

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der  
Naturwissenschaften  
Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilian-Universität  
München

Exosomale Tumorantigene:  
Bedeutung bei der Tumorummunevasion  
und Mittel zur Generierung  
tumorassoziierter Antikörper

vorgelegt von  
**Christina Battke**

Dissertation eingereicht am 25.08.2009

1. Gutachter: Prof. Dr. Dirk Eick
2. Gutachter: Prof. Dr. Ute Vothknecht

Mündliche Prüfung am 25.01.2010

Nicht Kunst und Wissenschaft allein,  
Geduld will bei dem Werke sein.

*Johann Wolfgang von Goethe*

Für meine Familie

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>1</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>4</b>
<b>1.1 Tumorimmunologie</b>	<b>4</b>
1.1.1 Geschichtlicher Hintergrund	4
1.1.2 Immunevasion von Tumoren	6
1.1.3 Tumorantigene und ihre Bedeutung für die Tumorimmuntherapie	9
<b>1.2 Exosomen</b>	<b>12</b>
1.2.1 Biogenese und Zusammensetzung von Exosomen	13
1.2.2 Funktion von Exosomen	16
1.2.3 Tumorexosomen	28
<b>1.3 Ziel der Arbeit</b>	<b>21</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>22</b>
<b>2.1 Material</b>	<b>22</b>
2.1.1 Zelllinien	22
2.1.2 Patientenmaterial	22
2.1.3 Antikörper	23
2.1.4 Peptide und Pentamere	24
2.1.5 Chemikalien	25
2.1.6 Verbrauchsmaterial	26
2.1.7 Geräte	27
2.1.8 Software	28
<b>2.2 Puffer</b>	<b>29</b>
2.2.1 Zellkulturmethoden	29
2.2.2 Immunbiologische Methoden	29
2.2.3 Proteintechniken	30
<b>2.3 Methoden</b>	<b>32</b>
2.3.1 Zellkulturmethoden	32
2.3.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien	32
2.3.1.2 Gefrierlagerung und Auftauen von Zelllinien	32
2.3.1.3 Zellzahlbestimmung	32
2.3.1.4 Isolierung von PBMCs	33
2.3.1.5 Überwachung von Mykoplasmenkontaminationen	33
2.3.1.6 Magnetische Separation spezifischer Subpopulationen	34
2.3.1.7 Isolierung von Exosomen aus Überständen von Tumorzelllinien	35
2.3.1.8 Isolierung von Exosomen aus Aszitesflüssigkeit	35
2.3.1.9 Isolierung von Exosomen aus Serum mittels Gelfiltration	36
2.3.1.10 Dichtegradientenzentrifugation von Exosomen im Saccharosegradienten	36
2.3.1.11 Isoosmotische Dichtegradientenzentrifugation von Exosomen	36
2.3.1.12 Bestimmung der Exosomenkonzentration	37
2.3.1.13 Etablierung MelanA spezifischer zytotoxischer T-Zellen	37
2.3.1.14 Zytotoxizitätsanalyse: Calcein – Freisetzung	39
2.3.1.15 Nicht-invasive Zytotoxizitätsanalyse mittels Cellscreen	40
2.3.2 Immunbiologische Methoden	40
2.3.2.1 ELISA	40

2.3.2.2	Durchflusszytometrie	41
2.3.2.3	Immunfluoreszenz	42
2.3.2.4	Immunhistochemie	42
2.3.3	Proteinchemische Methoden	43
2.3.3.1	Isolierung von Gesamtprotein aus eukaryotischen Zellen	43
2.3.3.2	Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen	43
2.3.3.3	Isolierung spezifischer Proteine mittels Immunpräzipitation	43
2.3.3.4	Proteinkonzentrationsbestimmung	45
2.3.3.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	45
2.3.3.6	Immunoblotting-Verfahren	45
2.3.3.7	Färbung von SDS-Gelen mit Coomassie	47
2.3.3.8	Verdau von Proteinlysaten mit Proteinase K	47
2.3.4	Herstellung von tumorspezifischen Antikörpern	47
2.3.4.1	Immunisierung von Ratten mit Exosomen	47
2.3.4.2	Immunisierung von Mäusen mit Exosomen	47
2.3.4.3	Herstellung von Hybridomklonen	47
2.3.5	Elektronenmikroskopie	48
2.3.5.1	Einbettung von Zellen in Araldit und Kontrastierung mit Uranylacetat	48
2.3.5.2	Fixierung und Kontrastierung von Exosomen	49
2.3.5.3	Immunelektronenmikroskopie von Exosomen	49
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>50</b>
<b>3.1</b>	<b>Charakterisierung der Exosomenpräparationen</b>	<b>50</b>
3.1.1	Elektronenmikroskopischer Nachweis von Exosomen	50
3.1.2	Untersuchung der Dichte der präparierten Exosomen	50
3.1.3	Normalisierung von Exosomenkonzentrationen	52
3.1.4	Etablierung eines Verfahrens zur Aufreinigung intakter Exosomen mittels Dichtegradientenzentrifugation	53
<b>3.2</b>	<b>Generierung tumorspezifischer Antikörper mittels Immunisierung mit Tumorexosomen</b>	<b>55</b>
3.2.1	Immunisierung von Ratten und Mäusen mit Exosomen aus Lungentumorzellen und Auswahlprüfverfahren für die Hybridomüberstände	54
3.2.2	Der Antikörper 8G7 ist vom IgG2a-Subtyp	56
3.2.3	Das von 8G7 erkannte Epitop wird bei Denaturierung mit SDS und bei Verdau mit Proteinase K zerstört	56
3.2.4	Etablierung eines Protokolls für die Immunpräzipitation mit 8G7	58
3.2.5	Der Antikörper 8G7 bindet spezifisch an die Zelloberfläche.	60
3.2.6	Der Antikörper 8G7 bindet an verschiedene Tumorzelllinien und Tumorexosomen.	60
3.2.7	Der Antikörper 8G7 färbt Bereiche in Normalgeweben und in Tumorgeweben an.	63
3.2.8	Zytotoxizität des Antikörpers 8G7	68
<b>3.3</b>	<b>Einfluss von Tumorexosomen auf tumorspezifische Antikörper</b>	<b>71</b>
3.3.1	Exosomen aus Zellkultuüberständen enthalten membranständiges Her2.	71
3.3.2	Tumorexosomen aus Zellkulturüberständen verhindern die Bindung tumorspezifischem Antikörper an Tumorzellen in Antigen-abhängiger Weise.	73
3.3.3	Die Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität auf	

---

	Tumorzellen wird durch Tumorexosomen in antigen-abhängiger Weise gestört.	80
<b>3.4</b>	<b>Einfluss von Tumorexosomen auf tumorspezifische T-Zellen</b>	<b>80</b>
3.4.1	Etablierung von MelanA-spezifischen CD8 <sup>+</sup> T-Zellklonen	81
3.4.2	Tumorexosomen bewirken keine deutliche Blockierung des T-Zellrezeptors und beeinträchtigen die Oberflächenexpression von CD3 und CD8 in antigen-unabhängiger Weise.	81
3.4.3	Tumorexosomen beeinträchtigen die Effektorfunktion von CD8 <sup>+</sup> T-Zellklonen.	86
3.4.4	CD8 <sup>+</sup> T-Zellkone werden nicht durch Tumorexosomen aktiviert.	87
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>90</b>
4.1	Generierung tumorspezifischer Antikörper mittels Immunisierung mit Exosomen	90
4.2	Einfluss von Tumorexosomen auf die tumorspezifische Immunantwort	95
4.3	Bedeutung der Ergebnisse hinsichtlich der Immuntherapie von Tumoren	100
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>102</b>
<b>6.</b>	<b>Abstract</b>	<b>103</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang</b>	<b>104</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>109</b>
<b>9.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>130</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>134</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>136</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Tumorimmunologie

### 1.1.1 Geschichtlicher Hintergrund

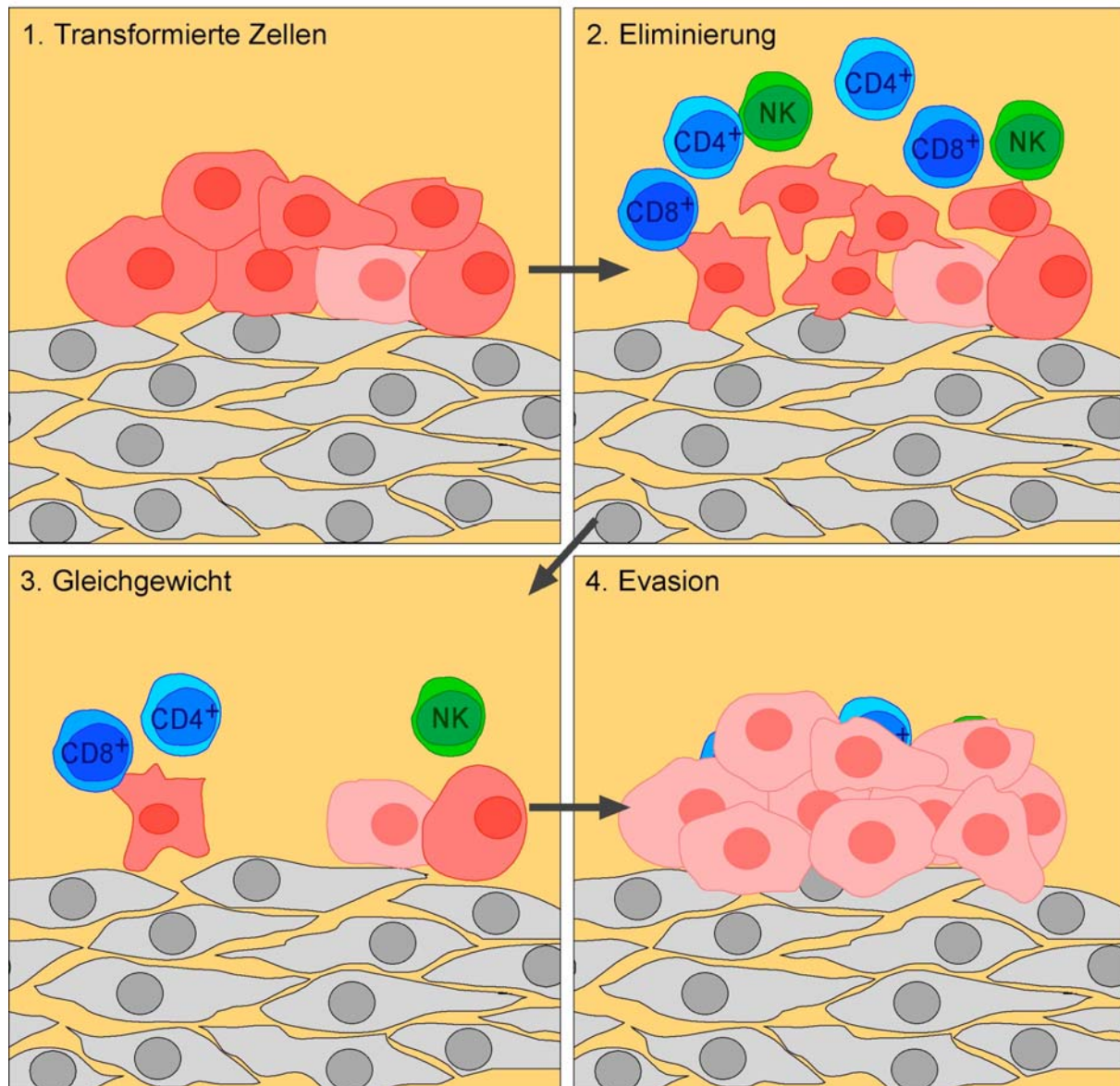
Vor rund 100 Jahren erhielt Paul Ehrlich zusammen mit Ilja Iljitsch Metschnikow den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin für die Begründung der Immunologie. In einem Vortrag an der Amsterdamer Universität stellte Ehrlich als einer der Ersten einen Zusammenhang zwischen Tumorentstehung und Immunität her: „Ich bin überzeugt, daß aberrierende Keime bei dem kolossal komplizierten Verlauf der fötalen und postfötalen Entwicklung außerordentlich häufig vorkommen, daß sie aber glücklicherweise bei der überwiegenden Mehrzahl der Menschen vollkommen latent bleiben, dank der Schutzvorrichtungen des Organismus. Würden diese nicht bestehen, so könnte man vermuten, daß das Karzinom in einer geradezu ungeheuerlichen Frequenz auftreten würde.“ [1]

Die Theorie der Kontrolle von Tumoren durch das Immunsystem wurde jedoch zunächst nicht weiterverfolgt. Erst in den 50er Jahren, durch die Entdeckung von Peter Brian Medawar, dass zelluläre Bestandteile des Immunsystems an der Abstoßung von Transplantaten beteiligt sind, wurde schließlich die Idee der Immunogenität von Tumoren und der damit verbundenen „Tumor-spezifischen Antigene“ etabliert. Aus dieser Idee entwickelte sich die Hypothese der „Immunüberwachung“, die von Macfarlane Burnet und Lewis Thomas begründet wurde. Im Wesentlichen sagt diese Hypothese aus, dass kontinuierlich, durch natürlicherweise auftretende Mutationen, entartete Zellen entstehen, die im Normalfall durch das Immunsystem eliminiert werden [2].

Lange Zeit fand diese Hypothese nur wenig Anerkennung. Erst in den 70er und 90er Jahren des 20. Jahrhunderts konnte aufgrund neuer Tiermodelle und erweitertem Hintergrundwissen in einer Vielzahl von Experimenten diese Hypothese bekräftigt werden. Gavin P. Dunn *et al.* gingen noch einen Schritt weiter und stellten die „*Cancer immunoediting*“-Hypothese auf [3]. Nach dieser Hypothese kann das

---

Immunsystem die Tumorentstehung sowohl negativ (Eliminierung) als auch positiv (Immenselektion) beeinflussen (Siehe Abb. 1.1).



**Abbildung 1.1: Immunüberwachung und Immunedition von Tumoren.**

Schlägt die initiale Eliminierung der entarteten Zellen durch das Immunsystem fehl, stellt sich eine Gleichgewichtsphase ein, in der Tumorwachstum und Tumorerstörung sich die Waage halten. Während dieser Phase üben die Effektorzellen des Immunsystems (CD8<sup>+</sup> T-Zellen, CD4<sup>+</sup> T-Zellen und NK-Zellen) einen Selektionsdruck auf die Tumorzellen aus. Die genetisch instabilen Tumorzellen werden dabei auf bessere Überlebenschancen im immunkompetenten Umfeld selektiert. Die daraus resultierenden Tumorzellen sind unempfindlich gegenüber dem Immunsystem und können sich ungehindert vermehren. Meist wird der Tumor erst in dieser Phase klinisch apparent. (Nach Dunn [3]).

Bilderklärung: grau: Normale Gewebszellen; rot: immunogene Tumorzellen; hellrot: nicht-immunogene Tumorzellen; CD8<sup>+</sup>: CD8<sup>+</sup> T-Zellen; CD4<sup>+</sup>: CD4<sup>+</sup> T-Zellen; NK: NK-Zellen.



Neben der Immunüberwachungshypothese wurde von Fuchs und Matzinger das Gefahr-Modell (*danger model*) zur Beschreibung der Immunantwort gegen Tumoren etabliert [4]. Das Gefahrmodell definiert professionelle Antigen-präsentierende Zellen (professionelle APCs) als Wächter für Gewebeschäden. Die durch Gefahrensignale aktivierte APCs stimulieren T-Zellen. Bei entarteten Zellen fehlt das für eine effektive Immunantwort nötige Signal, da diese für die Immunzellen anscheinend keine direkte Gefahr darstellen. Der Tumor wird daher durch das Immunsystem ignoriert und nicht eliminiert.

### 1.1.2 Immunevasion von Tumoren

Die Entstehung von Tumoren trotz der Anwesenheit von potentiell tumorreaktiven Immunzellen kann verschiedene Ursachen besitzen. Eine Zusammenfassung der bisher bekannten Immunevasionsstrategien von Tumoren ist in Tabelle 1.1 zu finden.

