

Organisation der Zellmembran im Nanobereich

Wie das Membranprotein CD20 humane B-Lymphozyten ruhig hält

KATHRIN KLÄSENER, MICHAEL RETH

ABTEILUNG FÜR MOLEKULARE IMMUNOLOGIE, BIOLOGIE III DER UNIVERSITÄT FREIBURG

The membrane protein CD20 of B lymphocytes is the target of Rituximab (RTX), the first successful therapeutic antibody. The biological function of CD20 was a mystery so far. We found that loss of CD20 leads to the reorganization of a protein/lipid nanodomain on the plasma membrane, the activation of human B cells, and their differentiation into antibody-producing plasma cells. These findings shed new light on the functional membrane organization and the therapeutic mechanism of anti-CD20 antibodies.

DOI: 10.1007/s12268-022-1835-1
© Die Autorinnen und Autoren 2022

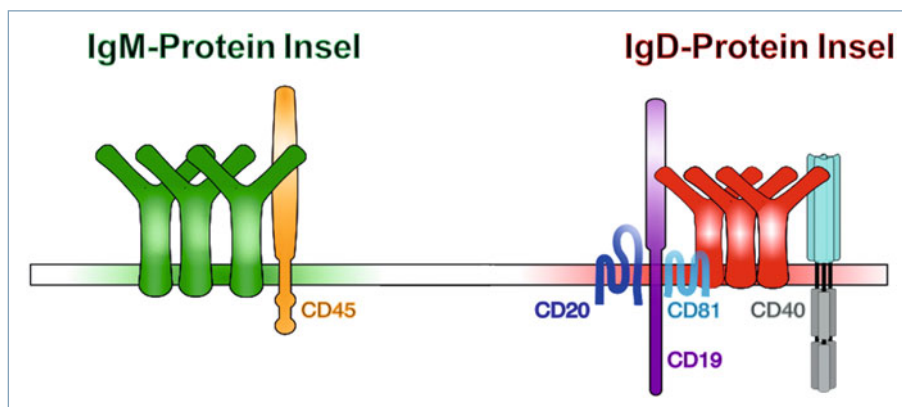
■ 1974 packte ein frisch gebackener Freiburger Doktorand seine junge Familie in einen VW-Bus und fuhr nach Cambridge, UK, um dort im *Laboratory of Molecular Biology* seine Arbeit als Post-Doktorand aufzunehmen. Zwei Jahre später kehrte er nach Deutschland zurück mit einer Erfindung, die die biologische Forschung und die medizinische Praxis revolutionieren sollte und für die ihm im Jahre 1984, zusammen mit César Milstein, der Nobelpreis verliehen wurde. Dem jungen Biologen Georges Köhler war gelungen aktivierte B-Lymphozyten mit einer

Myeloma-Tumorzelle zu fusionieren und dadurch Hybridom-Klone zu gewinnen, die einen monoklonalen Antikörper (mAk) mit gewünschter Spezifität produzieren; heute in der medizinischen Diagnostik und Therapie nicht mehr wegzudenken [1]. Der erste zugelassene und bisher erfolgreichste therapeutische mAk ist der anti-CD20-Antikörper Rituximab (RTX), welcher bei mehr als einer Million Patienten zur Behandlung von B-Zell-Tumoren oder einer B-Zell getriebenen Autoimmunität eingesetzt wurde. Das Membranprotein CD20 ist eine ideale Ziel-

struktur einer anti-B-Zell-Therapie, da es in großen Mengen nur auf reifen B-Lymphozyten vorkommt. Die biologische Funktion des CD20-Membranproteins war allerdings bis vor kurzem vollkommen unbekannt und ein großes Rätsel der B-Zell-Forschung [2]. Die Verwirrung um das CD20-Protein wurde noch dadurch verstärkt, dass eine CD20-Knockout-Maus kaum einen B-Zell-Defekt aufwies [3]. Warum ist das CD20 dann evolutionär so hoch konserviert und auf allen reifen B-Zellen exprimiert? Die Lösung dieses Rätsels liegt im schwer zugänglichen Nanobereich der Plasmamembran von B-Lymphozyten.

