab-induzierte *CD20*-Internalisierung, zu Resistenzentwicklungen [88, 93, 97].

Es werden fortlaufend neuartige anti-*CD20-mAb* entwickelt, um die Schwächen des Vorgängers zu umgehen und bessere Therapieergebnisse zu erzielen (Tabelle 3).

Tabelle 3: Übersicht über unkonjugierte anti-*CD20-mAb*.

Wirkstoff	Typ	Generation	Epitop / Glykosylierung
Rituximab	I	1.	große Schleife* / nicht glykosyliert
Ofatumumab	I	2.	kleine und große Schleife / nicht glykosyliert**
Obinutuzumab	II	3.	große Schleife* / glykosyliert
Ublituximab (TG-1101)	I	3.	unbekannt*** / glykosyliert

*Die Epitope von Rituximab und Obinutuzumab überlappen partiell [98]. **Ofatumumab, anti-*CD20-mAb* der zweiten Generation, bindet an die große und kleine Schleife [99]. ***Das exakte Epitop von Ublituximab ist bisher unbekannt, unterscheidet sich jedoch von den Epitopen der bisherigen anti-*CD20-mAb* [100, 101]. *CD*: Cluster of Differentiation; *mAb*: monoclonal Antibody

Das Epitop, an welches Rituximab bindet, befindet sich im Bereich der großen, extrazellulären Schleife des *CD20* (Abb. 5) [102]. Durch Modifikation der Epitope in modernen *mAb* soll unter anderem eine bessere Bindungsstärke erzielt werden. Den Epitopen, über welche anti-*CD20-mAb* binden, kommt hierbei eine entscheidende Rolle zu. Sie und die chemischen Eigenschaften der *mAb* determinieren die Wege, über welche die *mAb* ihre Wirkung entfalten [103].

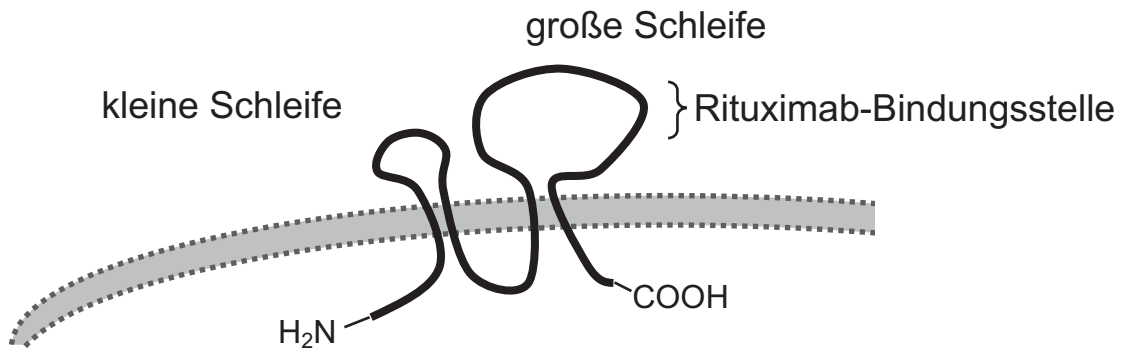


Abb. 5: Schematische Darstellung des Cluster of Differentiation 20. *CD20* besitzt eine große und eine kleine extrazelluläre Schleife [104]. Das Epitop, an welches Rituximab bindet, liegt auf der großen extrazellulären Schleife des *CD20*-Moleküls [102]. Die Enden der Proteinkette liegen intrazellulär und enden in einer Carboxylgruppe (COOH), nahe der großen Schleife, und eine Amoniumgruppe (NH₂), nahe der kleinen Schleife. CD: Cluster of Differentiation

Anhand ihrer Wirkmechanismen lassen sich die *mAb* in zwei Typen einteilen (Tabelle 4). Ein wesentlicher Effektmechanismus der Typ-I-*mAb* besteht in der Verschiebung von *CD20* in *lipid rafts*, bestimmte Zellmembranabschnitte [105]. Die Verlagerung von *CD20* in *lipid rafts* korreliert dabei positiv mit der Stärke des CDC.

Mit Obinutuzumab wurde 2013 der erste glykosylierte anti-*CD20-mAb*, in den Vereinigten Staaten von Amerika zur Behandlung der Chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) zugelassen [106].

Tabelle 4: Unterschiede zwischen Typ-I- und Typ-II-*mAb* [105, 107-109].

Wirkmechanismus	Typ-I- <i>mAb</i>	Typ-II- <i>mAb</i>
Verschiebung von <i>CD20</i> in <i>lipid rafts</i> / CDC	stark	schwach
ADCC	stark	stark
DCD	Caspase-abhängig	Caspase-unabhängig

mAb: monoclonal antibody; *CD*: cluster of differentiation; *CDC*: complement-dependent cytotoxicity; *ADCC*: antibody-dependent cellular cytotoxicity; *DCD*: direct cell death

Bei Obinutuzumab handelt es sich um einen Typ-II-*mAb* [107]. Durch die Glykosylierung der *Fc*-Domäne wird eine höhere Affinität zum *Fc*-Rezeptor der NK-Zellen erreicht und darüber das *ADCC* verstärkt. Darüber hinaus induziert Obinutuzumab *DCD* Caspase-unabhängig [108, 109]. Der Mechanismus des *DCD* ist Bestandteil gegenwärtiger Forschung und scheint eng mit der homotypischen Adhäsion, welche über Antikörperkomplexe erfolgt, zusammenzuhängen [108, 109].

1.4 Zielsetzung

Typ-2-*mAb* versprechen verbesserte Therapiemöglichkeiten der NHL. Bereits durch Rituximab wurden signifikant bessere Therapieergebnisse erzielt. Die vorliegenden in-vitro Studien zu Rituximab und modernen anti-*CD20-mAb*, wie Obinutuzumab, verwenden auf Effektorseite größtenteils genormte Zelllinien zur Überprüfung der NK-Zell-Aktivität, was insbesondere vor dem Hintergrund möglicher NK-Zell-Defizienzen die externe Validität der Ergebnisse in Frage stellt.

Daher soll im Rahmen dieser Arbeit anhand der therapeutischen Antikörper Rituximab und Obinutuzumab überprüft werden, ob die Ergebnisse auf NK-Zellen, welche von NHL-Patienten stammen, übertragbar sind und inwiefern sich die Ergebnisse der *mAb* Rituximab und Obinutuzumab voneinander unterscheiden. Ferner soll untersucht werden, ob und in welcher Weise sich die zelluläre Antwort verschiedener NK-Zell-Klassen nach Aktivierung durch die *mAb* unterscheidet.

2 Material und Methoden

2.1 Rahmenbedingungen und Kohorten

Die durchgeführte Studie ist konform zur Deklaration von Helsinki und ist nach durch das Ethikvotum 5128, erteilt durch die Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, gedeckt. Sämtliche Studienteilnehmer wurden auf Einwilligungsfähigkeit überprüft und für sämtliche Patienten liegen unterzeichnete Aufklärungsbögen vor.

Die Patientenkohorte wurde zwischen dem 11.11.2015 und dem 14.06.2016 über die Ambulanzen und Stationen der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie des Universitätsklinikums Düsseldorf rekrutiert. Insgesamt wurden n = 41 Teilnehmer, die aufgrund eines B-Zell-NHL in Behandlung waren, in die Studie eingebunden. Drei der Patienten wurden aufgrund anderweitiger hämatologischer Vorerkrankungen aus der Studie ausgeschlossen (Vorerkrankungen: 2x Morbus Hodgkin, 1x Akute lymphatische Leukämie). Von den übrigen Patienten wurden im Rahmen hämato-onkologischer Routineuntersuchungen über das reguläre Blutvolumen hinaus zusätzlich maximal 7 ml venöses Blut in Ethylendiamintetraazetsäure-Röhrchen abgenommen. Die Kontrollkohorte bestand aus n = 9 gesunden Spendern, deren Blutproben in Form von *buffy coats* über die Blutspendezentrale der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf bezogen wurden.

2.2 Zellseparation und -konservierung

2.2.1 Zellseparation

Das Blut wurde innerhalb von 12-24 Stunden weiterverarbeitet. Sowohl in der Patienten- als auch in der Kontrollkohorte wurden zum Zwecke der HLA- und *KIR*-Genotypisierung jeweils 0.5 ml Blut pro Probe in 1.5 ml Mikroreaktionsröhrchen übertragen, bei 4 °C gekühlt und bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

Die *Mononuclear Cells (MNCs)* wurden aus dem restlichen Blut isoliert. Hierzu wurde das Vollblut mit Hilfe von *Biocoll separating solution* (Biochrom, Berlin, Deutschland) dichtezentrifugiert: Das Vollblut wurde in 50 ml Falcon-Röhrchen mit angewärmter (21 °C), phosphatgepufferter Natriumchloridlösung (*Phosphate Buffered Saline, PBS*) (BioWhittaker, Verviers, Belgien) auf ein Gesamtvolumen von 35 ml

verdünnt. In ein weiteres 50 ml Falcon-Röhrchen wurden 15 ml der *Separating Solution* vorgelegt. Die Vollblut-Lösung wurden behutsam auf die *Separating Solution* pipettiert, sodass eine zweiphasige Dispersion entstand.

Anschließend wurde die Probe für 20 Minuten (min) bei Raumtemperatur (21 °C) mit 2000 Umdrehungen / Minute (U / min) zentrifugiert. Um ein Durchmischen der Probe durch den Bremsvorgang zu verhindern, wurde die Bremse für den Zentrifugationsvorgang deaktiviert.

Die entstandene Interphase wurde anschließend abpipettiert und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Die Probe wurde mit 35 ml *PBS* (4 °C) auf ein Gesamtvolumen von 50 ml verdünnt und 10 min bei 1320 U / min und 4 °C mit aktivierter Bremse zentrifugiert, sodass die *MNCs* sich am Boden des Falcon-Röhrchens absetzten.

Die Resuspension der Zellen erfolgte in 2 ml *PBS*. Zur Zellzahlbestimmung wurden 20 µl der Suspension in einem Verhältnis von 1:1 mit Trypanblau gefärbt und auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Im Anschluss wurde die Zellzahl mit Hilfe eines Lichtmikroskops bestimmt. Im Fall einer mikro- oder makroskopisch sichtbaren Verunreinigung der Probe durch Erythrozyten wurde ergänzend eine Erythrozytolyse mittels Ammoniumchlorid durchgeführt.

Die Zellen wurden hierzu erneut für 10 min bei 1320 U / min, 4 °C, mit aktivierter Bremse zentrifugiert. Der *PBS*-Überstand wurde verworfen, die Zellen in 20 ml gekühlter (4 °C) Ammoniumchloridlösung resuspendiert und 10 min bei Raumtemperatur unter dem Abzug inkubiert. Im Anschluss wurde die Lösung mit *PBS* auf ein Gesamtvolumen von 50 ml verdünnt und für 10 min zentrifugiert (1320 U / min, 4 °C). Um die Ammoniumchlorid-Rückstände zu entfernen, wurden die Zellen im anschließend insgesamt dreimal erneut in 50 ml *PBS* resuspendiert und zentrifugiert (1320 U / min, 4 °C).

2.2.2 Kryokonservierung der Zellen und Auftauprozess

Zur Vorbereitung auf die Kryokonservierung wurden die Zellen in Einfriermedium (Tabelle 5) aufgenommen, sodass eine Konzentration von 10×10^6 Zellen / ml resultierte. Die Kryokonservierungsröhrchen (Maximalvolumen 1.5 ml) wurden auf Eis gelagert und mit je 500 µl Zellsuspension / Röhrchen bestückt.

Tabelle 5: Zusammensetzung der verwendeten Medien.

Ingredienzien	Standardmedium	Einfriermedium	DMSO-Medium
Basis	500 ml RPMI-1640	Standardmedium	Einfriermedium
FCS	10%	30%	-
Penicillin	- 100 U / ml	-	-
Streptomycin	100 µg / ml		
Dimethyl-sulfoxid	-	-	20%

RPMI-1640 (BioWhittaker, Verviers, Belgien); Penicillin & Streptomycin (Gibco, Eggenstein, Deutschland); *FCS: fetal calf serum*; (Biochrom, Berlin, Deutschland); DMSO: Dimethyl-sulfoxid

Anschließend wurden jedem Röhrchen 500 µl Dimethyl-sulfoxid (DMSO)-Medium zu einer Konzentration von 5×10^6 Zellen / ml beigemischt und die Röhrchen umgehend in die bei -80°C tiefgekühlt. Nach Bedarf wurden die Zellen im Wasserbad bei 37°C angetaut und unmittelbar in 15 ml Falcon-Röhrchen, gefüllt mit Standardmedium (Tabelle 5), überführt. Die Zellen wurden für 10 min ($1320 \text{ U} / \text{min}$, 4°C) mit aktivierter Bremse zentrifugiert. Um Restbestandteile des DMSO zu entfernen, erfolgte eine erneute Resuspension in 15 ml Standardmedium und die Zentrifugation wurde wiederholt. Nach dem Waschvorgang wurden die Zellen in 2 ml Standardmedium resuspendiert und wie zuvor beschrieben unter dem Lichtmikroskop gezählt.

2.3 Kultivierung der Zelllinien und *Mononuclear cells*

Als Zielzelle der *mAb* wurde die $CD20^+$ humane Lymphom-Zellreihe Raji (CCL-86) verwendet. Als Positivkontrolle diente die humane Leukämie-Zellreihe K562 (CCL-243) der *American Type Culture Collection*. Die Zelllinien wurden in Standardmedium in einer Zelldichte von $0.5 \times 10^6 / \text{ml}$ bei 37°C , 5% Kohlenstoffdioxid, und feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre im Brutschrank (FormaScientific, Thermo Life Sciences, Egelsbach) kultiviert.

Die *Mononuclear cells* (MNCs) wurden 12-16 Stunden (h) vor Versuchsbeginn wie beschrieben aufgetaut und gezählt und anschließend in NK-Zell-Medium, bestehend aus Standardmedium, ergänzt um 5% humanes AB-Serum (Biochrom, Berlin, Deutschland) und $1000 \text{ U} / \text{ml}$ Interleukin-2 (IL-2) (Novartis, Rocky Hill, NJ, USA), aufgenommen, sodass die Zellkonzentration bei $1 \times 10^6 / \text{ml}$ Medium lag. Die Zellen wurden auf 12-Well-Platten übertragen (3 ml / Well) und für 12 h im Brutschrank inkubiert.

2.4 CFDA-SE-Assay

Die Funktionsweise des CFDA-SE-Assays ist in Abbildung 6 dargestellt. Raji und K562 wurden geerntet und unter dem Lichtmikroskop gezählt. Anschließend wurden sie zentrifugiert (1320 U / min, 4 °C, Bremse aktiviert), und in einer Lösung aus *PBS* und 20% *Fetal Calf Serum (FCS)* resuspendiert, sodass eine Zelllösung der Konzentration 1×10^7 / ml entstand. Die Hälfte der Zellen wurde nach Herstellerprotokoll mittels CFDA-SE (Vybrant® CFDA-SE Tracer Kit, Invitrogen, CA, USA) gefärbt und in *PBS* mit 20% *FCS* gewaschen [110]. Die gefärbten Raji-Zellen wurden zu gleichen Teilen auf drei 15 ml-Falcon-Röhrchen aufgeteilt. Zu jeweils einem der Röhrchen wurde ein therapeutischer *mAb* (Rituximab oder Obinutuzumab) zu der Zielkonzentration von 0.1 mg / ml hinzugefügt und die Lösung für 45 min im Brutschrank inkubiert.

Nach Ablauf der Zeit wurden die Zielzellen erneut in *PBS* + 20% *FCS* gewaschen. Die gefärbten und die ungefärbten Raji-Zellen wurden zentrifugiert und auf eine Konzentration von 1×10^6 / ml in NK-Zell-Medium resuspendiert. Mit den gefärbten und ungefärbten K562-Zellen wurde analog verfahren.

Die *MNCs* wurden geerntet, unter dem Lichtmikroskop gezählt und auf eine Konzentration von 1×10^7 / ml in NK-Zell-Medium resuspendiert. Jeweils 100 µl der Zielzellen wurden nach dem Pipettierplan (Tabelle 6) auf einer 96-Well-Mikrotiterplatte vorgelegt, anschließend wurden jeweils 100 µl der Effektorzellen hinzugefügt, sodass ein Effektor-Zielzell-Verhältnis von 10:1 entstand.

Die Zellen wurden für 6 h im Brutschrank inkubiert, geerntet, in 500 µl *PBS* resuspendiert und zentrifugiert (1320 U / min, 4 °C, Bremse aktiviert). Das überschüssige *PBS* wurde abgossen und verworfen. Die Zellen wurden im *PBS*-Überstand resuspendiert.

Im Anschluss wurden die Proben unter Ausnahme der PI Kontrollen mit 5 µl PI (BD Biosciences, NJ, USA) gefärbt. Die Proben wurden umgehend durchflusszytometrisch (*FACS-CyAn-ADP*, Beckman Coulter, Marseille, Frankreich) gemessen. Zusätzlich wurde die spezifische Lyse der Zielzellen wurde als Differenz aus spontaner Lyse und Lyse in Gegenwart der Effektorzellen berechnet.

Die verfügbare Anzahl der *MNCs* pro Patientenprobe war durch das geringe Volumen der Blutproben limitiert. Aufgrund dessen wurde der CFDA-SE-Assay an $n = 13$ Patienten- und $n = 9$ Kontrollproben durchgeführt.

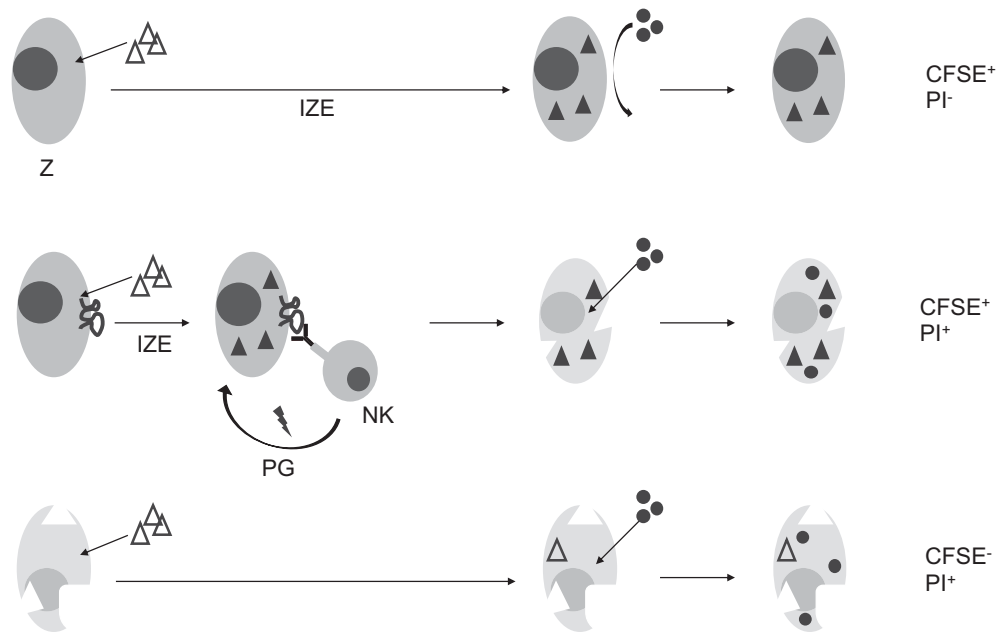


Abb. 6: CFDA-SE Zytotoxizitäts-Assay. Die Zielzellen (Z) durchlaufen den Assay von links nach rechts. CFSE und PI sind durchflusszytometrisch messbare Farbstoffe [111, 112]. Oben: CFDA-SE (hohle Dreiecke) diffundiert in die Zielzelle und wird durch intrazelluläre Esterasen (IZE) zu CFSE (solide Dreiecke) gespalten. Bei intakter Zellmembran gelangt Propidiumiodid (PI) (Punkte) nicht in die Zelle. Die Zelle ist CFSE⁺PI⁻. Mittig: Die Zielzelle nimmt CFDA-SE auf, das über IZE zu CFSE gespalten wird. Die Zielzelle trägt ein opsonisiertes Oberflächenmolekül, welches die Natürliche Killerzelle (NK) über ihren *FcγIIIIR* erkennt. Die Zytolyse der Zielzelle über Perforin und Granzym B (PG) wird eingeleitet. Über die defekte Zellmembran der untergegangenen Zielzelle tritt Propidiumiodid in die Zelle über. Die Zelle ist CFSE⁺PI⁺. Unten: Die Zelle ist zu Versuchsbeginn avital. Aufgrund mangelnder Esterasen wird CFDA-SE nicht gespalten. Die Zelle nimmt über ihre defekte Membran PI auf und ist somit CFSE⁻PI⁺. CFDA-SE: Carboxyfluoresceindiazetat-succinimidylester; CFSE: Carboxyfluorescein-succinimidylester; *FcγIIIIR*: *Crytallizable Fragment-γIII-Receptor*

Tabelle 6: Pipettierplan CFDA-SE des Zytotoxizitäts-Assays

Kontrollprobe	Patientenprobe	Zielzell-Kontrollen
(Raji + CFDA-SE) + <i>MNCs</i>	(Raji + CFDA-SE) + <i>MNCs</i>	Raji ungefärbt
(Raji + CFDA-SE + Rit) + <i>MNCs</i>	(Raji + CFDA-SE + Rit) + <i>MNCs</i>	(Raji + CFDA-SE)
(Raji + CFDA-SE + Obi) + <i>MNCs</i>	(Raji + CFDA-SE + Obi) Obi + <i>MNCs</i>	(Raji + CFDA-SE) + PI
(K562 + CFDA-SE) + <i>MNCs</i>	(K562 + CFDA-SE) + <i>MNCs</i>	(Raji CFDA-SE + Rit) + PI
		(Raji + CFDA-SE + Obi) + PI
		K562 ungefärbt
		(K562 + CFDA-SE)
		(K562 + CFDA-SE) + PI

Jedes Tabellenfeld entspricht einem Well der 96-Well-Mikrotiterplatte. Die eingeklammerten Bestandteile geben die Zusammensetzung der hinzugefügten Zielzellen an: (Raji + CFDA-SE + Rituximab) bedeutet, dass die hinzugefügten Raji vor Versuchsbeginn mit CFDA-SE gefärbt und mit Rituximab markiert wurden. Die linke Spalte gibt die Zusammensetzung der Wells an, welche abschließend um *MNCs* der Kontrollen ergänzt wurden. Die mittlere Spalte gibt die Zusammensetzungen der Wells wieder, die um die Patienten-*MNCs* ergänzt wurden. Die rechte Spalte zeigt die Zusammensetzung verschiedener Kontrollen der Zielzellen ohne Effektorzellen. CFDA-SE: Carboxyfluoresceindiazetat-succinimidylester; PI: Propidiumiodid; Rit: Rituximab; Obi: Obinutuzumab; *MNCs*: *Mononuclear cells*

2.5 KIR- und HLA-C-Typisierung

Die *KIR*- und HLA-C-Typisierungen wurden im Rahmen der Routineuntersuchungen im Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Die Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid, DNA*) der Proben wurde mittels *QiaAmp DNA Blood Mini kit* (QIAGEN, Hilfen, Deutschland) isoliert. Anschließend wurde eine Polymerase-Kettenreaktion mit sequenz-spezifischen Primern (*polymerase chain reaction – sequence specific primers, PCR-SSP*) durchgeführt, um die Ziel-DNA zu amplifizieren. Die amplifizierten DNA-Abschnitte wurden mittels Gelelektrophorese ausgewertet. Die Einteilung in NKG2 und *KIR*-Genotypen sowie die HLA-C-Genotypen C1/C1, C2/C2 und C1/C2 erfolgte anhand der Ergebnisse der Gelelektrophorese [69, 113].

2.6 Funktionsanalyse der NK-Zellen: *CD107a*-, TNF- α - und IFN- γ -Assays

Die Prinzipien der *CD107a*-, TNF- α - und IFN- γ -Assays, anhand derer die spezifische Aktivität der und die spezifische Zytokinproduktion der NK-Zellen gemessen wurde, sind in Abbildung 7 dargestellt.

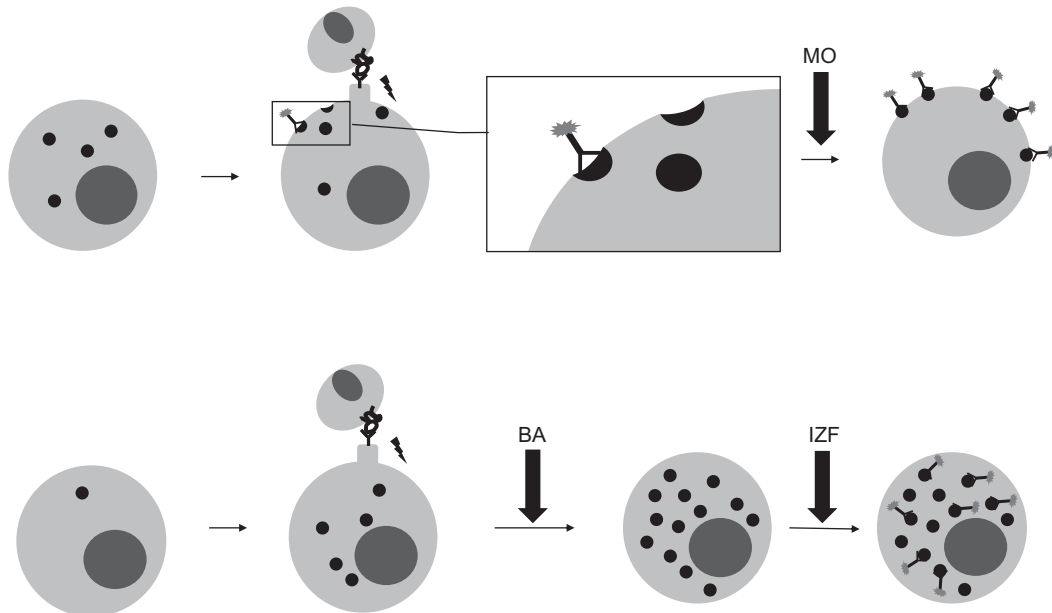


Abb. 7: Prinzip des *CD107a*-Assays und der intrazellulären Färbung von TNF- α und IFN- γ . Die Vorgänge sind zugunsten der Übersichtlichkeit getrennt dargestellt, laufen jedoch im Versuch simultan ab. Oben: Die NK-Zelle (NK) enthält Granula, welche an ihrer Innenseite *CD107a*-Moleküle tragen [45, 46]. Bei Aktivierung der NK-Zelle durch eine antikörpermarkierte Zelle, fusionieren die Granula mit der NK-Zell-Membran und *CD107a* wird auf der Zelloberfläche präsentiert. Hieran können *CD107a*-spezifische, farbstoffkonjugierte Antikörper (Y-förmig) binden [52]. Durch Zugabe von Monensin (MO), einem Golgi-Apparat-Inhibitor, wird anschließend die Endozytose des *CD107a* verhindert. Unten: Die NK-Zelle bildet bei Aktivierung verstärkt Zytokine, wie TNF- α und IFN- γ . Brefeldin A (BA) wird hinzugegeben und induziert den retrograden Transport der Zytokine vom Golgi-Apparat zum endoplasmatischen Retikulum. Hier akkumulieren die Zytokine und können anschließend durch antikörperkonjugierte Intrazellulärfarbstoffe (IZF) angefärbt werden. NK-Zelle: Natürliche Killerzelle; *CD*: Cluster of Differentiation; TNF- α ; Tumornekrosefaktor α ; IFN- γ : Interferon- γ

Die *MNCs* wurden analog zum CFDA-SE-Assay für 12 h mit IL-2 stimuliert. Die Färbung mit CFDA-SE wurde unterlassen. Stattdessen wurden jeweils 5 μ l des farbstoffgekoppelten Antikörpers *CD107a*-Fluorescein-isothiocyanat (FITC) (BD Biosciences, San Jose, CA, U.S.A) auf einer 96-Well-Mikrotiterplatte entsprechend des

Pipettierplans (Tabelle 7) unter Aussparung der Wells der ungefärbten Kontrollen vorgelegt.