In vielen Fällen findet keine Aktivierung des Immunsystems statt, da, nach dem Gefahr-Modell entsprechende aktivierende Signale fehlen. Der Tumor wird also vom Immunsystem ignoriert [5, 6]. Tumoren, die im Gehirn oder im Auge wachsen, die als immunprivilegierte Bereiche gelten, werden vom Immunsystem nur eingeschränkt erkannt und Tumoren aus anderen Bereichen können oft nur dann vom Immunsystem erkannt werden, wenn die Tumorzellen in sekundäre Lymphorgane wandern und T-Zellen direkt aktivieren [7-9].

Eine mögliche Ursache für das Versagen des Immunsystems kann auch in der geringen Immunogenität von manchen Tumoren liegen [11, 12]. Die Immunogenität des Tumors ist unter anderem abhängig von der Antigenpräsentation durch die Tumorzellen. Im Normalfall werden Antigene in der Zelle zu bestimmten Peptiden prozessiert, auf HLA-Moleküle (humanes Leukozytenantigen) geladen und an der Zelloberfläche präsentiert. Ist die Präsentation entsprechender Tumorantigenpeptide auf HLA-Molekülen nicht gewährleistet, können zytotoxische T-Zellen nicht aktiviert werden. Oftmals kommt es bei malignen Zellen zu einem Fehlen eines entsprechenden Tumorantigens aufgrund reduzierter Expression oder Mutation des Antigens [13-16]. Ist die Expression von HLA-Molekülen reduziert oder treten Mutationen in den HLA-Genen auf, kann ebenfalls die tumorspezifische

---

Immunantwort beeinträchtigt sein [17-24]. Die Antigenpräsentation kann auch durch Defekte in der Antigen-Prozessierung beeinträchtigt werden. Mutationen oder reduzierte Expression von Untereinheiten des Proteasoms haben die Präsentation eines veränderten Peptidspektrums und damit häufig ein Ausfallen der tumorspezifischen T-Zellantwort zur Folge [25-27]. Die Proteine TAP (*transporter associated with antigen processing*) und Tapasin, die für die Beladung von HLA-Molekülen mit Peptiden zuständig sind, können ebenfalls mutiert oder schwächer exprimiert sein [21, 23, 25-29]. Eine totale Abwesenheit von HLA-Molekülen auf der Tumorzelle würde unter normalen Umständen eine Natürliche-Killer-Zellantwort (NK-Zellantwort) induzieren. Tumorzellen umgehen diesen Effekt durch die Expression von HLA-Surrogaten, die eine effektive NK-Zellantwort unterdrücken [30, 31].

**Tabelle 1.1: Mechanismen der Immunevasion von Tumoren.**

Strategie	Mechanismus
Ignoranz	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Wachstum in immunprivilegierten Regionen</li> <li>- Fehlen von Tumorantigenen in lymphoiden Organen</li> <li>- Fehlen von Adhäsionsmolekülen</li> </ul>
Defekte Antigenpräsentation	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mutation oder Abwesenheit von Tumorantigenen</li> <li>- Reduzierte Oberflächenexpression von HLA-Molekülen</li> <li>- Defekt in der Antigenprozessierung</li> <li>- Dysfunktion von Antigen-präsentierenden Zellen</li> </ul>
Expression von immunsuppressiven Molekülen	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Zytokine</li> <li>- Prostaglandine</li> </ul>
Induktion von Toleranz	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fehlen kostimulatorischer Moleküle</li> <li>- Immunabweichung</li> <li>- Regulatorische T-Zellen</li> <li>- Myeloische Suppressorzellen</li> <li>- T-Zell-Deletion</li> </ul>
Apoptoseresistenz	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Expression anti-apoptotischer Moleküle</li> <li>- Fehlen/ Mutation pro-apoptotischer Moleküle</li> </ul>
Gegenangriff des Tumors	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Expression von Todesrezeptorliganden</li> </ul>

(modifiziert nach Whiteside [10]).

Ein weiterer Mechanismus der Immunevasion ist die Expression von immunsuppressiven Molekülen durch den Tumor selbst oder durch das Tumorstroma. Das Zytokin TGF $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* ) beeinflusst die Proliferation und Differenzierung von Immunzellen zugunsten des Tumors [32-37]. Auch VEGF (*vascular endothelial growth factor*) beeinflusst, zusätzlich zu seinem

angiogenen Effekt, die Differenzierung von Immunzellen wie z.B. Dendritische Zellen (DCs) [38]. Des Weiteren werden von Tumoren immunsuppressive Prostaglandine, Interleukin-10 (IL-10) und M-CSF (*macrophage colony stimulating factor*) sezerniert [39-46].

Die Induktion von Toleranz in tumorspezifischen T-Zellen kommt ebenfalls als Evasionsstrategie in Frage [47-49]. Es gibt mehrere Mechanismen, die zur Toleranz führen können und auch von malignen Zellen genutzt werden. Die Induktion von Anergie, das heißt, das Fehlen einer T-Zell-Reaktion trotz stimulatorischer Reize, erfolgt, wenn bei der Stimulation des T-Zellrezeptors die Bindung von kostimulatorischen Molekülen (z.B. B7) an Rezeptoren auf der T-Zelloberfläche (CD28) fehlt [50, 51]. Viele Tumorzellen exprimieren diese kostimulatorischen Moleküle nicht [24, 52-54]. Die T-Zelle wird daher nicht mehr aktiviert, wenn sie durch das entsprechende Tumorantigen stimuliert wird. Auch die Beeinflussung der CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen in Form der Immunabweichung (*immune deviation*) induziert Toleranz. Man unterteilt die Reaktion von CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen in die Th1-Antwort (zur Stimulation der zellulären Immunantwort) und die Th2-Antwort (zur Stimulation der humoralen Immunantwort). Wird das Gleichgewicht zwischen beiden Antworten in Richtung der humoralen Th2-Antwort verschoben, kann die zytotoxische T-Zellantwort unterdrückt werden [55, 56]. Die zytotoxische T-Zellantwort wird von manchen Tumoren auch durch die Akkumulation von regulatorischen T-Zellen und von Myeloischen Suppressor Zellen (MDSC) verhindert [57-60].

Tumorzellen nutzen teilweise die Deletion von T-Zellen zur Toleranzinduktion [61, 62]. Bei wiederholter Stimulation in Abwesenheit von kostimulatorischen Molekülen (B7) tritt der Aktivierungs-induzierte Zelltod (AICD) von T-Zellen ein [63]. Dabei wird in den T-Zellen über den Todesrezeptor Fas und den zugehörigen Fas-Ligand (FasL) Apoptose induziert [64-67]. Tumorzellen nutzen als Gegenangriff auf T-Zellen auch die Expression von Todesrezeptorliganden wie z.B. FasL, TNF $\alpha$  (Tumornekrosefaktor  $\alpha$ ) oder TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), die vom Immunsystem selbst verwendet werden [68-71]. Die Induktion von Apoptose in T-Zellen durch FasL auf der Tumorzelle wird kontrovers diskutiert, da es Unstimmigkeiten bezüglich der Expression auf bestimmten Tumorzelllinien und Zweifel gegenüber der Spezifität einiger Antikörper gibt [72, 73]. Außerdem existieren

---

neben der Apoptoseinduktion eine Reihe anderer Mechanismen, wie z.B. Inflammation oder Rekrutierung von MDSCs, die ebenfalls durch das Fas-System vermittelt werden [74-76].

Maligne Zellen zeigen häufig eine veränderte Expression von Molekülen der Apoptose-Signalwege. Die Tumorzelle erlangt dadurch eine Resistenz gegenüber Apoptose und spricht nicht mehr auf mögliche Immunantworten an [77].

### **1.1.3 Tumorantigene und ihre Bedeutung für die Tumorimmuntherapie**

Wenn man davon ausgeht, dass ein Teil der Tumoren trotz ihrer offensichtlichen Immunogenität nur aufgrund des Versagens des Immunsystems entstehen, ist es naheliegend, für die Tumorthherapie einen Ansatz zu wählen, der die Stärkung und Aktivierung der tumorspezifischen Immunantwort zum Ziel hat. Einige therapeutische Ansätze beschäftigen sich mit der allgemeinen Stimulation des Immunsystems mit Hilfe von Zytokinen wie z.B. Interleukin-2 (IL-2) oder TNF $\alpha$ . Ein beträchtlicher Teil der tumortherapeutischen Ansätze basiert jedoch auf der Eliminierung des Tumors durch die spezifische Immunantwort in Form von tumorspezifischen T-Zellen oder Antikörpern. Grundvoraussetzung hierfür ist, dass entsprechende Zielstrukturen oder Antigene bekannt sind, gegen die die T-Zellen oder Antikörper gerichtet sind, da nicht alle Antigene gleichermaßen geeignet sind. Zunächst muss die Zielstruktur eine Immunreaktion hervorrufen können, also immunogen sein. Es sollte stabil und besonders stark von Tumorzellen exprimiert werden. Gleichzeitig darf es aber nicht oder nur in sehr viel schwächerem Ausmaß in Zellen des Normalgewebes vorhanden sein. Für die T-Zell-Therapie ist essentiell, dass das Antigen in der Zelle zu Peptiden prozessiert wird, die von HLA Klasse I Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Bei Tumorantigenen für die Antikörpertherapie dagegen ist die Oberflächenexpression besonders wichtig, da nur auf diese Weise eine effektive Antikörperbindung gewährleistet werden kann und Prozesse, die von der Interaktion mit weiteren Komponenten des Immunsystems abhängig sind, stattfinden können. Besonders vorteilhaft ist, wenn das Tumorantigen eine für die Zelle überlebensnotwendige Funktion besitzt, da so allein aufgrund der Blockade der Funktion des Tumorantigens tumortoxische Effekte hervorgerufen werden. Idealerweise sollte das Tumorantigen während verschiedener Tumorstadien stabil exprimiert werden, um durch die Immuntherapie ein breiteres Wirkungsspektrum

---

hinsichtlich verschiedener Patienten zu erzielen. Die Expression eines Tumorantigens ausschließlich in frühen Tumorstadien ist eher nachteilig für eine antigenspezifische Therapie, da Tumoren in den meisten Fällen erst in späteren Tumorstadien diagnostiziert und behandelt werden. [78]

Aufgrund ihrer Expressionsmuster werden Tumorantigene in verschiedenen Gruppen unterteilt. Sogenannte "*cancer-testis*" (CT) Antigene (z.B. NY-ESO-1) werden nur von Tumorzellen und Keimzellen exprimiert. Antigene, die eine Unterscheidung von verschiedenen Differenzierungsstadien von Zellen ermöglichen (z.B. MelanA), werden als Differenzierungsantigene bezeichnet. Aufgrund der genetischen Instabilität von malignen Zellen können auch Tumorantigene entstehen, die sich durch Mutationen von den in normalen Zellen exprimierten Proteinen unterscheiden (z.B.  $\beta$ -Catenin). Manche Tumorantigene, wie z.B. Wachstumsfaktorrezeptoren (Her2), bringen den Tumorzellen Wachstumsvorteile und sind gegenüber normalen Zellen stark überexprimiert, wodurch eine, im Vergleich zum gesunden Gewebe, effizientere und stärkere Immunreaktion hervorgerufen wird [79-81].

Für die T-Zell-Therapie wurde eine Vielzahl an geeigneten Tumorantigenen identifiziert und auch eine Reihe klinischer Studien wurde durchgeführt. Die meisten adoptiven T-Zelltherapien zeigten nur eine mäßige Effizienz in der Klinik, weshalb bisher die Anwendung derartiger Therapien nicht über klinische Studien hinausging. Derzeit wird nach Möglichkeiten gesucht, den Erfolg von adoptiven T-Zelltherapien durch Beeinflussung von immunsuppressiven Mechanismen, die durch regulatorische T-Zellen oder MDSCs vermittelt werden, zu verbessern. Auf peptidbeladenen DCs basierende Tumorstoffe, die zur Etablierung einer tumorspezifischen T-Zellantwort beitragen, haben sich als erfolgreicher im Vergleich zu adoptiven T-Zelltherapien erwiesen und eine kommerzielle Zulassung in der Schweiz erhalten. [81]

Monoklonale Antikörpertherapien dagegen haben sich stark etabliert. Im letzten Jahrzehnt wurden therapeutische Antikörper zu der am häufigsten zugelassenen Wirkstoffgruppe für die Tumorthherapie (siehe Tab. 1.2) [82]. Ein besonders prominentes Beispiel für tumorspezifische Antikörper ist Trastuzumab (Herceptin®). Es handelt sich dabei um einen monoklonalen humanen Antikörper gegen den Wachstumsfaktorrezeptor Her2. Bei Brustkrebspatientinnen mit Her2-positivem

---

Tumor wurde eine signifikante Verbesserung der 5-Jahresüberlebensrate mit Trastuzumab als Bestandteil einer adjuvanten Therapie erreicht [83].

**Tabelle 1.2: Zugelassene therapeutische Antikörper für die Tumorthherapie.**

Generischer Name (Handelsname)	Zielstruktur	Anwendung	Referenz
Trastuzumab (Herceptin®)	Her2	Mammakarzinom	[83-86]
Rituximab (Rituxan®)	CD20	Lymphom	[87]
Cetuximab (Erbix®)	EGF-Rezeptor	Kolonkarzinom	[88]
Bevacizumab (Avastin®)	VEGF	Kolonkarziom, Lungenkarzinom, Mammakarzinom	[89]
Alemtuzumab (Campath-1H®)	CD52	Chronische lymphatische Leukämie	[90]
<b>Immunkonjugate</b>			
Ibritumomab tiuxetan (Zevalin®) (konjugiert mit <sup>90</sup> Yttrium) plus Rituximab	CD20	Lymphom	[91]
<sup>131</sup> I Tositumomab (konjugiert mit <sup>131</sup> Iod) plus Tositumomab (Bexxar®)	CD20	Lymphom	[92]
Gemtuzumab (Myelotarg®) (konjugiert mit Calicheamicin)	CD33	Akute myeloische Leukämie	[93]
<b>Bispezifische Antikörper</b>			
Catumaxomab (Removab®)	EpCAM, CD3	Maligner Aszites	[94]

Abkürzungen: CD = *cluster of differentiation*; EGF = *endothelial growth factor*; VEGF = *vascular endothelial growth factor*; EpCAM = *epithelial cell adhesion molecule* (modifiziert nach Weiner [82]).

Die Wirkung eines tumorspezifischen Antikörpers kann auf verschiedenen Mechanismen basieren. In vielen Fällen ist der Wirkungsmechanismus noch nicht vollständig geklärt. Die Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) beruht auf der Bindung von Antikörpern an die Tumorzelle und anschließender Erkennung der Fc-Region (*fragment crystallizable region*) durch Fc-Rezeptoren auf Immuneffektorzellen, wie z.B. NK-Zellen oder Makrophagen [95]. Im Tiermodell konnte die Abhängigkeit einer effizienten anti-Tumor-Antwort von der Interaktion zwischen Fc-Domäne und Fcγ-Rezeptor gezeigt werden. Inwiefern diese Interaktion für die Wirkung im Patienten relevant ist, ist bisher nicht vollständig geklärt [96]. Neben einer direkten Zellyse bei der ADCC wird auch eine Kreuzpräsentation der

Antigene aus zerstörten Tumorzellen durch DCs und eine daraus hervorgehende tumorspezifische T-Zellantwort vermutet [97-100]. Bei den Antikörpern, deren Wirkungsmechanismus von weiteren Komponenten des Immunsystems abhängt, ist die Art des Isotyps (z.B. Immunglobulin G1 für ADCC) entscheidend und auch die Art der Glykosylierung scheint darauf einen gewissen Einfluss zu haben [101].