Die Oberflächenproteine der B-Lymphozyten

Um ihre vielfältigen Aufgaben im Immunsystem wahrzunehmen, wie die Erkennung und Bekämpfung von eingedrungenen Bakterien und Viren, tragen Lymphozyten eine Vielzahl von Proteinen auf ihrer Zelloberfläche. Bei den B-Lymphozyten sind dies die B-Zell-Antigenrezeptoren (BCR), welche in verschiedenen Klassen, dem IgM-, IgD-, IgG- IgA-, und IgE-BCR, vorkommen. Naive, reife B-Lymphozyten tragen zunächst einen IgD-BCR und IgM-BCR mit einer identischen Antigenbindungsstelle in vielen Kopien auf ihrer Oberfläche. Die Bindung dieser Rezeptoren an ein bestimmtes Antigen führt zur Aktivierung der naiven B-Zellen, die sich daraufhin einmal zu den antikörperproduzierenden Plasmazellen oder zu Gedächtnis-B-Zellen entwickeln können. Gedächtnis B-Zellen können durch Klassenwechsel einen BCR der Klasse IgG, IgA oder IgE auf ihrer Oberfläche ausprägen. Neben den Antigen-erkennenden BCRs tragen Lymphozyten viele weitere Membranproteine, die Cluster of Differentiation (CD) benannt und mit einer Nummer (CD1-CD320) versehen werden. Jeder Lymphozytentypus exprimiert charakteristische CD-Markerproteine. B-Lymphozyten können über die Ausprägung des CD19- oder CD20-Markers erkannt werden. Das CD19-Membranprotein spielt dabei eine wichtige Rolle als Transmembran-Adapterprotein und Ko-



▲ **Abb. 1:** Schematische Darstellung der vorgeschlagenen Lokalisierung von Korezeptoren und Oberflächenmarkern innerhalb von Proteinclustern der IgM- und IgD-B-Zellrezeptorklasse auf der Oberfläche humaner, ruhender B-Zellen.

rezeptor der BCR-Klassen. Bei einer B-Zellaktivierung werden die neun Tyrosine des zytoplasmatischen Sequenzanteils phosphoryliert und von Proteinen mit einer SH2-Domäne gebunden. Dadurch kann CD19 den BCR mit verschiedenen Signalwegen verbinden und die BCR-Signalleitung sowohl regulieren als auch verstärken. Das CD20-Protein trägt keine zytoplasmatischen Tyrosine und besteht, als Tetraspanin, hauptsächlich aus Transmembrandomänen. Auch daher war seine Funktion lange ein Rätsel.

Das molekulare Leben im Nanobereich

Die größte Tragik im Forscherleben einer Molekularbiologin und eines Molekularbiologen ist es, dass die Moleküle ihrer Neugier nie direkt bei ihrer vielfältigen Arbeit in lebenden Zellen beobachten werden können. Dafür sind sie mit 2–20 nm Größe viel zu klein. Informationen über den Aufbau eines Proteinkomplexes können nur im eingefrorenen Zustand, entweder mittels einer Kristallstruktur oder mittels der Elektronenmikroskopie (kryo-EM) gewonnen werden. Das dynamische Verhalten der Proteine in lebenden Zellen kann allerdings nur indirekt mittels der Fluoreszenzmikroskopie verfolgt werden. Das große Problem der letzteren Methode ist die Auflösungsgrenze der Lichtmikroskopie bei 200 nm. Die genaue Lokalisation und Zusammensetzung eines Proteinkomplexes kann daher mit dieser Methode nicht bestimmt werden, was besonders bei der Untersuchung von Membranproteinen ein großes Problem ist. Die Entwicklung der hochauflösenden (super-resolution) Mikroskopie ab den 2000er-Jahren ermöglichte erstmals die Untersuchung der Organisation auch von Membranproteinen im Nanobereich auf isolierte Membranen oder fixierte Zellen.