Tabelle 7: Pipettierplan des *CD107a*-Zytotoxizitätsassays

Färbungen	Kontrollen, ungefärbt
<i>MNCs</i> + <i>CD107a</i> -FITC	Raji
<i>MNCs</i> + <i>K562</i> + <i>CD107a</i> -FITC	Raji + Rit
<i>MNCs</i> + <i>Raji</i> + <i>CD107a</i> -FITC	Raji + Obi
<i>MNCs</i> + <i>Raji</i> + <i>CD107a</i> -FITC + Rit	<i>K562</i>
<i>MNCs</i> + <i>Raji</i> + <i>CD107a</i> -FITC + Obi	<i>MNCs</i>

Jedes Tabellenfeld entspricht einem Well der 96-Well-Mikrotiterplatte. *CD*: Cluster of Differentiation; *MNCs*: Mononuclear cell; FITC: Fluorescein-isothiocyanat; Rit: Rituximab; Obi: Obinutuzumab

Die Zielzellen wurden analog zum CFFA-SE-Assay mit *mAbs* markiert. 100 µl der *MNC*-Suspension, entsprechend 1×10^6 Zellen, wurden den Wells hinzugefügt. Im Anschluss wurden jeweils 100 µl der Zielzellen hinzugefügt (1×10^5 Zellen), resultierend in einem Effektor-Zielzell-Verhältnis von 10:1. Die Negativkontrolle bestand aus *CD107a*-gefärbten *MNCs* ohne Zielzelle. Die Wells wurden mit NK-Zell-Medium auf 200 µl aufgefüllt und für 1 h im Brutschrank inkubiert.

Nach Ablauf der Zeit wurden jeder gefärbten Probe jeweils 2 µl Brefeldine A und 2 µl Monensin (BD Golgi Stop, BD Biosciences, San Jose, CA, U.S.A.) hinzugefügt und die Proben wurden für weitere 5 h im Brutschrank inkubiert. Zur Vorbereitung auf die fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (*fluorescence activated cell sorting*, *FACS*) wurden die in Tabelle 8 gelisteten *FACS-mAb* in der angegebenen Menge in *FACS*-Röhrchen vorgelegt.

Die *MNCs* wurden geerntet und in die vorbereiteten *FACS*-Röhrchen überführt, wobei ungefärbte Kontrollen in *FACS*-Röhrchen ohne färbende Antikörper gegeben wurden. Die Zellen wurden lichtgeschützt für 20 min bei 4 °C mit den extrazellulär färbenden Antikörpern inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden die *FACS*-Röhrchen mit *PBS* aufgefüllt und bei 1320 U / min, 4 °C, mit aktivierter Bremse zentrifugiert. Das *PBS* wurde abgossen und verworfen und die Zellen im *PBS*-Überstand resuspendiert.

Tabelle 8: Verwendete Mengen färbender Antikörper in der extrazellulären Färbung.

<i>FACS-mAb</i>	Menge pro <i>FACS</i> -Röhrchen (μ l)
<i>CD56</i> -PE-Dazzle	2
<i>CD3</i> - <i>BV510</i>	1
<i>KIR2DL1</i> -APC	5
<i>KIR2DL2/3</i> -PE-Cy5.5	2.5
<i>NKG2A</i> -PE	7.5

Bezeichnungen der *FACS-mAb* laut Hersteller. *FACS*: *fluorescence-activated cell sorting*; *CD*: *Cluster of Differentiation*; *PE*: *Phycoerythrin*; *APC*: *Allophycocyanin*; *Cy*: *Cyanin*; *BV*: *Brilliant violet*; *KIR*: *Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor*

Zur Vorbereitung auf die intrazelluläre Färbung wurden zu gefärbten Probe 250 μ l Fixierlösung (BD Pharmingen, BD Biosciences, San Jose, CA, U.S.A.) hinzugegeben, die Zellen für 20 min lichtgeschützt bei 4 °C inkubiert und anschließend zweifach mit der zugehörigen Waschlösung gewaschen (Zentrifuge: 1320 U / min, 4 °C, Bremse aktiviert).

Das Waschmedium wurde abgegossen und die Zellen im Überstand resuspendiert. Jeder gefärbten Probe wurden jeweils 5 μ l der Intrazellulärfarbstoffe IFN- γ -Phycoerythrin-Cyanin 7 (IFN- γ -PE-Cy7) und TNF- α -Allophycocyanin-Cyanin 7 (TNF- α -APC-Cy7) *FACS-mAb* (Biolegend, San Diego, CA, U.S.A.) hinzugefügt. Es folgte die lichtgeschützte Inkubation für 30 min bei 4 °C, ein Waschvorgang mit der vorgesehenen Waschlösung und ein letzter Waschvorgang mit *PBS*.

Anschließend wurden die Proben umgehend durchflusszytometrisch analysiert. Die Messdaten wurden anschließend mit Hilfe der Kaluza Analysis Software Version 1.2 (Beckman Coulter, Brea, CA, U.S.A.) ausgewertet.

Auch für die Analysen der NK-Zell-Funktion und der Zytokinproduktion war die verfügbare Anzahl *MNCs* pro Patientenprobe durch das geringe Volumen der Blutproben limitiert. Aufgrund dessen wurden die *CD107a*-, TNF- α -, und IFN- γ -Assays an jeweils n = 29 Patienten- und n = 9 Kontrollproben durchgeführt.

2.7 Definition der NK-Zell-Populationen

Um die Aktivität der natürlichen Killerzellen gegeneinander vergleichen zu können, wurden sie entsprechend ihres Rezeptorexpressionsprofils in unterschiedliche NK-Zell-Populationen eingeteilt. Hierzu wurden die Zellen in der Analysesoftware auf einen Plot aufgetragen und die Populationen voneinander abgegrenzt (Abb. 8). Die betrachteten NK-Zell-Populationen umfassten:

1. Die NK-Zellen wurden anhand der Expressionsdichte des Membranständigen Markers *CD56* in *CD56^{dim}* und *CD56^{bright}* unterschieden.
2. Die NK-Zellen wurden anhand des Expressionsprofils der inhibitorischen Rezeptoren *NKG2A*, *KIR2DL1* und *KIR2DL2/3* unterschieden. Hierzu wurden die NK-Zellen identifiziert, die nur einen der drei genannten Rezeptoren auf ihrer Oberfläche trugen. Zusätzlich wurde die Gruppe der NK-Zellen identifiziert, die keinen der genannten Rezeptoren präsentierte. Der Übersicht halber wurden die Gruppen nach dem jeweils vorhandenen Rezeptor benannt:
 - a. $NKG2A^+$ ($NKG2A^+KIR2DL1^-KIR2DL2/3^-$)
 - b. $KIR2DL1^+$ ($NKG2A^-KIR2DL1^+KIR2DL2/3^-$)
 - c. und $KIR2DL2/3^+$ ($NKG2A^-KIR2DL1^-KIR2DL2/3^+$)
 - d. *triple negative* ($NKG2A^-KIR2DL1^-KIR2DL2/3^-$)

2.7 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde GraphPad Prism, Version 8 (San Diego, CA, U.S.A.) verwendet. Das Signifikanzniveau für sämtliche statistischen Tests wurde zweiseitig auf 5% festgesetzt ($P < 0.05$). P Werte wurden auf die dritte Dezimalstelle gerundet. Falls der ermittelte P Wert die Grenze 0.0005 unterschritt, erfolgte die Angabe als $P < 0.001$.

Mittelwerte und Standardabweichungen der Messparameter wurden für (I) die Gesamtkohorte, (II) für Patienten- und Kontrollkohorte, (III) für *CD56^{dim}* und *CD56^{bright}* in Patienten- und Kontrollkohorte (IV) für *KIR*-Genotypen, welche in ausreichender Frequenz ($n \geq 3$) vorlagen, und (V) für die NK-Zell-Populationen *triple negative*, $NKG2A^+$, $KIR2DL1^+$, $KIR2DL2/3^+$ jeweils in Patienten- und Kontrollkohorte bestimmt.

Interkohortenunterschiede kategorialer Variablen (beispielsweise der HLA-C-Typen in Patienten- und Kontrollkohorte) wurden hinsichtlich ihrer Verteilung auf die Kohorten mittels Chi Quadrat-Test nach Pearson überprüft. Die Unterschiede kontinuierlicher Variablen (beispielsweise spezifische Zytolyse der K562 in Patienten- und Kontrollkohorte) wurden mittels ungepaarter t-Tests auf statistische Signifikanz geprüft. Die Signifikanz der Unterschiede innerhalb derselben Kohorte (beispielsweise spezifische Zytolyse der Raji und K562-Zielzellen innerhalb der Patientenkohorte oder Vergleiche der NK-Zellpopulationen $CD56^{dim}$ und $CD56^{bright}$) wurde mittels gepaarter t-Tests ermittelt.

Vor den Auswertungen wurden die Rohdaten auf Ausreißer überprüft. Ausreißer, deren Messwerte ≥ 1.5 Standardabweichungen außerhalb der Bezugskohorte lagen, wurden aus der Analyse entfernt und anschließend gesondert betrachtet.

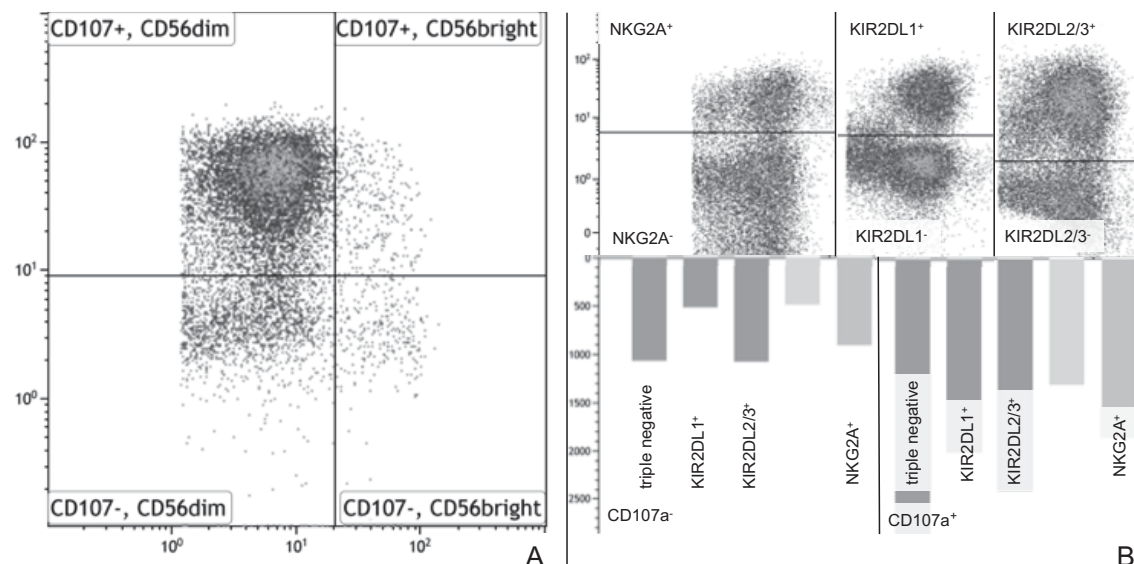


Abb. 8: Identifikation der NK-Zell-Populationen. **A:** $CD56^{dim/bright}$, $CD56^{dim}$ (linke Bildhälfte) wurden von $CD56^{bright}$ (rechte Bildhälfte) abgegrenzt. Zusätzlich zeigt die Darstellung die Unterteilung der $CD56$ -Populationen in $CD107a^+$ und $CD107a^-$. **B:** $NKG2A^+$, $KIR2DL1^+$, $KIR2DL2/3^+$ und *triple negative*. Die Plots in der oberen Bildhälfte zeigen die Aufteilung der Zellen in positiv (obere Plothälfte) und negativ gewertete Zellen (untere Plothälfte). Der untere Teil der Abbildung zeigt das zugehörige Säulendiagramm, das die absolute Anzahl der Zellen in der jeweiligen Population angibt. Die Zellen sind zusätzlich nach dem Aktivitätsmarker $CD107a$ stratifiziert (links: $CD107a^-$; rechts: $CD107a^+$). NK-Zelle: Natürliche Killerzelle; CD: Cluster of Differentiation; KIR: Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor

3 Ergebnisse

3.1 Kohortencharakteristika

Von 38 Patienten, die in die Studie eingebunden wurden, waren 23 männlich (60.5%) und 15 weiblich (39.5%) (Tabelle 9). Die häufigsten NHL in der Patientenkohorte waren *DLBCL* (n (%); 12 (31.6)) und Follikuläres Lymphom (9 (23.7%)). Auf Burkitt-Lymphom und Morbus Waldenström entfiel jeweils ein Fall (2.6%). Das mittlere Patientenalter lag bei 63.9 Jahren (\pm Standardabweichung; \pm 17.9).

Tabelle 9: Übersicht Kohortencharakteristika

Charakteristikum	Gesamt	Zytotoxizität	Funktion
Anzahl (n)*	47	21	36
Kontrollkohorte (n (%))	9 (19.1)	9 (42.9)	9 (25.0)
Patientenkohorte (n (%))*	38 (80.9)	12 (57.1)	27 (75.0)
männlich (n (%))	23 (60.5)	10 (83.3)	15 (55.6)
weiblich (n (%))	15 (39.5)	2 (16.7)	12 (44.4)
Alter (in Jahren, Mittelwert \pm Standardabweichung)	63.9 \pm 17.9	65.3 \pm 14.0	64.0 \pm 15.0
B-NHL-Typ			
Follikuläres Lymphom (n (%))	9 (23.7)	2 (16.7)	7 (58.3)
DLBCL (n (%))	12 (31.6)	4 (33.3)	11** (40.7)
Marginalzonenlymphom (n (%))	8 (21.1)	1 (8.3)	3** (11.1)
CLL (n (%))	7 (18.4)	4 (33.3)	5 (18.5)
Morbus Waldenström (n (%))	1 (2.6)	0	1 (3.7)
Burkitt-Lymphom (n (%))	1 (2.6)	1 (8.3)	1 (3.7)

Für kategoriale Variablen sind Anzahl (n) und der prozentuale Anteil an der zugrundeliegenden Kohorte angegeben. Für die kontinuierliche Variable 'Alter' sind Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Angaben für die Kohorten der jeweiligen Assays (Zytotoxizität: CFDA-SE; Funktion: *CD107a*, TNF- α , IFN- γ). *Nach Ausschluss dreier Patienten mit relevanten hämatologischen Vorerkrankungen (2x Morbus Hodgkin, 1x Akute lymphatische Leukämie); **Ein Patient war sowohl an einem Marginalzonenlymphom als auch an einem DLBCL erkrankt. *DLBCL*: *Diffuse Large B-Cell Lymphoma*; *CLL*: Chronisch lymphatische Leukämie; *CD*: *Cluster of Differentiation*; TNF- α : Tumornekrosefaktor α ; IFN- γ : Interferon- γ ; B-NHL-Typ: B-Zell Non-Hodgkin Lymphom-Typ; CFDA-SE: Carboxyfluoresceindiazetat-succinimidylester; CFSE: Carboxyfluorescein-succinimidylester;

Von den Patienten hatten $n = 4$ im Vorfeld der Studie eine Stammzelltransplantation erhalten, während $n = 32$ der Patienten bereits mit Rituximab therapiert worden waren. Keine Vortherapie und eine Vortherapie mit Obinutuzumab hatten jeweils $n = 5$ Patienten erhalten. Zu den eingebundenen Kontrollen ($n = 9$) lagen aufgrund datenschutzrechtlicher Bestimmungen keine weiterführenden Daten zu Geschlecht, Alter oder Vorerkrankungen vor.

3.2 Spezifische Zytolyse: CFDA-SE Assay

Über den CFDA-SE Assay wurde gemessen, wie viele Zielzellen in einer definierten Zeitspanne von 6 Stunden die Apoptose durchliefen (Abb. 9). Hierzu wurde zunächst überprüft, wie viele Zielzellen in dem Zeitraum einer spontanen Zytolyse unterlagen. Die spontane Lyse der Raji-Zellen betrug durchschnittlich 2.83% ($\pm 1.17\%$), während die spontane Lyse der K562-Zellen bei 3.65% ($\pm 1.68\%$) lag. Die induzierte Zytolyse der Raji-Zellen ohne Anwesenheit eines therapeutischen Antikörpers lag gemittelt bei 5.02% ($\pm 1.12\%$). Der Unterschied zwischen spontaner Lyse der Raji-Zellen und induzierter Lyse in Abwesenheit therapeutischer *mAb* war signifikant ($P = 0.007$). Von den Ergebnissen der weiteren Messungen wurde jeweils die zugrunde liegende spontane Zytolyse subtrahiert, um die Messungen auf den Effekt des aktivierenden Stimulus (K562 respektive therapeutische Antikörper) zu reduzieren.

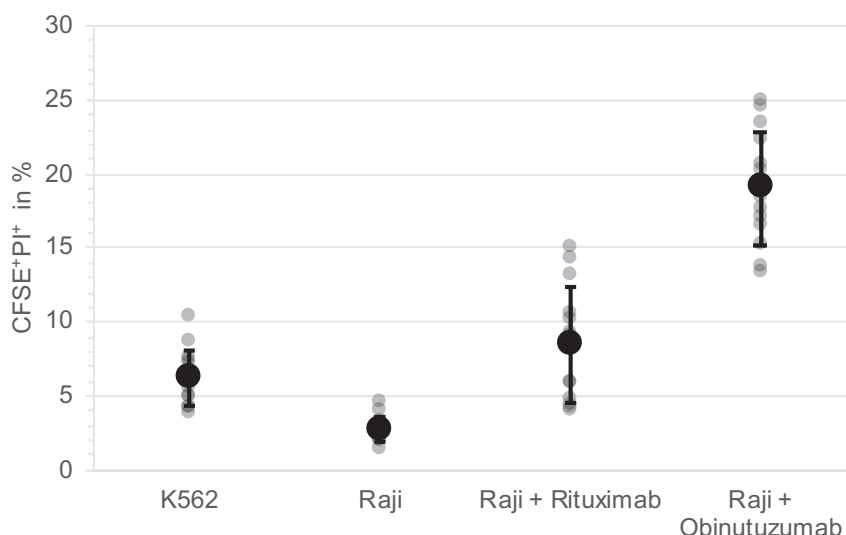


Abb. 9: Vergleich der induzierten Zytolyse über sämtliche Proben gegen K562, unmarkierte Raji, Raji + Rituximab und Raji + Obinutuzumab. $n = 21$; Mittelwerte (Punkte), Standardabweichungen (Fehlerbalken) und einzelne Messwerte (graue Punkte) der Anteile CFSE+PI+ Zielzellen sind eingezeichnet. CFSE: Carboxyfluorescein-succinimidylester; PI; Propidiumiodid

Über sämtliche Proben hinweg betrug die mittlere induzierte Zytolyse der K562-Zellreihe 6.18% ($\pm 1.91\%$), der Rituximab-markierten Raji-Zellen 8.47% ($\pm 3.99\%$) und der Obinutuzumab-markierten Zellen 19.03% ($\pm 3.96\%$) (Abb. 10).

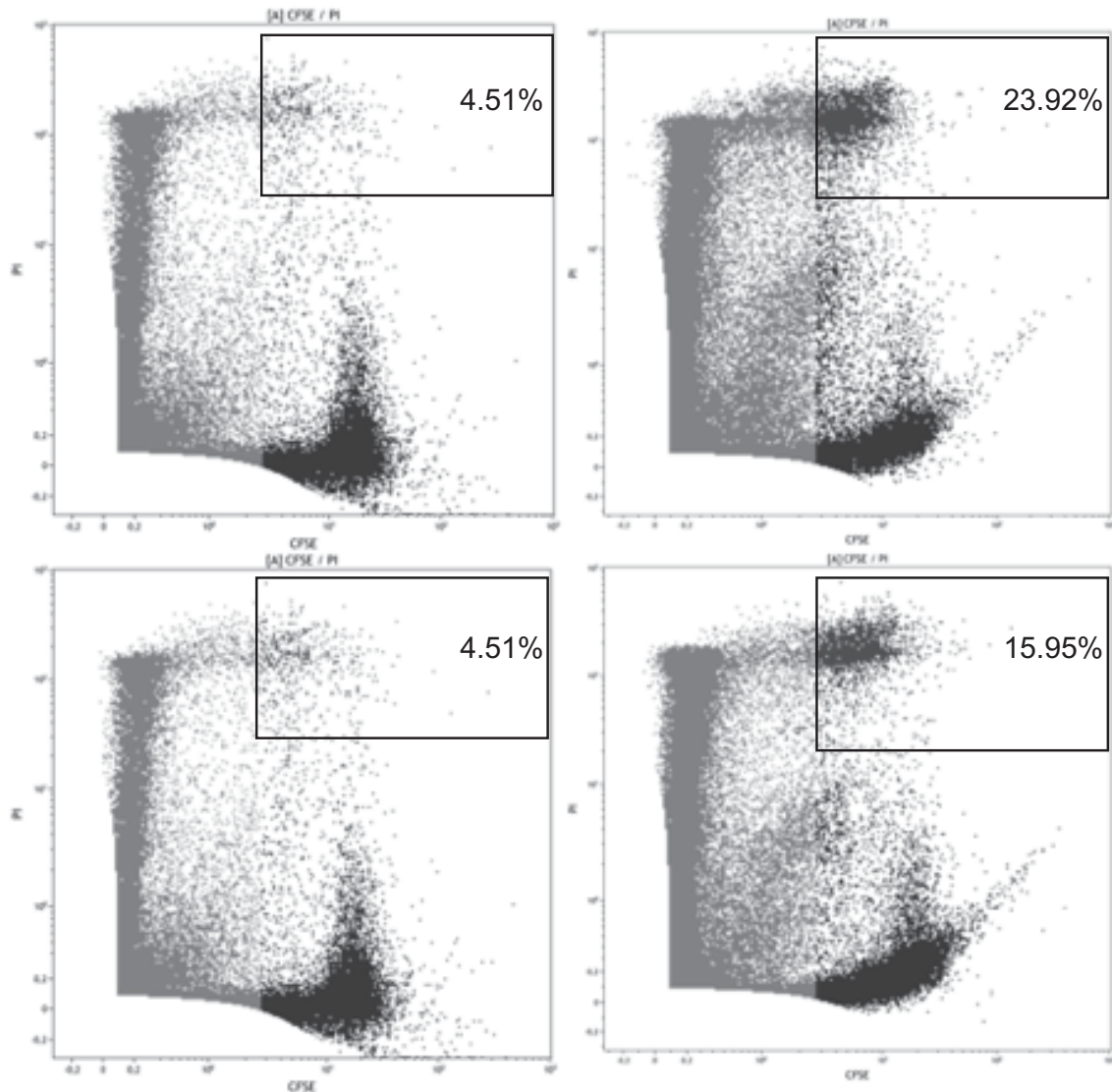


Abb. 10: Messung der spezifischen Zytolyse mittels CFDA-SE-Assay. X-Achsen: Relative Emissionsstärke der CFSE-spezifischen Wellenlänge (logarithmisch). Y-Achsen: Relative Emissionsstärke der PI-spezifischen Wellenlänge (logarithmisch). Links oben und unten: Messung *MNCs* gegen Raji. Rechts oben: Messung *MNCs* gegen Obinutuzumab-markierte Raji. Rechts unten: Messung *MNCs* gegen Rituximab-markierte Raji. Die CFSE⁺-Population ist schwarz dargestellt, die CFSE⁻-Population grau. CFSE⁺PI⁺ sind umrahmt. CFDA-SE: Carboxyfluoresceindiazetat-succinimidylester; CFSE: Carboxyfluorescein-succinimidylester; PI: Propidiumiodid; *MNCs*: *Mononuclear cells*

Der Unterschied zwischen den Gruppen Raji und Raji + Rituximab war signifikant ($P < 0.001$). Auch der Anteil der lysierten Obinutuzumab-markierten Raji war signifikant höher als der Anteil der lysierten, unmarkierten Raji ($P < 0.001$). Darüber

hinaus war die induzierte Lyse der Obinutuzumab-markierten Raji signifikant höher als der Rituximab-markierten Raji ($P < 0.001$). Die Positivkontrolle K562 wurde zu einem signifikant höheren Anteil lysiert als Raji, während mit Obinutuzumab oder Rituximab markierte Raji-Zellen zu einem signifikant größeren Anteil lysiert wurden als K562 (K562 *versus* (vs.) Raji + Obinutuzumab: $P < 0.001$; K562 vs. Raji + Rituximab: $P = 0.034$).

Die spezifische Lyse der Raji + Rituximab durch Kontrollproben ($n = 9$) unterschied sich signifikant von der durch Patientenproben ($n = 12$): Während in der Patientenkohorte 6.00% ($\pm 2.37\%$) der Zielzellen lysiert wurden, betrug der Wert in der Kontrollkohorte 13.06% ($\pm 2.75\%$) ($P < 0.001$) (Abb. 11). Der Vergleich der Obinutuzumab-behandelten Proben ergab hingegen keinen signifikanten Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen (Patienten: $18.85\% \pm 4.25\%$; Kontrollen: $21.06\% \pm 5.49\%$) ($P = 0.410$). Auch die Ergebnisse der beiden Kohorten gegen K562 unterschieden sich nicht signifikant ($P = 0.214$).