Therapeutische Antikörper können in bestimmten Fällen auch unabhängig von dem Immunsystem eine Antitumor-Wirkung entfalten. Für den Antikörper Trastuzumab wurde neben der ADCC-Induktion eine Blockade von überlebensnotwendigen Signalwegen durch die Bindung an Wachstumsfaktorrezeptoren gezeigt, die direkt zum Absterben von malignen Zellen führte [102]. Durch den Tumor oder das Stroma sezernierte Zytokine wie z.B. VEGF können mittels entsprechender Antikörper (z.B. Avastin) neutralisiert werden, um das Tumorwachstum zu stoppen [103]. Tumorspezifische Antikörper, die *per se* keine der oben genannten Aktivitäten besitzen, können durch Kopplung an Effektorsubstanzen, wie Radionuklide (z.B. Ibritumomab tiuxetan) oder Toxine (Gemtuzumab) ebenfalls therapeutisch angewandt werden [91, 93].

Durch die Kombination von mehreren Spezifitäten in Form von bispezifischen bzw. trispezifischen Antikörpern wird die Wirkung von Antikörpern verstärkt [104-106]. Häufig wird dabei die Spezifität gegen ein Tumorantigen mit einer CD3-Spezifität zur Rekrutierung von T-Zellen und/oder einer Spezifität gegen Fc-Rezeptoren zur Rekrutierung von NK-Zellen und Makrophagen verbunden [107, 108].

Betrachtet man die Liste der bisher zugelassenen tumorspezifischen Antikörper, ist nur eine sehr begrenzte Zahl an Zielstrukturen und Anwendungsbereiche zu erkennen. Es besteht daher ein großer Bedarf an neuartigen Zielstrukturen, um die hohe Effizienz von Antikörpertherapien auch für Tumorerkrankungen zu nutzen, die nicht den zugelassenen Indikationen entsprechen.

## **1.2 Exosomen**

Der Begriff Exosomen wurde 1981 erstmal zur Beschreibung von Mikrovesikeln, die 5'-Nucleotidase-Aktivität besitzen und von neoplastischen Zelllinien sezerniert

---

werden, verwendet [109]. Johnstone et al. zeigten, dass derartige Vesikel mittels Zentrifugation aus dem Überstand von Retikulozyten-Kulturen gewonnen werden können und dass diese multivesikulären Endosomen entstammen [110]. Im Laufe der Zeit konnten von verschiedenen Gruppen Exosomen aus den Zellkulturüberständen von hämatopoetischen Zellen, Tumorzellen hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Ursprungs und Epithelzellen isoliert werden [111]. Das Argument, dass es sich bei Exosomen nur um ein Zellkulturartefakt handeln könne, wurde durch den Nachweis von Exosomen in Körperflüssigkeiten, wie z.B. Plasma, Serum, Urin oder Milch entkräftet [112-117]. Veröffentlichungen der letzten zehn Jahre, die die Beteiligung von Exosomen an verschiedenen physiologischen und pathologischen Prozessen belegten, verstärkten besonders das Interesse an dem Forschungsgebiet der sezernierten Membranvesikel, das neben Exosomen auch andere Membranvesikel, wie z.B. Mikrovesikel oder Ektosomen, die sich in Größe, Zusammensetzung und Sedimentationsverhalten unterscheiden, umfasst. Die bisherigen Erkenntnisse zu den verschiedenen Membranvesikeln sind in Tabelle 1.3 zusammengefasst [118]. Die als Exosomen bezeichneten Mikrovesikel sollten allerdings nicht mit dem als „Exosom“ bezeichneten Ribonukleasekomplex, der für den Abbau von nukleären RNAs verantwortlich ist, verwechselt werden [119].

### **1.2.1 Biogenese und Zusammensetzung von Exosomen**

Exosomen sind Membranvesikel, die die selbe Topologie wie Zellen besitzen. Das heißt, sie entsprechen dem von einer Lipiddoppelmembran umgebenen Zytoplasma. Sie besitzen, abhängig von der Zelllinie, der sie entstammen, bei Negativkontrastierung in der Elektronenmikroskopie eine runde, eingebuchtete („*cup-shaped*“) Form mit einem Durchmesser von 30 bis 100 nm und einer Dichte von 1,13 g/mL bis 1,19 g/mL im Saccharosegradient [120, 126, 127]. Ein entscheidendes Merkmal, das Exosomen von anderen sezernierten Membranvesikeln (wie z.B. Mikrovesikeln) unterscheidet, ist ihre Sekretion über so genannte multivesikuläre Körper (MVB) (siehe Abb. 1.2). MVB werden durch Einstülpung der Membran aus dem späten Endosom gebildet. Bei Fusionierung der äußeren Membran des MVB mit der Plasmamembran werden die intraluminalen Vesikel als Exosomen sezerniert [128-132]. Der Transport der MVB in die Zellperipherie ist Microtubulin- und Kinesin-abhängig [133]. Die Fusion von MVB mit der Plasmamembran findet unter Erhöhung

---

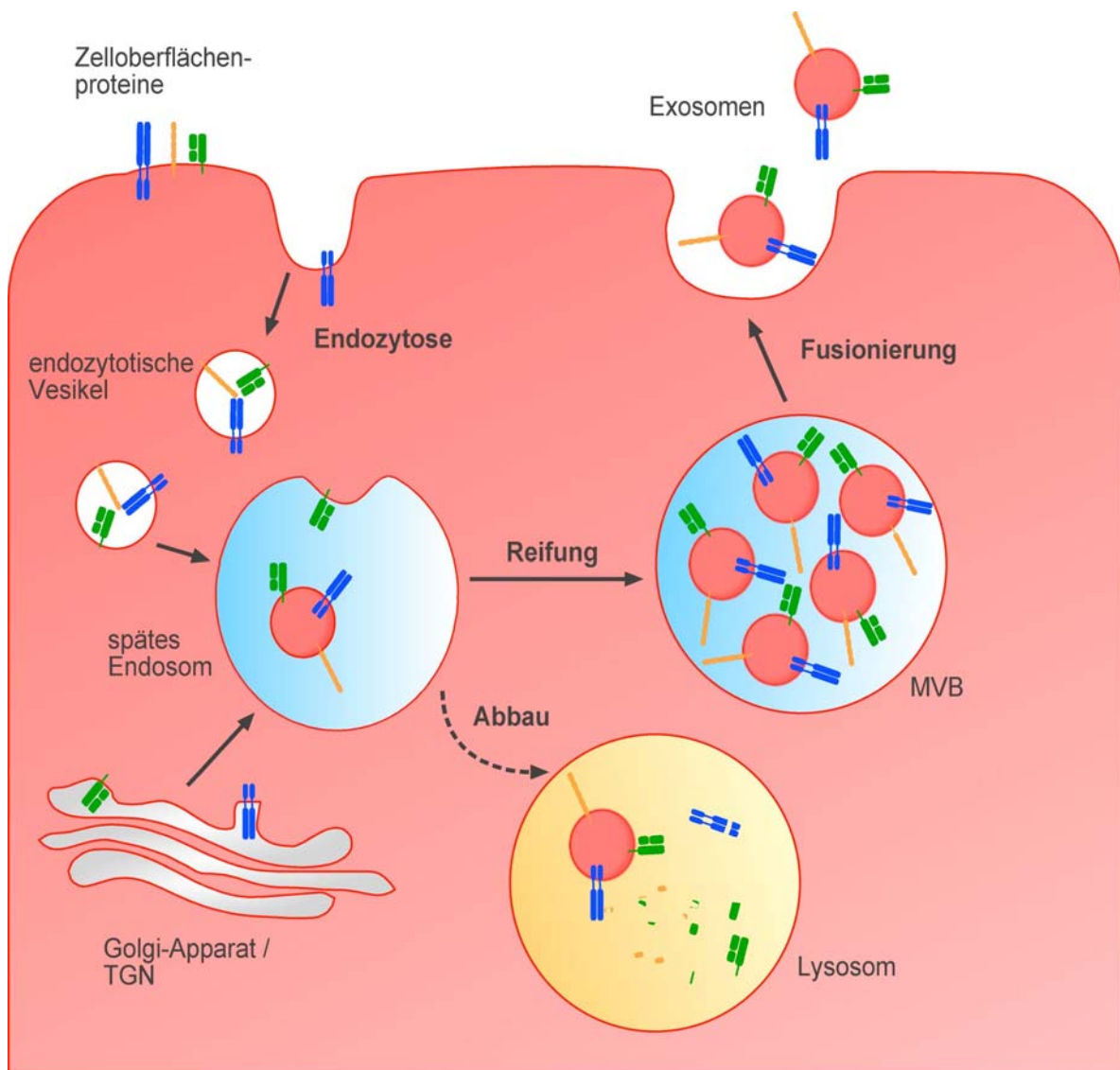


der intrazellulären Calciumionen-Konzentration und der Beteiligung von Synaptotagmin, Rab und SNARE Proteinen statt [134-137]. Die Sekretion von Exosomen *in vitro* kann je nach Zelltyp spontan stattfinden oder induziert werden. Retikulozyten, T-Zellen, Mastzellen und ruhende B-Zellen beispielsweise können Exosomen nur nach vorangegangener Aktivierung sezernieren [129, 138-144]. Eine konstitutive Sekretion von Exosomen wurde dagegen für Epstein-Barr Virus (EBV)-transformierte B-Zellen, DCs, Makrophagen und einige Tumorzelllinien beschrieben [130, 145, 146]. Zusätzlich können Stressfaktoren, wie z.B. Bestrahlung oder Seneszenz, die Sekretion von Exosomen-artigen Vesikeln durch Aktivierung des Tumorsuppressors p53 in Tumorzellen bewirken [147, 148].

**Tabelle 1.3 Merkmale verschiedener Arten sezernierter Membranvesikel.**

	Exosomen	Mikro-vesikel	Ektosomen	Membran-partikel	exosomen-ähnliche Vesikel	Apoptotische Vesikel
<b>Größe [nm]</b>	50-100	100-1000	50-200	50-80	20-50	50-500
<b>Form (EM)</b>	"cup shape"	unregelmäßig, elektronendicht	bilamellare, runde Strukturen	rund	unregelmäßig	heterogen
<b>Dichte [g/ml]</b>	1,13-1,19	unbekannt	unbekannt	1,04-1,07	1,1	1,16-1,28
<b>Sedimentation [g]</b>	100.000	10.000	160.000-200.000	100.000-200.000	175.000	1.200-10.000 oder 100.000
<b>Lipid-zusammensetzung</b>	Cholesterin, Sphingomyelin, Ceramid, enthalten "lipid rafts", exponieren Phosphatidylserin	exponieren Phosphatidylserin	Cholesterin, Diacylglycerol, exponieren Phosphatidylserin	unbekannt	keine "lipid rafts"	unbekannt
<b>Markerproteine</b>	Tetraspanine (CD63, CD9), Alix, TSG101	Integrine, Selectine, CD40L	CR1 und proteolytische Enzyme, kein CD63	CD133, kein CD63	TNFR1	Histone
<b>Intrazellulärer Ursprung</b>	Endosomen	Plasmamembran	Plasmamembran	Plasmamembran	Interne Kompartimente (?)	unbekannt
<b>Referenz</b>	[120]	[121]	[122]	[123]	[124]	[125]

Abkürzungen: EM = Elektronenmikroskopie; CD = *cluster of differentiation*; TSG101 = tumor susceptibility antigen 101; CD40L = CD40-Ligand; CR1 = *complement receptor 1*; TNFR1 = Tumornekrosefaktorrezeptor 1. (Nach Thery [118]).



### Abbildung 1.2: Exosomenbiogenese.

Membranproteine gelangen von der Zelloberfläche über endozytische Vesikel oder aus dem Endoplasmatischen Retikulum über das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) durch Fusion in späte endosomale Vesikel. Durch Einwärtsstülpung der endosomalen Membran werden intraluminale Vesikel gebildet, die die einsortierten (z.B. mittels ESCRT-Komplex) Proteine enthalten. Durch vermehrte Einstülpung der Membran bildet sich ein multivesikulärer Körper (MVB) aus. Bei der Fusionierung des MVB mit der Plasmamembran werden die intraluminale Vesikel als Exosomen freigesetzt. Alternativ zu der MVB-Bildung kann sich das späte Endosom auch zu einem Lysosom entwickeln, was zur Degradation der enthaltenen Proteine führt. (modifiziert nach Fevrier [158])

Exosomen weisen ein sehr charakteristisches Muster an Proteinkomponenten auf. Es ist daher anzunehmen, dass die exosomalen Proteine unter geregelten Bedingungen eingebaut werden. Hierzu sind verschiedene Mechanismen beschrieben. In *Saccharomyces cerevisiae* wurde gezeigt, dass die

Monoubiquitinierung von endosomalen Proteinen als ein Signal zur Einsortierung der Proteine in intraluminale Vesikel dient [149-151]. An diesem Mechanismus ist der aus mehreren Proteinen zusammengesetzte ESCRT-Komplex (*endosomal sorting complex required for transport*) beteiligt [152-154]. Jedoch findet man auch Proteine, die unabhängig vom ESCRT-Komplex z.B. über Aggregation in Exosomen eingebracht werden [155]. Eine durch Antikörper induzierte Aggregation von Proteinen kann ebenfalls zum Einbau in MVBs führen [142, 155]. Ein alternativer Weg ist abhängig von dem Lipid Ceramid [156]. Ceramid induziert bevorzugt laterale Phasentrennungen und besitzt zudem eine keilförmige Struktur, was den Einbau von Proteinen erleichtern könnte. [157]

Die genaue Zusammensetzung von Exosomen hängt stark von der Zellart, der sie entstammen, ab. Neben den Zelltyp-spezifischen Komponenten gibt es jedoch auch Bestandteile, die, unabhängig von der Ursprungszellart, in allen Exosomen zu finden sind. Dazu zählen Proteine, die an der Membranfusion beteiligt sind, wie z.B. Rab GTPasen, Annexine und Flotillin, Proteine für die Bildung der MVB (Alix, TSG101), Hitzeschockproteine (HSP70 und HSP90) und Adhäsionsmoleküle, wie z.B. Integrine und Tetraspanine [125, 159-162]. Charakteristisch für Exosomen ist die Anreicherung von Lipiden, wie Cholesterol, Sphingolipide, Ceramide und Glycerophospholipide mit langen, gesättigten Fettsäureketten, die auch in *lipid rafts* (Lipidstrukturen in Membranen, die zu einer effizienten Signaltransduktion beitragen) gefunden werden [156]. Einige aktuellere Studien zeigen auch die Anwesenheit von mRNAs (*messenger ribonucleic acid*) und miRNAs (*micro ribonucleic acid*) in Exosomen [163, 164].

### **1.2.2 Funktion von Exosomen**

Ursprünglich wurde angenommen, dass die Hauptfunktion von Exosomen die Entsorgung von nicht mehr benötigten Proteinen ist, wie z.B. Transferrinrezeptor und Acetylcholinesterase während der Reifung von Retikulozyten, und eine Alternative zur lysosomalen Degradation darstellt [110, 165, 166]. Die Möglichkeit, dass Exosomen auch ein Mittel zur interzellulären Kommunikation darstellen könnten, findet jedoch zunehmend Anerkennung.

Exosomen aus Immunzellen spielen sowohl eine Rolle bei der Antigenpräsentation als auch bei der Immunsuppression. Exosomen aus APCs können HLA-abhängig T-Zellen stimulieren [130, 167]. Mit Hilfe von Exosomen aus Tumorpeptid-gepulsten DCs war es sogar möglich, im Mausmodell eine T-Zell-abhängige Tumorabstoßung zu erreichen [145]. Neben antigenabhängigen immunstimulatorischen Effekten wurden auch antigenunabhängige Effekte, z.B. durch CDC25 auf Mastzellexosomen, beobachtet [168]. Auch eine Kreuzpräsentation von Antigenen auf Tumorexosomen oder Virus-infizierten Epithelzellen durch DCs und eine daraus folgende Aktivierung von Immuneffektorzellen ist denkbar [169-171]. Auf der anderen Seite können Exosomen (z.B. in Form von Tumorexosomen oder Tolerosomen) Antigen-unabhängige immunsuppressive Effekte hervorrufen [172-179]. Auf die immunsuppressive Wirkung von Tumorexosomen wird im folgenden Kapitel näher eingegangen.