Auf Grund vieler Lichtmikroskopiestudien war man lange davon ausgegangen, dass die meisten Membranproteine auf der Oberfläche ruhender Lymphozyten zufällig verteilt sind und erst nach einer Zellaktivierung Cluster bilden können. Wir wissen heute, dass die gleichmäßige Verteilung der Membranproteine eine Illusion der auflösungsbegrenzten Lichtmikroskopie ist. Mit der Superresolutionsmikroskopie konnten wir erstmalig zeigen, dass die IgD- und IgM-BCR-Rezeptor-

komplexe auf naiven B-Zellen in verschiedenen Membranbereichen getrennt voneinander vorkommen [4] und dies mittels der Elektronenmikroskopie an isolierten Membranen unter Einsatz von Goldpartikel gekoppelten Antikörpern bestätigen [5]. IgM- und IgD-BCR befinden sich in 150–220 nm großen Nanodomänen mit unterschiedlicher Protein- und Lipidzusammensetzung. Die IgD-Nanodomäne gehört zu den *lipid rafts*, Membrandomänen mit großem Anteil von Cholesterol und Sphingolipiden in denen das GM1-Gangliosid verortet ist. Mit hochauflösenden Proximity-Ligation Assays (FAPLA) konnten wir dann bestimmte Membranproteine den verschiedenen Nanoclustern zuordnen. Tests mit DNA-gekoppelten FAB-Fragmenten bestimmen, ob zwei Proteine im 5–10 nm-Bereich zusammen organisiert sind und wie sich deren Ko-Lokalisation nach einer Zellaktivierung verändert [6].

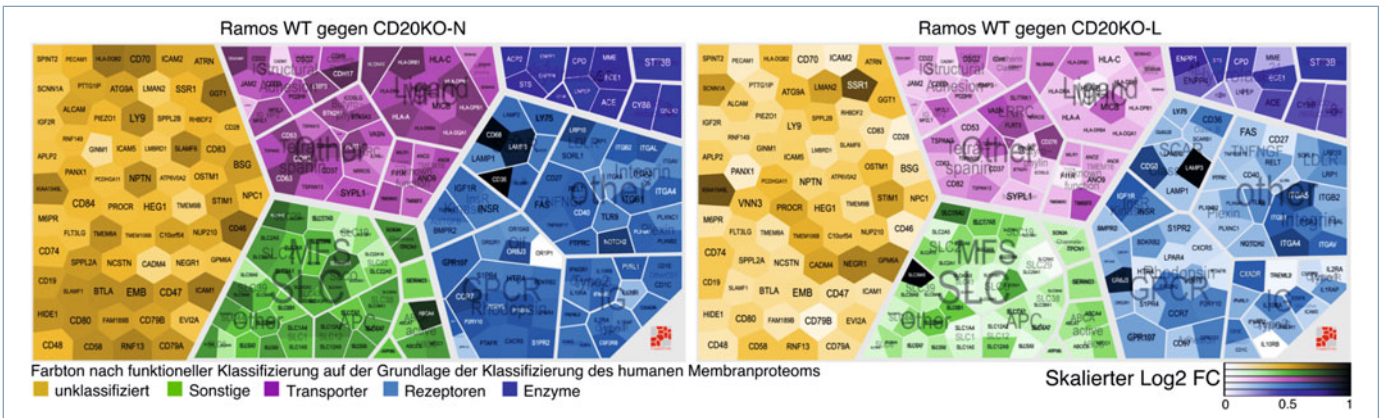
Wir fanden im IgD-Nanocluster eine Vielzahl von weiteren Membranproteinen, wie das CD19, CD20, CD40 und den Chemokinrezeptor CXCR4 (**Abb. 1**). Der IgM-BCR hingegen ist mit der membranständigen Tyrosinphosphatase CD45 liiert, welche eine spontane Aktivierung verhindert. Die klassenspezifische Organisation der Membranproteine in Nanobereichen ist zudem funktionell relevant. Der Chemokinrezeptor CXCR4 ist nicht nur im IgD-Nanoclustern verortet, sondern benötigt den IgD-BCR für seine Signalleitung [7]. Es kommt daher in den Nanodomänen der B-Zellmembran zu einer Kooperation ganz unterschiedlicher Rezeptorklassen. Diese geordnete und getrennte Membranorganisation ändert sich erst nach einer B-Zellaktivierung wobei das CD19 zusammen mit dem CD20 zum IgM-BCR wandert und dort die Signale des Antigenrezeptors verstärkt.