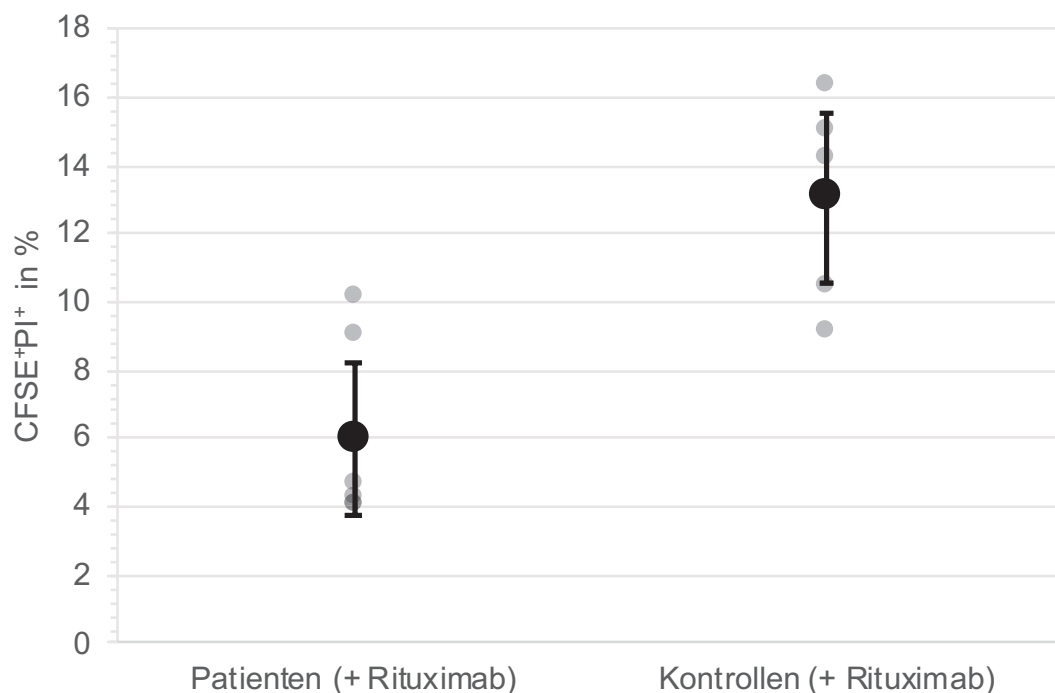


Abb. 11: Vergleich des Rituximab-induzierten Zelltods zwischen Patienten- und Kontrollkohorte. $n_{\text{Patientenkohorte}} = 12$; $n_{\text{Kontrollkohorte}} = 9$; Die Zielzellen sind vor Versuchsbeginn mit Rituximab inkubiert worden. Mittelwerte (Punkte), Standardabweichungen (Fehlerbalken) und einzelne Messwerte (graue Punkte) der Anteile CFSE⁺PI⁺ Zielzellen sind eingezeichnet. $P \leq 0.001$. CFSE: Carboxyfluorescein-succinimidylester; PI; Propidiumiodid

3.3 Aktivität und Zytokinproduktion der Natürlichen Killerzellen: CD107a-, TNF- α - und IFN- γ -Assays

3.3.1 Aktivität der Natürlichen Killerzellen in Gesamt-, Patienten- und Kontrollkohorte (CD107a)

Aufgrund überlagernder Wellenlängen in der durchflusszytometrischen Analyse waren 15 der 27 analysierten Patientenproben nicht hinsichtlich ihrer *CD107a*-Werte analysierbar. Die spontane Degranulierung der Effektorzellen über die restlichen Proben hinweg (n = 21), betrug 10.36% (\pm 2.01%). Die Werte der anschließend durchgeführten Messungen wurden auf den Wert der spontanen Degranulierung genullt, um die Messung auf die spezifische Aktivität, also den Effekt des aktivierenden Stimulus, zu reduzieren. Bei der Betrachtung der gesamten Kohorte wurden drei Ausreißer identifiziert, deren Aktivitätswerte sich auch in Versuchen gegen antikörpermarkierte Raji auf einem niedrigen Niveau bewegten (Abb. 12). Alle drei Proben gehörten der Patientenkohorte an. Die Aktivitätswerte der Ausreißer lagen gegenüber antikörpermarkierten Raji 1.9 bis 2.5 Standardabweichungen unterhalb des Mittelwerts. Darüber hinaus befanden sich die Messwerte gegenüber der Positivkontrolle (K562) für alle drei Proben außerhalb 1.5 Standardabweichungen gegenüber dem Mittelwert. Die Proben wurden von den weiteren Analysen der Kohorten ausgeschlossen und anschließend separat betrachtet.

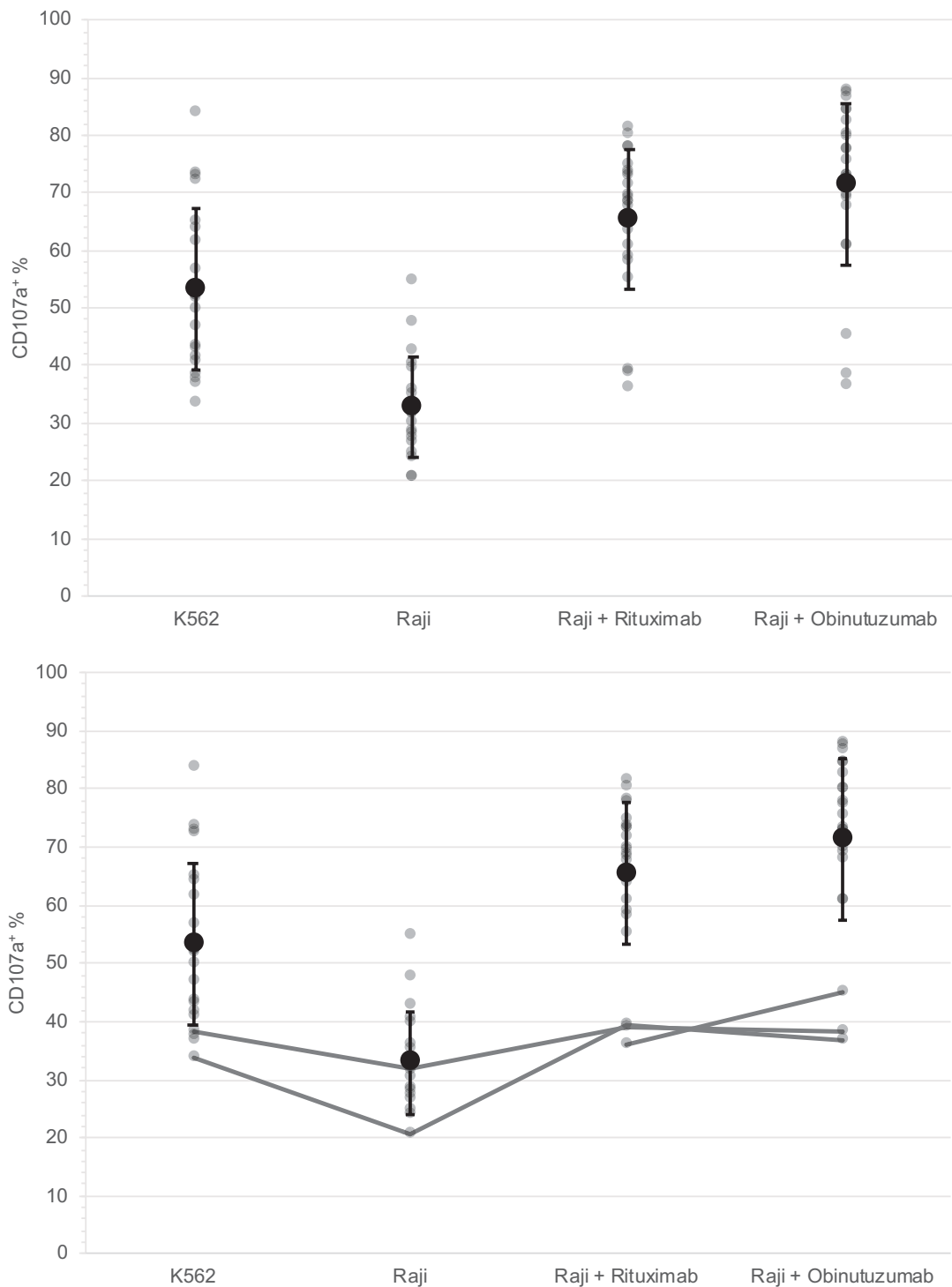


Abb. 12: Ergebnisse des *CD107a*-Assays: Identifikation der Ausreißer. n = 21; Mittelwert (schwarzer Kreis), Standardabweichung (schwarze Fehlerbalken) und einzelne Messwerte (graue Punkte) der spezifischen Aktivität gegen Zielzellen (X-Achse). Oben: Bei der Betrachtung der mit Rituximab und Obinutuzumab versetzten Proben fallen drei Ausreißer mit geringer prozentualer Aktivierung, gemessen über *CD107a*⁺, auf. Unten: Die Messwerte der Ausreißer gegen unterschiedliche Ziele sind mit Linien verbunden. Aufgrund der geringen Zellzahl liegt für einen der Ausreißer kein Messwert gegen Raji oder K562 vor. *CD*: Cluster of Differentiation

Über die Gesamtkohorte hinweg wurden gegen antikörpermarkierte Raji signifikant höhere Anteile *CD107a*⁺ NK-Zellen gefunden als gegen Raji ohne Antikörpermarkierung (Mittelwert ± Standardabweichung; Raji: 32.84 ± 9.03; Raji + Rituximab: 66.45 ± 11.96; Raji + Obinutuzumab: 72.47 ± 14.42) (jeweils $P \leq 0.001$) (Abb. 13). Auch der Unterschied zwischen Raji + Rituximab und Raji + Obinutuzumab war signifikant ($P < 0.001$). Gegen K562 zeigte die Gesamtkohorte eine signifikant größere Aktivität im Vergleich zu Raji (K562: 53.58 ± 14.84) ($P < 0.001$).

Sämtliche Vergleiche der über *CD107a* gemessenen Aktivität zwischen Kontroll- (n = 9) und Patientenkohorte (n = 12) ergaben signifikante Unterschiede, wobei die Patientenproben stets eine niedrigere prozentuale Aktivität aufwiesen, als die Kontrollproben ($P \leq 0.011$) (Tabelle 10). Während der niedrigste gemessene Aktivitätswert gegen Raji in der Patientengruppe mit 28.10% (± 5.98%) ermittelt wurde, wurde der höchste Aktivitätswert in der Kontrollkohorte gegen Obinutuzumab-markierte Raji gemessen (80.65% ± 7.01). In beiden Kohorten war die niedrigste Aktivität gegen unmarkierte Raji zu finden, gefolgt von K562, Raji + Rituximab und schließlich Raji + Obinutuzumab.

Tabelle 10: Kohortenspezifische NK-Zell-Aktivität (*CD107a*⁺)

Zielzelle	Patientenkohorte (%) [*]	Kontrollkohorte (%) [*]	P ^{**}
K562	44.10 ± 7.22	65.38 ± 12.14	< 0.001
Raji	28.10 ± 5.98	38.10 ± 9.16	0.011
Raji + Rit	60.02 ± 12.56	74.37 ± 5.69	0.004
Raji + Obi	65.83 ± 14.76	80.65 ± 7.01	0.010

^{*}Mittelwert ± Standardabweichung; ^{**}t-Test für ungepaarte Stichproben; n_{Patientenkohorte} = 12; n_{Kontrollkohorte} = 9; NK-Zelle: Natürliche Killerzelle; vs.: *versus*; Rit: Rituximab; Obi: Obinutuzumab; CD: *Cluster of Differentiation*

Sowohl in der Patientenkohorte als auch in der Kontrollkohorte war die gemessene Aktivität gegen antikörpermarkierte Raji signifikant größer als gegen unmarkierte Raji ($P < 0.001$). Auch die Aktivität gegenüber der Positivkontrolle K562 war signifikant größer als gegenüber Raji ($P < 0.001$). Darüber hinaus wurden die NK-Zellen durch Raji + Obinutuzumab signifikant stärker aktiviert als durch Raji + Rituximab ($P < 0.001$).

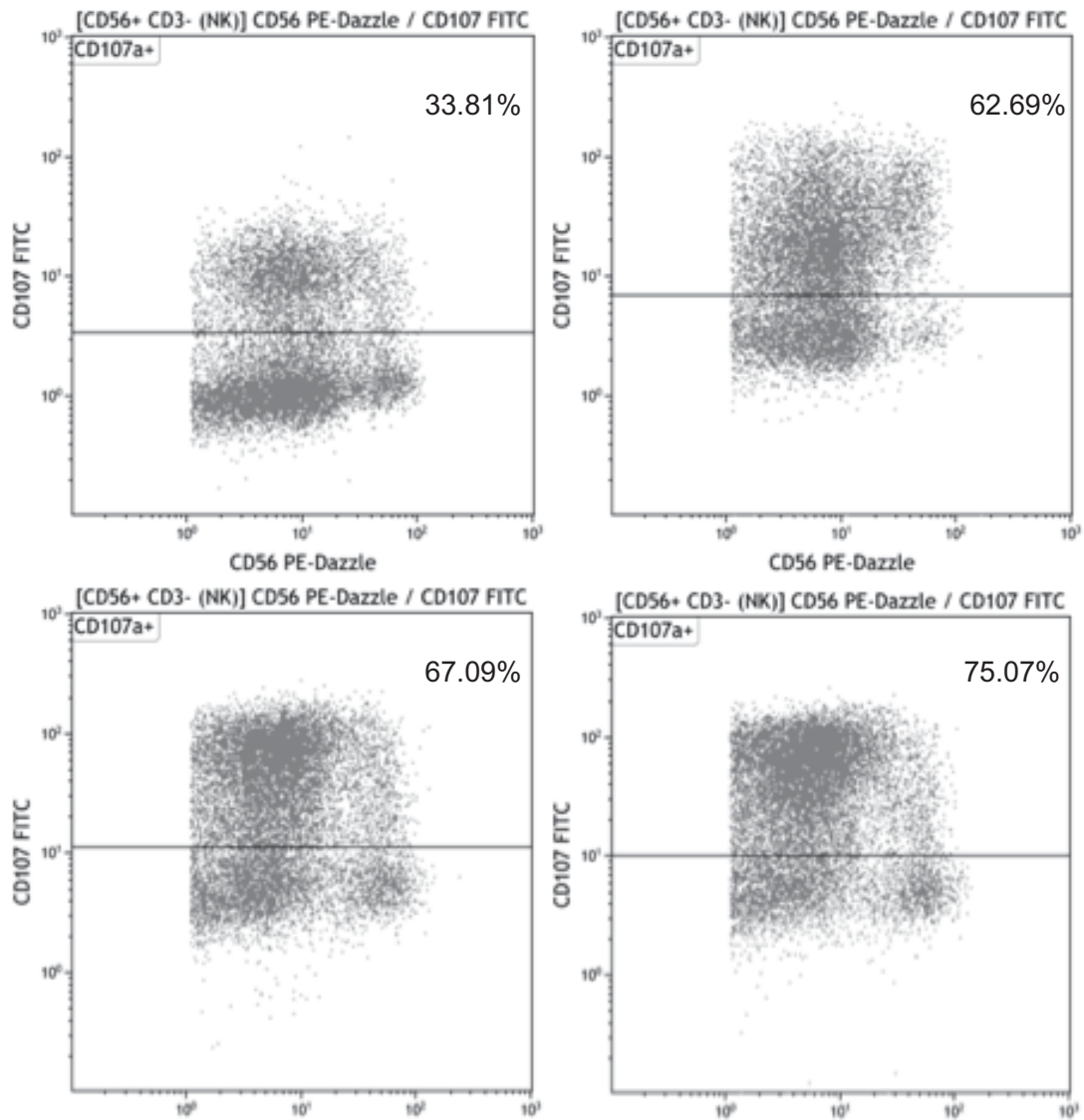


Abb. 13: Messung der NK-Zell-Aktivität über den Oberflächenmarker *CD107a*. X-Achsen: Relative Emissionsstärke der FITC-spezifischen Wellenlänge (logarithmisch). Y-Achsen: Relative Emissionsstärke der PE-Dazzle-spezifischen Wellenlänge (logarithmisch). Die angegebenen Prozentwerte geben den als *CD107a*⁺ gemessenen NK-Zell-Anteil wieder. Links oben: NK-Zellen gegen Raji; links unten: NK-Zellen gegen K562; rechts oben: NK-Zellen gegen Raji + Rituximab; rechts unten: NK-Zellen gegen Raji + Obinutuzumab. NK-Zelle: Natürliche Killerzelle; *CD*: Cluster of Differentiation; FITC: Fluorescein-isothiocyanat; PE: Phycoerythrin

3.3.2 Zytokinproduktion der Natürlichen Killerzellen in Gesamt-, Patienten- und Kontrollkohorte (TNF- α und IFN- γ)

Der Anteil der spontanen Zytokinproduktion betrug für TNF- α ⁺ 0.88% (\pm 0.29%) und für IFN- γ ⁺ 5.33% (\pm 2.12%). Die jeweiligen Basiswerte wurden von den

anschließenden Messungen subtrahiert, um die Messwerte auf die spezifische Zytokinproduktion zu reduzieren.

Über die Gesamtkohorte hinweg zeigte sich eine signifikante Erhöhung der TNF- α Messwerte in Gegenwart antikörpermarkierter Raji, verglichen zu unmarkierten Raji (Raji: 11.76 ± 7.26 ; Raji + Rituximab: 29.54 ± 14.65 ; Raji + Obinutuzumab: 34.25 ± 15.94) (jeweils $P < 0.001$). Vergleichbar zum *CD107a*-Assay zeigten die NK-Zellen einen signifikant größeren Anteil TNF- α^+ Zellen gegen K562, als gegen Raji (K562: 19.83 ± 15.75) ($P < 0.001$). Die Messwerte in Raji + Obinutuzumab waren, ebenfalls vergleichbar zu den Ergebnissen des *CD107a*-Assays, signifikant größer als in Raji + Rituximab ($P = 0.004$). Auch der Anteil IFN- γ^+ NK-Zellen gegen antikörpermarkierte Raji war signifikant höher als gegen unmarkierte Raji (Raji: 19.31 ± 12.48 ; Raji + Rituximab: 52.61 ± 23.87 ; Raji + Obinutuzumab: 53.98 ± 23.73) (jeweils $P < 0.001$). Die IFN- γ^+ Messwerte gegen K562 übertrafen die gegen Raji signifikant (K562: 30.07 ± 20.11) ($P < 0.001$). Zwischen Raji + Rituximab und Raji + Obinutuzumab waren allerdings keine signifikanten Unterschiede festzustellen ($P = 0.700$).

Die spezifische Zytokinproduktion der Kontrollkohorte lag signifikant höher als in der Patientenkohorte (TNF- α : $P < 0.004$; IFN- γ : $P < 0.001$) (Tabelle 11). Ähnlich zu den Ergebnissen des *CD107a*-Assays wurden auch bei den TNF- α - und IFN- γ -Assays die niedrigsten Messwerte auf Patientenseite gegen unmarkierte Raji gefunden, während die höchsten Messwerte in den NK-Zellen der Kontrollkohorte gegen Raji + Obinutuzumab ermittelt wurden (in %; TNF- α , Patientenkohorte, vs. Raji: 7.31 ± 4.19 ; TNF- α Kontrollkohorte, vs. Raji + Obinutuzumab: 44.66 ± 10.88 ; IFN γ , Patientenkohorte, vs. Raji: 10.90 ± 7.08 ; IFN γ , Kontrollkohorte, vs. Raji + Obinutuzumab: $72.76\% \pm 8.26\%$). Darüber hinaus war auch der Anstieg der Messwerte von NK vs. Raji über NK vs. K562, NK vs. Raji + Rituximab und NK vs. Raji + Obinutuzumab gleich der Reihenfolge im *CD107a*-Assay (Abb. 14).

Tabelle 11: Kohortenspezifische NK-Zell-Zytokinproduktion (TNF- α^+ und IFN- γ^+)

Assay	Zielzelle	Patientenkohorte	Kontrollkohorte	P**
		(%)*	(%)*	
TNF- α	K562	9.23 \pm 4.16	31.74 \pm 15.41	< 0.001
	Raji	7.31 \pm 4.19	17.17 \pm 6.31	< 0.001
	Raji + Rit	25.95 \pm 13.84	39.81 \pm 8.77	0.003
	Raji + Obi	31.02 \pm 12.74	44.66 \pm 10.88	0.004
IFN- γ	K562	15.77 \pm 8.39	47.68 \pm 13.38	< 0.001
	Raji	10.90 \pm 7.08	29.05 \pm 10.13	< 0.001
	Raji + Rit	43.80 \pm 19.68	70.75 \pm 8.57	< 0.001
	Raji + Obi	43.08 \pm 16.20	72.76 \pm 8.26	< 0.001

*Mittelwert \pm Standardabweichung; **t-Test für ungepaarte Stichproben; $n_{\text{Patientenkohorte}} = 12$; $n_{\text{Kontrollkohorte}} = 9$; TNF- α : Tumornekrosefaktor α ; IFN- γ : Interferon- γ ; NK-Zelle: Natürliche Killerzelle; Rit: Rituximab; Obi: Obinutuzumab

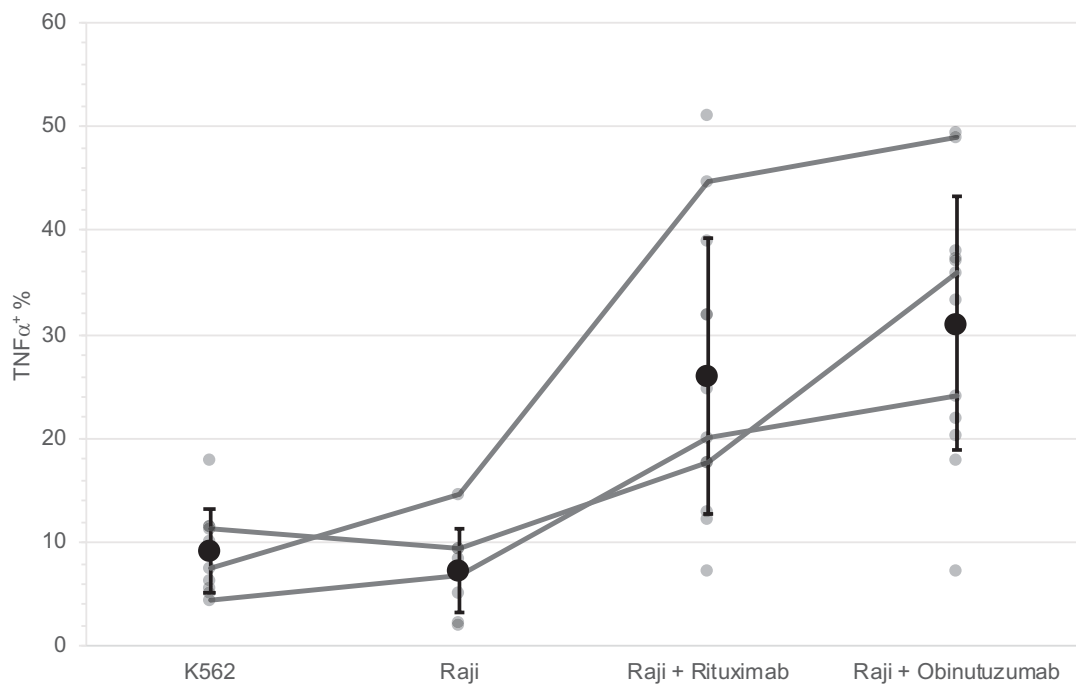


Abb. 14: Anteile TNF- α^+ NK-Zellen in der Patientenkohorte. Die TNF- α^+ -Messwerte dreier exemplarisch ausgesuchter Proben sind mittels Linien verbunden. Die Abbildung zeigt die Steigerung der Messwerte von Raji über K562 zu Raji + Rituximab und Raji + Obinutuzumab. Mittelwert (Punkt), Standardabweichung (Fehlerbalken) und einzelne Messwerte ($n = 12$; graue Punkte) sind eingezeichnet. TNF- α : Tumornekrosefaktor α ; NK-Zelle: Natürliche Killerzelle; Rit: Rituximab; Obi: Obinutuzumab

Während antikörpermarkierte Raji im Vergleich zu unmarkierten Raji durchweg zu signifikant besseren Ergebnissen sowohl in der TNF- α - als auch für IFN- γ -Produktion führten, ergaben die Tests der beiden *mAb* gegeneinander gemischte Ergebnisse (Tabelle 12): In Patienten war der Anteil TNF- α^+ NK-Zellen nach Stimulation durch Obinutuzumab-markierte Raji im Vergleich zu Rituximab signifikant höher, in Kontrollen jedoch nicht ($P_{\text{Patientenkohorte}} = 0.007$; $P_{\text{Kontrollkohorte}} = 0.158$). Im IFN- γ -Assay wurden weder in Patienten, noch in Kontrollen signifikante Unterschiede zwischen den Ergebnissen gegen Raji + Rituximab und Raji + Obinutuzumab gefunden ($P \geq 0.430$).

Tabelle 12: Vergleich der spezifischen NK-Zell-Zytokinproduktion (TNF- α^+ und IFN- γ^+) gegen unterschiedliche Zielzellen

Assay	Verglichene Zielzellen	$P_{\text{Patientenkohorte}}^*$	$P_{\text{Kontrollkohorte}}^*$
TNF- α	Raji vs. Raji + Rit	< 0.001	< 0.001
	Raji vs. Raji + Obi	0.002	< 0.001
	Raji + Rit vs. Raji + Obi	0.007	0.158
IFN- γ	Raji vs. Raji + Rit	< 0.001	< 0.001
	Raji vs. Raji + Obi	< 0.001	< 0.001
	Raji + Rit vs. Raji + Obi	0.924	0.430

*t-Test für gepaarte Stichproben; $n_{\text{Patientenkohorte}} = 12$; $n_{\text{Kontrollkohorte}} = 9$; TNF- α : Tumornekrosefaktor α ; IFN- γ : Interferon- γ ; NK-Zelle: Natürliche Killerzelle; Rit: Rituximab; Obi: Obinutuzumab; vs.: *versus*

3.3.3 Aktivität der Natürlichen Killerzell-Populationen $CD56^{dim}$ und $CD56^{bright}$ ($CD107a$)

Bei der Erhebung der Anteile der $CD56^{dim}$ und $CD56^{bright}$ in der Gesamtkohorte wurde ein Ausreißer identifiziert, bei dem der Anteil der $CD56^{dim}$ 32.55% betrug und somit unterhalb der dritten Standardabweichung gegenüber der Gesamtkohorte lag ($90.41\% \pm 8.03\%$). Die Probe stammte aus der Patientenkohorte und wurde von den angeschlossenen Analysen ausgeschlossen und anschließend eigenständig betrachtet.