Es wurde außerdem gezeigt, dass die in den Exosomen enthaltenen RNA-Moleküle auf andere Zellen übertragen und dort translatiert werden. Diese Klasse von RNA wird auch als esRNA (*exosomal shuttle RNA*) bezeichnet [163].

Retroviren und Prionen scheinen auch MVBs und den exosomalen Sekretionsweg zu nutzen [180-182]. Es ist jedoch unklar, ob es sich dabei tatsächlich um den gleichen Sekretionsweg oder um zwei sehr ähnliche Sekretionswege handelt [183]. Immunogene Komponenten, so genannte PAMPs (*pathogen associated molecular pattern*), von intrazellulären Mikroorganismen, wie z.B. Mykobakterien oder Salmonellen, werden durch Exosomen auf benachbarte Zellen übertragen und induzieren damit eine proinflammatorische Antwort [146, 184-186].

Die meisten dieser exosomalen Effekte wurden *in vitro* nachgewiesen und einige dieser Effekte, sowohl immunstimulatorische als auch immunsuppressive, konnten auch *in vivo* beobachtet werden. Welcher dieser beiden Effekte überwiegt, scheint jedoch stark von der Zusammensetzung des applizierten Exosomenpräparats (z.B. Anwesenheit von kostimulatorischen Molekülen oder Zytokinen) abhängig zu sein [118]. Über die tatsächliche physiologische Bedeutung von Exosomen ist bisher nur wenig bekannt. Eine Studie an schwangeren Patientinnen zeigte eine negative Korrelation zwischen dem Serumgehalt an Plazentaexosomen und Frühgeburten

[115]. Exosomen von Plazentazellen scheinen dabei eine Immunreaktion der Mutter gegen den Fötus zu unterdrücken. Des Weiteren wurde bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom ein positiver Zusammenhang zwischen Tumorlast und Serumgehalt an Tumorexosomen beobachtet, was die Vermutung einer immunsuppressiven bzw. tumorbegünstigenden Funktion von Tumorexosomen bekräftigt [117]. Aus den Indizien von *in vitro* und *in vivo* Experimenten wird Exosomen aus DCs eine Funktion des kontaktunabhängigen Antigenaustausches zwischen verschiedenen, räumlich getrennten DC-Populationen zugeschrieben [118]. Der Transfer von Exosomen aus Darmepithelzellen oder bronchialen Zellen auf DCs könnte dabei zur Entwicklung einer Toleranz gegen Lebensmittel- bzw. Atemwegsallergene beitragen [178, 187]. Schließlich können Exosomen auch als Vakzine für die Immuntherapie eingesetzt werden. Bisher werden hauptsächlich Exosomen aus DCs, die mit Peptiden aus Tumorantigenen beladen wurden, für die Tumortherapie eingesetzt [145, 188, 189]. In einer anderen Studie wurde mit Tumorexosomen vakziniert [190]. Eine Heilung der Tumorerkrankung wird durch die Therapie mit Tumorexosomen vermutlich nicht erreicht, aber eine Verlängerung der Lebenserwartung bei Patienten, die auf konventionelle Therapien nicht ansprechen, erscheint möglich [118].

### **1.2.3 Tumorexosomen**

Tumorzellen beeinflussen ihre Umgebung durch die Sekretion von löslichen Faktoren und direkten Zellkontakt. Alternativ dazu geben Tumorzellen auch Exosomen ab, die ebenfalls auf die Tumorumgebung einwirken. Tumorexosomen liegen in Körperflüssigkeiten wie Serum, Aszites und Pleuraergüssen von Tumorpatienten in hoher Abundanz vor [191-193]. In der Literatur sind sowohl immunsuppressive Effekte als auch immunstimulatorische Effekte für Exosomen beschrieben. Die immunstimulatorischen Effekte beziehen sich hauptsächlich auf Exosomen, die von Tumorzellen bei Stressexposition, wie z.B. Hitzeschock, sezerniert wurden [194-198]. Durch die Hitzeschockbehandlung wird die Expression von Hitzeschockproteinen (z.B. HSP70) angeregt und die Immunogenität der Tumorexosomen dadurch erhöht. Eine derartige Behandlung könnte vor allem für die Verwendung von Tumorexosomen in der Immuntherapie vorteilhaft sein. Gleichzeitig ist ein besonderes Merkmal von Tumorexosomen die Anwesenheit von Tumorantigenen. Exosomen aus Melanomzellen enthalten beispielsweise die Tumorantigene MelanA und gp100. In

---

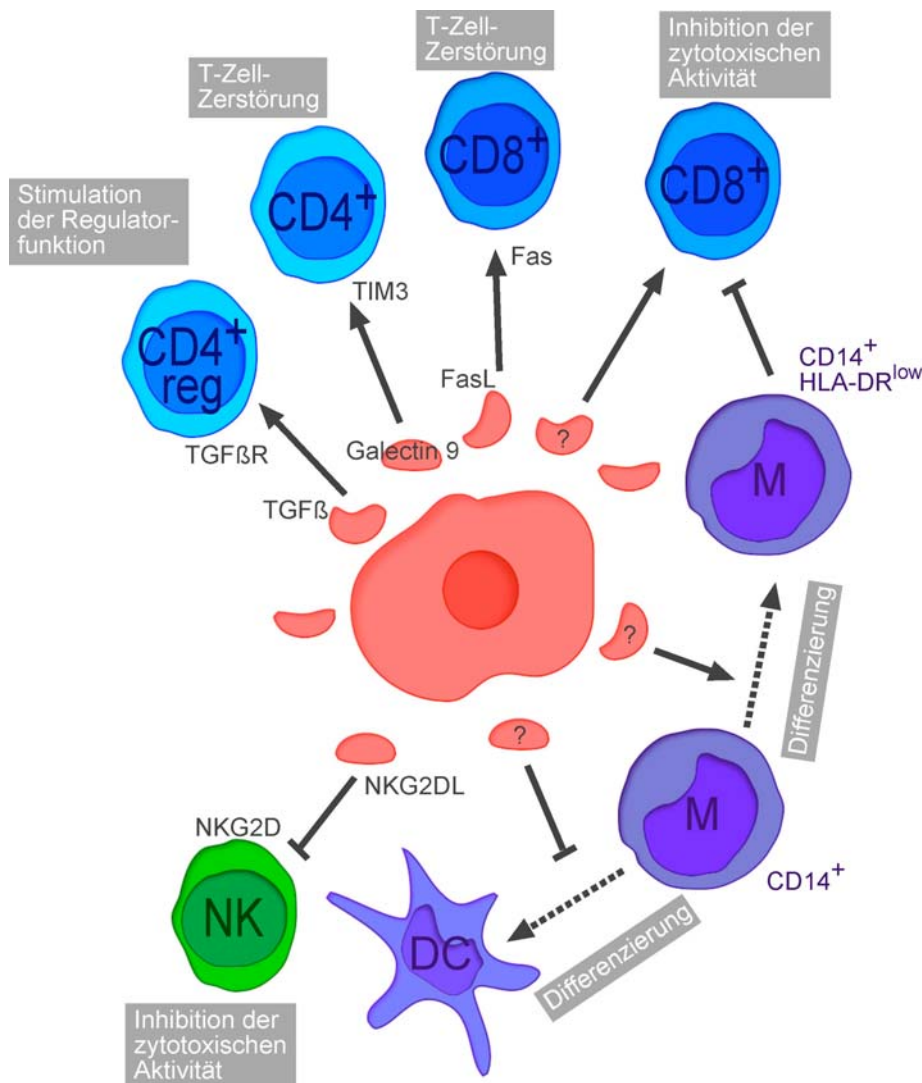
von Kolonkarzinomzellen sezernierten Vesikeln fand man den Tumormarker CEA (*carcinoembryonic antigen*) und den Wachstumsfaktorrezeptor Her2 [170, 174, 192]. Aufgrund dieser beiden Eigenschaften stellen Exosomen ein potenziell gut geeignetes Mittel zur Vakzinierung für die Tumorthherapie dar.

Unter physiologischen Bedingungen scheint die Funktion von Tumorexosomen jedoch hauptsächlich in der Suppression einer tumorspezifischen Immunantwort zu liegen. Im Mausmodell beschleunigten Tumorexosomen das Wachstum eines implantierten Tumors [199]. Mechanismen, die zur Immunsuppression führen, sind in Abbildung 1.3 zusammengefasst. Tumorexosomen, gewonnen aus Zellkulturüberständen oder Tumorpatienten, können Apoptose in T-Zellen induzieren. Bei CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde eine Fas/FasL-abhängige Apoptoseinduktion gezeigt und bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen konnte auch eine Apoptoseinduktion durch Interaktion von exosomalem Galectin 9 mit TIM3 (*T cell immunoglobulin domain and mucin domain protein 3*) nachgewiesen werden [174, 192, 200]. Auch die IL2-induzierte T-Zellproliferation kann durch Tumorexosomen mittels Promotion von regulatorischen T-Zellen verringert werden [201, 202]. Die zytotoxische Aktivität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen und NK-Zellen wird ebenfalls von Tumorexosomen beeinträchtigt [199, 203]. Tumorexosomen beeinträchtigen die Differenzierung von myeloischen Vorläuferzellen in DCs und begünstigen stattdessen die Bildung von MDSCs [193, 204, 205]. Die Promotion von regulatorischen T-Zellen wird hauptsächlich durch das Zytokin TGFβ auf Tumorexosomen vermittelt. Die Beeinträchtigung der Zytotoxizität von NK-Zellen findet zumindest teilweise durch die Interaktion von exosomalem NKG2D (*NK group 2, member D*) Liganden mit NKG2D statt, wodurch NKG2D auf NK-Zellen oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen herunterreguliert wird.

Abgesehen von der Immunsuppression wird auch das Wachstum von Tumorzellen direkt durch Tumorexosomen begünstigt. Es wurde gezeigt, dass Exosomen aus Glioblastomzellen angiogene Proteine, mRNAs und miRNAs enthalten und das Wachstum von Gliomzellen verstärken [164]. Des Weiteren können Exosomen aus Gliomzellen, die EGFR VIII (*epithelial growth factor receptor VIII*) enthalten, die Transformation und kontaktunabhängige Wachstumskapazität von anderen Tumorzellen verstärken [206]. Bei Magenkarzinomzellen wurde eine durch Tumorexosomen hervorgerufene Tumorzellproliferation durch Aktivierung der

---

PI3K/Akt (Phosphoinositid 3-Kinase/Akt) und MAPK/ERK (Mitogen-aktiviertes-Protein-Kinase/ Extrazelluläres-Signal-regulierte Kinase) Signalwege beobachtet [207].



### Abbildung 1.3: Exosomen-abhängige Immunevasionsmechanismen.

Tumorzellen sezernieren Exosomen, die auf verschiedene Weisen mit Komponenten des Immunsystems interagieren. TGFβ (*transforming growth factor β*) auf Tumorexosomen stimuliert die Regulatorfunktion von regulatorischen T-Zellen (CD4<sup>+</sup>reg) über den TGFβ-Rezeptor (TGFβR). Die Zerstörung von T-Zellen wird bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen über Galectin 9 auf Exosomen über den Rezeptor TIM3 bzw. bei CD8<sup>+</sup> T-Zellen über Fas-Ligand (FasL) auf Exosomen über Fas vermittelt. Tumorexosomen inhibieren die zytotoxische Aktivität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen (CD8<sup>+</sup>) und NK-Zellen (NK). Im Fall der NK-Zellen ist die Interaktion von NKG2D (*NK group 2, member D*) mit dem exosomal NKG2D-Ligand (NKG2DL) für diesen Effekt verantwortlich. Auch die Differenzierung von Monozyten (M) in Dendritische Zellen (DC) wird zugunsten der Entwicklung eines suppressiven Monozytenphänotyps (M CD14<sup>+</sup> HLA-DR<sup>low</sup>) durch Tumorexosomen inhibiert. (Nach Thery [118]).

Die Berücksichtigung der Effekte von Tumorexosomen auf die Tumorzellen und auf das Immunsystem könnte die Wirkungsweise von Tumorthérapien entscheidend verbessern. Daher ist es von großer Wichtigkeit, die Wirkungsmechanismen von Tumorexosomen, aber auch den Zusammenhang zwischen Tumorexosomen in Tumorpazienten und dem Tumor selbst genauer zu studieren.

### **1.3 Ziel der Arbeit**

Es wurde gezeigt, dass Tumorexosomen eine Vielfalt an bereits bekannten Tumorantigenen enthalten. Es ist daher denkbar, dass auch bisher unbekannte Tumorantigene in Tumorexosomen zu finden sind. Die Identifikation von neuartigen Zielstrukturen in Form von Tumorantigenen ist essentiell für die Entwicklung therapeutischer Antikörper und diagnostischer Verfahren. Bisher existieren für solide Tumoren nur wenige Zielstrukturen, gegen die in der Klinik erfolgreiche Antikörper generiert werden konnten. Die Anwesenheit von Tumorantigenen, gegen die spezifische Antikörper und T-Zellen in Patienten existieren, erscheint paradox angesichts der vielfältigen immunsuppressiven Eigenschaften von Exosomen. Es ist jedoch denkbar, dass Tumorexosomen ein von dem Tumor ausgehendes Ablenkungsmanöver für tumorantigen-spezifische T-Zellen und Antikörper darstellen und durch Bindung an T-Zellrezeptoren bzw. an Antikörperparatope deren Wirkung unterbinden.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die technische Anwendbarkeit von Tumorexosomen für die Identifizierung neuer Zielstrukturen für die Tumorthérapie und für die Herstellung von tumorspezifischen Antikörpern zu analysieren und gleichzeitig eine mögliche Bedeutung der antigenabhängigen Interaktion von Tumorexosomen mit Antikörpern bzw. T-Zellrezeptoren für die Immunevasion von Tumoren zu untersuchen.



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Referenz
A375	Melanom	Giard et al., 1973 [208]
A549	Lungenkarzinom	Giard et al., 1973 [208]
BBL RZ	B-Blasten, HLA-A2 positiv	Wiesner et al., 2008 [209]
BT-474	Mammakarzinom	Lasfargues et al., 1978 [210]
CD40L	L-929 transfiziert mit CD40L	Garrone et al., 1995 [211]
CLG-Klon	LMP2-spezifischer CD8 <sup>+</sup> T-Zellklon	Laboreigene Zelllinie
JNB3	mLCL, HLA-A2 positiv	Laboreigene Zelllinie
Jurkat	T-Zelleukämie	Weiss et al., 1984 [212]
L-929	Murine Fibroblasten	Earle et al., 1943 [213]
MAB2	mLCL, HLA-A2 positiv	Laboreigene Zelllinie
Mel624.38	Melanom	Rivoltini et al., 1995 [214]
MG-63	Osteosarkom	Billiau et al., 1977 [215]
PCI-1	Hypopharynxkarzinom	Rabinowich et al., 1992 [216]
RCC 1.24	Nierenzellkarzinom	Jaffee et al., 1993 [217]
SKBR3	Mammakarzinom	Trempe et al., 1976 [218]
TC RZ ELA8-I3*	MelanA-spezifischer CD8 <sup>+</sup> T-Zellklon	Im Rahmen dieser Arbeit etabliert
TC-71	Ewing-Sarkom	Scotlandi et al., 1998 [219]

mLCL = B-Zellen, die mit Hilfe eines nicht-replikationsfähigen Epstein-Barr Virus immortalisiert wurden.