Das CD20 als Wächterprotein

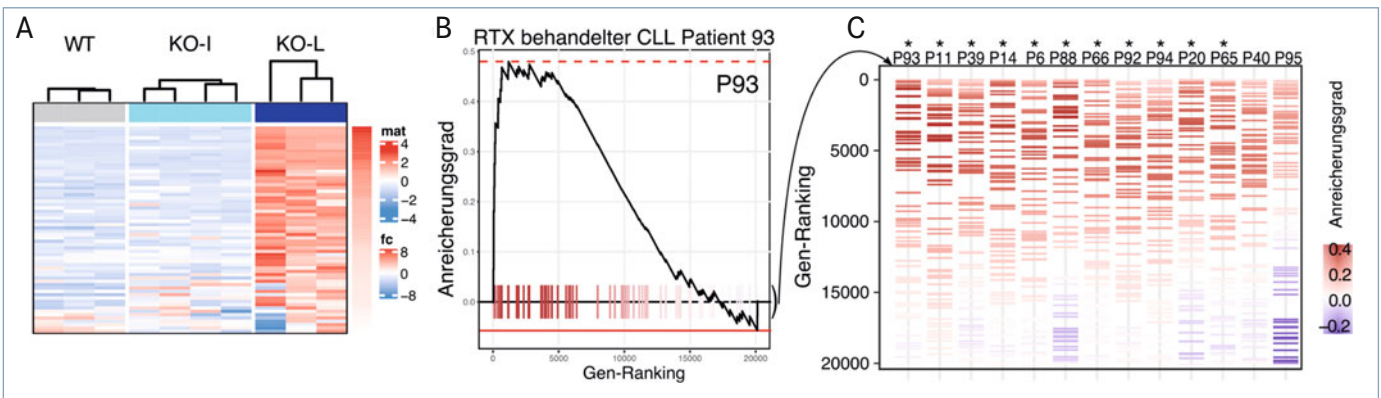
Zur Aufdeckung der Funktion des Tetraspanins CD20 im IgD-Nanocluster waren dann Untersuchungen mit der Burkitt-Lymphomlinie Ramos von großer Bedeutung. Die Forschung an humanen Zelllinien hat sich in den letzten Jahren durch die Entwicklung neuer Techniken wie dem CRISPR-Cas9-Gene Editing sowie den Möglichkeiten der Genom- und Proteombestimmung im Hochdurchsatz komplett verändert. Zelllinien, die für lange Zeit

Hier steht eine Anzeige.

 Springer



▲ **Abb. 2:** Voronoi-Karte der Oberflächenmoleküle von Ramos-Wildtyp (WT) verglichen mit neuen CD20KO-Ramos-B-Zellen (CD20-N links) oder gegen bereits differenzierten Plasmazellen (CD20KO-L rechts). Alle quantifizierten Proteine wurden kartiert und entsprechend ihrer funktionellen Klassifizierung hierarchisch gruppiert. Zur Darstellung wurde die skalierte Log₂-Veränderung (FC) der Werte für jedes Protein von 0-1 skaliert und durch Farbintensität zwischen den verglichenen Bedingungen dargestellt.