Der mittlere Anteil der $CD56^{dim}$ in der Kontrollgruppe war mit 88.14% ($\pm 9.74\%$) zwar niedriger als in der Patientenkohorte ($92.46\% \pm 6.49\%$), der Unterschied war jedoch nicht signifikant ($P = 0.235$). Die über $CD107a$ gemessene Aktivität der $CD56^{dim}$ gegen antikörpermarkierte Raji war in der Gesamtkohorte signifikant größer als gegen unmarkierte Raji (Raji: 29.92 ± 8.43 ; Raji + Rituximab: 65.57 ± 7.55 ;

Raji + Obinutuzumab: 74.48 ± 7.61) (jeweils $P < 0.001$). Auch der Unterschied zwischen Raji + Rituximab und Raji + Obinutuzumab war signifikant ($P < 0.001$).

Auch die $CD56^{bright}$ -Populationen der Gesamtkohorte zeigten signifikant höhere Aktivitätswerte gegen antikörpermarkierte Raji verglichen mit unmarkierten Raji (in %; Raji: 41.61 ± 12.32 ; Raji + Rituximab: 60.78 ± 9.97 ; Raji + Obinutuzumab: 63.41 ± 10.13) ($P < 0.001$). Die Aktivität dieser Population war ähnlich zu den $CD56^{dim}$ gegen Raji + Obinutuzumab am größten, allerdings war der Unterschied zu Raji + Rituximab nicht signifikant ($P = 0.055$).

Der Anteil der $CD107a^+ CD56^{dim}$ war in der Kontrollkohorte über alle Versuche hinweg größer als in der Patientenkohorte (jeweils $P \leq 0.044$) (Tabelle 13). Im Kontrast dazu standen die Ergebnisse der $CD56^{bright}$: Bei ihnen war kein signifikanter Aktivitätsunterschied zwischen Patienten- und Kontrollkohorte beobachtbar (jeweils $P \geq 0.098$), sondern gegen Obinutuzumab-markierte Raji-Zellen sogar eine größere Aktivität in den Patienten- $CD56^{bright}$ festzustellen (Patienten: 65.22 ± 8.87 ; Kontrollen: 61.39 ± 11.56). Der Unterschied war jedoch nicht signifikant ($P = 0.427$).

Tabelle 13: Kohortenspezifische NK-Zell-Aktivität ($CD107a^+$), nach $CD56$ -Population

Population	Zielzelle	Patientenkohorte (%)*	Kontrollkohorte (%)*	P**
$CD56^{dim}$	Raji	24.69 ± 3.61	33.41 ± 9.04	0.044
	Raji + Rit	62.33 ± 7.54	69.04 ± 4.21	0.031
	Raji + Obi	69.13 ± 5.66	78.91 ± 5.43	0.001
$CD56^{bright}$	Raji	35.15 ± 6.20	45.91 ± 13.76	0.098
	Raji + Rit	60.91 ± 8.51	60.64 ± 11.92	0.955
	Raji + Obi	65.22 ± 8.87	61.39 ± 11.56	0.427

*Mittelwert \pm Standardabweichung; **t-Test für ungepaarte Stichproben; $n_{\text{Patientenkohorte}} = 12$; $n_{\text{Kontrollkohorte}} = 9$; NK-Zelle: Natürliche Killerzelle; CD: Cluster of Differentiation; Rit: Rituximab; Obi: Obinutuzumab; vs.: versus

Der Anteil $CD107a^+ CD56^{dim}$ war sowohl in der Patientenkohorte als auch in der Kontrollkohorte gegen Obinutuzumab-markierte Raji signifikant größer als gegen Raji + Rituximab (jeweils $P < 0.001$) (Tabelle 14). Im Gegensatz dazu unterschied sich der Anteil der $CD107a^+ CD56^{bright}$ gegen Rituximab-markierte Raji nicht signifikant von dem gegen Obinutuzumab-markierte Raji ($P_{\text{Patientenkohorte}} = 0.063$; $P_{\text{Kontrollkohorte}} = 0.588$). Verglichen mit den Messwerten gegen die unmarkierten Raji zeigten sich gegen

antikörpermarkierte Raji signifikant größere Anteile $CD107a^+$ NK-Zellen, sowohl in der Patienten-, als auch in der Kontrollkohorte (jeweils $P < 0.001$).

Tabelle 14: Vergleich der spezifischen NK-Zell-Aktivität ($CD107a^+$) gegen unterschiedliche Zielzellen, nach $CD56$ -Population

Population	Verglichene Zielzellen	$P_{\text{Patientenkohorte}}^*$	$P_{\text{Kontrollkohorte}}^*$
$CD56^{dim}$	Raji vs. Raji + Rit	< 0.001	< 0.001
	Raji vs. Raji + Obi	< 0.001	< 0.001
	Raji + Rit vs. Raji + Obi	< 0.001	< 0.001
$CD56^{bright}$	Raji vs. Raji + Rit	< 0.001	0.001
	Raji vs. Raji + Obi	< 0.001	0.001
	Raji + Rit vs. Raji + Obi	0.063	0.588

*t-Test für gepaarte Stichproben; $n_{\text{Patientenkohorte}} = 12$; $n_{\text{Kontrollkohorte}} = 9$; NK-Zelle: Natürliche Killerzelle; CD: Cluster of Differentiation; Rit: Rituximab; Obi: Obinutuzumab; vs.: versus

Der Vergleich der $CD56$ -Populationen zeigte basierend auf der Gesamtkohorte für $CD56^{bright}$ gegen unmarkierte Raji signifikant größere Anteile $CD107a^+$ Zellen als in $CD56^{dim}$ (Tabelle 15). Während gegen Raji + Rituximab kein signifikanter Unterschied zwischen den Zellpopulationen bestand ($P = 0.110$), kehrte sich das Verhältnis gegen Raji + Obinutuzumab um ($P = 0.002$). Auch in der Patientenkohorte überstieg die Aktivität der $CD56^{dim}$ die der $CD56^{bright}$ gegen antikörpermarkierte Ziele, die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant (Raji + Rituximab: $P = 0.660$; Raji + Obinutuzumab: $P = 0.163$). In den Kontrollproben lag die Aktivität der $CD56^{dim}$ gegen Raji + Obinutuzumab signifikant über derer der $CD56^{bright}$ ($P = 0.003$).

Tabelle 15: Vergleich der spezifischen Aktivität ($CD107a^+$) in $CD56^{dim}$ und $CD56^{bright}$

Zielzellen	Gesamtkohorte	Patientenkohorte	Kontrollkohorte
Raji	0.001	0.002	0.034
Raji + Rit	0.110	0.660	0.112
Raji + Obi	0.002	0.163	0.003

*t-Test für gepaarte Stichproben ($CD56^{dim}$ vs. $CD56^{bright}$); $n_{\text{Gesamtkohorte}} = 21$; $n_{\text{Patientenkohorte}} = 12$; $n_{\text{Kontrollkohorte}} = 9$; CD: Cluster of Differentiation; Rit: Rituximab; Obi: Obinutuzumab; vs.: versus

3.3.4 Zytokinproduktion der Natürlichen Killerzell-Populationen $CD56^{dim}$ und $CD56^{bright}$ (TNF- α und IFN- γ)

In der Gesamtkohorte war der Anteil der TNF- α^+ $CD56^{dim}$ gegen antikörpermarkierte Raji signifikant größer als gegen unmarkierte Raji, und gegen Raji + Obinutuzumab größer als gegen Raji + Rituximab (Raji: 11.33 ± 6.80 ; Raji + Rituximab: 32.11 ± 13.13 ; Raji + Obinutuzumab: 38.36 ± 12.25) (jeweils $P < 0.001$).

Auch für IFN- γ^+ waren die Messwerte in $CD56^{dim}$ gegen Raji + Obinutuzumab signifikant größer als gegen Raji + Rituximab, und gegen Raji + Rituximab signifikant größer als gegen unmarkierte Raji (Raji: 20.49 ± 12.35 ; Raji + Rituximab: 57.21 ± 15.17 ; Raji + Obinutuzumab: 61.99 ± 16.54) (jeweils $P < 0.003$).

Die TNF- α -Werte der $CD56^{bright}$ lagen in der Gesamtkohorte gegen antikörpermarkierte Raji signifikant über denen gegen unmarkierte (Raji: 17.12 ± 8.54 ; Raji + Rituximab: 25.86 ± 7.38 ; Raji + Obinutuzumab: 25.16 ± 6.98) (jeweils $P < 0.001$). Der Anteil TNF- α^+ unterschied sich jedoch nicht signifikant zwischen den Antikörpern ($P = 0.256$).

Auch hier verhielten sich die Ergebnisse des IFN- γ -Assays für $CD56^{bright}$ wie die des TNF- α -Assays (Raji: 31.38 ± 16.76 ; Raji + Rituximab: 44.61 ± 12.46 ; Raji + Obinutuzumab: 45.62 ± 12.48) (für Raji vs. Raji + Rituximab und Raji vs. Raji + Obinutuzumab jeweils $P < 0.001$; für Raji + Rituximab vs. Raji + Obinutuzumab $P = 0.547$).

Die Ergebnisse der TNF- α - und IFN- γ -Assays in Patienten- und Kontrollkohorte, stratifiziert nach $CD56$ -Populationszugehörigkeit, sind in Tabelle 16 dargestellt. Signifikante Kohortenunterschiede in TNF- α - und IFN- γ -Messwerten für $CD56^{dim}$ wurden gegen unmarkierte Raji und gegen Obinutuzumab-markierte Raji gefunden (jeweils $P \leq 0.031$). Gegen Raji + Rituximab war der Kohortenunterschied für die TNF- α -Messwerte auf der Grenze zur Signifikanz, während er für IFN- γ signifikant war ($P_{\text{TNF-}\alpha} = 0.050$; $P_{\text{IFN-}\gamma} < 0.001$).

Tabelle 16: Kohortenspezifische NK-Zell-Zytokinproduktion (TNF- α^+ und IFN- γ^+), nach CD56-Population

Assay	Population	Zielzelle	Pat (%)*	Kont (%)*	P**
TNF- α	<i>CD56^{dim}</i>	Raji	6.84 \pm 4.76	14.32 \pm 6.45	0.031
		Raji + Rit	25.74 \pm 13.65	37.51 \pm 10.04	0.050
		Raji + Obi	30.74 \pm 10.64	44.33 \pm 9.21	0.009
	<i>CD56^{bright}</i>	Raji	12.45 \pm 7.79	20.23 \pm 7.90	0.083
		Raji + Rit	21.79 \pm 7.51	25.63 \pm 7.55	0.282
		Raji + Obi	23.73 \pm 7.59	26.76 \pm 6.28	0.360
IFN- γ	<i>CD56^{dim}</i>	Raji	10.86 \pm 6.37	26.90 \pm 11.21	0.008
		Raji + Rit	43.36 \pm 14.57	66.00 \pm 6.30	< 0.001
		Raji + Obi	47.77 \pm 12.27	71.16 \pm 10.81	< 0.001
	<i>CD56^{bright}</i>	Raji	18.20 \pm 9.42	40.16 \pm 14.80	0.007
		Raji + Rit	35.83 \pm 9.96	51.07 \pm 11.12	0.006
		Raji + Obi	36.40 \pm 9.48	52.17 \pm 9.35	0.002

*Mittelwert \pm Standardabweichung; **t-Test für ungepaarte Stichproben; Pat: Patientenkohorte (n = 12); Kont: Kontrollkohorte (n = 9); NK-Zelle: Natürliche Killerzelle; TNF- α : Tumornekrosefaktor α ; IFN- γ : Interferon- γ ; CD: Cluster of Differentiation; Rit: Rituximab; Obi: Obinutuzumab

Für *CD56^{bright}* wurden im TNF- α -Assay keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten- und Kontrollkohorte nachgewiesen ($P \geq 0.083$). Im IFN- γ -Assay zeigten die Proben der Kontrollgruppe sowohl in der *CD56^{dim}* als auch in der *CD56^{bright}*-Population signifikant größere IFN- γ^+ Anteile ($P \leq 0.006$). Der Anteil der TNF- α^+ und IFN- γ^+ *CD56^{bright}* und *CD56^{dim}* war kohortenübergreifend gegen antikörpermarkierte Raji signifikant größer als gegen unmarkierte Raji ($P < 0.036$), allerdings zeigten lediglich die *CD56^{dim}* eine höhere Aktivität unter Stimulation durch Obinutuzumab- als durch Rituximab-markierte Raji (Patienten: $P_{\text{TNF-}\alpha} = 0.008$; $P_{\text{IFN-}\gamma} = 0.036$; Kontrollen: $P_{\text{TNF-}\alpha} = 0.005$; $P_{\text{IFN-}\gamma} = 0.045$) (Tabelle 17).

Tabelle 17: Vergleich der spezifischen NK-Zell-Zytokinproduktion (TNF- α^+ und IFN- γ^+) gegen unterschiedliche Zielzellen, nach CD56-Population

Assay	Population	Verglichene Zielzellen	P _{Patientenkohorte} *	P _{Kontrollkohorte} *
TNF- α	<i>CD56^{dim}</i>	Raji vs. Raji + Rit	0.010	< 0.001
		Raji vs. Raji + Obi	< 0.001	< 0.001
		Raji + Rit vs. Raji + Obi	0.008	0.005
	<i>CD56^{bright}</i>	Raji vs. Raji + Rit	0.013	0.020
		Raji vs. Raji + Obi	0.036	0.006
		Raji + Rit vs. Raji + Obi	0.408	0.452
IFN- γ	<i>CD56^{dim}</i>	Raji vs. Raji + Rit	< 0.001	< 0.001
		Raji vs. Raji + Obi	< 0.001	< 0.001
		Raji + Rit vs. Raji + Obi	0.036	0.045
	<i>CD56^{bright}</i>	Raji vs. Raji + Rit	0.002	0.001
		Raji vs. Raji + Obi	0.001	0.007
		Raji + Rit vs. Raji + Obi	0.796	0.524

*t-Test für gepaarte Stichproben; n_{Patientenkohorte} = 12; n_{Kontrollkohorte} = 9; TNF- α : Tumornekrosefaktor α ; IFN- γ : Interferon- γ ; NK-Zellen: Natürliche Killerzelle; CD: Cluster of Differentiation; Rit: Rituximab; Obi: Obinutuzumab; vs.: versus

Der Vergleich der TNF- α - und IFN- γ -Produktion der CD56-Populationen ergab gegen Raji signifikant größere Anteile zytokinproduzierender Zellen in der CD56^{bright}-Population als in CD56^{dim} (P = 0.005) (Tabelle 18) (Abb. 15). Gegen antikörpermarkierte Raji kehrte sich das Verhältnis um: Hier war der Anteil TNF- α^+ und IFN- γ^+ NK-Zellen in CD56^{dim} signifikant größer als in CD56^{bright}. Auch in der Patientenkohorte überstieg der Anteil zytokinproduzierender Zellen in CD56^{dim} den der CD56^{bright} gegen Obinutuzumab-markierte Raji (P_{TNF- α} = 0.041; P_{IFN- γ} = 0.002). Gegen Rituximab-markierte Raji zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen CD56^{dim} und CD56^{bright} der Patienten (P_{TNF- α} = 0.178; P_{IFN- γ} = 0.093). Während die TNF- α -Werte der CD56^{dim} und CD56^{bright} gegen Raji in Kontrollen keinen signifikanten Unterschied zeigten (P = 0.074), war der Anteil TNF- α^+ Zellen in CD56^{dim} gegen Raji + Rituximab und Raji + Obinutuzumab signifikant größer als in CD56^{bright} (Raji + Rituximab: P = 0.018; Raji + Obinutuzumab: P < 0.001). Die IFN- γ -Werte der CD56^{bright} gegen Raji waren in Kontrollproben signifikant größer als die der CD56^{dim}

($P = 0.041$), jedoch kehrte sich auch hier das Verhältnis gegen antikörpermarkierte Raji um (Raji + Rituximab: $P = 0.009$; Raji + Obinutuzumab: $P = 0.002$).

Tabelle 18: Vergleich der spezifischen Zytokinproduktion ($\text{TNF-}\alpha^+$ und $\text{IFN-}\gamma^+$) in $CD56^{dim}$ und $CD56^{bright}$

Assay	Zielzellen	$P_{\text{Gesamtkohorte}}^*$	$P_{\text{Patientenkohorte}}^*$	$P_{\text{Kontrollkohorte}}^*$
TNF- α	Raji	0.005	0.009	0.074
	Raji + Rit	0.006	0.178	0.018
	Raji + Obi	< 0.001	0.041	< 0.001
IFN- γ	Raji	0.006	0.017	0.041
	Raji + Rit	0.002	0.093	0.009
	Raji + Obi	< 0.001	0.002	0.002

*t-Test für gepaarte Stichproben ($CD56^{dim}$ vs. $CD56^{bright}$); $n_{\text{Gesamtkohorte}} = 21$; $n_{\text{Patientenkohorte}} = 12$; $n_{\text{Kontrollkohorte}} = 9$; TNF- α : Tumornekrosefaktor α ; IFN- γ : Interferon- γ ; CD: Cluster of Differentiation; Rit: Rituximab; Obi: Obinutuzumab

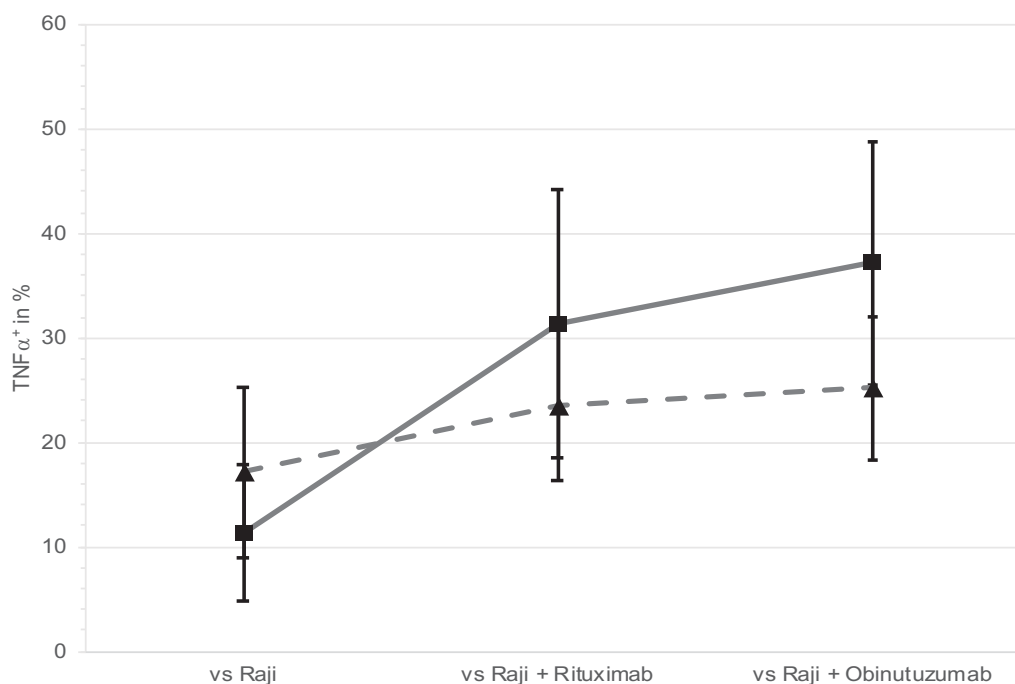


Abb. 15: Unterschiede in den TNF- α -Werten der $CD56^{dim}$ und $CD56^{bright}$. Aufgetragen sind Mittelwerte ($CD56^{dim}$: Quadrate, solide Linie; $CD56^{bright}$: Dreiecke, gestrichelte Linie) und Standardabweichungen (Fehlerbalken). Der Graph verdeutlicht, dass die $CD56^{bright}$ -Population gegen unmarkierte Raji einen höheren Anteil TNF- α^+ Zellen aufweist als die $CD56^{dim}$, dieser Anteil sich aber gegen antikörpermarkierte Raji nur mäßig ändert. Die $CD56^{dim}$ -Population zeigt zwar einen geringeren Anteil TNF- α^+ Zellen gegen unmarkierte Raji, allerdings ist der Anteil gegen antikörpermarkierte Zielzellen deutlich größer ($n = 21$). TNF- α : Tumornekrosefaktor α

3.3.5 Verteilung der HLA-C- und *KIR*-Genotypen

Die Gesamtverteilung der HLA-C-Genotypen ist in Tabelle 19, und die der *KIR*-Genotypen in Tabelle 20 (Seite 47) gelistet. Die sichere Beurteilung des durchflusszytometrisch ermittelten *KIR*-Expressionsstatus war in $n = 3$ Proben durch überlagernde Signale in der durchflusszytometrischen Analyse nicht möglich. Daher wurde im Folgenden die 'limitierte Kohorte' ($n = 18$) betrachtet, in der $n = 11$ Proben auf die Patientenkohorte und $n = 7$ Proben auf die Kontrollkohorte entfielen. In der 'limitierten Kohorte' besaßen auf Patientenseite jeweils $n = 3$ analysierte Proben die *KIR*-Genotypen 1 und 3. Jeweils $n = 1$ Patientenprobe besaßen die *KIR*-Genotypen 2, 4, 17, 18 und 38. In den Kontrollen der 'limitierten Kohorte' war die Frequenz des *KIR*-Genotyps 1 $n = 3$ und des *KIR*-Genotyps 3 $n = 1$. Die angeschlossenen Funktionsanalysen in Abhängigkeit des *KIR*-Expressionsstatus wurden aufgrund der niedrigen Frequenzen der übrigen *KIR*-Genotypen auf die *KIR*-Genotypen 1 und 3 beschränkt.

In der Gesamtkohorte betrug die Frequenz der *KIR*-Genotypgruppe AA 40.4% ($n/n_{\text{Gesamt}} = 19/47$), der *KIR*-Genotypgruppe AB 42.6% ($20/47$) und der *KIR*-Genotypgruppe BB 16.7% ($8/47$). Die Verteilung der *KIR*-Genotypgruppen unterschied sich weder in der Gesamtkohorte, noch in der limitierten Kohorte signifikant zwischen Patienten und Kontrollen (Gesamtkohorte: $P = 0.350$; limitierte Kohorte: $P = 0.220$).

Tabelle 19: Verteilung der HLA-C-Genotypen in der Gesamtkohorte und der 'limitierten Kohorte'

HLA-Genotyp	Gesamtkohorte (n = 47)			Limitierte Kohorte* (n = 18)		
	nPatienten	nKontrollen	nGesamt	nPatienten	nKontrollen	nGesamt
C1/C1	15	3	18	6	2	8
C2/C2	7	1	8	1	1	2
C1/C2	16	5	21	4	4	8

HLA: Humanes Leukozytenantigen *Aufgrund überlagernder Wellenlängenbereiche in der durchflusszytometrischen Analyse waren lediglich 18 von 47 Proben ('limitierte Kohorte') hinsichtlich ihres *KIR*-Expressionsstatus auswertbar.

Die Verteilung der HLA-C-Genotypen über die Gesamtkohorte zeigte eine hohe Prävalenz des C1/C2-Genotyps ($n/n_{\text{Gesamt}} (\%)$; $21/47 (44.7)$). Der C2/C2-Genotyp war außerdem mit $8/48$ Fällen (16.7%) deutlich seltener vertreten als der C1/C1-Genotyp ($18/47 (38.3)$). Prozentual waren in der Patientenkohorte die homozygoten

C1/C1-Genotypen ($n/n_{\text{Patientenkohorte}}$ (%); 15/38 (38.5)) und C2/C2-Genotypen (7/38 (18.4)) verglichen mit den Kontrollen überrepräsentiert ($n/n_{\text{Kontrollkohorte}}$ (%), C1/C1: 3/9 (33.3); C2/C2: 1/9 (11.1)).

Die 'limitierte Kohorte' bestand aus jeweils $n = 8$ (44.4%) C1/C1- und C1/C2-Genotypen, und $n = 2$ (12.2%) C2/C2-Genotypen. Davon entfielen auf die Patientenkohorte für C1/C1 $n = 6$ (75%), für C1/C2 $n = 4$ (50%) und für C2/C2 $n = 1$ (50%). Weder in der Gesamtkohorte, noch in der limitierten Kohorte war die Verteilung der HLA-C-Genotypen in Patienten und Kontrollen signifikant unterschiedlich (Gesamtkohorte: $P = 0.743$; limitierte Kohorte: $P = 0.443$).

Die Analyse der *KIR*-Expression in Abhängigkeit des HLA-C-Typs in der 'limitierten Kohorte' ergab für *KIR2DL2/3* einen Trend zu einer höheren Expressionsrate in der C1/C1-Homozygoten im Vergleich zum HLA-C-Genotyp C2/C2 (Mittelwert \pm Standardabweichung in %; C1/C1: 47.10 ± 14.86 ; C2/C2: 22.44 ± 9.11) ($P = 0.055$). In der Expressionsrate des *KIR2DL1* wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den homozygoten HLA-C-Genotypen festgestellt (C1/C1: 6.43 ± 4.39 ; C2/C2: 10.3 ± 7.30) ($P = 0.330$).

Tabelle 20: *KIR*-Genotypen in der Gesamtkohorte und der 'limitierten Kohorte'

<i>KIR</i> - Genotypnummer	<i>KIR</i> - Genotypgruppe	Gesamtkohorte (n = 47)			Limitierte Kohorte* (n = 18)		
		nPat	nKont	nGes	nPat	nKont	nGes
1	AA	13	3	16	3	3	6
2	AB	7	1	8	1	0	1
3	AB	2	1	3	3	1	4
4	AB	1	0	1	1	0	1
5	BB	0	1	1	0	1	1
6	AA	2	0	2	0	0	0
10	BB	2	0	2	0	0	0
11	AA	1	0	1	0	0	0
12	AB	2	0	2	0	0	0
17	BB	1	0	1	1	0	1
18	BB	1	0	1	1	0	1
19	AB	0	1	1	0	1	1
21	BB	0	1	1	0	1	1
30	AB	2	0	2	0-	0	0
34	AB	1	0	1	0	0	0
38	AB	1	0	1	1	0	1
58	AA	1	0	1	0	0	0
**	BB	1	0	1	0	0	0
**	BB	0	1	1	0	0	0

*Aufgrund überlagernder Wellenlängenbereiche in der durchflusszytometrischen Analyse waren lediglich 18 von 47 Proben ('limitierte Kohorte') hinsichtlich ihres *KIR*-Expressionsstatus auswertbar. **Jeweils eine Patientenprobe und eine Kontrollprobe wiesen *KIR*-Genotypen auf, die in der aktuellen Nomenklatur nicht gelistet waren. Patient: *KIR2DL1*⁺; *KIR2DL2*⁻; *KIR2DL3*⁺; *KIR2DL5*⁺; *KIR3DL1*⁻; *KIR3DL2*⁺; *KIR2DS1*⁺; *KIR2DS2*⁺; *KIR2DS3*⁻; *KIR2DS4*⁺; *KIR2DS5*⁺; *KIR3DS1*⁺; Kontrolle: *KIR2DL1*⁺; *KIR2DL2*⁻; *KIR2DL3*⁺; *KIR2DL5*⁺; *KIR3DL1*⁻; *KIR3DL2*⁺; *KIR2DS1*⁺; *KIR2DS2*⁺; *KIR2DS3*⁻; *KIR2DS4*⁻; *KIR2DS5*⁺; *KIR3DS1*⁺; Nomenklatur der *KIR*-Genotypen nach Uhrberg et al. [69]. *KIR*: Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor; Pat: Patientenkohorte; Kont: Kontrollkohorte; Ges: Gesamt

3.3.6 Vergleich der spezifischen Aktivität und Zytokinproduktion der Natürlichen Killerzellen in *KIR*-Genotyp 1 und 3

Die Ergebnisse des *CD107a*-Assays der 'limitierten Kohorte', stratifiziert nach *KIR*-Genotypen, sind in Tabelle 21 gelistet. Für die Proben der *KIR*-Genotypen 1 und 3 wurde gegen keine Zielzelle eine signifikante Abweichung des Anteils der *CD107a*⁺ von der übrigen 'limitierten Kohorte' festgestellt ($P \geq 0.268$).