#### 2.1.2 Patientenmaterial

Art	Erkrankung	Bezugsquelle
Aszites	Ovarialkarzinom	Universitäts-Frauenklinik Essen
Gefrierschnitte von Geweben aus dem Kopf-Hals-Bereich	Diverse Tumoren und gesunde Gewebe	HNO-Forschung, Klinikum der Universität München
Leukozytenpräparat	gesund	Universitätsklinikum Ulm
Vollblut	gesund	Freiwillige Spender

### 2.1.3 Antikörper

Antikörper	Herkunft/Isotyp	Bezugsquelle
8G7	Ratte/ IgG2a	Hybridom im Rahmen dieser Arbeit etabliert
$\alpha$ -FLAG (Klon 4H3)	Ratte/ IgG2b	AG Dr. Elisabeth Kremmer, Helmholtz Zentrum München
$\alpha$ -GST (Klon 6G9)	Ratte/ IgG2a	AG Dr. Elisabeth Kremmer, Helmholtz Zentrum München
$\alpha$ -HIS (Klon 3D5)	Maus/ IgG2b	AG Dr. Elisabeth Kremmer, Helmholtz Zentrum München
$\alpha$ -human CD3, PeCy5-konjugiert	Maus	Becton Dickinson GmbH (BD Pharmingen™), Heidelberg
$\alpha$ -human CD4, FITC-konjugiert	Maus	Becton Dickinson GmbH (BD Pharmingen™), Heidelberg
$\alpha$ -human CD8, APC-konjugiert	Maus	Becton Dickinson GmbH (BD Pharmingen™), Heidelberg
$\alpha$ -human CD40	Maus/ IgG2a	Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz (USA)
$\alpha$ -human EpCAM/ clone HO-3-19	Maus/ IgG2a	Trion Research GmbH, Martinsried
$\alpha$ -human Her2/neu/ clone 2502A	Maus/ IgG2a	Trion Research GmbH, Martinsried
$\alpha$ -human Her2/ErbB2 M45 (3250)	Ratte/ polyklonal	Cell Signaling Technology, Danvers (USA)
$\alpha$ -human Her2/ErbB2 44E7 (2248)	Maus/ IgG1	Cell Signaling Technology, Danvers (USA)
$\alpha$ -human HLA-ABC human (SM1222P)	Maus/ IgG2a	AcrisAntibodies GmbH, Hiddenhausen
$\alpha$ -human IgG (H+L), PE-konjugiert	Ziege/ F(ab') <sub>2</sub> Fragment	Beckman Coulter, Krefeld
$\alpha$ -Kaninchen Ig, HRP-konjugiert (W4011)	Ziege/ IgG (H+L)	Promega GmbH, Mannheim
$\alpha$ -Kaninchen Ig (H+L), IRDye 800CW – konjugiert	Schaf	Rockland Inc. Gilbertsville (USA)
$\alpha$ -Maus IgG (H+L), AlexaFluor® 680 – konjugiert	Ziege	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
$\alpha$ -Maus IgG, Cy5-konjugiert	Ziege	Dianova GmbH, Hamburg

Antikörper	Herkunft/Isotyp	Bezugsquelle
$\alpha$ -Maus IgG, FITC-konjugiert	Ziege	BioLegend, San Diego (USA)
$\alpha$ -Maus IgG (H+L), HRP-konjugiert (W4021)	Ziege	Promega GmbH, Mannheim
$\alpha$ -Ratte IgG, Cy3-konjugiert	Maus	Dianova GmbH, Hamburg
$\alpha$ -Ratte IgG, Cy5-konjugiert	Maus	Dianova GmbH, Hamburg
$\alpha$ -Ratte IgG, Cy5-konjugiert	Ziege	Dianova GmbH, Hamburg
$\alpha$ -Ratte IgG (H+L), Biotin-konjugiert	Ziege	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
$\alpha$ -Ratte IgG + IgM, ALP-konjugiert	Ziege	Dianova GmbH, Hamburg
$\alpha$ -Ratte IgG + IgM, HRP-konjugiert	Ziege	Dianova GmbH, Hamburg
Trastuzumab (Herceptin®)	Rekombinantes humanisiertes IgG1 $\kappa$	Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen
Isotyp-PE	Maus IgG2a	BioLegend, San Diego (USA)

$\alpha$ : anti; ALP: alkalische Phosphatase; APC: Allophycocyanin; Cy3/5: Cyanin 3/5; FITC: Flourescein-Isothiocyanat; HRP: Meerrettich-Peroxidase; H+L: schwere und leichte Kette; Ig: Immunglobulin; PE: Phycoerythrin

### 2.1.4 Peptide und Pentamere

Peptide und Pentamere wurden von der Firma ProImmune, Oxford (UK) bezogen.

Bezeichnung	Beschreibung	Aminosäuresequenz	Referenz
ELA	HLA-A2 restringiertes Peptid aus MelanA	ELAGIGILTV	Valmori et al., 1998 [220]
CLG	HLA-A2 restringiertes Peptid aus dem EBV-Protein LMP-2	CLGGLLTMV	Wills et al., 1996 [221]
Melan A Pentamer	HLA-A*0201 MHC Pro5™ Pentamer R-PE-Konjugat beladen mit ELA-Peptid	ELAGIGILTV	Maeurer et al., 2002 [222]
NLV	HLA-A2 restringiertes Peptid aus dem CMV-Protein pp65	NLVPMVATV	Lee et al., 1993 [224]

## 2.1.5 Chemikalien

Chemikalien, die nicht in der folgenden Tabelle aufgeführt sind, wurden von der Firma Carl Roth GmbH (Karlsruhe) bezogen.

Artikel	Bezugsquelle
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Aldehyd-Sulfat-Latex-Partikel	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Alkaline Phosphatase Substrate Kit	BioRad Laboratories GmbH, München
Aurion Block/ Aurion BSA-c™	BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln
Avidin-Biotin-HRP-Komplex	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
BCA Protein Assay Kit	Pierce Biotechnology, Rockford (USA)
Biocoll Separating Solution	Biochrom AG, Berlin
Calcein-AM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Choleratoxin Untereinheit B; HRP-Konjugiert	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Chromogen AEC-Substratlösung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Complete, Mini, Protease Inhibitor	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
DMP (Dimethylpimelimidat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DNA-Größenstandard	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
ELISA-Kit IFN $\gamma$	Mabtech AB, Nacka Strand (Schweden)
Entwicklerreagenzien	Ernst Christiansen GmbH, Planegg
FACS Flow™	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
FACS Rinse™	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
FACS Röhrchen	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Fötales Kälberserum	PAA-Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
Heparin	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare Europe GmbH, München
Interleukin-2 (Proleukin)	Chiron GmbH, München
Interleukin-4	R&D Systems, Minneapolis (USA)
MACS® CD8 micro beads human	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
MACS® Monocyte Isolation Kit II human	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Medium für die konfokale Mikroskopie (Vectashield Mounting Medium)	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
Mykoplasmenachweis Venor® GeM	Minerva Biolabs GmbH, Berlin
NHS-PEG <sub>4</sub> -Biotin	Pierce Biotechnology, Rockford (USA)
OptiPrep™	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PBS	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
Phytohämagglutinin (PHA-M)	Calbiochem/ Merck KGaA, Darmstadt
Proteinase K	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Protein G Sepharose 4 Fast Flow	GE Healthcare Europe GmbH, München

<b>Artikel</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Proteingrößenstandard „Benchmark“	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Proteingrößenstandard „Precision Plus Protein Western C“	BioRad Laboratories GmbH, München
Proteingrößenstandard „Prestained Protein Molecular Weight Marker“	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Roti®-Lumin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
StrepTactin-HRP Konjugat	BioRad Laboratories GmbH, München
Taq-Polymerase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Trypsin EDTA	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
Zellkulturmedien und Zusätze	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein

### 2.1.6 Verbrauchsmaterial

<b>Artikel</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Chemilumineszenz-Filme	GE Healthcare Europe GmbH, München
Einwegpipetten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Kanülen	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Kryoröhrchen	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold
MACS® Säulen (LS, MS)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
MaxiSorp™ 96-Lochplatten	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold
MaxiSorp™ StarTube	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold
Nitrocellulosemembran, Protran®	Schleicher&Schuell/ Whatman, Dassel
Objektträger, Superfrost® Plus	Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig
Pipettenspitzen	Gilson Inc, Middleton (USA)
Pipettenspitzen, gestopft	Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf
Röhrchen, steril, Zellkultur	Falcon/ BD, Heidelberg
Skalpelle	Feather/ PFM, Köln
Spritzen	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Sterilfilter (0,22 µm, Polyethersulfon)	Millipore, Billerica (USA)
Zellkulturflaschen	Falcon/ BD, Heidelberg Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold
Zellkultur Mehrloch-Platten	Falcon/ BD, Heidelberg
Zentrifugationsfilter Centricon® Plus-70	Millipore, Billerica (USA)
Zentrifugationsfilter Ultrafree®-MC (10kDa)	Millipore, Billerica (USA)
Zentrifugengefäße 1,5 mL/ 2 mL safe-lock®	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifugengefäße Polyallomer	Beckman Coulter, Krefeld

## 2.1.7 Geräte

Artikel	Bezugsquelle
Bestrahlungsanlage Gammazell40 ( <sup>137</sup> Cs)	AECL, Missisauga (Kanada)
BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg
Blotting-Apparatur	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Cellscreen® V1.6.	Roche Innovatis AG, Bielefeld
Durchflusszytometer „FACSCalibur“	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Elektrophoresekammer (horizontal)	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Elektrophoresekammer (vertikal)	Hoefler Scientific Instruments, San Francisco (USA)
Elektrophorese-Netzgerät	Amersham Biosciences (GE Healthcare Europe GmbH, München)
Entwicklermaschine	Agfa-Gevaert, Leverkusen
Filmkassetten	Dr. Goos-Suprema GmbH, Heidelberg
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Biberach/Riss
Gefrierschrank -80°C	Heraeus, München
Infrarot-Bildgebungssystem Odyssey	LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg
Inkubator für Zellkultur, CO <sub>2</sub> -begast	Heraeus, München
Konfokales Mikroskop	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Kühlschrank	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe
MACS® Separator Magnete	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Magnetheizplatte	VWR International GmbH, Darmstadt
Mehrkanalpipetten	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Mikroliterpipetten	Gilson Inc., Middleton (USA)
Neubauer-Zählkammer (Hämocytometer)	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Phasenkontrast-/ UV-Mikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen
pH-Meter	VWR International GmbH, Darmstadt
Plattenphotometer EL800	BioTek Instruments Inc., Winooski (USA)
Refraktometer	A. Krüss Optronic GmbH, Hamburg
Reinstwasseranlage Milli-Q UF Plus	Millipore, Bedford (USA)
Rollenmischer	A. Hartenstein Laborbedarf GmbH, Würzburg
Rotoren für Ultrazentrifugen	Beckmann Coulter, Krefeld
Sicherheitswerkbank Klasse II	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen
Stickstoff-Tiefkühlagereinrichtung	Messer Group, Sulzbach
Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg
Ultrazentrifugen	Sorvall, Bad Homburg Beckmann Coulter, Krefeld

Artikel	Bezugsquelle
Vortex Mischer	neoLab, Heidelberg
Waagen	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Wallac Victor <sup>2</sup> multilabel counter	Perkin Elmer, Waltham (USA)
Zentrifugen	Eppendorf AG, Hamburg
	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
	Beckmann Coulter, Krefeld

### 2.1.8 Software

Artikel	Bezugsquelle
Adobe Photoshop 7.0_D	Adobe Systems Inc., San Jose (USA)
AIDA Version 3.20.116	Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt
CellQuest v3.3	Becton Dickinson, Franklin Lakes (USA)
EndNote 8	Thomson Reuters, New York (USA)
FlowJo 8.8.4	Tree Star Inc., Ashland (USA)
FreeHand MX vers. 11	Adobe Systems Inc., San Jose (USA)
ImageJ	<a href="http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html">http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html</a>
Microsoft Office 2004 für Mac	Microsoft, Redmond (USA)
Prism4	GraphPad Software, La Jolla (USA)

## 2.2 Puffer

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Puffer mit Reinstwasser (Reinstwasseranlage Milli-Q UF Plus von der Firma Millipore, Bedford, USA) angesetzt.

### 2.2.1 Zellkulturmethoden

#### Standardmedium für adhärent wachsende Zellen

D-MEM (mit L-Glutamin, 4,5 g/L D-Glucose, 110 mg/L Natriumpyruvat)  
10% (v/v) FKS

#### Standardmedium für in Suspension wachsende Zellen

RPMI 1640 (mit L-Glutamin)  
10% (v/v) FKS  
1% Penicillin/Streptomycin  
100nM Natriumselenit

#### PBS

8 g/L NaCl  
0,2 g/L KCl  
1,44 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
0,24 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
pH 7,4 mit HCl

#### Einfriermedium

50% (v/v) FKS  
40% (v/v) Medium  
10% (v/v) DMSO

#### 50x TAE-Puffer (für Mycoplasmen-Nachweis)

242,2 g/L Tris  
5,71% (v/v) Essigsäure  
18,61 g/L Na-EDTA  
pH 8,5

### 2.2.2 Immunbiologische Methoden

#### ELISA-Blockierungsreagenz Standardmedium

#### ELISA- Waschpuffer

PBS  
0,05% (v/v) Tween

#### Puffer für Saccharosegradient

20 mM HEPES pH 7,4

#### Puffer für Iodixanolgradient

10 mM Tris/HCl pH 7,4  
0,25 M Saccharose

#### Medium für BBL-Kultivierung

RPMI 1640 (mit L-Glutamin)  
10% (v/v) FKS  
1% (v/v) Penicillin/Streptomycin  
100 nM Natriumselenit  
2 ng/mL IL-4

#### Medium für T-Zell-Kultivierung

RPMI 1640 (mit L-Glutamin)  
10% (v/v) FKS  
1% (v/v) Penicillin/Streptomycin  
100 nM Natriumselenit  
1000 U/mL IL-2

#### FACS-Puffer

PBS  
2% (v/v) FKS

#### FACS-Fixierpuffer

PBS  
1% Formaldehyd



Absättigungspuffer

PBS  
100mM Glycin

10x HBS

78,8 g/L NaCl  
7,4 g/L KCl  
0,81 g/L MgCl<sub>2</sub>  
1,1 g/L CaCl<sub>2</sub>  
23,6 g/L HEPES  
pH 7,4 mit NaOH

HBS+

10% (v/v) 10xHBS  
1% (w/v) BSA  
0,15% (w/v) Glycin

HBS/Triton

10% (v/v) 10xHBS  
0,15% (v/v) Triton X-100

4% PFA

8 g Paraformaldehyd in 100 mL H<sub>2</sub>O  
aufschlännen  
auf dem Magnetkocher erhitzen  
pH 7 mit NaOH einstellen bis geklärt  
100 mL 2xHBS zugeben

**2.2.3 Proteintechniken**RIPA-Lysepuffer

150 mM NaCl  
50 mM Tris/HCl pH 7,4  
1% (v/v) NP-40  
0,5% (v/v) Na-Desoxycholat  
0,1% (w/v) SDS  
1 Proteaseinhibitortablette à 10 mL

SF-Lysepuffer

150 mM NaCl  
10 mM Tris/HCl pH 7,4  
1% NP-40  
1 Proteaseinhibitortablette à 10 mL

Kopplungspuffer (zur kovalenten  
Kopplung von Antikörpern)

0,2 M Natriumborat pH 9,0  
20 mM Dimethylpimelimidat

Stoppuffer (zur kovalenten Kopplung  
von Antikörpern)

0,2 M Ethanolamin pH 9,0

3x SDS-Probenpuffer

65 mM Tris/HCl pH 6,8  
10% (v/v) Glycerin  
2,3% (w/v) SDS  
5% (v/v) β-Mercaptoethanol  
Bromphenolblau

Trenngel 12,5%

3,5 mL H<sub>2</sub>O  
2,5 mL 1 M Tris pH 8,8  
3,8 mL 30% Acrylamid  
50 µL 20% SDS  
60 µL 10% APS  
6 µL TEMED