▲ **Abb. 3:** Die PLASMA UP GENES Heatmap zeigt die Expression von Genen, die bei der Plasmazelldifferenzierung hochreguliert sind. Der Farbcode zeigt die zeilenweise-skalierte Intensität in den Proben (WT, KO-I, KO-L) an. **A,** Die Gene sind nach ihrer Log₂-Veränderung (FC) in Ramos-Wildtyp (WT links) gegen CD20KO-Plasmazellen (intermediär KO-I, oder differenziert KO-L, rechts) geordnet. **B,** Beispiel für ein Anreicherungsdiagramm (Kurve) der hochregulierten Gene (Striche) der Plasmazelldifferenzierung eines Rituximab (RTX) – behandelten Leukämie-Patienten (Nr. 93). **C,** Anreicherungs-Barcode, der die Verteilung der hochregulierten Gene der Plasmazelldifferenzierung (farbige Segmente) bei jedem einzelnen Patienten veranschaulicht, GSE37168. Die behandelten Patienten wurden von links nach rechts nach ihrem Anreicherungsgrad geordnet, von hoch zu niedrig. Signifikante Anreicherungsgrade sind durch „*“ gekennzeichnet.

den Ruf hatten artifiziell zu sein und deswegen zugunsten von *in vivo*-Tierexperimenten in den Hintergrund traten, werden wieder in den Fokus der modernen Zellforschung gerückt. Mittels der CRISPR-Technik können Gene in Zelllinien ausschalten oder verändert werden. Wir haben diese neuen Möglichkeiten ausgenutzt, um in Ramos-B-Zellen das für CD20 codierende Gen auszuschalten und dann ein zelluläres Wunder erlebt. Der Verlust von CD20 führte zur sofortigen Auflösung des IgD-Nanoclusters und ermöglichte die Interaktion von CD19 mit dem IgM-BCR und das Anschalten der Signalwege. Ramos-B-Zellen werden dadurch nicht nur aktiviert, sondern verändern auch ihre Identität indem sie sich zu Plasmazellen entwickeln (**Abb. 2**, [8]). Die Entwicklung einer menschlichen B-Zelle zur antikörperprodu-

zierenden Plasmazelle welche normalerweise in den Keimzentren der lymphatischen Organe stattfindet, konnten wir in einer Zellkulturschale nachvollziehen und die Veränderungen des Genoms, Proteoms und Metaboloms im Detail dokumentieren. Ein zelluläres Wunder ist dies, weil bisher angenommen wurde, dass transformierte Tumorzelllinien in ihrem Differenzierungsstadium eingefroren sind.

Unsere Untersuchung der CD20KO-Ramos-B-Zellen, belegte eindeutig, dass CD20 eine Wächterfunktion hat, die den CD19-Ko-Rezeptor im IgD-Nanoclusters festhält und dadurch spontane Aktivierung und Differenzierung der B-Zellen verhindert.

Die therapeutische Rolle der anti-CD20-Antikörper

Bisher war angenommen worden, dass B-Zellen, die von einem anti-CD20-Antikörper gebunden wurden, entweder durch das Komplement-System, durch Natürliche Killerzellen oder durch Phagozyten eliminiert werden. Wir fanden allerdings, dass die Behandlung von Ramos-B-Zellen mit RTX ebenfalls die Organisation der Nanocluster auf der ruhenden B-Zelle stört und es dabei zu einer partiellen B-Zell-Aktivierung kommt worauf RTX in kürzester Zeit internalisiert und auf der Zelloberfläche nicht mehr nachweisbar ist. Wir haben deshalb geprüft wie sich die B-Zelloberfläche unter therapeutischer Anwendung von RTX bei Patienten mit rheumatoider Arthritis verändert. Wir konnten feststellen, dass sich die Oberfläche der

B-Zellen dieser Patienten ebenfalls verändert und es wichtige B-Zell-Markerproteine wie CD19 und der IgM-BCR herunterreguliert werden. Es sind daher neue klinische Strategien zur Bestimmung der residualen B-Zellpopulation nötig.