Tabelle 21: Kohortenspezifische NK-Zell-Aktivität (*CD107a*⁺), nach *KIR*-Genotyp

Ziel	G1 (%) [*]	Lim. Kohorte ohne G1 (%) [*]	P ^{**}	G3 (%) [*]	Lim. Kohorte ohne G3 (%) [*]	P ^{**}
K562	51.71 ± 11.87	56.20 ± 14.63	0.547	51.65 ± 14.70	55.92 ± 13.93	0.597
Raji	30.08 ± 7.71	35.08 ± 9.45	0.314	29.91 ± 8.58	34.75 ± 9.18	0.366
Raji + Rit	69.13 ± 5.96	69.38 ± 7.91	0.945	65.61 ± 11.71	70.18 ± 5.99	0.268
Raji + Obi	77.07 ± 7.50	75.38 ± 8.40	0.672	72.49 ± 11.05	76.65 ± 7.32	0.362

Die limitierte Kohorte (Lim. Kohorte; n = 18) enthält die Fälle, deren *KIR*-Expressionsprofil durchflusszytometrisch ausgewertet wurde. G1: *KIR*-Genotyp 1 (n = 6); G3: *KIR*-Genotyp 3 (n = 4). *Mittelwert ± Standardabweichung; **t-Test für ungepaarte Stichproben; *KIR*: Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor; NK-Zelle: Natürliche Killerzelle; *CD*: Cluster of Differentiation; Rit: Rituximab; Obi: Obinutuzumab; Ziel: Zielzelle

Die HLA-C-Genotypen waren in *KIR*-Genotyp 1 ungleichmäßig verteilt (n/n_{Genotyp 1} (%); C1/C1: 4/6 (66.7%); C1/C2: 1/6 (16.7%); C2/C2: 1/6 (16.7%)). In *KIR*-Genotyp 3 entfielen drei der vier Proben auf den HLA-C-Genotyp C1/C2 (75.0%) und eine Probe auf C2/C2 (25.0%).

Der Vergleich der spezifischen Zytokinproduktion (TNF- α ⁺ und IFN- γ ⁺) sowie der spezifischen NK-Zell-Aktivität (*CD107a*⁺) in NK-Zellen gegen Zielzellen, ergab gemischte Ergebnisse: Während Proben des *KIR*-Genotyps 3 signifikant bessere Ergebnisse gegen antikörpermarkierte Raji als gegen unmarkierte Raji in der IFN- γ Produktion und im *CD107a*⁺-Anteil erzielten, wurde kein signifikanter Unterschied in der TNF- α -Produktion gefunden ($P_{\text{TNF-}\alpha} \geq 0.058$; $P_{\text{CD107a,IFN-}\gamma} \leq 0.036$) (Tabelle 22).

Tabelle 22: Kohortenspezifische NK-Zell-Zytokinproduktion (TNF- α^+ und IFN- γ^+), nach *KIR*-Genotyp

Assay	Zielzelle	G1 (%)*	Lim. ohne G1 (%)*	P**	G3 (%)*	Lim. ohne G3 (%)*	P**
TNF- α	K562	19.00 \pm 11.23	20.98 \pm 17.89	0.822	14.33 \pm 13.86	21.37 \pm 16.31	0.442
	Raji	14.37 \pm 4.74	12.63 \pm 7.98	0.663	7.60 \pm 8.93	14.04 \pm 6.37	0.126
	Raji + Rit	40.27 \pm 4.82	29.70 \pm 14.46	0.102	24.50 \pm 20.73	33.63 \pm 11.59	0.237
	Raji + Obi	40.74 \pm 8.44	36.38 \pm 15.12	0.520	30.37 \pm 22.61	38.39 \pm 11.03	0.300
IFN- γ	K562	32.99 \pm 9.89	30.14 \pm 22.31	0.789	21.16 \pm 22.16	33.48 \pm 18.78	0.275
	Raji	20.37 \pm 3.18	20.56 \pm 15.16	0.978	13.80 \pm 19.03	22.57 \pm 10.19	0.237
	Raji + Rit	64.44 \pm 12.52	51.72 \pm 22.53	0.212	39.05 \pm 29.02	59.08 \pm 17.35	0.089
	Raji + Obi	61.91 \pm 11.77	53.35 \pm 22.29	0.389	42.07 \pm 31.12	59.03 \pm 16.06	0.129

Die limitierte Kohorte (Lim.; n = 18) enthält die Fälle, deren *KIR*-Expressionsprofil durchflusszytometrisch ausgewertet wurde. G1: *KIR*-Genotyp 1 (n = 6); G3: *KIR*-Genotyp 3 (n = 4). *Mittelwert \pm Standardabweichung; **t-Test für ungepaarte Stichproben; NK-Zelle: Natürliche Killerzelle; *CD*: *Cluster of Differentiation*; Rit: Rituximab; Obi: Obinutuzumab; *KIR*: *Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor*; TNF- α : Tumornekrosefaktor α ; IFN- γ : Interferon- γ

Ein signifikanter Unterschied zwischen Obinutuzumab- und Rituximab-markierten Raji wurde in *KIR*-Genotyp 3 nur in *CD107a* gefunden (P = 0.022). In *KIR*-Genotyp 1 waren die *CD107a*⁺, TNF- α ⁺ und IFN- γ ⁺-Anteile der NK-Zellen gegen antikörpermarkierte Raji signifikant größer als gegen unmarkierte Raji (jeweils P \leq 0.004). Ähnlich zu *KIR*-Genotyp 3, waren auch die *CD107a*⁺-Anteile gegen Obinutuzumab-markierte Raji signifikant größer als gegen Rituximab-markierte Raji, während dieser Unterschied im TNF- α - und IFN- γ -Assay nicht gefunden wurde (P_{*CD107a*} = 0.007; P_{TNF- α} = 0.895; P_{IFN- γ} = 0.281).

Verglichen mit *KIR*-Genotyp 3, war der mittlere Anteil IFN- γ -produzierender Zellen in *KIR*-Genotyp 1 größer (*KIR*-Genotyp 1: 61.91 ± 11.77 ; *KIR*-Genotyp 3: 42.07 ± 31.12), der Unterschied verblieb jedoch ein statistischer Trend ($P = 0.094$) (Tabelle 23). Auch in den übrigen Vergleichen lag der mittlere Anteil zytokinproduzierender NK-Zellen in *KIR*-Genotyp 1 über dem in *KIR*-Genotyp 3, jedoch erreichten die Unterschiede keine statistische Signifikanz ($P \geq 0.103$).

Tabelle 23: Vergleich der NK-Zell-Aktivität (CD107a⁺) und Zytokinproduktion (TNF-a und IFN-g) in *KIR*-Genotypen 1 und 3

Assay	Zielzellen	P*
<i>CD107a</i>	Raji	0.976
	Raji + Rituximab	0.543
	Raji + Obinutuzumab	0.453
TNF- α	Raji	0.184
	Raji + Rituximab	0.103
	Raji + Obinutuzumab	0.327
IFN- γ	Raji	0.465
	Raji + Rituximab	0.094
	Raji + Obinutuzumab	0.185

*t-Test für ungepaarte Stichproben; $n_{\text{Genotyp 1}} = 6$; $n_{\text{Genotyp 3}} = 4$; *CD*: Cluster of Differentiation; TNF- α : Tumornekrosefaktor α ; IFN- γ : Interferon- γ ; NK-Zelle: Natürliche Killerzelle

In beiden *KIR*-Genotypen aktivierten antikörpermarkierte Raji die NK-Zellen signifikant stärker als unmarkierte Raji (jeweils $P \leq 0.002$) (Tabelle 24). Darüber hinaus wurden NK-Zellen beider *KIR*-Genotypen durch Obinutuzumab-markierte Ziele signifikant stärker aktiviert als durch Rituximab-markierte (jeweils $P \leq 0.022$). Während auch die Zytokinproduktion der NK-Zellen des *KIR*-Genotyps 1 gegen antikörpermarkierte Raji signifikant größer war als gegen unmarkierte (jeweils $P \leq 0.004$), war in *KIR*-Genotyp 3 nur der Unterschied der IFN- γ -Produktion signifikant (Raji vs. Raji + Rituximab: $P = 0.017$; Raji vs. Raji + Obinutuzumab: $P = 0.036$). Während sich die spezifische TNF- α -Produktion in *KIR*-Genotyp 1 nicht signifikant zwischen den Antikörpern unterschied ($P = 0.895$), war in *KIR*-Genotyp 3 ein Trend zu höheren Messwerten gegen Obinutuzumab-markierte Raji zu erkennen ($P = 0.058$).

Tabelle 24: Vergleich der spezifischen NK-Zell-Aktivität (*CD107a*⁺) und -Zytokinproduktion (TNF- α und IFN- γ), nach *KIR*-Genotyp

Population	Verglichene Zielzellen	P_{Genotyp 1}*	P_{Genotyp 3}*
CD107a	Raji vs. Raji + Rit	< 0.001	0.002
	Raji vs. Raji + Obi	< 0.001	0.001
	Raji + Rit vs. Raji + Obi	0.007	0.022
TNF- α	Raji vs. Raji + Rit	< 0.001	0.069
	Raji vs. Raji + Obi	0.004	0.053
	Raji + Rit vs. Raji + Obi	0.895	0.058
IFN- γ	Raji vs. Raji + Rit	< 0.001	0.017
	Raji vs. Raji + Obi	< 0.001	0.036
	Raji + Rit vs. Raji + Obi	0.281	0.544

*t-Test für gepaarte Stichproben (*KIR*-Genotyp 1 vs. *KIR*-Genotyp 3); n_{Genotyp 1} = 6; n_{Genotyp 3} = 4; *CD*: Cluster of Differentiation; TNF- α : Tumornekrosefaktor α ; IFN- γ : Interferon- γ ; Rit: Rituximab; Obi: Obinutuzumab

Der *KIR*-Genotyp 3 wurde von Vergleichen zwischen Patienten- und Kontrollkohorte aufgrund der niedrigen Fallzahl (n_{Kontrollen} = 1) ausgeschlossen. Eine Übersicht der Ergebnisse der *CD107a*-, TNF- α - und IFN- γ -Assays für *KIR*-Genotyp 1 und die Unterschiede zwischen Patienten- und Kontrollkohorte sind in Tabelle 25 dargestellt. Obwohl der Anteil der *CD107a*⁺ in den *KIR*-Genotyp 1-Proben der Kontrollkohorte gegen sämtliche Ziele größer war als in der Patientenkohorte, waren die Unterschiede nicht signifikant (P \geq 0.103).

Tabelle 25: Kohortenspezifische NK-Zell-Aktivität (*CD107a*⁺) und Zytokinproduktion (TNF- α und IFN- γ) in *KIR*-Genotyp 1

Assay	Zielzellen	Patientenkohorte G1 (%) [*]	Kontrollkohorte G1 (%) [*]	P ^{**}
<i>CD107a</i>	Raji	23.67 \pm 4.06	34.35 \pm 6.49	0.137
	Raji + Rit	64.96 \pm 3.88	73.30 \pm 4.65	0.076
	Raji + Obi	74.94 \pm 8.48	79.20 \pm 7.42	0.549
TNF- α	Raji	12.13 \pm 3.68	15.86 \pm 5.46	0.469
	Raji + Rit	38.55 \pm 6.38	41.99 \pm 2.89	0.443
	Raji + Obi	41.39 \pm 6.51	40.09 \pm 11.60	0.874
IFN- γ	Raji	19.18 \pm 2.15	19.45 \pm 3.67	0.846
	Raji + Rit	60.00 \pm 13.96	68.87 \pm 11.76	0.088
	Raji + Obi	54.91 \pm 12.37	68.90 \pm 6.82	0.061

*Mittelwert \pm Standardabweichung; **t-Test für ungepaarte Stichproben; n_{Patientenkohorte G1} = 3; n_{Kontrollkohorte G1} = 3; *CD*: Cluster of Differentiation; G1: *KIR*-Genotyp 1; TNF- α : Tumornekrosefaktor α ; IFN- γ : Interferon- γ ; NK-Zelle: Natürliche Killerzelle; Rit: Rituximab; Obi: Obinutuzumab

3.3.7 Vergleich der spezifischen Aktivität der Natürlichen Killerzell-Populationen NKG2A⁺, *KIR2DL1*⁺, *KIR2DL2/3*⁺ und *triple negative*

Tabelle 26 enthält eine Übersicht der Anteile der *CD107a*⁺ NK-Zellen innerhalb der Zellpopulationen. Im Mittel war die spezifische Aktivität der NKG2A⁺-Population gegen alle Ziele größer als in den übrigen untersuchten Zellpopulationen. Die *triple negative* und die NKG2A⁺-Populationen wiesen mit durchschnittlich 33.25% \pm 13.28% und 33.09% \pm 11.63% die höchsten durchschnittlichen Frequenzen auf. Die Frequenzen der *KIR2DL1*⁺ (9.60% \pm 4.14%) und *KIR2DL2/3*⁺ (9.83% \pm 8.32%) waren vergleichsweise geringer.

Die spezifische NK-Zell-Aktivität war darüber hinaus in sämtlichen Populationen gegen antikörpermarkierte Raji größer als gegen unmarkierte Raji (jeweils P \leq 0.049) (Tabelle 27). Die *triple negative*-, NKG2A⁺- und die *KIR2DL1*⁺-Population zeigten eine signifikant höhere Aktivität gegen Obinutuzumab-markierte Raji als gegen Raji + Rituximab (jeweils P \leq 0.038), während der Vergleich in *KIR2DL2/3*⁺ keine signifikanten Unterschiede zeigte (P = 0.373).

Tabelle 26: Spezifische NK-Zell-Aktivität (*CD107a*⁺), nach Zellpopulationen (*NKG2A*⁺, *KIR2DL1*⁺, *KIR2DL2/3*⁺ und *triple negative*)

Zielzelle	<i>NKG2A</i> ⁺ (%) [*]	<i>KIR2DL1</i> ⁺ (%) [*]	<i>KIR2DL2/3</i> ⁺ (%) [*]	<i>triple negative</i> (%) [*]
K562	19.82 ± 11.22	3.47 ± 1.85	4.47 ± 2.84	11.38 ± 5.01
Raji	11.15 ± 6.50	1.60 ± 0.85	2.08 ± 1.59	6.01 ± 1.96
Raji + Rit	21.08 ± 9.28	6.17 ± 2.99	5.95 ± 5.74	19.49 ± 8.50
Raji + Obi	24.42 ± 10.86	7.75 ± 3.97	5.47 ± 4.96	23.56 ± 9.71

^{*}Mittelwert ± Standardabweichung; für jede NK-Zell-Population jeweils n = 10; NK-Zelle: Natürliche Killerzelle; *CD*: Cluster of Differentiation; *KIR*: Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor; Rit: Rituximab; Obi: Obinutuzumab

Tabelle 27: Vergleich der spezifischen NK-Zell-Aktivität (*CD107a*⁺) gegen unterschiedliche Zielzellen, nach Zellpopulationen (*NKG2A*⁺, *KIR2DL1*⁺, *KIR2DL2/3*⁺ und *triple negative*)

Vergleich	<i>P</i> _{<i>NKG2A</i>⁺} [*]	<i>P</i> _{<i>KIR2DL1</i>⁺} [*]	<i>P</i> _{<i>KIR2DL2/3</i>⁺} [*]	<i>P</i> _{<i>triple negative</i>} [*]
Raji vs. Raji + Rit	< 0.001	0.002	0.023	0.003
Raji vs. Raji + Obi	< 0.001	0.002	0.049	0.002
Raji + Rit vs. Raji + Obi	0.038	0.006	0.373	< 0.001

^{*}t-Test für gepaarte Stichproben; für jede NK-Zell-Population jeweils n = 10; NK-Zelle: Natürliche Killerzelle; *CD*: Cluster of Differentiation; *KIR*: Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor; Rit: Rituximab; Obi: Obinutuzumab; vs.: versus

Der Vergleich der Populationen in Patienten- und Kontrollkohorte zeigte keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 28). Lediglich gegen Raji sowie Raji + Rituximab wurde für *NKG2A*⁺, und gegen Raji für *KIR2DL1*⁺ wurden statistischen Trends zu einer stärkeren Aktivierung der Kontrollproben gefunden (jeweils $P \leq 0.082$).

Die Ergebnisse des Aktivitätsvergleichs der NK-Zellpopulationen sind in Tabelle 29 präsentiert. Über die limitierte Kohorte und die Kontrollkohorte hinweg waren *NKG2A*⁺ den Populationen *KIR2DL1*⁺ und *KIR2DL2/3*⁺ überlegen ($P \leq 0.039$). Während Patienten-*NKG2A*⁺ gegen Raji + Rituximab signifikant höhere Aktivitätswerte erzielten als *KIR2DL1*⁺ ($P = 0.024$), war der Unterschied gegen die Ziele Raji und Raji + Obinutuzumab nicht signifikant ($P \geq 0.071$). Darüber hinaus wurde in Patienten kein signifikanter Unterschied zwischen *NKG2A*⁺ und *KIR2DL2/3*⁺ gefunden, unabhängig des Ziels ($P \geq 0.065$).

Der Vergleich der Populationen *NKG2A*⁺ und *triple negative* gegen unmarkierte Raji ergab in der limitierten Kohorte und der Kontrollkohorte signifikant größere

Aktivitätswerte für NKG2A⁺ ($P \leq 0.049$), während in Patientenproben kein signifikanter Unterschied gefunden wurde ($P = 0.496$). Unabhängig von der betrachteten Kohorte bestand weder gegen Raji + Obinutuzumab, noch gegen Raji + Rituximab ein signifikanter Unterschied zwischen NKG2A⁺ und *triple negative* ($P \geq 0.473$).

Tabelle 28: Kohortenspezifische NK-Zell-Aktivität (*CD107a*⁺), nach Zellpopulationen (NKG2A⁺, *KIR2DL1*⁺, *KIR2DL2/3*⁺ und *triple negative*)

Population	Zielzellen	Patientenkohorte (%)*	Kontrollkohorte (%)*	P**
NKG2A ⁺	Raji	7.20 ± 4.19	15.09 ± 6.29	0.082
	Raji + Rit	16.75 ± 6.77	27.57 ± 9.40	0.066
	Raji + Obi	20.48 ± 10.86	30.33 ± 8.90	0.172
<i>KIR2DL1</i> ⁺	Raji	1.08 ± 0.77	2.11 ± 0.61	0.081
	Raji + Rit	5.53 ± 2.98	7.13 ± 3.17	0.440
	Raji + Obi	7.30 ± 4.32	8.42 ± 3.88	0.687
<i>KIR2DL2/3</i> ⁺	Raji	2.67 ± 2.09	1.49 ± 0.75	0.328
	Raji + Rit	7.03 ± 6.95	4.32 ± 3.53	0.497
	Raji + Obi	6.24 ± 6.00	4.33 ± 3.29	0.582
<i>triple neg.</i>	Raji	5.81 ± 2.14	6.21 ± 2.06	0.799
	Raji + Rit	17.98 ± 9.37	21.75 ± 7.68	0.525
	Raji + Obi	22.16 ± 10.02	25.66 ± 10.29	0.607

*Mittelwert ± Standardabweichung; **t-Test für ungepaarte Stichproben; n_{Patientenkohorte} = 6; n_{Kontrollkohorte} = 4; *CD*: Cluster of Differentiation; *KIR*: Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor; NK-Zelle: Natürliche Killerzelle; Rit: Rituximab; Obi: Obinutuzumab; *triple neg.*: *triple negative*

Zwischen *KIR2DL1*⁺ und *KIR2DL2/3*⁺ war für keine der Kohorten ein signifikanter Unterschied vorhanden ($P \geq 0.282$). *Triple negative* erzielte gegen sämtliche Ziele in allen Kohorten signifikant größere Aktivitätswerte als *KIR2DL1*⁺ ($P \leq 0.045$), und in der limitierten Kohorte sowie der Kontrollkohorte auch gegen *KIR2DL2/3*⁺ ($P \leq 0.041$). In der Patientenkohorte hingegen wurden zwar signifikant höhere Aktivitätswerte der *triple negative* gegen Raji + Obinutuzumab gefunden ($P = 0.026$), jedoch bestand gegen unmarkierte Raji sowie Raji + Rituximab kein signifikanter Unterschied ($P \geq 0.069$).

Tabelle 29: Vergleich der spezifischen Aktivität (*CD107a*⁺) in Zellpopulationen (*NKG2A*⁺, *KIR2DL1*⁺, *KIR2DL2/3*⁺ und *triple negative*)

Vergleich	Zielzellen	Lim.	Pat.	Kont.
<i>NKG2A</i> ⁺ vs. <i>KIR2DL1</i> ⁺	Raji	0.004	0.078	0.030
	Raji + Rit	0.001	0.024	0.036
	Raji + Obi	0.004	0.071	0.039
<i>NKG2A</i> ⁺ vs. <i>KIR2DL2/3</i> ⁺	Raji	0.009	0.172	0.024
	Raji + Rit	0.005	0.099	0.026
	Raji + Obi	0.002	0.065	0.009
<i>NKG2A</i> ⁺ vs. <i>triple neg.</i>	Raji	0.043	0.496	0.049
	Raji + Rit	0.726	0.841	0.473
	Raji + Obi	0.885	0.842	0.636
<i>KIR2DL1</i> ⁺ vs. <i>KIR2DL2/3</i> ⁺	Raji	0.567	0.321	0.394
	Raji + Rit	0.921	0.641	0.411
	Raji + Obi	0.282	0.703	0.296
<i>KIR2DL1</i> ⁺ vs. <i>triple neg.</i>	Raji	0.001	0.045	0.031
	Raji + Rit	< 0.001	0.013	0.020
	Raji + Obi	< 0.001	0.009	0.030
<i>KIR2DL2/3</i> ⁺ vs. <i>triple neg.</i>	Raji	0.002	0.069	0.032
	Raji + Rit	0.007	0.108	0.041
	Raji + Obi	0.001	0.026	0.037

*t-Test für gepaarte Stichproben; *CD*: Cluster of Differentiation; *KIR*: Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor; Lim.: Limitierte Kohorte (n = 10); Pat: Patientenkohorte (n = 6); Kont.: Kontrollkohorte (n = 4); Rit: Rituximab; Obi: Obinutuzumab

3.3.8 Analyse der Ausreißer

Die aufgrund fehlender Aktivitätszunahme unter Antikörperstimulation identifizierten Ausreißer wurden gesondert betrachtet (Tabelle 30). Zwei der Proben mit stammten von *DLBCL*-Erkrankten. Zwei der Patienten waren männlich und das mittlere Alter lag bei 66 Jahren. Die *KIR*-Typisierung ergab für einen Patienten mit *DLBCL* einen bislang nicht dokumentierten *KIR*-Genotyp (*KIR2DL1*⁺; *KIR2DL2*⁻; *KIR2DL3*⁺; *KIR2DL5*⁺; *KIR3DL1*⁻; *KIR3DL2*⁺; *KIR2DS1*⁺; *KIR2DS2*⁺; *KIR2DS3*⁻; *KIR2DS4*⁺;

KIR2DS5⁺; *KIR3DS1*⁺; restliche *KIR* nicht getestet) [114]. Auch die Wiederholung der *PCR-SSP* ergab den gleichen *KIR*-Expressionsstatus (Abb. 16).

In beiden *DLBCL*-Proben war insbesondere die spezifische Aktivität der *NKG2A*⁺-Population herabgesetzt. Darüber hinaus zeigten auch die *triple negative*-Population eine im Vergleich zu den übrigen Proben herabgesetzte Aktivität (Abb. 17). Ausreißer 2 zeigte eine größere Aktivität gegen Raji + Obinutuzumab als gegen Raji + Rituximab. In Ausreißer 1 hingegen war die spezifische Aktivität gegen K562, Raji + Rituximab und Raji + Obinutuzumab annähernd identisch. In Ausreißer 3 wurde insgesamt nur eine sehr geringe NK-Zell-Zahl analysiert und von diesen gehörte der Großteil zu der *triple negative*-Population (Abb. 17).

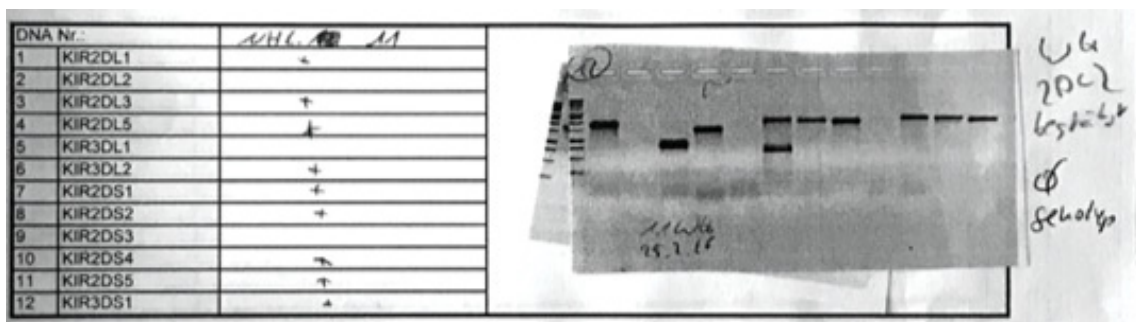


Abb. 16: Bislang nicht dokumentierter *KIR*-Genotyp in der Patientenkohorte. Die Abbildung zeigt den *KIR*-Genotyp (*KIR2DL1*⁺; *KIR2DL2*; *KIR2DL3*⁺; *KIR2DL5*⁺; *KIR3DL1*; *KIR3DL2*⁺; *KIR2DS1*⁺; *KIR2DS2*⁺; *KIR2DS3*⁻; *KIR2DS4*⁻; *KIR2DS5*⁺; *KIR3DS1*⁺; restliche *KIR* nicht getestet), welcher bisher nicht dokumentiert wurde.