Trenngel 10%

4,3 mL H<sub>2</sub>O  
2,5 mL 1 M Tris pH 8,8  
3 mL 30% Acrylamid  
50 µL 20% SDS  
60 µL 10% APS  
6 µL TEMED

Sammelgel 2,5%

2,63 mL H<sub>2</sub>O  
1,25 mL 0,5 M Tris pH 6,8  
0,84 mL 30% Acrylamid  
25 µL 20% SDS  
40 µL 10% APS  
4 µL TEMED

10x SDS-Laufpuffer

30,2 g/L Tris  
145 g/L Glycin  
0,4% (v/v) SDS

1x SDS-Laufpuffer1:10 10x SDS-Laufpuffer in H<sub>2</sub>OCoomassie-Lösung

40% (v/v) Ethanol  
10% (v/v) Essigsäure  
0,2% (v/v) Coomassie Brilliant Blue  
R250

Coomassie-Entfärbelösung

40% (v/v) Ethanol  
10% (v/v) Essigsäure

10x Blotpuffer

30,3 g/L Tris  
144 g/L Glycin  
0,4% (v/v) SDS

1x Blotpuffer

10% (v/v) 10x Blotpuffer  
20% (v/v) Methanol

10x TBS

24,2 g/L Tris  
80 g/L NaCl  
pH 7,4 mit HCl

TBST

10% (v/v) 10x TBS  
0,1% (v/v) Tween

MTBST

TBST  
5% (w/v) Milchpulver

BTBST

TBST  
5% (w/v) BSA

## **2.3 Methoden**

### **2.3.1 Zellkulturmethoden**

#### 2.3.1.1. Kultivierung eukaryotischer Zelllinien

Alle Zelllinien wurden in einem Inkubator (Firma Heraeus, München) bei 37°C unter 5% Kohlendioxid gehalten. Sofern nicht anders beschrieben, wurden Suspensionszellen in RPMI 1640 mit Zusatz von 10% fötalem Kälberserum (FKS) und adhärenente Zellen in D-MEM mit 10% FKS kultiviert. Zur Subkultivierung adhärenenter Zelllinien wurde das Medium abgenommen und die Zellkulturflasche mit PBS ausgespült. Das Ablösen der Zellen vom Substratum erfolgte durch eine Behandlung mit 0,05% Trypsin/ 0,02% EDTA. Abhängig von den Wachstumseigenschaften wurden die Zellen in entsprechend geringerer Dichte in eine neue Zellkulturflasche überführt. Die Zentrifugationsschritte erfolgten in 50 mL-Röhrchen (Falcon/BD, Heidelberg) bei 1200 Upm, 20°C für 10 min.

#### 2.3.1.2 Gefrierlagerung und Auftauen von Zelllinien

Zur Langzeitlagerung wurden die Zellen in der Gasphase über flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Das Einfriermedium setzte sich aus 50% FKS, 40% Medium und 10% DMSO zusammen. Als Gefäße dienten 2 mL-Röhrchen mit Innengewinde (Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold). Für ein schonendes Einfrieren wurden die Zellen zunächst in einem Styroporbehälter bei -80°C gelagert und einige Tage später in den Stickstofftank überführt. Das Auftauen erfolgte mittels Auflösen der gefrorenen Suspension durch auf 37°C vorgewärmtes Medium. Das in dem Medium enthaltene DMSO wurde durch einmaliges Waschen mit 20 mL Medium entfernt. Die Zellen wurden der Zellzahl entsprechend in Zellkulturflaschen ausgesät. Nach 24h wurde das Medium gewechselt, um DMSO-Rückstände zu beseitigen.

#### 2.3.1.3 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen) ermittelt. Ein Zählgitter dieser Kammer besteht aus 4 Großquadraten mit je 16 Kleinquadraten. Das Volumen eines Großquadrates entspricht 0,1 mm<sup>3</sup>. Zur Unterscheidung zwischen toten und vitalen Zellen wurde die

Zellsuspension mit einem Volumen 0,2% Trypanblau in PBS gemischt. Tote Zellen werden aufgrund ihrer, für den Farbstoff durchlässigen Zellmembran blau angefärbt und können so von vitalen Zellen unterschieden werden.

#### 2.3.1.4 Isolierung von PBMCs

Blutzellen aus Leukozytenpräparaten (*buffy coats*) bzw. Vollblut wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt [224]. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte können auf diese Weise Erythrozyten und Granulozyten von Lymphozyten und Monozyten abgetrennt werden. Das Blut wurde 1:1 mit PBS gemischt und mit 10 mL Biocoll Separating Solution ( $\rho = 1,077 \text{ g/l}$ ) unterschichtet. Die Zentrifugation erfolgte bei  $1000 \times g$  ohne Bremse für 15 min. Die farblose, trübe Schicht, welche die Lymphozyten und Monozyten (PBMCs) enthielt, wurde abgenommen, 1:5 in PBS verdünnt und bei 1200 Upm abzentrifugiert. Um restliches Biocoll zu entfernen, wurden die PBMCs dreimal mit 50 mL PBS gewaschen.

#### 2.3.1.5 Überwachung von Mykoplasmenkontaminationen

Die Zelllinien wurden regelmäßig auf Mykoplasmenkontaminationen mittels dem auf einer Multiplex-PCR (Polymerasekettenreaktion) basierenden Nachweissystem der Firma Minerva Biolabs GmbH (Berlin) untersucht. Die Mykoplasmen-DNA wurde durch Aufkochen (5 min  $98^\circ\text{C}$ ) aus dem Überstand der Zellkulturen isoliert. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation für 1 min bei  $10.000 \times g$  entfernt. Von dem so gewonnenen Überstand wurden 2  $\mu\text{L}$  direkt für die PCR eingesetzt (siehe nachfolgendes Reaktionsschema). Die Analyse der PCR-Reaktion erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (1% Agarosegel in TAE-Puffer). Mykoplasmen-freie Kulturen liefern als Kontrolle für eine erfolgreiche PCR-Reaktion eine Bande bei 191 Basenpaaren (bp), während Mykoplasmen-kontaminierte Kulturen durch eine zweite Bande bei 267 bp gekennzeichnet sind.

PCR-Ansatz:

15,3 µL	H <sub>2</sub> O
2,5 µL	10X Reaktionspuffer
2,5 µL	Oligonukleotid / Mononukleotid Mix
2,5 µL	Interne Kontroll-DNA
0,2 µL	Taq-Polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot)
2 µL	Zellkulturüberstand

PCR-Reaktion

2 min	94°C	x 39
30 sec	94°C	
30 sec	55°C	
30 sec	72°C	

2.3.1.6 Magnetische Separation spezifischer Subpopulationen aus PBMCs

Zur magnetischen Separation von Zellen wurde das Verfahren der Firma Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach) verwendet. Es beruht auf der Verwendung von spezifischen monoklonalen Antikörpern, die an superparamagnetische Partikel mit einem Durchmesser von ca. 50 nm gekoppelt sind. Mit diesen Antikörpern lassen sich verschiedene Zellpopulationen markieren. In einer mit paramagnetischer Matrix ausgekleideten Säule, die sich in einem starken Magnetfeld befindet, werden markierte Zellen durch die Antikörper festgehalten, während unmarkierte Zellen die Säule durchlaufen. Die markierten Zellen können nach Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld von der Säule gespült werden. Das Ergebnis der Separation wurde mittels Färbung durch spezifische Antikörper durchflusszytometrisch analysiert. Die Durchführung erfolgte gemäß dem Herstellerprotokoll für positive Selektionierung. Die Zellen wurden in 40 µL PBS/2% FKS pro  $1 \times 10^7$  Zellen aufgenommen und für 10 min bei 4°C mit 10 µL Biotin-markiertem Antikörper markiert. Danach wurden 30 µL PBS/ 2% FKS und 20 µL Anti-Biotin-Magnetpartikel zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei 4°C wurde 2 mL PBS/ 2% FKS zugegeben und der Ansatz für 10 min bei 1200 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und die Zellen wurden in 500 µL PBS/ 2% FKS resuspendiert. Entsprechend der eingesetzten Zellzahl wurde eine Säule im Magneten mit den angegebenen Puffervolumina (MS mit 500 µL oder LS mit 3 mL) gespült. Die Zellsuspension wurde

auf die Säule gegeben und mit dem dreifachen Säulenvolumen an PBS/ 2% FKS nachgespült. Zum Einsammeln der positiv markierten Zellen wurde die Säule vom Magneten entfernt. Die in der Säule befindlichen Zellen wurden mit 1 mL PBS/ 2% FKS unter Verwendung eines Stößels eluiert.

#### 2.3.1.7 Isolierung von Exosomen aus Überständen von Tumorzelllinien

Für eine optimale Ausbeute war es nötig, zunächst ein geeignetes Verfahren der Exosomenisolation zu etablieren. Es wurden verschiedene, in der Literatur beschriebene Verfahren getestet [120]. Die besten Ergebnisse erzielte eine Kombination aus Filtrations- und Zentrifugationsschritten. Um den Anteil unerwünschter Exosomen aus bovinem Serum zu minimieren, wurde bei ca. 60-80% konfluenten Zellkulturen 48 h vor der Exosomenisolation das FKS-haltige Kulturmedium durch FKS-freies Kulturmedium ersetzt. Die Überstände wurden bei 1200 Upm für 10 min zentrifugiert und anschließend mit einem 0,2 µm-Sterilfilter filtriert. Der so gewonnene Überstand wurde mit Hilfe eines Zentrifugationsfilters mit 100 kDa Ausschlussgröße (Millipore, Billerica USA) für 20 min bei 3500 x g aufkonzentriert. Das Konzentrat wurde mit PBS verdünnt und in der TL-100 Ultrazentrifuge (Beckman Coulter, Krefeld) für 2 h bei 100.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 mL PBS aufgenommen und erneut zentrifugiert. Das so erhaltene Exosomenpellet wurde in 10 – 50 µL PBS aufgenommen. Ein Volumen von 40 mL Zellkulturüberstand lieferte rund 50 µg Exosomen.

#### 2.3.1.8 Isolierung von Exosomen aus Aszitesflüssigkeit

Da es sich bei Aszitesproben in der Regel um größere Volumina handelt, erfolgte die Exosomenisolation nach einem modifizierten Protokoll. Die Aszitesflüssigkeit wurde für 10 min bei 1200 Upm, für 45 min bei 12.000 x g und für 2 h bei 100.000 x g zentrifugiert. Das aus dem letzten Zentrifugationsschritt resultierende Pellet wurde in PBS (1/6 des Ausgangsvolumens) aufgenommen und durch einen 0,2 µm-Sterilfilter filtriert. Nach einstündiger Zentrifugation bei 100.000 x g im SW28-Rotor (Beckman Coulter, Krefeld) wurde das Pellet in PBS verdünnt und erneut für 1 h bei 100.000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde schließlich in PBS aufgenommen, so dass eine 6000-fache Aufkonzentrierung entstand. Die Temperatur bei den Zentrifugationsschritten betrug 4°C. Aus 3 L Aszitesflüssigkeit konnten so ca. 500 µg Exosomen gewonnen werden.

#### 2.3.1.9 Isolierung von Exosomen aus Serum mittels Gelfiltration

Exosomen aus dem Serum wurden mit Hilfe von Gelfiltration aus Serum isoliert [176]. Auf das Säulenbett einer mit Sepharose 2B gepackten Säule (30 cm x 1 cm) wurde vorsichtig ca. 1 mL Serum gegeben und mit dem 1,5 fachen Säulenvolumen an PBS durch Gravitationsfluss eluiert. Dabei wurden Fraktionen zu 1ml gesammelt. Anschließend wurde die Proteinkonzentration der einzelnen Fraktionen mittels BCA-Test gemessen. Die Exosomenisolation aus den Fraktionen mit der höchsten Proteinkonzentration erfolgte mittels Ultrazentrifugation (100.000 x *g*, 4°C, 1:30h).

#### 2.3.1.10 Dichtegradientenzentrifugation von Exosomen im Saccharosegradienten

Um Exosomen von anderen bei 100.000 x *g* präzipitierenden Bestandteilen zu trennen, wurden diese anhand ihrer Dichte mit Hilfe eines diskontinuierlichen linearen Saccharosegradienten aufgetrennt [120]. Die Dichte von Exosomen in Saccharose liegt bei ca. 1,15-1,19 g/mL. Es wurden acht verschieden konzentrierte Lösungen von Saccharose in 20 mM HEPES pH 7,4 in einem Bereich von 0,25 bis 2 M Saccharose hergestellt. Der Aufbau des Gradienten erfolgte in einem Polyallomerröhrchen (Beckman Coulter, Krefeld) für den SW60Ti-Rotor (Beckman Coulter, Krefeld) durch Aufeinanderschichtung von jeweils 0,5 mL der einzelnen Saccharoselösungen mit abnehmender Dichte. Die Exosomen befanden sich in der dichtesten Lösung. Der Gradient wurde 1 h bei 4°C inkubiert und anschließend über Nacht bei 39.000 Upm und 4°C ohne Bremse zentrifugiert. Anschließend wurden 0,5 mL-Fraktionen mit Hilfe einer Mikroliterpipette von oben abgenommen und in einem Refraktometer (A, Krüss Optronics GmbH, Hamburg) auf ihre Dichte untersucht.

#### 2.3.1.11 Isoosmotische Dichtegradientenzentrifugation von Exosomen

Da die Reinigung von Exosomen mit dem Saccharosegradient keine intakten Vesikel lieferte, wurde für Experimente, bei denen die Integrität der Vesikel von Bedeutung war, als Alternative ein Iodixanolgradient verwendet [225]. Es wurden fünf verschieden konzentrierte Lösungen von Iodixanol (OptiPrep™; Sigma-Aldrich, Taufkirchen) in 10 mM Tris/HCl pH 7,4 und 0,25 M Saccharose in einem Bereich von 10% bis 50% Iodixanol hergestellt. Die Exosomen wurden in 0,75 mL der dichtesten Lösung aufgenommen und in ein Polyallomerröhrchen für den SW60Ti-Rotor gegeben. Diese wurden dann mit jeweils 0,75 mL Fraktionen abnehmender Dichte vorsichtig überschichtet. Die Zentrifugation des Gradienten erfolgte bei 39.000 Upm

und 4°C für 4 h ohne Bremse. Anschließend wurden 0,75 mL-Fractionen mit der Pipette vorsichtig von oben abgenommen, mit dem vierfachen Volumen an PBS verdünnt und für 1,5 h bei 100.000 x g und 4°C zentrifugiert.

#### 2.3.1.12 Bestimmung der Exosomenkonzentration

Als Anhaltspunkt für die Exosomenkonzentration diente die Proteinkonzentration der Exosomenfraktionen. Diese wurde mit Hilfe des BCA-Tests (siehe unter 2.3.3.4) ermittelt.

Da die Proteinkonzentrationsbestimmung zur Ermittlung der Exosomenkonzentration das Vorhandensein unspezifischer Proteine im Präparat nicht berücksichtigt, kann über den tatsächlichen Exosomengehalt einer Probe keine genaue Aussage getroffen werden. Da der Exosomenanteil in einem Exosomenpräparat von Zelllinie zu Zelllinie unterschiedlich ausfallen kann, ist hier ein zusätzlicher Vergleich der Exosomenkonzentrationen nötig. Als Referenz hierfür wurde das Lipid Gangliosid GM1 gewählt, das in *lipid rafts* akkumuliert auftritt und spezifisch durch die Untereinheit B von Cholera toxin (CTB) nachgewiesen werden kann [226, 227]. Der Nachweis erfolgte mittels HRP-gekoppeltem CTB (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) im Dot Blot Verfahren (siehe 2.3.3.6). Dabei wurden verschiedene Verdünnungen der jeweiligen Exosomenprobe aufgetragen und die Intensität der Dot-Blot-Signale densitometrisch mit der AIDA-Software bestimmt. Intensitäten, deren Signale nicht im Sättigungsbereich lagen, wurden für den Konzentrationsvergleich der Proben verwendet. Auf diese Weise waren eine Bestimmung der relativen Exosomenkonzentrationen verschiedener Proben und somit auch die Anpassung der entsprechenden Konzentration möglich.