Wenn der Verlust von CD20 nach RTX-Therapie mit einer verstärkten Plasmazell-differenzierung bei Leukämien einhergeht, sollten wir auch plasmazellspezifische Gene nach RTX-Therapie von B-Zell-Malignomen *in vivo* identifizieren können. Zu diesem Zweck haben wir das Transkriptom-Profil der B-Zellen von Leukämie-Patienten, die nach einer kombinierten RTX-Behandlung einen Rückfall erlitten haben, auf die Expression plasmazellspezifischer Gene in einer Gensatzanreicherungsanalyse untersucht und diesen Gensatz mit unseren Ramos-WT- und CD20KO-Zelllinien verglichen (**Abb. 3**). Die Proben von 11 der 13 CLL-Patienten zeigten eine signifikant erhöhte Expression plasmazellspezifischer Gene nach einer RTX-Behandlung, was unsere Vermutung bestätigt, dass eine anti-CD20 Behandlung die Differenzierung von B- zu Plasmazellen fördert.

Unsere neuen Erkenntnisse über die Funktion des CD20 und den Nachweis der partiellen Aktivierung der Zellen, weisen auf einen teilweise anderen Wirkungsmechanismus der RTX-Behandlung hin, der auch von anderen Forschergruppen beobachtet wurde. Auch wurden weitere Oberflächenproteine auf Abwehrzellen identifiziert, die maßgeblich am Interaktom des CD20-Signalwegs beteiligt sind [9]. Heute sind neue modifizierte, therapeutische anti-CD20-Antikörper der 2., 3. und 4. Generation entwickelt worden, die länger auf der B-Zelloberfläche persistieren, den Verlust von CD20 verhindern und schneller von körpereigenen Abwehrzellen

erkannt werden sollen. Ebenfalls werden vielversprechende kombinationstherapeutische Ansätze in den Kliniken angewendet, die Aktivierung der B-Zellen verhindern sollen und Resistenzen vermeiden helfen. Über das bessere Verständnis der CD20-Funktion könnten diese therapeutischen Ansätze eine wesentliche Weiterentwicklung erfahren. ■

Literatur

- [1] Köhler G, Milstein C (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495–497
- [2] Gvand P, Mraz M (2020) The regulation and function of CD20: An 'enigma' of B-cell biology and targeted therapy. *Haematologica* 105:1494–1506
- [3] Morsy DED, Sanyal R, Zaiss AK et al. (2013) Reduced T-dependent humoral immunity in CD20-deficient mice. *J Immunol* 191:3112–3118
- [4] Kläsener K, Maity PC, Hobeika E et al. (2014) B cell activation involves nanoscale receptor reorganizations and inside-out signaling by Syk. *Elife* 3:e02069
- [5] Maity PC, Blount A, Jumaa H (2015) B cell antigen receptors of the IgM and IgD classes are clustered in different protein islands that are altered during B cell activation. *Sci Signal* 8:ra93
- [6] Kläsener K, Yang J, Reth M (2018) Study B cell antigen receptor nano-scale organization by in situ fab proximity ligation assay. *Methods Mol Biol* 1707:171–181

- [7] Becker M, E. Hobeika E, H. Jumaa H, M. Reth et al. (2017) CXCR4 signaling and function require the expression of the IgD-class B-cell antigen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 114:5231–5236
- [8] Kläsener K, Jellusova J, Andrieux G et al. (2021) CD20 as a gatekeeper of the resting state of human B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 118:e2021342118
- [9] Marshall MJE, Stopforth RJ, Cragg MS (2017) Therapeutic antibodies: What have we learnt from targeting CD20 and where are we going? *Front Immunol*, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01245>

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Michael Reth
 Universität Freiburg, Biologie 3
 Schänzlestraße 1
 D-79104 Freiburg
 michael.reth@bioss.uni-freiburg.de

AUTORINNEN UND AUTOREN



Kathrin Kläsener

2012–2016 Promotion, Universität Freiburg. 2016–2021 Postdoktorandin im Department für Molekulare Immunologie der Biologie III der Universität Freiburg. Seit 2022 Forscherin am Exzellenzcluster Centre for Integrative Biological Signalling Studies (CIBSS) an der Universität Freiburg.



Michael Reth

1971–1977 Biologiestudium am Institut für Genetik der Universität zu Köln. 1978–1983 Promotion, Universität zu Köln. Seit 1996 Professor an der Biologie III der Universität Freiburg, Ko-Sprecher des Exzellenzclusters für biologische Signalstudien (BIOSS).