Tabelle 30: Charakteristika der Ausreißer mit niedriger spezifischer Aktivität

Charakteristikum	Ausreißer 1	Ausreißer 2	Ausreißer 3
Grunderkrankung	<i>DLBCL</i>	<i>DLBCL</i>	CLL
Geschlecht	männlich	weiblich	männlich
Analysierte Zellzahl pro Ziel	14000	10000	2000
<i>KIR</i> -Genotyp	1	*	6
Spezifische Aktivität gegen			
K562 (%)		38.46	33.72
Raji (%)		31.81	20.69
Raji + Rit (%)	36.02	38.85	39.29
Raji + Obi (%)	45.13	38.45	36.7

*Der *KIR*-Genotyp des Ausreißers ist bislang nicht dokumentiert oder nummeriert. *DLBCL*: *Diffuse Large B-Cell Lymphoma*; *CLL*: Chronisch lymphatische Leukämie

Der Ausreißer mit signifikant abweichendem $CD56^{dim/bright}$ -Verhältnis (Ausreißer 4) stammte ebenfalls aus der Patientenkohorte. Er war männlich, zum Zeitpunkt der Blutabnahme 50 Jahre alt und an einem MCL erkrankt. Die durchschnittlich analysierte Zellzahl lag bei 10000 NK-Zellen / Probe. Die spezifische Aktivität und Zytokinproduktion der NK-Zellen sowie der $CD56^{dim/bright}$ -Populationen ist in Tabelle 31 gelistet.

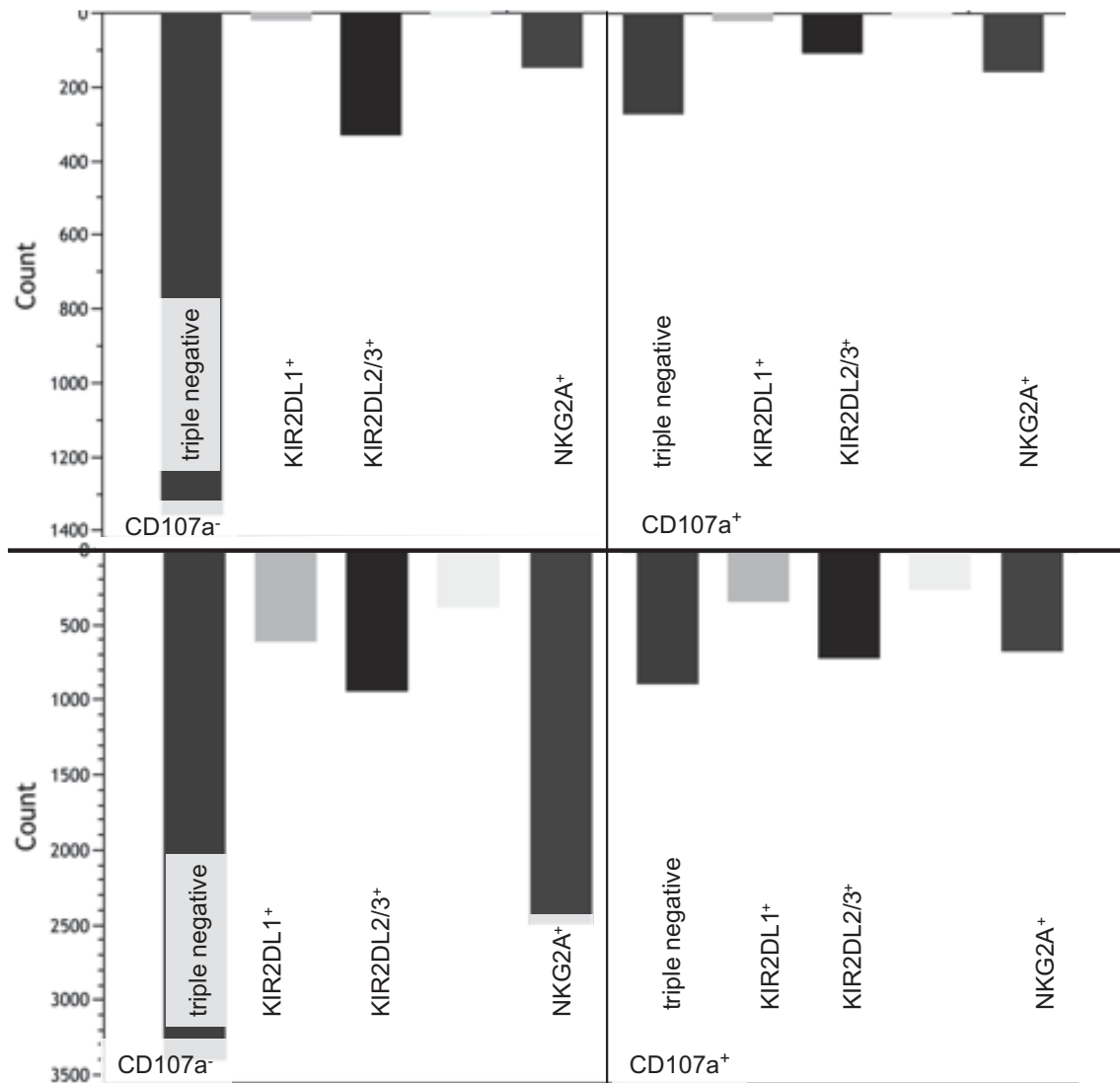


Abb. 17: Verteilung der NK-Zell-Populationen in Ausreißern mit niedriger spezifischer Aktivität. Obere Bildhälfte: Ausreißer 3. Das Säulendiagramm zeigt die absolute Häufigkeit der NK-Zellen, sortiert nach Populationszugehörigkeit und $CD107a$ -Status (links negativ, rechts positiv). Der Großteil der Zellen gehörte der *triple negative*-Population an, während die Frequenzen der rezeptorpositiven NK-Zellen deutlich geringer waren. Untere Bildhälfte: Säulendiagramm einer Probe mit signifikant herabgesetzter spezifischer NK-Zell-Aktivität (links $CD107a^-$, rechts $CD107a^+$ positiv). NK-Zelle: Natürliche Killerzelle; KIR: Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor; CD: Cluster of Differentiation

Während sowohl $CD56^{dim}$ und $CD56^{bright}$ einen starken Anstieg der $CD107a^+$ -Population gegenüber antikörpermarkierten Raji zeigten, stieg der IFN- γ -Mittelwert in der $CD56^{dim}$ -Population des Ausreißers deutlich stärker als in der $CD56^{bright}$ -Population. Für TNF- α war sowohl für $CD56^{dim}$ als auch $CD56^{bright}$ nur ein geringer Anstieg des Mittelwerts von der unmarkierten zu den antikörpermarkierten Raji zu verzeichnen.

Tabelle 31: Spezifische Aktivität ($CD107a^+$) und Zytokinproduktion (TNF- α und IFN- γ) der $CD56$ -Populationen in Ausreißer 4 mit vermindertem $CD56^{dim}$ -Anteil

Assay	Population	K562	Raji	Raji + Rit	Raji + Obi
$CD107a$	$CD56^{dim+bright}$	49.91	19.14	62.37	61.36
	$CD56^{dim}$	45.41	27.32	57.66	65.95
	$CD56^{bright}$	51.90	19.73	62.96	61.76
TNF- α	$CD56^{dim+bright}$	3.03	1.40	4.40	6.14
	$CD56^{dim}$	1.43	1.85	7.01	9.70
	$CD56^{bright}$	4.31	1.27	3.82	5.32
IFN- γ	$CD56^{dim+bright}$	3.76	2.46	8.96	11.68
	$CD56^{dim}$	4.54	4.54	13.88	25.26
	$CD56^{bright}$	5.30	2.78	7.28	9.73

CD: Cluster of Differentiation; TNF- α : Tumornekrosefaktor α ; IFN- γ : Interferon- γ ; NK-Zelle: Natürliche Killerzelle; Rit: Rituximab; Obi: Obinutuzumab

4 Diskussion

In dieser Studie wurden die therapeutischen anti-*CD20*-Antikörper Rituximab und Obinutuzumab, die in der Therapie der Non-Hodgkin-Lymphome eingesetzt werden, hinsichtlich ihrer Wirksamkeit in der Zielzellbekämpfung und der Aktivierung der Natürlichen Killerzellen untersucht. Während durch beide *mAb* signifikant bessere Ergebnisse gegen die Zielzellen erreicht wurden, als ohne *mAb*, wurde darüber hinaus eine Überlegenheit des Typ-2- Antikörper Obinutuzumab gegenüber seinem Vorgänger Rituximab gefunden: Sowohl in der spezifischen Aktivierung der Natürlichen Killerzellen als auch in der spezifischen Lyse der Zielzellen war Obinutuzumab Rituximab signifikant überlegen. Darüber hinaus wurde die Natürliche Killerzell-Population *CD56^{dim}* durch Obinutuzumab signifikant besser angesprochen als durch Rituximab, reflektiert in der spezifischen Aktivität sowie der Produktion von Tumornekrosefaktor α und Interferon- γ . Auch eine verbesserte Rekrutierung der *CD56^{bright}*-Zellen durch Obinutuzumab für die Natürliche Killerzell-Antwort wurde nachgewiesen.

Das mittlere Alter der eingebundenen NHL-Patienten lag mit 63.9 Jahren in dem Altersbereich, auf den rund zwei Drittel der NHL-Neuerkrankungen entfallen [1]. In der Gesamtkohorte lag der Anteil der Männer bei 60.5%. Daten zur geschlechterspezifischen Inzidenz der NHL zeigen, dass Männer häufiger betroffen sind als Frauen, wodurch Unterschiede in der Geschlechterverteilung erklärt werden [1, 6]. In der Kohorte, die den CFDA-SE-Assay durchlief, war der Männeranteil mit 83.3% allerdings deutlich größer als der Frauenanteil. Die Kohortendaten zeigten außerdem, dass das *DLBCL* der am häufigsten vorliegende NHL-Typ war (31.6%), gefolgt von dem Follikulären Lymphom (23.7%) und dem Marginalzonenlymphom (21.1%). Diese Verteilung ähnelt, vor allem bezogen auf die Inzidenzen des *DLBCL* und des Follikulären Lymphoms, publizierten Daten für Westeuropa und Amerika [5].

Die Therapie der NHL wurde durch die Entwicklung monoklonaler anti-*CD20-mAb* revolutioniert [27]. Dem Typ-1-*mAb* Rituximab kommt seit seiner Entwicklung 1997 in der Therapie der B-Zell-NHL eine tragende Rolle zu [115]. In der Leitlinie der AWMF zur Therapie der CLL wird Rituximab als integraler Therapiebestandteil empfohlen und auch in der Therapie des Follikulären Lymphoms wird Rituximab eingesetzt [27, 116]. Der Antikörper entfaltet seine Wirkung über die Bindung an sein Epitop, *CD20*, das auf den Zielzellen vorhanden ist. Die opsonisierte

Zelle wird über den *FcγRIII* der NK-Zellen erkannt, wodurch *ADCC* initiiert wird [117, 118].

Durch die Verteilung des Oberflächenmarkers, welcher auf reifen B-Zellen und den meisten B-Zell-NHL vorhanden ist, aber auf differenzierten Plasmazellen sowie blutbildenden Stammzellen fehlt, besitzt der *mAb* eine große Spezifität in der Markierung der Zielzellen [119]. Durch die Kombination aus effektiver Depletion der Zielzellen unter Schonung des sensiblen hämatopoetischen Systems wurden signifikante Fortschritte in der Therapie der B-Zell-NHL erzielt: Coiffer et al. verglichen in einer randomisierten Kohortenstudie die Therapieschemata CHOP plus Rituximab und CHOP ohne Rituximab [120]. Die Autoren fanden eine signifikant höhere *complete response*-Rate in der Kohorte, welche R-CHOP erhalten hatte (76%) gegenüber der Kohorte, welche das konventionelle Chemotherapie-Regime CHOP erhielt (63%). Die Überlegenheit der antikörperbasierten Therapie wurde darüber hinaus in einer Langzeitstudie über 10 Jahre bestätigen [121].

Die in klinischen Studien nachgewiesene wirksame Depletion der Zielzellen durch anti-*CD20-mAb* wurde in dieser Arbeit nachvollzogen: Im CFDA-SE-Assay, in dem die Effektivität der Zielzelledepletion durchflusszytometrisch bestimmt wird, wurde gegenüber unmarkierten Raji durch Zugabe von Rituximab eine signifikante Zunahme der spezifischen induzierten Apoptose der Zielzellen erreicht. Der Anteil der CFSE⁺PI⁺ Zielzellen bewegte sich dabei auf einem Niveau vergleichbar zu der verwendeten Positivkontrolle K562, die ein natürliches Ziel für NK-Zellen abgibt [122].

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche zeigten darüber hinaus, dass durch Markierung der Raji mit dem Typ-2-*mAb* Obinutuzumab die Depletion der Zielzellen nicht nur gegenüber unmarkierten Raji und K562, sondern auch gegenüber Rituximab-markierten Raji signifikant gesteigert wurde. Reddy et al. zeigten ebenfalls eine Überlegenheit von Obinutuzumab gegenüber Rituximab in Patienten mit Rheumatoider Arthritis und systemischem Lupus erythematoses. Die Autoren demonstrierten eine signifikant bessere B-Zell-Depletion in Vollblut-Proben sowie eine signifikant stärkere *ADCC*-induktion durch Obinutuzumab verglichen mit Rituximab, dessen Wirkung durch *CDC* geprägt war [123]. Darüber hinaus beschrieben sie eine signifikant höhere spezifische Aktivität, gemessen über den *CD107a*-Assay, in Obinutuzumab-stimulierten NK-Zellen gegenüber Rituximab.

Die Beobachtung der Autoren deckt sich mit den Beobachtungen, die in dieser Arbeit gemacht wurden: Es wurde gezeigt, dass sowohl Obinutuzumab als auch

Rituximab zu einer verstärkten NK-Zell-Aktivierung führten und dass die Aktivitätssteigerung in Obinutuzumab-stimulierten Proben signifikant größer war als in Rituximab-markierten Proben. Durch die Differenzierung der NK-Zellen in *CD56*-Subpopulationen wurden in dieser Arbeit darüber hinaus signifikant höhere Aktivitätswerte in der *CD56^{dim}*-Population nach Stimulation mit Obinutuzumab, verglichen mit Rituximab, gefunden - ein Ergebnis, das nach bestem Wissen zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Dissertationsschrift noch nicht publiziert wurde.

In einer Studie, in der der prä-klinische *mAb* LFR-R603 untersucht wurde, demonstrierten Le Garff-Tavernier et al. ebenfalls eine stärkere Aktivierung der NK-Zellen [124].

Obinutuzumab und LFB-R603 gehören beide zur dritten Generation der monoklonalen anti-*CD20-mAb*. Als Vertreter der Typ-2-*mAb* besitzen sie einen glykosylierten *Fc*-Teil, über welchen die Affinität zum NK-Zell-Rezeptor *FcγRIII* gesteigert wird [109]. Neben dem glykosylierten *Fc*-Teil besitzt Obinutuzumab weitere Merkmale, die gegenüber Rituximab zu einem verstärkten *ADCC* führen: Es wurde bereits gezeigt, dass Typ-1-*mAb* wie Rituximab durch die Bindung an *CD20* eine Modulation des Oberflächenmarkers verursachen, die zu einer verstärkten Internalisierung des Komplexes aus *CD20* und *mAb* durch die B-Zelle führt [97]. Darüber hinaus wurde demonstriert, dass der Komplementfaktor C3b an die *Fc*-Domäne des Typ-1-*mAb* binden kann und die Bindungsstelle des NK-Zell-Rezeptors *FcγRIII* blockiert, wodurch die Erkennung des Antikörpers durch die NK-Zelle verhindert wird [125]. Da diese Einschränkungen die NK-Zell-Seite betreffen, stellen sie Erklärungen für die gefundenen Unterschiede in der Aktivierbarkeit der NK-Zellen durch die *mAb* Rituximab und Obinutuzumab dar.

Eine weitere Erklärung für die Überlegenheit des Typ-2-*mAb*, welche nur auf den CFDA-SE-Assay anwendbar ist, ist die Fähigkeit von Obinutuzumab, *DCD* Caspase-unabhängig zu initiieren [109]. Verstärktes, Caspase-unabhängiges *DCD* basiert auf der Wirkung von Antikörperfragmenten, (*F(ab)*'2), deren *Fc*-Teil durch Proteasen entfernt wurde [126]. Inwiefern dieser Mechanismus auch in der experimentellen Umgebung dieser Arbeit eine Rolle spielt, bleibt jedoch unklar.

In dieser Arbeit wurde außerdem die Produktion von TNF- α und IFN- γ in NK-Zellen überprüft, welche einen signifikanten Anteil der Immunantwort der NK-Zellen ausmacht [127-129]. Neben den regulatorischen Mechanismen der Zytokine auf die

körpereigene Immunantwort wurde eine modulatorische und verstärkende Wirkung auf die zytotoxische Funktion der NK-Zellen über den Komplex aus *ICAM-1* und *LFA-1* nachgewiesen [49]. Saga et al. zeigten außerdem, dass eine verminderte Expression von *ICAM-1* in Tumorzellen die NK-Zell-Antwort signifikant beeinträchtigte [130].

Die Betrachtung der TNF- α und IFN- γ -Produktion der NK-Zellen ist darüber hinaus von entscheidender Bedeutung, da für andere Erkrankungen des hämatopoetischen Systems bereits NK-Zellen beschrieben wurden, welche im *CD107a*-Assay zwar eine Aktivitätssteigerung zeigten, diese aber nicht mit gesteigerten IFN- γ -Werten oder einer Steigerung der zytotoxischen Funktion einherging [131-133].

In der untersuchten Kohorte waren der Anteil IFN- γ - und TNF- α -produzierender NK-Zellen gegen antikörpermarkierte Ziele signifikant größer als gegen unmarkierte Ziele, somit wurde weder im CFDA-SE-Assay noch in den Assays zur Analyse der Zytokinproduktion eine generelle Defizienz der Zytotoxizität festgestellt. Hervorzuheben ist allerdings, dass trotz der signifikanten Überlegenheit von Obinutuzumab gegenüber Rituximab im *CD107a*-Assay kein statistischer Unterschied zwischen den Antikörpern in der spezifischen IFN- γ -Produktion gefunden wurde. Dieses Ergebnis kollidiert mit den Ergebnissen vorheriger Studien, in denen eine Assoziation zwischen verstärkter IFN- γ -Produktion und Obinutuzumab gezeigt wurde [94]. Die Autoren verwendeten allerdings NK-Zellen gesunder Probanden, welche zusätzlich im Vorfeld der Versuche expandiert wurden, und eine Verstärkung der zytotoxischen Kapazität durch Expansion wurde bereits demonstriert, wodurch die verstärkte IFN- γ -Produktion erklärt werden kann [134].

Darüber hinaus wurde gezeigt, dass ein signifikant größerer Anteil der Patienten-NK-Zellen auf Obinutuzumab mit einer TNF- α -Produktion antwortete, als auf Rituximab. Dieser Zusammenhang bestand in der Kontrollkohorte nicht; hier führten beide *mAb* zu ähnlichen Ergebnissen. Die Internalisierung des Komplexes aus *CD20* und Typ-1-*mAb*, explizit für Rituximab und auch die verwendete Raji-Zelllinie beschrieben ist, bietet einen Erklärungsansatz für den beobachteten Unterschied in der TNF- α -Produktion [97, 135, 136]. Darüber hinaus ist möglich, dass dem *Disarming* ähnliche Gewöhnungseffekte zu den Unterschieden beitragen [83]: Auf der Basis der Rituximab-Dauertherapie kann eine Überstimulation der NK-Zellen resultieren, die zu einem Funktionsverlust führt. Insbesondere vor dem Hintergrund, dass 84.2% der eingebundenen Patienten im Vorfeld der Arbeit mit Rituximab therapiert wurden, muss diese Möglichkeit in Betracht gezogen werden. Die Differenz der TNF- α -Produktion

bietet daher – neben der beobachteten Verstärkung des *ADCC* – eine Erklärung für die klinische Überlegenheit von Obinutuzumab.

Die zytotoxische Funktion der NK-Zellen (CFDA-SE-Assay), ihre Aktivität (*CD107a*-Assay) und ihre Zytokinproduktion (TNF- α - und IFN- γ -Assays) waren in der Patientenkohorte gegenüber der Kontrollkohorte signifikant vermindert. Mehrere Studien demonstrierten bereits, dass Patienten-NK-Zellen im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine verminderte zytotoxische Potenz aufweisen: Katrinakis et al. und Ziegler et al. beobachteten eine deutlich reduzierte zytotoxische Aktivität der NK-Zellen von CLL-Patienten gegen die Zellreihe K562, während die Untersuchung neu diagnostizierter *DLBCL* eine Abnahme der zytotoxischen NK-Zell-Funktion über 12 Monate zeigte [132, 133, 137]. Neben der CLL wurde außerdem für das myelodysplastische Syndrom ein Zusammenhang der Erkrankung mit einer herabgesetzten zytotoxischen Potenz der NK-Zellen nachgewiesen und es wurden Assoziationen zwischen der Multiplen Sklerose und einer NK-Zell-Defizienz aufgedeckt [131, 138].

CLL-Patienten machten mit 18.4% in der Gesamtkohorte und 33.3% sowie 18.5% in den Zytotoxizitäts- und Funktions-Assays einen überschaubaren Anteil der eingebundenen Patienten aus. Vor diesem Hintergrund ist eine alleinige Erklärung der Beobachtungen über den Faktor der CLL nicht möglich. Darüber hinaus traf der durch Hejazi et al. beschriebene Zusammenhang zwischen unauffälliger *CD107a*-Aktivität bei herabgesetzter Zytotoxizität, welcher durch einen verringerten Perforingehalt der Granula verursacht wurde, auf die Beobachtungen in dieser Arbeit nicht zu; die Patientenzellen in dieser Arbeit wiesen eine ausgeprägte Zytotoxizität auf, obgleich diese geringer war als in der Kontrollkohorte [131]. Für die Krankheitsgruppe der NHL muss insbesondere vor dem Hintergrund der gezeigten Differenzen zwischen Patienten- und Kontrollkohorte sowie bestehenden NK-Zell-Defizienzen in anderen Erkrankungen die Möglichkeit einer insgesamt herabgesetzten NK-Zell-Funktionalität in NHL diskutiert werden und soll als Ziel für weitere Arbeiten dienen.

Die *CD56^{dim}*-Population der NHL-Patienten zeigte in den *CD107a*-, TNF- α - und IFN- γ -Assays gegenüber den Kontrollproben signifikant schlechtere Ergebnisse. Eine Reduktion der IFN- γ -Produktion durch *CD56^{dim}* als Ausdruck eingeschränkter NK-Zell-Funktionalität wurde bereits in HIV-Patienten und Patienten mit multipler Sklerose nachgewiesen [138, 139]. Darüber hinaus zeigten Tahrili et al. eine signifikante Assoziation zwischen verminderten TNF- α -Werten und einer geringeren Zytotoxizität

[138]. Auch für das Krankheitsbild *DLBCL* wurden signifikant niedrigere *CD107a*-Werte der *CD56^{dim}* in Patienten gezeigt [140]. Während Danielou-Lazareth et al. ebenfalls im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant geringere *CD107a*-Werte in Patienten mit *de novo* Lymphom nach Lungentransplantation zeigten, wurde in der Studie nicht weiter zwischen den *CD56*-Populationen differenziert [141]. Darüber hinaus fanden die Autoren keine signifikante Differenz in TNF- α - und INF- γ -Produktion zwischen Patienten und Kontrollen.

Dies steht im Kontrast zu den Ergebnissen dieser Arbeit: Es wurde gezeigt, dass eine signifikant eingeschränkte *CD56^{dim}*-Funktionalität in NHL-Patienten vorliegt und dies mit einer verminderten Produktion von TNF- α und IFN- γ einhergeht. Durch Anwendung des Typ-2-Antikörpers Obinutuzumab wurden die Ergebnisse zwar signifikant verbessert, die Differenz aber letztlich nicht überkommen. Dieser Zusammenhang wurde nach bestem Wissen des Autors bislang nicht dokumentiert und stellt somit eine zentrale Erkenntnis dieser Arbeit dar.

Die *CD56^{bright}*-Populationen der Patienten schnitten verglichen mit den Kontrollen ebenfalls signifikant schlechter in der IFN- γ -Produktion sowie der spezifischen, über *CD107a* gemessenen Aktivität ab. Die Ergebnisse des TNF- α -Assays unterschieden sich jedoch nicht signifikant zwischen den Kohorten. Eine Studie, die die Zusammensetzung und Funktionsfähigkeit der NK-Zell-Populationen in Patienten mit aplastischer Anämie untersuchte, kam zu ähnlichen Ergebnissen [142]. Als mögliche Erklärung der unterschiedlichen Produktionsraten der Zytokine wurden bereits epigenetische Veränderungen im Rahmen chronischer Infektionen postuliert [143]. Ob es allerdings auch im Rahmen eines NHL zu epigenetischen Veränderungen in den *CD56^{bright}* kommt, die in einer reduzierten Produktion von IFN- γ bei erhaltener TNF- α -Produktion münden, bleibt ungeklärt.

Des Weiteren zeigte die Analyse der *CD56*-Populationen, dass sowohl *CD56^{dim}* als auch *CD56^{bright}* in Patienten und Kontrollen durch antikörpermarkierte Raji signifikant besser aktiviert wurden, als durch unmarkierte Raji. Die Aktivierung der *CD56^{bright}* ist hervorzuheben, da sie eine wesentlich geringere Expressionsdichte des Antikörperrezeptors *Fc γ RIIR* aufweisen als *CD56^{dim}* und somit keine wesentliche Aktivierung der Population zu erwarten war [37, 39, 144]. Die Ergebnisse zeigen indes, dass auch die *CD56^{bright}*-Population durch *mAb* aktivierbar war und an der NK-Zell-Antwort teilnahm. Daher deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass der

therapeutische Effekt der anti-*CD20-mAb* zumindest partiell durch eine Einbeziehung der *CD56^{bright}*-Population in die NK-Zell-Antwort bedingt ist.

Der direkte Vergleich der *CD56*-Populationen zeigte allerdings auch, dass während die Populationen nach Stimulation durch Raji + Rituximab gleichauf lagen, Obinutuzumab zu einer signifikant größeren Aktivität und Zytokinproduktion der *CD56^{dim}* führte, weswegen der Großteil der NK-Zell-Funktion auf die *CD56^{dim}*-Population zurückgeführt wird.

Das schlechtere Abschneiden der Patientenproben gegenüber Kontrollen wurde in *CD56^{bright}* unabhängig der Zielzelle und weder in *CD107a*-Werten, noch in den Ergebnissen des TNF- α -Assays beobachtet. Lediglich die IFN- γ -Produktion der *CD56^{bright}* war in den Patienten verglichen mit den Kontrollen signifikant limitiert. Das Ergebnis, dass die Funktionseinschränkung in *CD56^{bright}* weniger stark ausgeprägt war als in *CD56^{dim}* bekräftigen den Schluss, dass auch *CD56^{bright}* für einen signifikanten Anteil der NK-Zell-Antwort auf *mAb* verantwortlich sind. Da bereits gezeigt wurde, dass *CD56^{bright}* bei adäquater Stimulation die *CD16*-Expression heraufregulieren, bieten sie in Zusammenschau mit den Ergebnissen dieser Arbeit einen Ansatzpunkt für eine weitere Verbesserung der *mAb*-Therapie [145, 146].