#### 2.3.1.13 Etablierung Melan-A spezifischer zytotoxischer T-Zellen

Das Standardmedium für die Kultivierung von T-Zellen und B-Blasten setzte sich aus RPMI 1640, 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin und 100 nM Natriumselenit zusammen. Als Antigen-präsentierende Stimulatorzellen für die T-Zell-Stimulation wurden im eigenen Labor etablierte B-Blasten verwendet. Diese wurden auf bestrahlten (75 Gy), adhärent wachsenden, CD40L-exprimierenden murinen Fibroblasten (L929 transfiziert mit CD40L) als *Feeder*-Zellen und mit 2 ng/mL IL-4



(R&D Systems, Minneapolis, USA) kultiviert. Die B-Blasten wurden wöchentlich 1:4 verdünnt und auf neue *Feeder*-Zellen umgesetzt.

Das für die T-Zell-Stimulation verwendete HLA-Klasse I-Epitop stammt aus dem Protein Melan-A und besitzt die Aminosäuresequenz ELAGIGILTV (Abkürzung „ELA“) [222]. Die initiale Stimulation von polyklonalen HLA-A2 restringierten Melan-A spezifischen T-Zellen aus PBMCs erfolgte mit zwei unterschiedlichen Verfahren. Bei dem ersten Verfahren wurden die T-Zellen mit Peptid-beladenen B-Blasten stimuliert. Die B-Blasten wurden mit 50 Gy bestrahlt und mit 1 µg/mL Peptid ELA für 1 h bei 37°C beladen. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die beladenen B-Blasten mit frisch isolierten PBMCs des selben Spenders im Verhältnis B-Blasten : PBMCs = 1 : 20 gemischt und in 12-Loch-Platten (Falcon/ BD, Heidelberg) ausgesät. An Tag 9 wurden die stimulierten PBMCs auf bestrahlte, peptidgepulste B-Blasten im Verhältnis B-Blasten : PBMCs = 1 : 4 umgesetzt. An Tag 12 wurden 20 U/mL IL-2 (Chiron GmbH, München) zugesetzt. Die Stimulation mit B-Blasten und IL-2 wurde an Tag 16 wiederholt. Für das zweite Stimulationsverfahren wurden die T-Zellen mit freiem ELA-Peptid und einem Helferpeptid (NLV) aus dem CMV-Protein pp65 mit ähnlicher Sequenz behandelt. Frisch isolierte PBMCs eines Spenders mit HLA-A2-Allel wurden bei einer Zellzahl von  $2 \times 10^6$  Zellen/mL mit 0,1 µg/mL Peptid ELA und 0,1 µg/mL Helferpeptid NLV (CMV pp65) im 12-Loch-Plattenformat stimuliert. An Tag 9 wurden die stimulierten PBMCs auf bestrahlte, mit ELA-Peptid beladene B-Blasten im Verhältnis B-Blasten : PBMCs = 1 : 4 umgesetzt. An Tag 12 wurden 20 U/mL IL-2 zugesetzt. Die Stimulation mit B-Blasten und IL-2 wurde an Tag 16 wiederholt.

An Tag 23 wurden mittels magnetischer Separation (siehe 2.3.1.6) CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus dem Stimulationsansatz isoliert und mittels limitierender Verdünnung kloniert. Um die vereinzelt T-Zellen zur Proliferation anzuregen, wurden bestrahlte allogene PBMCs von drei verschiedenen Spendern (je  $3 \times 10^5$  Zellen/mL) und bestrahlte, autologe, mit einem nicht-replikationsfähigen EBV immortalisierten B-Zellen (mLCLs) ( $10^5$  Zellen/mL) in Medium supplementiert mit 0,5 µg/mL Phytohämagglutinin und 1000 U/mL IL-2 mit T-Zellen gemischt. Die T-Zellen wurden in zwei verschiedenen Dichten (2,5 Zellen/mL bzw. 25 Zellen/mL) mit dem oben beschriebenen Klonieransatz gemischt und in 96-Loch-Rundbodenplatten (Falcon/ BD, Heidelberg) ausgesät. Die Zellen wurden im zweiwöchigen Turnus wie oben beschrieben mit

bestrahlten PBMCs, mLCLs und IL-2 restimuliert. Die proliferierenden Klone wurden zu Zellzahlen von über  $10^6$  expandiert, um detaillierte Studien mit IFN $\gamma$ -ELISA, Zytotoxizitätstests und Durchflusszytometrie sowie die Kryokonservierung zu ermöglichen.

#### 2.3.1.14 Zytotoxizitätsanalyse: Calcein - Freisetzung

Der Nachweis zellulär vermittelter Zytotoxizität erfolgte anhand der Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffs Calcein aus lysierten Zellen [228]. Calcein ist ein Fluorescein-Derivat, das nach Komplexierung von Calciumionen stark grün fluoresziert. Durch eine Acetoxymethylgruppe am Calcein (Calcein-AM von Invitrogen GmbH Karlsruhe) wird die Chelatisierung von Calcium verhindert. Der bis-Acetoxymethylester von Calcein-AM wird durch die Zellmembran in das Zytoplasma transportiert. In der Zelle wird die Acetoxymethylgruppe unspezifisch durch Esterasen abgespalten. Calcein kann so intrazelluläres Calcium binden, was zur Fluoreszenz führt. Bei Zerstörung der Zelle, z.B. durch Antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC), kann die Fluoreszenz im Überstand nachgewiesen werden. Die Zielzellen wurden mit 10 mg/mL Calcein-AM in Medium beladen (30 min bei 37°C und 5% CO $_2$ ) und dreimal in PBS gewaschen. Pro Vertiefung einer 96-Loch-V-Boden-Platte (Falcon/ BD, Heidelberg) wurden  $5 \times 10^3$  Zielzellen vorgelegt. Das Gesamtvolumen einer Reaktion betrug 200  $\mu$ L. Nach der Inkubation mit den Effektoren wurde die Fluoreszenz im Zellkulturüberstand mittels Plattenfluorimeter (Perkin Elmer, Waltham, USA) bestimmt. Als Kontrollreaktion diente die maximale Lyse der Zellen durch 0,5% Triton X-100. Der prozentuale Anteil der Lyse errechnet sich mit folgender Formel:  $100 \times (\text{Probe} - \text{Hintergrund}) / (\text{maximale Lyse} - \text{Hintergrund})$ . Alle Reaktionen wurden in Triplikaten durchgeführt

Für die Untersuchung der T-Zell-vermittelten Zytotoxizität wurden T-Zellklone in einer 96-Loch-V-Boden-Platte mit Calcein-beladenen Mel624.38-Zellen im Verhältnis 20:1 gemischt und für 3h bei 37°C inkubiert. Bei Behandlung mit Exosomen wurden diese zeitgleich zugegeben.

Die Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität (ADCC) wurde durch die Koinkubation von Calcein-markierten Tumorzellen, PBMCs und einem Antikörper analysiert (modifiziert nach [229]). Frisch isolierte PBMCs wurden im Verhältnis

Effektorzelle : Zielzelle = 40 : 1 zusammen mit dem Antikörper Trastuzumab (Endkonzentration = 1 µg/mL) zu Calcein-markierten BT474-Zellen gegeben. Nach sechsstündiger Inkubation bei 37°C erfolgte die Fluoreszenzmessung. Bei Behandlung mit Exosomen wurden diese mit dem Antikörper für 1h bei Raumtemperatur vorinkubiert.

#### 2.3.1.15 Nicht-invasive Zytotoxizitätsanalyse mittels Cellscreen

Die nicht-invasive Zytotoxizitätsanalyse mittels Cellscreen® V1.6 (Roche Innovatis AG, Bielefeld) basiert auf der mikroskopischen Verfolgung der Änderung der in einer Kulturschale von Zellen bedeckten Fläche [230]. Die Zellen wurden am Vortag mit einer Dichte von  $5 \times 10^3$  Zellen/Vertiefung in einer 96-Loch-Flachboden-Platte (Falcon/BD, Heidelberg) ausgesät. Die Messungen erfolgten direkt nach der Behandlung der Zellen und im 24h-Abstand.

### **2.3.2 Immunbiologische Methoden**

#### 2.3.2.1 ELISA

ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) ist ein Verfahren zum immunologischen Nachweis löslicher Proteine (z.B. Zytokine) und anderer Moleküle (z.B. Prostaglandine) [231]. In dieser Arbeit wurde das so genannte „sandwich“-ELISA Verfahren verwendet. Bei diesem Verfahren wird das zu analysierende Protein mittels eines ersten, spezifischen, immobilisierten Antikörpers eingefangen und dann mit einem zweiten, spezifischen und mit Biotin markierten Antikörper, der an ein anderes Epitop innerhalb des Proteins bindet, detektiert. An den Biotin-markierten Antikörper wird mittels Streptavidin eine alkalische Phosphatase gebunden. Dieses Enzym setzt farbloses p-Nitrophenylphosphat zu gelbem p-Nitrophenol um. Der Farbumschlag wird photometrisch bei 405 nm detektiert. Die Durchführung des ELISA erfolgte mittels Antikörpern, Zytokinstandard und Protokoll der Firma Mabtech AB (Nacka Strand, Schweden). Maxisorp 96-Loch-Platten (Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold), die eine stark proteinbindende Oberfläche besitzen, wurden über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper (verdünnt in PBS nach Herstellerangabe) beschichtet. Nach zweimaligem Waschen mit PBS folgte ein einstündiger Blockierungsschritt mit DMEM/ 10% FKS als Blockierungsreagenz. Die Vertiefungen der Platten wurden fünfmal mit PBS/ 0,05%Tween als Waschpuffer

gewaschen und anschließend mit der Probe bzw. dem Standard für 2h inkubiert. Ungebundene Komponenten wurden durch fünfmaliges Waschen mit Waschpuffer entfernt. Der Sekundärantikörper und die Streptavidin-gekoppelte Alkalische Phosphatase wurden nacheinander jeweils 1:1000 verdünnt in Waschpuffer für je 1h in den Vertiefungen inkubiert. Zwischen und nach den beiden Inkubationsschritten erfolgte fünfmaliges Waschen mit PBS. Für die Detektion wurde das „Alkaline Phosphatase Substrate Kit“ von BioRad verwendet.

### 2.3.2.2 Durchflusszytometrie

Die Expression von Oberflächenproteinen auf Zellen und Exosomen wurde mittels Fluoreszenzaktivierter Zellsortierung (FACS, *fluorescence activated cell sorting*) untersucht.

Zur durchflusszytometrischen Analyse von Zellen wurden diese geerntet, in 50 µL PBS/2% FKS gewaschen und mit dem entsprechenden Antikörper verdünnt in 50 µL PBS/2% FKS inkubiert. Bei nicht direkt markierten Antikörpern erfolgte ein weiterer Waschschrift und die Färbung im Dunkeln mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper verdünnt in 50 µL PBS/2% FKS. Die gefärbten Zellen wurden in 200 µL PBS/2% FKS aufgenommen und zur Analyse im FACSCalibur in spezielle Röhrchen überführt. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten für 4 min bei 1000 x g.

Exosomen mussten für die Durchflusszytometrie zunächst an Latex-Aldehyd-Partikel gekoppelt werden. Pro Ansatz wurden 5 µL Partikelsuspension mit 40 µg Exosomen 30 min bei Raumtemperatur und 2 h bei 4°C koinkubiert und anschließend mit 100 mM Glycin in PBS abgesättigt. Die Färbung der an die Partikel gekoppelten Exosomen erfolgte nach dem für die durchflusszytometrische Analyse von Zellen beschriebenen Protokoll.

### 2.3.2.3 Immunfluoreszenz

Speziell beschichtete Objektträger (SuperFrost® Plus von der Firma Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig) wurden steril in große Zellkulturschalen gelegt und zum Anhaften mit einigen Tropfen des Mediums, in dem die Zellen üblicherweise kultiviert wurden, unterspült. 100 µL Zellsuspension ( $1 \times 10^6$  Zellen/mL) wurden auf den Objektträger getropft und ca. 30 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend

wurde seitlich Medium nachgespült, um ein Austrocknen der Zellen während der über-Nacht-Inkubation zu verhindern.

Die Fixierung der Zellen auf dem Objektträger wurde nach folgendem Ablauf durchgeführt.

- 2 x 5 min waschen mit kaltem HBS
- 5 min 4% PFA bei 4°C
- 10 min 4% PFA bei RT
- 3 x 5 min HBS bei RT

Für die Fluoreszenzfärbung wurden die fixierten Zellen mit Triton X-100 permeabilisiert, so dass intrazelluläre Proteine mit Antikörpern bzw. DNA mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) markiert werden können. Die Färbung erfolgte nach unten stehendem Schema:

- 3 x 5 min HBS/Triton
- 3 x 10 min HBS+
- 1 h Primärantikörper (100 µL 1:2 verdünnt in HBS+)
- 1 x 5 min HBS
- 1 x 10 min HBS/Triton
- 1 x 5 min HBS
- 1 x 7 min HBS+
- 45 min fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper (100 µL 1:200 verdünnt in HBS+)
- 2 x 5 min HBS/Triton
- 2 x 7 min HBS
- 90 sec DAPI (1:10.000) (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
- 2 x 2 min HBS
- Versiegelung mit Deckglas und Nagellack in Vectashield mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, USA)

#### 2.3.2.4 Immunhistochemie

Die Durchführung der Immunhistochemie übernahm Frau Brigitte Mack (HNO-Forschung der Ludwigs-Maximilians-Universität in München). Der Nachweis der Zielstruktur von 8G7 auf der Oberfläche von Zellen in Gewebeschnitten erfolgte mittels der Avidin-Biotin-Komplex Technik (ABC-Technik). Dazu wurden

Gefrierschnitte von verschiedenen Tumoren aus dem Kopf-Hals-Bereich mit dem Primärantikörper 8G7 inkubiert. Als nächstes wurde das Gewebe mit einem Biotin-konjugiertem Sekundärantikörper behandelt. Der Sekundärantikörper wurde mit Hilfe eines Peroxidase-konjugiertem Avidin-Biotin-Komplexes (Vector Laboratories, Burlingame, USA) detektiert. Das Avidin des Komplexes ist dabei nicht vollständig mit Biotin besetzt, so dass freie Bindungsstellen vorliegen, die an den Biotin-gekoppelten Sekundärantikörper binden können. Über die Enzymaktivität bei der Umsetzung einer Chromogen AEC-Substratlösung (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) erfolgte der Nachweis des gesuchten Antigens. Die Zellkerne im Gewebe wurden mit einer Hämatoxylin-Färbung sichtbar gemacht.

### **2.3.3 Proteinchemische Methoden**

#### 2.3.3.1 Isolierung von Gesamtprotein aus eukaryotischen Zellen

Die Zellen wurden geerntet und mit PBS gewaschen. Die Lyse der Zellen erfolgte mit 10 µL RIPA-Lysepuffer [232] bzw. SF-Lysepuffer (bei SDS-sensitiven Antigenen) pro  $10^6$  Zellen für 60 min auf Eis. Unerwünschte Zellbestandteile wurden bei 4°C und 14.000 x g für 15 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei -20°C gelagert.

#### 2.3.3.2 Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen

Zelloberflächenproteine wurden mittels NHS-PEG4-Biotin (Pierce Biotechnology, Rockford, USA) markiert [233]. Es handelt sich dabei um modifiziertes Biotin, das aufgrund einer hydrophilen Polyethylenoxidgruppe wasserlöslich ist und die Zellmembran nicht durchdringen kann. Die N-hydroxysuccinimidestergruppe (NHS) reagiert spezifisch mit Lysinresten und N-terminalen Aminogruppen bei pH 7-9 und bildet eine stabile Amidbindung. Zur Biotinylierung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 1 h bei 4°C in 2 mM Biotin in PBS inkubiert. Die Kopplungsreaktion wurde durch dreifaches Waschen der Zellen in PBS/ 100 mM Glycin abgestoppt.