Im Vorfeld der *KIR*- und *NKG2A*-populationsbasierten Analysen der NK-Zell-Funktion wurden die HLA-C- und *KIR*-Genotypen der Patienten- und Kontrollproben ermittelt, um einerseits die externe Validität der Arbeit zu überprüfen und andererseits eine tiefgreifende Interpretation der Messwerte zu ermöglichen. Eine Reihe von Studien zeigte bereits Zusammenhänge zwischen der inhibitorischen Potenz der diversen *KIR*-Expressionsmuster, resultierend aus der Kombination der HLA-C- und *KIR*-Genotypen der NK-Zellen [57, 71, 147]. Zusammengefasst zeigten die Ergebnisse, dass die inhibitorische Potenz des *KIR3DL1* die der *KIR2DL*-Typen übertrifft und dass die *KIR2DL1* und *KIR2DL2* eine stärkere Inhibition der NK-Zellen verursachen, als *KIR2DL3* [147] [71]. Ahlenstiel et al. demonstrierten in diesem Zusammenhang, dass eine geringere inhibitorische Potenz der HLA-*KIR*-Kombination mit einer gesteigerten Reaktionsfreudigkeit der NK-Zellen einhergeht [147].

Die Untersuchung der Verteilung der HLA-C-Genotypen in der Gesamtkohorte offenbarte eine hohe Frequenz der HLA-Genotypen mit mindestens einem C1-Allel: 44.6% besaßen den heterozygoten HLA-Genotyp C1/C2 und 38.3% waren homozygote C1-Träger. Diese Ergebnisse reflektieren die räumliche Verteilung der HLA-C-Genotypen in Westeuropa, wo die C1-Frequenz deutlich über der C2-Frequenz

liegt [148]. Auch die Verteilung der *KIR*-Genotypgruppen mit einer hohen Frequenz der AA und AB-Genotypen entsprach in etwa derer, die bereits in Westeuropa gezeigt wurde [69, 149]. Darüber hinaus ähnelten die Frequenzen der numerischen *KIR*-Genotypen der Gesamtkohorte bereits publizierten Daten für den Raum Düsseldorf: Uhrberg et al. zeigten 2002 in 268 Proben, dass die Frequenzen der *KIR*-Genotypen 1 und 3 addiert bei etwa 56% lagen [69]. In dieser Arbeit machten die *KIR*-Genotypen 1 und 3 – insbesondere aufgrund der hohen Frequenz des *KIR*-Genotyps 1 – 57.4% der Proben aus.

Die mittlere Zytokinproduktion übertraf in Proben des *KIR*-Genotyps 1 die des *KIR*-Genotyps 3, allerdings zeigte lediglich der Vergleich für IFN- γ gegen Rituximab-markierte Zellen einen Trend zur Signifikanz der Ergebnisse. Die geringe Signifikanz trotz der beachtlichen Mittelwertunterschiede ist auf die Streuung der Messergebnisse in *KIR*-Genotyp 3 zurückzuführen, die aufgrund der geringen Probenzahl ($n = 4$) nicht kompensiert wurde.

Der Aspekt der verstärkten Zytokinproduktion in den untersuchten Proben des *KIR*-Genotyps 1 ist durch unterschiedliche Affinitäten der *KIR* zu ihren jeweiligen HLA-C-Liganden erklärbar. Hierbei spielen zwei Faktoren der Kombination aus HLA und *KIR* eine wichtige Rolle: Einerseits benötigen *KIR*-tragende NK-Zellen nach dem Modell des *Licensing* den passenden Liganden, um ihre zytotoxische Potenz zu erhalten [80]. Andererseits zeigen die Bindungen zwischen HLA und *KIR* verschiedene Affinitäten, die in einer ungleich starken Inhibition der NK-Zell-Antwort je nach Kombination aus Rezeptor und Ligand resultieren [71, 147].

KIR-Genotyp 1 fehlt der Genabschnitt, der den inhibitorischen *KIR2DL2* kodiert und 66.7% der *KIR*-Genotyp 1-Proben besaßen den HLA-C-Genotyp C1/C1, welcher das passende Epitop für *KIR2DL3* und *KIR2DL2* darstellt. Durch die Abwesenheit des *KIR2DL2*, beschränkt sich die Interaktion zwischen HLA-C1 und inhibitorischem *KIR* in diesen Proben auf die Kombination aus HLA-C1 und *KIR2DL3*, der eine signifikant schwächere inhibitorische Potenz verglichen mit anderen *KIR*-HLA-Kombinationen zugesprochen wird [71, 147].

KIR-Genotyp 3 hingegen ist dadurch gekennzeichnet, dass er neben *KIR2DL1* und *KIR2DL3* auch *KIR2DL2* trägt [69]. Die Proben des *KIR*-Genotyps 3 besaßen darüber hinaus zu 75% den HLA-C-Genotyp C1/C2. Somit wurden die NK-Zellen dieses *KIR*-Genotyps durch die drei inhibitorischen Typen des *KIR2DL* effektiv inhibiert. Aus den Zusammenhängen der *KIR*-HLA-C-Kombination resultiert eine potentiell stärkere Stimulation der *KIR*-Genotyp 1-Proben [71, 147]. Aufgrund der fehlenden statistischen

Signifikanz der Daten bleibt die Erklärung der beobachteten Unterschiede jedoch letztlich unbelegt.

Sowohl in *KIR*-Genotyp 1 als auch in *KIR*-Genotyp 3 wurde gezeigt, dass NK-Zellen auf antikörpermarkierte Ziele mit signifikant größerer Aktivität (*CD107a*) und Zytokinproduktion ($\text{IFN-}\gamma$) reagieren, als auf unmarkierte Ziele. Hervorzuheben ist, dass auch die Unterschiede zwischen den beiden therapeutischen Antikörpern für den Aktivitätsmarker *CD107a* signifikant waren.

Während in *KIR*-Genotyp 1 der Vergleich der antikörpermarkierten und unmarkierten Proben signifikant war, waren die Unterschiede zwischen Raji + Rituximab und Raji + Obinutuzumab nicht signifikant. Im $\text{TNF-}\alpha$ -Assay zeigten die Proben des *KIR*-Genotyps 3 gegen antikörpermarkierte Ziele einen Trend zu einer verstärkten Zytokinproduktion. Ebenfalls zeigte sich ein Trend zu einer verstärkten $\text{TNF-}\alpha$ -Produktion in Raji + Obinutuzumab verglichen mit Raji + Rituximab.

In Granulozyten wurde bereits gezeigt, dass Obinutuzumab verglichen mit Rituximab eine verstärkte $\text{TNF-}\alpha$ -Produktion induziert [150]. In Monozyten wurde hingegen eine signifikant stärkere $\text{TNF-}\alpha$ -Produktion unter Rituximab-Stimulation gezeigt [151]. Awasthi et al. demonstrierten in Obinutuzumab-stimulierten NK-Zellen zwar eine verstärkte Zytokinproduktion, allerdings wurde $\text{TNF-}\alpha$ in der Untersuchung nicht berücksichtigt [94].

Da in dieser Arbeit *KIR*-Genotyp 3 einen Trend zu einer erhöhten $\text{TNF-}\alpha$ -Produktion gegen Obinutuzumab-markierte Proben zeigte, wird dies als Hinweis darauf gedeutet, dass Obinutuzumab partiell dazu in der Lage ist, die stärkere *KIR*-basierte Inhibition der NK-Zellen zu überkommen.

Anhand der Expressionsmuster inhibitorischer Rezeptoren lassen sich diverse NK-Zell-Populationen innerhalb einzelner Individuen identifizieren [68]. In dieser Arbeit wurden die Populationen NKG2A^+ , KIR2DL1^+ und KIR2DL2/3^+ gesondert betrachtet und darüber hinaus die *triple negative*-Population identifiziert, die keinen der drei untersuchten inhibitorischen Rezeptoren trug. Hierbei ist zu beachten, dass die *triple negative*-Population durchaus reife NK-Zellen mit einem weiteren inhibitorischen *KIR* – *KIR3DL1* – enthält und somit aufgrund des *Licensings* eine zytotoxische Funktion erwarten lässt [152].

Bei NKG2A handelt es sich um den inhibitorischen Rezeptor, der bereits durch NK-Zellen exprimiert wird, welche sich in frühen Stadien der NK-Zell-Reifung befinden

und ein Großteil der NK-Zellen verliert NKG2A im Verlaufe der Lizenzierung [58]. *KIR2DL1* und *KIR2DL2/3* werden hingegen erst im Verlauf der Reifung exprimiert und nehmen über die Erkennung von HLA-C1 und HLA-C2 an der NK-Zell-Regulation teil [153]. Zwischen diesen zwei Polen findet sich ein breites Spektrum an NK-Zellen mit unterschiedlichen Expressionsdichten von NKG2A und *KIR*. Bei den betrachteten Populationen handelt es sich also um unreifere, NKG2A⁺ NK-Zellen und reifere, *KIR*⁺ NK-Zell-Populationen.

Sämtliche betrachteten NK-Zell-Populationen wurden durch antikörpermarkierte Zielzellen stärker aktiviert als durch unmarkierte Zielzellen. Zwischen den spezifischen populationsbezogenen Aktivitäten, evoziert durch die unterschiedlichen *mAb*, ergaben sich Unterschiede: Während sowohl NKG2A⁺, *KIR2DL1*⁺ als auch *triple negative* signifikant besser durch Obinutuzumab angesprochen wurden als durch Rituximab, wurde für die Population *KIR2DL2/3*⁺ kein signifikanter Unterschied festgestellt. Ungleichheiten der Aktivierbarkeit *KIR*-spezifischer NK-Zellpopulationen durch unterschiedliche therapeutische *mAb* wurden bislang nicht beobachtet und stellen somit eine wichtige Erkenntnis dar.

Als Erklärung sind auch hier die HLA-C-Frequenzen der limitierten Kohorte in Betracht zu ziehen: Da *KIR2DL2/3*⁺ durch HLA-C1 inhibiert werden und die HLA-Genotypen C1/C1 und C1/C2 mit jeweils 8 von 18 Proben in dem Großteil der Kohorte vertreten waren, ist eine verminderte Aktivität der *KIR2DL2/3*⁺-Population naheliegend [71, 147]. Darüber hinaus verglichen Lisovsky et al. in einer Studie verschiedene NK-Zell-Populationen hinsichtlich ihrer IgG-induzierten *Education* [154]. Die Autoren differenzierten dabei zwischen *KIR2DL3*⁺, welche von Spendern mit HLA-Genotyp-C2/C2 stammten, und *KIR2DL3*⁺ von Spendern mit HLA-C1/C1. Verglichen mit anderen *KIR* zeigte die *KIR2DL3*⁺-Population zwischen Spendern mit HLA-C1/C1 und HLA-C2/C2 keine relevante IgG-induzierte *Education*. Somit ist zu diskutieren, ob die fehlende Verbesserung der Ergebnisse der *KIR2DL2/3*⁺ in dieser Arbeit ebenfalls auf eine geringere antikörperinduzierte *Education* zurückzuführen ist.

Die Aktivität der *triple negative*-Population war sowohl in der Patienten- als auch in der Kontrollkohorte größer als die der *KIR2DL1*⁺ und *KIR2DL2/3*⁺-Population. Wie zuvor beschrieben ist davon auszugehen, dass die *triple negative*-Population NK-Zellen der Kombinationen sämtlicher übriger *KIR*, inklusive des inhibitorischen *KIR3DL1*⁺, dessen Ligand, HLA-Bw4, ca. in 40% der Bevölkerung vorhanden ist, enthielt [155]. Aufgrund einer hohen Variabilität des HLA-Bw4 sowie *KIR3DL1*⁺-Polymorphismen

lässt sich die inhibitorische Potenz – insbesondere in Anbetracht dessen, dass die HLA-Bw4-Typen und deren Frequenzen in dieser Arbeit nicht ermittelt wurden – nicht eingrenzen [156-158]. Uhrberg et al. fanden allerdings in einer vergleichbaren Population HLA-Bw4 in 95% der Teilnehmer, was eine effektives *Licensing* der KIR3DL1⁺-Population bei unklarer inhibitorischer Potenz der Rezeptor-Ligand-Kombination nahelegt und als Erklärung für die Aktivität der *triple negative* dient [69].

Die Proben der Ausreißer 1-4 wurden an unterschiedlichen Tagen bearbeitet, sodass ein methodischer Fehler als Grund für die beobachtete, eingeschränkte Aktivität unwahrscheinlich ist. Unter den Ausreißern 1-3 mit signifikant herabgesetzter NK-Zell-Aktivität befanden sich zwei Patienten mit *DLBCL* und ein Patient mit *CLL*. Für beide dieser Erkrankungen wurde bereits in einzelnen Fällen über eine eingeschränkte NK-Zell-Funktionalität berichtet [131, 138] [141]. Die Ausreißer 2 und 3 zeigten gegen Obinutuzumab-markierte Zielzellen, verglichen Raji + Rituximab, keine Aktivitätssteigerung. Als Gemeinsamkeit zeigten Ausreißer 1 und 2 eine niedrige Frequenz der NKG2A⁺-Population, welche in den Analysen der limitierten Kohorte – neben *triple negative* – als wichtigster Effektor identifiziert wurde. Das *Licensing*-Modell nach Kim et al. legt als Erklärung hierfür eine geringe *Education* der NKG2A⁺-Population nahe [80].

Neben der niedrigen gemessenen Aktivität unterschied sich in den Ausreißern 1 und 2 die NK-Zell-Aktivität nicht zwischen den angewendeten therapeutischen *mAb*. Da eine Internalisierung des Komplexes aus *CD20* und *mAb* sowie eine komplementbedingte Verlegung der *Fc*-Domäne bei Obinutuzumab nicht zu erwarten sind, bleiben mögliche zugrundeliegende Resistenzmechanismen unklar [125, 159, 160]. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass es trotz der bestätigten, guten Wirksamkeit der Antikörpertherapie keine Garantie für einen Therapieerfolg gibt und auch bei Obinutuzumab mögliche Resistenzentwicklungen in Betracht zu ziehen sind. Während die NKG2A⁺-Population in Ausreißer 3 einen Großteil der NK-Zellen ausmachte, wurde sie durch keinen der *mAb* aktiviert. Auch in diesem Fall sind zugrundeliegende, unbekannte Resistenzmechanismen, die über die zuvor genannten Mechanismen hinausgehen, zu diskutieren.

In Ausreißer 4 war der Anteil der CD56^{bright} gegenüber der restlichen Kohorte drastisch erhöht. Während die Aktivität und Zytokinproduktion der CD56^{dim} sich auf einem ähnlichen Niveau wie in den restlichen Patientenproben bewegte, unterschritt der Anteil zytokinproduzierender CD56^{bright} die zweite Standardabweichung gegenüber der

restlichen Patientenkohorte. Für andere hämatologische Erkrankungen wurde bereits von einer signifikanten Erhöhung der CD56^{bright}-Frequenz berichtet, welche allerdings nicht mit einer Einschränkung der Zytokinproduktion einherging [161]. Wahrscheinlicher erscheint dagegen ein erhöhter therapiebedingter NK-Zell-Umsatz, da unreife NK-Zellen, welche noch keine Lizenzierung durchlaufen haben, geringere Mengen TNF- α und IFN- γ produzieren [80, 162].

Diese Arbeit hat Limitationen. Die Übertragbarkeit der in-vitro Ergebnisse auf eine in-vivo Situation ist, wie in allen in-vitro Studien, begrenzt. Das experimentelle Effektor-Zielzell-Verhältnis von 10:1 liegt weit über dem in-vivo zu erwartenden Verhältnis, wo NK-Zellen circa 10% der peripheren *MNCs* ausmachen [37, 92]. Das Ziel dieser Studie war allerdings nicht, realitätsnahe in-vivo Bedingungen nachzuempfinden, sondern mögliche Unterschiede zwischen den therapeutischen *mAb* Rituximab und Obinutuzumab herauszuarbeiten und Unterschiede zwischen Patienten- und Kontrollkohorte sowie NK-Zell-Populationen zu identifizieren.

CDC, welches insbesondere in Typ-1-*mAb* für einen Teil der Wirkung verantwortlich ist, wurde in den durchgeführten Untersuchungen nicht gesondert betrachtet. Jedoch wurde bereits gezeigt, dass *CDC* in vivo nur einen geringen Anteil der *mAb*-Wirkung ausmacht [109, 163]. Die Zellen wurden außerdem vor den Versuchen von dem komplementhaltigen Serum getrennt und zahlreichen Waschvorgängen unterzogen, sodass von einer sehr geringen Konzentration der Komplemente auszugehen ist. Daher ist eine starke Beeinflussung der Testergebnisse durch *CDC* unwahrscheinlich.

Eine weitere Limitation war die Kohortengröße, welche mit 38 Patienten und neun Kontrollen relativ gering war. Die hauptsächlich limitierenden Faktoren waren die geringe Prävalenz und Inzidenz der Erkrankung. Darüber hinaus lehnten einige Patienten eine Teilnahme an der Studie ab, wodurch die Kohortengröße weiter reduziert wurde. Trotz dieser Limitation wurde mittels der HLA-C- und KIR-Typisierungen sowie der Alters- und Geschlechtsverteilung verdeutlicht, dass die untersuchte Kohorte mit der Bevölkerung vergleichbar ist.

Vor den durchgeführten Versuchen wurden die NK-Zellen nicht mittels *Cell sorting* isoliert, daher ist ein Einfluss der übrigen *MNCs*, basierend auf einem schwankenden Effektor-Zielzell-Verhältnis und HLA-Expression, auf die Versuche nicht auszuschließen. Hingegen scheint für die HLA-Expression in Anbetracht der diskutierten Ergebnisse ein Einfluss sogar wahrscheinlich. Allerdings sind in-vivo Situationen durch körpereigener *MNCs* und schwankende NK-Zell-Konzentrationen geprägt, daher hätte

das *Cell Sorting* nur auf Kosten der externen Validität zu konstanteren Ergebnissen führen können. Um den Einfluss der übrigen *MNCs* auf die NK-Zell-Aktivierung zu limitieren, erfolgte außerdem die *mAb*-Markierung der Zielzellen Versuchsbeginn und die Zielzellen wurden anschließend gewaschen, um überschüssige Anteile der *mAbs* zu entfernen. Daher ist von einer geringen *MNC*-bedingten Aktivierung der NK-Zellen auszugehen.

Schlussfolgernd wurde in den durchgeführten Experimenten eine Überlegenheit des Typ-2-Antikörpers Obinutuzumab gegenüber Rituximab in der Bekämpfung der *CD20⁺* Raji-Zellreihe festgestellt. Sowohl in den Analysen der NK-Zell-Aktivität als auch in der Überprüfung der Zytokinproduktion war der Typ-2-Antikörper dabei seinem Vorgänger signifikant überlegen. Eine neue Erkenntnis dieser Arbeit ist, dass die Überlegenheit dabei vor allem auf der verstärkten Reaktion der *CD56^{dim}*-Population basiert. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass auch die *CD56^{bright}*-Population durch *mAbs* in die NK-Zell-Antwort einbezogen wird, was eine stärkere Einbindung der ansonsten für ADCC als hyporeaktiv angesehenen NK-Zell-Population durch die Anwendung monoklonaler Antikörper impliziert. Außerdem wurde demonstriert, dass die Funktion der NK-Zellen in NHL-Patienten gegenüber Kontrollen signifikant eingeschränkt ist und die Unterschiede durch Obinutuzumab reduziert, allerdings nicht gänzlich überwunden werden können. Die Funktionseinschränkung wurde überwiegend in der *CD56^{dim}*-Population gezeigt, welche die Basis der zytotoxischen NK-Zell-Antwort bildet. Auf Ebene der receptorspezifischen NK-Zell-Populationen wurde demonstriert, dass der vorliegende HLA-C-Typ auch in der Ansprechbarkeit der Natürlichen Killerzellen durch monoklonale Antikörper eine entscheidende Rolle zukommt. Insbesondere die *KIR2DL3⁺*-Population zeigte eine am ehesten auf HLA-Inhibition basierende Funktionseinschränkung, die durch Obinutuzumab partiell reversibel erscheint. Abschließend verdeutlichen die identifizierten Ausreißer, dass der individuelle, auf Natürlichen Killerzellen basierende Therapieerfolg auch bei der Verwendung von Obinutuzumab nicht sicher gewährleistet werden kann und die Therapie daher überwacht und, wenn indiziert, reevaluiert werden sollte.

Literaturverzeichnis

1. Shankland KR, Armitage JO, Hancock BW. Non-Hodgkin lymphoma. *Lancet* 2012; 380: 848-857.
2. Jiang M, Bennani NN, Feldman AL. Lymphoma classification update: B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Expert Rev Hematol* 2017; 10: 405-415.
3. Teras LR, DeSantis CE, Cerhan JR, Morton LM, Jemal A, Flowers CR. 2016 US lymphoid malignancy statistics by World Health Organization subtypes. *CA Cancer J Clin* 2016; 66: 443-459.
4. Blood. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood* 1997; 89: 3909-3918.
5. Anderson JR, Armitage JO, Weisenburger DD. Epidemiology of the non-Hodgkin's lymphomas: distributions of the major subtypes differ by geographic locations. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Ann Oncol* 1998; 9: 717-720.
6. Miranda-Filho A, Pineros M, Znaor A, Marcos-Gragera R, Steliarova-Foucher E, Bray F. Global patterns and trends in the incidence of non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Causes Control* 2019; 30: 489-499.
7. SEER Cancer Statistics Review 1975-2015; Sect. 19, Table 25. vol. 2018. USA: U. S. National Institutes of Health, National Cancer Institute. 2015.
8. Noone AM, Han H, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). SEER Cancer Statistics Review 1975-2015. vol. 2018. USA: U. S. National Institutes of Health, National Cancer Institute. 2015.
9. Jarrett RF. Viruses and lymphoma/leukaemia. *J Pathol* 2006; 208: 176-186.
10. Roman E, Smith AG. Epidemiology of lymphomas. *Histopathology* 2011; 58: 4-14.
11. Smedby KE, Hjalgrim H, Askling J, Chang ET, Gregersen H, Porwit-MacDonald A, et al. Autoimmune and chronic inflammatory disorders and risk of non-Hodgkin lymphoma by subtype. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98: 51-60.
12. Park JB, Koo JS. Helicobacter pylori infection in gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 2751-2759.

13. Anderson LA, Gadalla S, Morton LM, Landgren O, Pfeiffer R, Warren JL, et al. Population-based study of autoimmune conditions and the risk of specific lymphoid malignancies. *Int J Cancer* 2009; 125: 398-405.
14. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 2016; 127: 2375-2390.
15. Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, Smithers DW, Tubiana M. Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. *Cancer Res* 1971; 31: 1860-1861.
16. Herold G. *Innere Medizin*. Köln, Herold 2014.
17. Ansell SM. Non-Hodgkin Lymphoma: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clinic Proceedings* 2015; 90: 1152-1163.
18. Agid R, Sklair-Levy M, Bloom A, Lieberman S, Polliack A, Ben-Yehuda D, et al. CT-guided biopsy with cutting-edge needle for the diagnosis of malignant lymphoma: experience of 267 biopsies. *Clinical radiology* 2003; 58: 143-147.
19. Elstrom R, Guan L, Baker G, Nakhoda K, Vergilio JA, Zhuang H, et al. Utility of FDG-PET scanning in lymphoma by WHO classification. *Blood* 2003; 101: 3875-3876.
20. Shah N, Hoskin P, McMillan A, Gibson P, Lowe J, Wong WL. The impact of FDG positron emission tomography imaging on the management of lymphomas. *Br J Radiol* 2000; 73: 482-487.
21. Shipp. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1993; 329: 987-994.
22. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol* 1982; 5: 649-655.
23. Glass AG, Karnell LH, Menck HR. The National Cancer Data Base report on non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer* 1997; 80: 2311-2320.
24. Chen Q, Ayer T, Nastoupil LJ, Seward M, Zhang H, Sinha R, et al. Initial management strategies for follicular lymphoma. *Int J Hematol Oncol* 2012; 1: 35-45.
25. Ardeshtna KM, Qian W, Smith P, Braganca N, Lowry L, Patrick P, et al. Rituximab versus a watch-and-wait approach in patients with advanced-stage,

- asymptomatic, non-bulky follicular lymphoma: an open-label randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2014; 15: 424-435.
26. Armitage JO, Longo DL. Is watch and wait still acceptable for patients with low-grade follicular lymphoma? *Blood* 2016; 127: 2804-2808.
 27. Kosmas C, Stamatopoulos K, Stavroyianni N, Tsavaris N, Papadaki T. Anti-CD20-based therapy of B cell lymphoma: state of the art. *Leukemia* 2002; 16: 2004-2015.
 28. Hiddemann W, Kneba M, Dreyling M, Schmitz N, Lengfelder E, Schmits R, et al. Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood* 2005; 106: 3725-3732.
 29. Freedman A. Follicular lymphoma: 2014 update on diagnosis and management. *Am J Hematol* 2014; 89: 429-436.
 30. Vidal L, Gafter-Gvili A, Salles G, Dreyling MH, Ghielmini M, Hsu Schmitz SF, et al. Rituximab maintenance for the treatment of patients with follicular lymphoma: an updated systematic review and meta-analysis of randomized trials. *J Natl Cancer Inst* 2011; 103: 1799-1806.
 31. Chiossone L, Dumas P-Y, Vienne M, Vivier E. Natural killer cells and other innate lymphoid cells in cancer. *Nature Reviews Immunology* 2018; 18: 671-688.
 32. Lanier LL, Chang C, Azuma M, Ruitenberg JJ, Hemperly JJ, Phillips JH. Molecular and functional analysis of human natural killer cell-associated neural cell adhesion molecule (N-CAM/CD56). *J Immunol* 1991; 146: 4421-4426.
 33. Sasca D, Szybinski J, Schüler A, Shah V, Heidelberger J, Haehnel PS, et al. NCAM1 (CD56) promotes leukemogenesis and confers drug resistance in AML. *Blood* 2019; 133: 2305-2319.
 34. Van Acker HH, Capsomidis A, Smits EL, Van Tendeloo VF. CD56 in the Immune System: More Than a Marker for Cytotoxicity? *Front Immunol* 2017; 8: 892.
 35. Bielack SS, Kempf-Bielack B, Delling G, Exner GU, Flege S, Helmke K, et al. Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols. *J Clin Oncol* 2002; 20: 776-790.

36. Lanier LL. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol* 2008; 9: 495-502.
37. Campbell KS, Hasegawa J. Natural killer cell biology: an update and future directions. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 132: 536-544.
38. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56bright subset. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 2001; 97: 3146-3151.
39. Poli A, Michel T, Theresine M, Andres E, Hentges F, Zimmer J. CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology* 2009; 126: 458-465.
40. van der Haar Àvila I, Marmol P, Cany J, Kiessling R, Pico de Coaña Y. Evaluating Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity by Flow Cytometry. In: *Immune Checkpoint Blockade: Methods and Protocols*, Pico de Coaña Y Ed. New York, NY: Springer New York 2019:181-194.
41. Grudzien M, Rapak A. Effect of Natural Compounds on NK Cell Activation. *J Immunol Res* 2018; 2018: 4868417.
42. Lieberman J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 361-370.
43. Pipkin ME, Lieberman J. Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. *Curr Opin Immunol* 2007; 19: 301-308.
44. Chavez-Galan L, Arenas-Del Angel MC, Zenteno E, Chavez R, Lascurain R. Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol Immunol* 2009; 6: 15-25.
45. Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods* 2004; 294: 15-22.
46. Uhrberg M. The CD107 mobilization assay: viable isolation and immunotherapeutic potential of tumor-cytolytic NK cells. *Leukemia* 2005; 19: 707-709.
47. Voskoboinik I, Dunstone MA, Baran K, Whisstock JC, Trapani JA. Perforin: structure, function, and role in human immunopathology. *Immunol Rev* 2010; 235: 35-54.
48. Froelich CJ, Orth K, Turbov J, Seth P, Gottlieb R, Babior B, et al. New paradigm for lymphocyte granule-mediated cytotoxicity target cells bind and internalize

- granzyme B, but an endosomolytic agent is necessary for cytosolic delivery and subsequent apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 1996; 271: 29073-29079.
49. Wang R, Jaw JJ, Stutzman NC, Zou Z, Sun PD. Natural killer cell-produced IFN- γ and TNF- α induce target cell cytolysis through up-regulation of ICAM-1. *J Leukoc Biol* 2012; 91: 299-309.
 50. Bryceson YT, March ME, Barber DF, Ljunggren H-G, Long EO. Cytolytic granule polarization and degranulation controlled by different receptors in resting NK cells. *The Journal of experimental medicine* 2005; 202: 1001-1012.
 51. Urlaub D, Hofer K, Muller ML, Watzl C. LFA-1 Activation in NK Cells and Their Subsets: Influence of Receptors, Maturation, and Cytokine Stimulation. *J Immunol* 2017; 198: 1944-1951.
 52. Maciorowski Z, Chattopadhyay PK, Jain P. Basic Multicolor Flow Cytometry. *Curr Protoc Immunol* 2017; 117: 5.4.1-5.4.38.
 53. Quah BJ, Warren HS, Parish CR. Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Nat Protoc* 2007; 2: 2049-2056.
 54. Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc* 2006; 1: 1458-1461.
 55. Karre K. NK cells, MHC class I molecules and the missing self. *Scand J Immunol* 2002; 55: 221-228.
 56. Ljunggren HG, Karre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 1990; 11: 237-244.
 57. Yawata M, Yawata N, Draghi M, Little AM, Partheniou F, Parham P. Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. *J Exp Med* 2006; 203: 633-645.
 58. Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, Soderstrom K, D'Andrea A, Ogg GS, et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 1998; 391: 795-799.
 59. Jongsma MLM, Guarda G, Spaapen RM. The regulatory network behind MHC class I expression. *Molecular Immunology* 2019; 113: 16-21.
 60. Klein J. Seeds of time: fifty years ago Peter A. Gorer discovered the H-2 complex. *Immunogenetics* 1986; 24: 331-338.
 61. Hewitt EW. The MHC class I antigen presentation pathway: strategies for viral immune evasion. *Immunology* 2003; 110: 163-169.

62. Vales-Gomez M, Reyburn H, Strominger J. Molecular analyses of the interactions between human NK receptors and their HLA ligands. *Hum Immunol* 2000; 61: 28-38.
63. Uhrberg M. Shaping the human NK cell repertoire: an epigenetic glance at KIR gene regulation. *Mol Immunol* 2005; 42: 471-475.
64. Uhrberg M. The KIR gene family: life in the fast lane of evolution. *Eur J Immunol* 2005; 35: 10-15.
65. Carrington M, Martin MP. The impact of variation at the KIR gene cluster on human disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006; 298: 225-257.
66. Wilson MJ, Torkar M, Haude A, Milne S, Jones T, Sheer D, et al. Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 4778-4783.
67. Trowsdale J, Barten R, Haude A, Stewart CA, Beck S, Wilson MJ. The genomic context of natural killer receptor extended gene families. *Immunological reviews* 2001; 181: 20-38.
68. Valiante NM, Uhrberg M, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, Arnett KL, D'Andrea A, et al. Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity* 1997; 7: 739-751.
69. Uhrberg M, Parham P, Wernet P. Definition of gene content for nine common group B haplotypes of the Caucasoid population: KIR haplotypes contain between seven and eleven KIR genes. *Immunogenetics* 2002; 54: 221-229.
70. Colonna M, Borsellino G, Falco M, Ferrara GB, Strominger JL. HLA-C is the inhibitory ligand that determines dominant resistance to lysis by NK1- and NK2-specific natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 12000-12004.
71. Moesta AK, Norman PJ, Yawata M, Yawata N, Gleimer M, Parham P. Synergistic polymorphism at two positions distal to the ligand-binding site makes KIR2DL2 a stronger receptor for HLA-C than KIR2DL3. *J Immunol* 2008; 180: 3969-3979.
72. D'Andrea A, Chang C, Franz-Bacon K, McClanahan T, Phillips JH, Lanier LL. Molecular cloning of NKB1. A natural killer cell receptor for HLA-B allotypes. *J Immunol* 1995; 155: 2306-2310.
73. Vilches C, Rajalingam R, Uhrberg M, Gardiner CM, Young NT, Parham P. KIR2DL5, a novel killer-cell receptor with a D0-D2 configuration of Ig-like domains. *J Immunol* 2000; 164: 5797-5804.

74. Stewart CA, Laugier-Anfossi F, Vely F, Saulquin X, Riedmuller J, Tisserant A, et al. Recognition of peptide-MHC class I complexes by activating killer immunoglobulin-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 13224-13229.
75. Sim MJW, Rajagopalan S, Altmann DM, Boyton RJ, Sun PD, Long EO. Human NK cell receptor KIR2DS4 detects a conserved bacterial epitope presented by HLA-C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019; 116: 12964-12973.
76. Purdy AK, Campbell KS. Natural killer cells and cancer: Regulation by the killer cell Ig-like receptors (KIR). *Cancer Biology & Therapy* 2009; 8: 2209-2218.
77. Uhrberg M, Valiante NM, Shum BP, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, Corliss B, et al. Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity* 1997; 7: 753-763.
78. Fernandez NC, Treiner E, Vance RE, Jamieson AM, Lemieux S, Raulet DH. A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules. *Blood* 2005; 105: 4416-4423.
79. Anfossi N, Andre P, Guia S, Falk CS, Roeytynck S, Stewart CA, et al. Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity* 2006; 25: 331-342.
80. Kim S, Poursine-Laurent J, Truscott SM, Lybarger L, Song YJ, Yang L, et al. Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature* 2005; 436: 709-713.
81. Yokoyama WM, Kim S. How do natural killer cells find self to achieve tolerance? *Immunity* 2006; 24: 249-257.
82. Boudreau JE, Hsu KC. Natural killer cell education in human health and disease. *Curr Opin Immunol* 2018; 50: 102-111.
83. Boudreau JE, Hsu KC. Natural Killer Cell Education and the Response to Infection and Cancer Therapy: Stay Tuned. *Trends Immunol* 2018; 39: 222-239.
84. Schonberg K, Srihar M, Enczmann J, Fischer JC, Uhrberg M. Analyses of HLA-C-specific KIR repertoires in donors with group A and B haplotypes suggest a ligand-instructed model of NK cell receptor acquisition. *Blood* 2011; 117: 98-107.
85. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256: 495-497.

86. Nobelprize.org. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1984. vol. 2018: Nobel Media AB 2014.
87. Padlan EA. Anatomy of the antibody molecule. *Mol Immunol* 1994; 31: 169-217.
88. Villamor N, Montserrat E, Colomer D. Mechanism of action and resistance to monoclonal antibody therapy. *Semin Oncol* 2003; 30: 424-433.
89. Bruggemann M, Winter G, Waldmann H, Neuberger MS. The immunogenicity of chimeric antibodies. *J Exp Med* 1989; 170: 2153-2157.
90. Waldmann H. Human monoclonal antibodies: the residual challenge of antibody immunogenicity. *Methods Mol Biol* 2014; 1060: 1-8.
91. Robertson JS, Chui W-K, Genazzani AA, Malan SF, López de la Rica Manjavacas A, Mignot G, et al. The INN global nomenclature of biological medicines: A continuous challenge. *Biologicals* 2019; 60: 15-23.
92. Murphy KM, Travers P, Walport M. *Janeway Immunologie*. 7. Edition, Springer Spektrum 2009.
93. Davis TA, Czerwinski DK, Levy R. Therapy of B-cell lymphoma with anti-CD20 antibodies can result in the loss of CD20 antigen expression. *Clinical cancer research* 1999; 5: 611-615.
94. Awasthi A, Ayello J, Van de Ven C, Elmacken M, Sabulski A, Barth MJ, et al. Obinutuzumab (GA101) compared to rituximab significantly enhances cell death and antibody-dependent cytotoxicity and improves overall survival against CD20+ rituximab-sensitive/-resistant Burkitt lymphoma (BL) and precursor B-acute lymphoblastic leukaemia (pre-B-ALL): potential targeted therapy in patients with poor risk CD20+ BL and pre-B-ALL. *British Journal of Haematology* 2015; 171: 763-775.
95. Shan D, Ledbetter JA, Press OW. Apoptosis of malignant human B cells by ligation of CD20 with monoclonal antibodies. *Blood* 1998; 91: 1644-1652.
96. Weng WK, Levy R. Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 2003; 21: 3940-3947.
97. Beers SA, French RR, Chan HT, Lim SH, Jarrett TC, Vidal RM, et al. Antigenic modulation limits the efficacy of anti-CD20 antibodies: implications for antibody selection. *Blood* 2010; 115: 5191-5201.

98. Al-Sawaf O, Fischer K, Engelke A, Pflug N, Hallek M, Goede V. Obinutuzumab in chronic lymphocytic leukemia: design, development and place in therapy. *Drug Des Devel Ther* 2017; 11: 295-304.
99. Cheson BD. Ofatumumab, a novel anti-CD20 monoclonal antibody for the treatment of B-cell malignancies. *J Clin Oncol* 2010; 28: 3525-3530.
100. Klein C, Lammens A, Schafer W, Georges G, Schwaiger M, Mossner E, et al. Epitope interactions of monoclonal antibodies targeting CD20 and their relationship to functional properties. *MAbs* 2013; 5: 22-33.
101. Sharman JP, Farber CM, Mahadevan D, Schreeder MT, Brooks HD, Kolibaba KS, et al. Ublituximab (TG-1101), a novel glycoengineered anti-CD20 antibody, in combination with ibrutinib is safe and highly active in patients with relapsed and/or refractory chronic lymphocytic leukaemia: results of a phase 2 trial. *Br J Haematol* 2017; 176: 412-420.
102. Binder M, Otto F, Mertelsmann R, Veelken H, Trepel M. The epitope recognized by rituximab. *Blood* 2006; 108: 1975-1978.
103. van Oers MH. CD20 antibodies: type II to tango? *Blood* 2012; 119: 5061-5063.
104. Chang K, Arber D, Weiss L. CD20: a review. *Applied Immunohistochemistry* 1996; 4: 1-15.
105. Cragg MS, Morgan SM, Chan HT, Morgan BP, Filatov AV, Johnson PW, et al. Complement-mediated lysis by anti-CD20 mAb correlates with segregation into lipid rafts. *Blood* 2003; 101: 1045-1052.
106. Lee HZ, Miller BW, Kwitkowski VE, Ricci S, DelValle P, Saber H, et al. U.S. Food and drug administration approval: obinutuzumab in combination with chlorambucil for the treatment of previously untreated chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 2014; 20: 3902-3907.
107. Alduaij W, Ivanov A, Honeychurch J, Cheadle EJ, Potluri S, Lim SH, et al. Novel type II anti-CD20 monoclonal antibody (GA101) evokes homotypic adhesion and actin-dependent, lysosome-mediated cell death in B-cell malignancies. *Blood* 2011; 117: 4519-4529.
108. Chan HT, Hughes D, French RR, Tutt AL, Walshe CA, Teeling JL, et al. CD20-induced lymphoma cell death is independent of both caspases and its redistribution into triton X-100 insoluble membrane rafts. *Cancer Res* 2003; 63: 5480-5489.

109. Mossner E, Brunker P, Moser S, Puntener U, Schmidt C, Herter S, et al. Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. *Blood* 2010; 115: 4393-4402.
110. Invitrogen. Vybrant® CFDA SE Cell Tracer Kit. vol. 2018. CA, USA: ThermoFisher Scientific.
111. WANG X-Q, DUAN X-M, LIU L-H, FANG Y-Q, TAN Y. Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester Fluorescent Dye for Cell Labeling. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 2005; 37: 379-385.
112. Cholujová D, Jakubíková J, Kubeš M, Arendacká B, Sapák M, Ihnatko R, et al. Comparative study of four fluorescent probes for evaluation of natural killer cell cytotoxicity assays. *Immunobiology* 2008; 213: 629-640.
113. Frohn C, Schlenke P, Kirchner H. The repertoire of HLA-Cw-specific NK cell receptors CD158 a/b (EB6 and GL183) in individuals with different HLA phenotypes. *Immunology* 1997; 92: 567-570.
114. allelefrequencies.net. Allele Frequencies in Worldwide Populations. vol. 2018: The Allele Frequencies Net Database 2007.
115. Maloney DG, Grillo-Lopez AJ, White CA, Bodkin D, Schilder RJ, Neidhart JA, et al. IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997; 90: 2188-2195.
116. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge für Patienten mit einer chronischen lymphatischen Leukämie, Kurzversion 1.0, 2018, AWMF Registernummer: 018-032OL. vol. 2018.
117. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 2000; 6: 443-446.
118. Cartron G, Dacheux L, Salles G, Solal-Celigny P, Bardos P, Colombat P, et al. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood* 2002; 99: 754-758.
119. Nadler LM, Ritz J, Hardy R, Pesando JM, Schlossman SF, Stashenko P. A unique cell surface antigen identifying lymphoid malignancies of B cell origin. *J Clin Invest* 1981; 67: 134-140.

120. Coiffier B, Lepage E, Briere J, Herbrecht R, Tilly H, Bouabdallah R, et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002; 346: 235-242.
121. Coiffier B, Thieblemont C, Van Den Neste E, Lepeu G, Plantier I, Castaigne S, et al. Long-term outcome of patients in the LNH-98.5 trial, the first randomized study comparing rituximab-CHOP to standard CHOP chemotherapy in DLBCL patients: a study by the Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte. *Blood* 2010; 116: 2040-2045.
122. Andersson LC, Nilsson K, Gahmberg CG. K562—A human erythroleukemic cell line. *International Journal of Cancer* 1979; 23: 143-147.
123. Reddy V, Klein C, Isenberg DA, Glennie MJ, Cambridge G, Cragg MS, et al. Obinutuzumab induces superior B-cell cytotoxicity to rituximab in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus patient samples. *Rheumatology (Oxford)* 2017; 56: 1227-1237.
124. Le Garff-Tavernier M, Decocq J, de Romeuf C, Parizot C, Dutertre CA, Chapiro E, et al. Analysis of CD16+CD56dim NK cells from CLL patients: evidence supporting a therapeutic strategy with optimized anti-CD20 monoclonal antibodies. *Leukemia* 2011; 25: 101-109.
125. Wang SY, Racila E, Taylor RP, Weiner GJ. NK-cell activation and antibody-dependent cellular cytotoxicity induced by rituximab-coated target cells is inhibited by the C3b component of complement. *Blood* 2008; 111: 1456-1463.
126. Cardarelli PM, Quinn M, Buckman D, Fang Y, Colcher D, King DJ, et al. Binding to CD20 by anti-B1 antibody or F(ab')(2) is sufficient for induction of apoptosis in B-cell lines. *Cancer Immunol Immunother* 2002; 51: 15-24.
127. Welsh RM, Jr. Cytotoxic cells induced during lymphocytic choriomeningitis virus infection of mice. I. Characterization of natural killer cell induction. *J Exp Med* 1978; 148: 163-181.
128. Gidlund M, Orn A, Wigzell H, Senik A, Gresser I. Enhanced NK cell activity in mice injected with interferon and interferon inducers. *Nature* 1978; 273: 759-761.
129. Trinchieri G, Santoli D, Koprowski H. Spontaneous cell-mediated cytotoxicity in humans: role of interferon and immunoglobulins. *J Immunol* 1978; 120: 1849-1855.

130. Saga K, Park J, Nimura K, Kawamura N, Ishibashi A, Nonomura N, et al. NANOG helps cancer cells escape NK cell attack by downregulating ICAM1 during tumorigenesis. *J Exp Clin Cancer Res* 2019; 38: 416.
131. Hejazi M, Manser AR, Frobel J, Kundgen A, Zhao X, Schonberg K, et al. Impaired cytotoxicity associated with defective natural killer cell differentiation in myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2015; 100: 643-652.
132. Katrinakis G, Kyriakou D, Papadaki H, Kalokyri I, Markidou F, Eliopoulos GD. Defective natural killer cell activity in B-cell chronic lymphocytic leukaemia is associated with impaired release of natural killer cytotoxic factor(s) but not of tumour necrosis factor-alpha. *Acta Haematol* 1996; 96: 16-23.
133. Ziegler HW, Kay NE, Zarling JM. Deficiency of natural killer cell activity in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Int J Cancer* 1981; 27: 321-327.
134. Chu Y, Hochberg J, Yahr A, Ayello J, van de Ven C, Barth M, et al. Targeting CD20+ Aggressive B-cell Non-Hodgkin Lymphoma by Anti-CD20 CAR mRNA-Modified Expanded Natural Killer Cells In Vitro and in NSG Mice. *Cancer Immunol Res* 2015; 3: 333-344.
135. Beum PV, Kennedy AD, Williams ME, Lindorfer MA, Taylor RP. The Shaving Reaction: Rituximab/CD20 Complexes Are Removed from Mantle Cell Lymphoma and Chronic Lymphocytic Leukemia Cells by THP-1 Monocytes. *The Journal of Immunology* 2006; 176: 2600-2609.
136. Kumar C, Pandey BN, Samuel G, Venkatesh M. Cellular internalization and mechanism of cytotoxicity of (1)(3)(1)I-rituximab in Raji cells. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2013; 32: 91-99.
137. Cox MC, Battella S, La Scaleia R, Pelliccia S, Di Napoli A, Porzia A, et al. Tumor-associated and immunochemotherapy-dependent long-term alterations of the peripheral blood NK cell compartment in DLBCL patients. *Oncoimmunology* 2015; 4: e990773.
138. Tahrali I, Kucuksezer UC, Altintas A, Uygunoglu U, Akdeniz N, Aktas-Cetin E, et al. Dysfunction of CD3-CD16+CD56dim and CD3-CD16-CD56bright NK cell subsets in RR-MS patients. *Clinical Immunology* 2018; 193: 88-97.
139. Naluyima P, Eller MA, Laeyendecker O, Quinn TC, Serwadda D, Sewankambo NK, et al. Impaired natural killer cell responses are associated with loss of the highly activated NKG2A(+)/CD57(+)/CD56(dim) subset in HIV-1 subtype D infection in Uganda. *Aids* 2014; 28: 1273-1278.

140. Baychelier F, Achour A, Nguyen S, Raphael M, Toubert A, Besson C, et al. Natural killer cell deficiency in patients with non-Hodgkin lymphoma after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2015; 34: 604-612.
141. Danielou-Lazareth A, Henry G, Geromin D, Khaznadar Z, Briere J, Tamouza R, et al. At diagnosis, diffuse large B-cell lymphoma patients show impaired rituximab-mediated NK-cell cytotoxicity. *European Journal of Immunology* 2013; 43: 1383-1388.
142. Chen T, Liu C, Li L, Liu H, Wang T, Shao Z, et al. CD56bright natural killer cells exhibit abnormal phenotype and function in severe aplastic anemia. *International Journal of Laboratory Hematology* 2019; 41: 353-363.
143. Tarrío ML, Lee S-H, Fragoso MF, Sun H-W, Kanno Y, O'Shea JJ, et al. Proliferation Conditions Promote Intrinsic Changes in NK Cells for an IL-10 Response. *The Journal of Immunology* 2014; 193: 354-363.
144. Nagler A, Lanier LL, Cwirla S, Phillips JH. Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells. *J Immunol* 1989; 143: 3183-3191.
145. Bryceson YT, March ME, Ljunggren H-G, Long EO. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood* 2006; 107: 159-166.
146. Takahashi E, Kuranaga N, Satoh K, Habu Y, Shinomiya N, Asano T, et al. Induction of CD16+ CD56bright NK cells with antitumour cytotoxicity not only from CD16- CD56bright NK Cells but also from CD16- CD56dim NK cells. *Scand J Immunol* 2007; 65: 126-138.
147. Ahlenstiel G, Martin MP, Gao X, Carrington M, Rehermann B. Distinct KIR/HLA compound genotypes affect the kinetics of human antiviral natural killer cell responses. *J Clin Invest* 2008; 118: 1017-1026.
148. Guinan KJ, Cunningham RT, Meenagh A, Dring MM, Middleton D, Gardiner CM. Receptor systems controlling natural killer cell function are genetically stratified in Europe. *Genes & Immunity* 2010; 11: 67-78.
149. Denis L, Sivula J, Gourraud P-A, Kerdudou N, Chout R, Ricard C, et al. Genetic diversity of KIR natural killer cell markers in populations from France, Guadeloupe, Finland, Senegal and Réunion. *Tissue Antigens* 2005; 66: 267-276.
150. Golay J, Da Roit F, Bologna L, Ferrara C, Leusen JH, Rambaldi A, et al. Glycoengineered CD20 antibody obinutuzumab activates neutrophils and

- mediates phagocytosis through CD16B more efficiently than rituximab. *Blood* 2013; 122: 3482-3491.
151. Rafiq S, Butchar JP, Cheney C, Mo X, Trotta R, Caligiuri M, et al. Comparative assessment of clinically utilized CD20-directed antibodies in chronic lymphocytic leukemia cells reveals divergent NK cell, monocyte, and macrophage properties. *J Immunol* 2013; 190: 2702-2711.
 152. Gumperz JE, Litwin V, Phillips JH, Lanier LL, Parham P. The Bw4 public epitope of HLA-B molecules confers reactivity with natural killer cell clones that express NKB1, a putative HLA receptor. *The Journal of experimental medicine* 1995; 181: 1133-1144.
 153. Moretta L. Dissecting CD56dim human NK cells. *Blood* 2010; 116: 3689-3691.
 154. Lisovsky I, Kant S, Tremblay-McLean A, Isitman G, Kiani Z, Dupuy FP, et al. Differential contribution of education through KIR2DL1, KIR2DL3, and KIR3DL1 to antibody-dependent (AD) NK cell activation and ADCC. *Journal of Leukocyte Biology* 2019; 105: 551-563.
 155. Cella M, Longo A, Ferrara GB, Strominger JL, Colonna M. NK3-specific natural killer cells are selectively inhibited by Bw4-positive HLA alleles with isoleucine 80. *J Exp Med* 1994; 180: 1235-1242.
 156. Thananchai H, Gillespie G, Martin MP, Bashirova A, Yawata N, Yawata M, et al. Cutting Edge: Allele-specific and peptide-dependent interactions between KIR3DL1 and HLA-A and HLA-B. *The Journal of Immunology* 2007; 178: 33-37.
 157. Vivian JP, Duncan RC, Berry R, O'Connor GM, Reid HH, Beddoe T, et al. Killer cell immunoglobulin-like receptor 3DL1-mediated recognition of human leukocyte antigen B. *Nature* 2011; 479: 401-405.
 158. Voorter CE, van der Vlies S, Kik M, van den Berg-Loonen EM. Unexpected Bw4 and Bw6 reactivity patterns in new alleles. *Tissue Antigens* 2000; 56: 363-370.
 159. Singh V, Gupta D, Almasan A. Development of Novel Anti-Cd20 Monoclonal Antibodies and Modulation in Cd20 Levels on Cell Surface: Looking to Improve Immunotherapy Response. *J Cancer Sci Ther* 2015; 7: 347-358.
 160. Freeman CL, Sehn LH. A tale of two antibodies: obinutuzumab versus rituximab. *Br J Haematol* 2018; 182: 29-45.

161. Li Y, Ding S, Liu C, Chen T, Liu H, Li L, et al. Abnormalities of quantities and functions of CD56bright natural killer cells in non-severe aplastic Anemia. *Hematology* 2019; 24: 405-412.
162. Lin L, Ma C, Wei B, Aziz N, Rajalingam R, Yusung S, et al. Human NK Cells Licensed by Killer Ig Receptor Genes Have an Altered Cytokine Program That Modifies CD4⁺ T Cell Function. *The Journal of Immunology* 2014; 193: 940-949.
163. Cartron G, Watier H, Golay J, Solal-Celigny P. From the bench to the bedside: ways to improve rituximab efficacy. *Blood* 2004; 104: 2635-2642.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Professor Dr. Markus Uhrberg für die herausragende Betreuung während der Arbeit im Labor. Ich danke auch Dr. Maryam Hejazi, Dr. Angela Manser, Sarah Reusing, Ricarda Ising und Nadine Scherenschlich, für die Hilfe bei der Durchführung der Experimente sowie die unzähligen hilfreichen Hinweise und Ratschläge.

Herrn Professor Dr. Rainer Haas danke ich für die Begleitung der Arbeit auf klinischer Seite und die Hilfe bei der Beantragung der DSO-Fördergelder. Aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie danke ich außerdem ganz besonders Frau PD Dr. Judith Strapatsas, ehem. Neukirchen für die Hilfe bei der Probandenauswahl sowie der Probenbeschaffung aus der Privatambulanz.

Darüber hinaus danke ich dem Komitee der Düsseldorf School of Oncology, das die Anfertigung dieser Arbeit durch ein MD-Stipendium ermöglicht hat sowie der Zentralapotheke der Uniklinik Düsseldorf für die freundliche Bereitstellung der verwendeten therapeutischen Antikörper.

Mein tiefer Dank gilt allen voran denen, die mich durch die Hochs und Tiefs während dieser Arbeit begleitet haben, insbesondere Inci, Elisabeth, Gianna, Jörg, Melek, Holger und Christine.