#### 2.3.3.3 Isolierung spezifischer Proteine mittels Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation ist ein Verfahren zur Aufkonzentrierung spezifischer Proteine in einem Proteingemisch. Es beruht auf der Verwendung immobilisierter Antikörper,

die an das gewünschte Protein binden und es reversibel aus der Lösung ausfällen. Für die Immunpräzipitation werden häufig Sepharose G Partikel (SGP) verwendet. Bei SGP handelt es sich um Partikel, die mit Protein G, welches Antikörper bindet, überzogen sind. Die Bindung zwischen Protein G und dem Antikörper ist jedoch relativ schwach und kann durch Aufkochen der Probe bei 95°C gelöst werden. Das bedeutet, dass sich neben dem ausgefällten Protein in der Probe auch die leichte und die schwere Kette des Antikörpers befinden. Vor allem die schwere Kette könnte für die weitere Analyse des Proteins störend sein, weshalb es notwendig ist den Antikörper durch eine kovalente Kopplung stabil an die Partikel zu binden. Die Antikörper wurden nach einem beschriebenen Verfahren mittels Dimethylpimelimidat (DMP) kovalent an die SGP gebunden [234]. Sepharose G sichert dabei, dass der Antikörper nicht in beliebiger Orientierung, sondern mit seinem Fc-Teil an die Partikel gekoppelt wird.

In dieser Arbeit wurde 1 mL SGP-Suspension (50%) (GE Healthcare Europe GmbH, München) für 1 h mit 10 mL Hybridom-Überstand inkubiert. Sollte der Antikörper nicht kovalent gekoppelt werden, wurden die SGP direkt im Anschluss dreimal mit PBS gewaschen. Für die kovalente Kopplung des Antikörpers wurden die SGP abzentrifugiert und zur Entfernung ungebundener Antikörper zweimal in 10 Volumen 0,2 M Natriumborat (pH 9,0) gewaschen. Der Kopplungsschritt erfolgte mit 20 mM DMP in 0,2 M Natriumborat (pH 9,0) für 30 min. Die Reaktion wurde durch zweimaliges Waschen in 0,2 M Ethanolamin (pH 8,0) und anschließender Inkubation für 2 h in 0,2 M Ethanolamin (pH 8,0) abgestoppt. Die SGP wurden zweimal mit PBS gewaschen und in 1 Volumen PBS mit 0,02% Natriumazid aufgenommen. Alle Inkubationsschritte wurden bei Raumtemperatur und kontinuierlichem Schwenken über Kopf durchgeführt. Die Zentrifugationsschritte erfolgten bei 1000 x g für 5 min. Zur Kontrolle der Kopplungsreaktion wurden vor und nach dem Kopplungsschritt jeweils 10 µL SGP entnommen und anschließend auf einem 10%-igem SDS-Gel mit Coomassiefärbung oder Silberfärbung analysiert. Das gewünschte Protein wurde mit den Antikörper-gekoppelten SGP über Nacht bei 4°C aus Gesamtprotein (siehe 2.3.3.1) präzipitiert. Für analytische Zwecke (z.B. Western Blot) wurden 0,5 mg Gesamtprotein und 10 µL SGP eingesetzt, für präparative Zwecke (Coomassie- bzw. Silberfärbung) wurden mindestens 2 mg und 50 µL SGP eingesetzt. Das Präzipitat wurde dreifach mit dem Lysepuffer und einmal mit PBS gewaschen. Die SGP wurden

in entsprechendem Volumen 3xSDS-Ladepuffer aufgenommen und für 5 min auf 95°C erhitzt. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 1000 x g für 5 min.

#### 2.3.3.4 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration in den Lysaten wurde mit Hilfe von Bicinchoninsäure (BCA) bestimmt [235]. Grundlage dieser Methode ist die Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{1+}$  durch Proteine unter alkalischen Bedingungen und der colorimetrische Nachweis von  $\text{Cu}^{1+}$  durch Bicinchoninsäure. Die Durchführung erfolgte mittels eines BCA Protein Assay Kit von Pierce. In einer 96-well-Platte wurden 1  $\mu\text{L}$  Probe mit 100  $\mu\text{L}$  Nachweisreagenz gemischt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Der Farbumschlag wurde bei 550 nm photometrisch gemessen. Als Standard diente eine BSA-Lösung. Alle Reaktionen wurden in Duplikaten durchgeführt.

#### 2.3.3.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Proteine wurden anhand ihres Molekulargewichts unter reduzierenden und denaturierenden Bedingungen nach Lämmli aufgetrennt [236]. Als Gelelektrophoresesystem wurde das "mighty small system" der Firma Hoefer Scientific Instruments (San Francisco, USA) verwendet. Je nach Proteingröße wurde ein 10 - 12,5% Trenngel mit Sammelgel verwendet. Die Proteinlysate wurden mit einem entsprechenden Volumen 3xSDS-Ladepuffer versetzt, 5 min bei 95°C denaturiert und in die Taschen des Sammelgels geladen. Die Auftrennung erfolgte bei 100 V.

#### 2.3.3.6 Immunoblotting-Verfahren

Proteine wurden nach der Auftrennung aus SDS-Gelen im elektrischen Feld auf Nitrozellulosemembranen transferiert (Western Blot) [237]. Das Blotten erfolgte mittels eines Semi-dry-Blotters von Peqlab. 10 x 10 cm große Blottingpapiere und Nitrozellulosemembran wurden in 1x Blottingpuffer getränkt. Der Aufbau erfolgte nach folgendem Schema (von Anode zur Kathode): 2 Blottingpapiere – Nitrozellulosemembran - SDS-Gel – 2 Blottingpapiere. Für ein Gel wurde ein Stromfluss von 200 mA für 1 h (bzw. 2h für Proteine > 150 kDa) eingestellt und die Spannung auf 15 V begrenzt. Die Effizienz des Transfers wurde mittels Anfärbung mit Ponceau S überprüft.



Zum Nachweis von nicht denaturierten Proteinen oder Proteinen auf Exosomen wurden die Proben direkt auf die Membran aufgebracht (Dot Blot). Für einen Probenfleck wurde 2  $\mu$ L Probe in einem zuvor markierten Bereich auf die trockene Nitrozellulosemembran aufgetropft. Nachdem der Fleck angetrocknet war, wurde die Membran wie unter 4.4.7 beschrieben blockiert und markiert.

Für den immunologischen Nachweis der immobilisierten Proteine mit Antikörpern wurden zunächst unspezifische Bindungsstellen auf der Blottingmembran durch einstündige Inkubation in Blockierungsreagenz blockiert. Als Blockierungsreagenz dienten abhängig vom jeweiligen Antikörper MTBST oder BTBST. Die Membran wurde dreimal für 5 min in TBST gewaschen und anschließend mit dem Antikörper gewünschter Spezifität, verdünnt in Blockierungsreagenz, über Nacht bei 4°C hybridisiert. Die Verdünnung für Hybridomüberstände war 1:100. Bei der Verdünnung kommerziell erworbener Antikörper dienten die Herstellerangaben als Orientierung. Nach 3 Waschschritten (5 min TBST) erfolgte eine zweistündige Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (1:5000 verdünnt) in Blockierungsreagenz. Die Membran wurde 3 x 15 min in TBST gewaschen. Spezifisch gebundene Antikörper wurden aufgrund enzymatischer Umsetzung von Luminol auf einem Chemilumineszenz-sensitiven Film detektiert.

Biotinylierte Proteine wurden mittels HRP-gekoppeltem StrepTactin (BioRad) detektiert. Dazu wurde die Membran nach dem Blockieren über Nacht bei 4°C in Streptavidin-HRP (1:5000 in BTBST) inkubiert und dreifach mit TBST gewaschen. Die Detektion erfolgte wie oben beschrieben.

Für den simultanen Nachweis der verschiedenen Modifikationen des Her2-Proteins in Exosomen erfolgte die Detektion mit Hilfe des Infrarot-Bildgebungssystems Odyssey (LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg). Die verwendeten Sekundärantikörper waren mit entsprechenden Farbstoffen gekoppelt ( $\alpha$ -Kaninchen, IRDye 800CW – konjugiert von der Firma Rockland Inc., Gilbertville, USA und  $\alpha$ -Maus, AlexaFluor® 680 – konjugiert von der Firma Invitrogen GmbH, Karlsruhe).

### 2.3.3.7 Färbung von SDS-Gelen mit Coomassie

Proteine können mit dem Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau, der an basische Seitenketten der Aminosäuren bindet, visualisiert werden [238]. Die SDS-Gele wurden nach der Elektrophorese 15 min in Coomassie-Lösung gefärbt und in Coomassie-Entfärber bis zur Sichtbarkeit der Proteinbanden gewaschen.

### 2.3.3.8 Verdau von Proteinlysaten mit Proteinase K

Die Erkennung der unbekanntes Zielstruktur durch 8G7 in Abhängigkeit von Proteinase K (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) sollte Aufschluss darüber geben, ob es sich bei der Zielstruktur tatsächlich um ein Protein handelt. A549-Zellen wurden zu diesem Zweck mit SF-Lysepuffer wie unter 2.3.3.1 behandelt. Das so gewonnene Lysat wurde mit 1 mg/mL Proteinase K für 60 min bei 50°C inkubiert. Die Bindung des Antikörpers an die Zielstruktur wurde mit Hilfe des Dot Blot-Verfahrens untersucht.

## **2.3.4 Herstellung von tumorspezifischen Antikörpern**

Die Immunisierung, Hybridomherstellung und Subklassentestung wurde durchgeführt von der Serviceplattform Monoklonale Antikörper des Helmholtz Zentrums München unter der Leitung von Frau Dr. Elisabeth Kremmer.

### 2.3.4.1 Immunisierung von Ratten mit Exosomen

Zwei LOU/C-Ratten wurden mit 10 µg Exosomen aus A549 Zellen unter Zugabe von „Incomplete Freund's Adjuvant“ immunisiert. Ratte I wurde nach 6 Wochen und Ratte II wurde nach 9 Wochen mit 10 µg Exosomen und CPG 2006 geboostet.

### 2.3.4.2 Immunisierung von Mäusen mit Exosomen

Eine CBL-Maus wurde mit 10 µg Exosomen aus A549 Zellen unter Zugabe von „Incomplete Freund's Adjuvant“ immunisiert. Nach 7 Wochen erfolgte der Boost mit 10 µg Exosomen und CPG1668.

### 2.3.4.3 Herstellung von Hybridom-Klonen

Analog zu dem von Köhler und Milstein beschriebenen Verfahren wurden die B-Zellen aus den Milzen der Tiere mit Myelomzellen unter Zugabe von

Polyethylenglykol (PEG) zu Hybridomen fusioniert [239]. Durch dieses Verfahren erhält man unbegrenzt proliferierende, Antikörper produzierende Zellen. Die Überstände der Hybridome wurden mittels eines Isotyp-spezifischen ELISA auf die Anwesenheit von Antikörpern der Immunglobulin-Klasse G getestet. Die IgG-positiven Überstände wurden anschließend auf die Bindung an A549-Zellen und auf die Ignoranz von PBMCs mittels Durchflusszytometrie untersucht. Hybridome, deren Überstände diese Kriterien erfüllten, wurden durch limitierende Verdünnung vereinzelt (kloniert). Die entstanden Klone wurden erneut mit den beschriebenen Methoden getestet und bei Bestehen des Auswahlverfahrens expandiert und kryokonserviert.

### **2.3.5 Elektronenmikroskopie**

Den elektronenmikroskopischen Nachweis der Exosomensekretion und die Immunelektronenmikroskopie führte die Arbeitsgruppe von Prof. Welsch (Anatomische Anstalt II, Klinikum der Universität München) durch. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen von BT474-Exosomen entstanden in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Wanner (AG Elektronenmikroskopie am Biozentrum der LMU). Für alle Aufnahmen wurde ein Transmissionselektronenmikroskop verwendet.

#### 2.3.5.1 Einbettung von Zellen in Araldit und Kontrastierung mit Uranylacetat

Die Zellen wurden für 4 h in 3,5% Glutaraldehyd in Phosphatpuffer bei RT fixiert und anschließend über Nacht (ÜN) in 1% Glutaraldehyd in Phosphatpuffer bei 4°C gelagert. Die fixierten Zellen wurden aufeinander folgend für 10 min, 20 min und 30 min in Phosphatpuffer bei 4°C gewaschen. Die Nachfixierung und Kontrastierung erfolgte für 2h in 2% Osmiumtetroxid in bidestilliertem Wasser bei 4°C. Anschließend wurde erneut für 5 min und 10 min bei RT in Phosphatpuffer gewaschen. Die Entwässerung fand nach folgendem Schema statt:

- 30% Ethanol rein:	1 x 5 min	1 x 15 min
- 50% Ethanol rein:	1 x 5 min	1 x 15 min
- 70% Ethanol rein:	1 x 5 min	1 x ÜN
- 90% Ethanol rein:	1 x 5 min	1 x 20 min
- 100% Ethanol rein:	1 x 5 min	3 x 20 min

- 100% Ethanol (Molekularsieb): 1 x 20 min
- Propylenoxid: 2 x 20 min

Die Einbettung erfolgte nach nachstehendem Protokoll:

- Propylenoxid-Araldit (1:1) – Gemisch mit 3% Beschleuniger ÜN
- reines Araldit mit 2% Beschleuniger für 6 h
- reines Araldit mit 2% Beschleuniger in Förmchen für 12 h bei 45°C und 48 h bei 60°C

Die eingebetteten Zellen wurden mit einem Ultracut-Gerät geschnitten und mit Uranylacetat und Blei nach Reynolds kontrastiert.

#### 2.3.5.2 Fixierung und Kontrastierung von Exosomen

Die Exosomen wurden in PBS resuspendiert und auf Formvar-beschichtete Netzchen getropft. Die Kontrastierung erfolgte mittels Uranylacetat.

#### 2.3.5.3 Immunelektronenmikroskopie von Exosomen

Die Exosomen wurden in PBS resuspendiert und ca. 8 µL der Exosomensuspension wurden auf Formvar-beschichtete Netzchen getropft und für 1h inkubiert. Die Fixierung der Exosomen erfolgte mittels einstündiger Inkubation in 2,2% Formaldehyd mit 0,1% Glutaraldehyd. Anschließend wurden die Netzchen 4 x mit PBS/ 1% BSA-C gespült. Nach 30-minütiger Blockierung in Aurion Block pur wurden die Exosomen mit dem anti-Her2-Antikörper (Klon 2503A) (1:50 in PBS/ 1% BSA-c™) für 2h bei RT und ÜN bei 4°C markiert. Nach fünffachem Spülen mit PBS/ 1% BSA-c™ (BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln) wurden die Netzchen mit dem an Goldpartikel gekoppelten Sekundärantikörper (anti-Maus) in Aurion Block für 90min inkubiert. Die Präparate wurden 1 x mit PBS-BSA-C und 5 x mit PBS gewaschen und anschließend für 10min in 2% Glutaraldehyd inkubiert. Nach einmaligem Waschen in PBS und dreifachem Waschen in H<sub>2</sub>O erfolgte die Negativkontrastierung in 2% Phosphowolframsäure für 2min. Die Netzchen wurden abschließend in H<sub>2</sub>O gespült.

## **3. Ergebnisse**

### ***3.1 Charakterisierung der Exosomenpräparationen***

Eine wichtige Voraussetzung für die Arbeit mit Exosomen war die Etablierung eines geeigneten Protokolls zur Exosomenisolation und dessen Validierung. In der Literatur sind hierfür verschiedene Verfahren für die Gewinnung von Exosomen beschrieben worden. Für die verwendeten Zelllinien erwies sich die Kombination aus Filtrationsverfahren und Ultrazentrifugation als besonders geeignet. Es war dabei jedoch unabdingbar, die so gewonnenen Exosomen auf typische Eigenschaften und Markerproteine zu untersuchen und zu validieren.

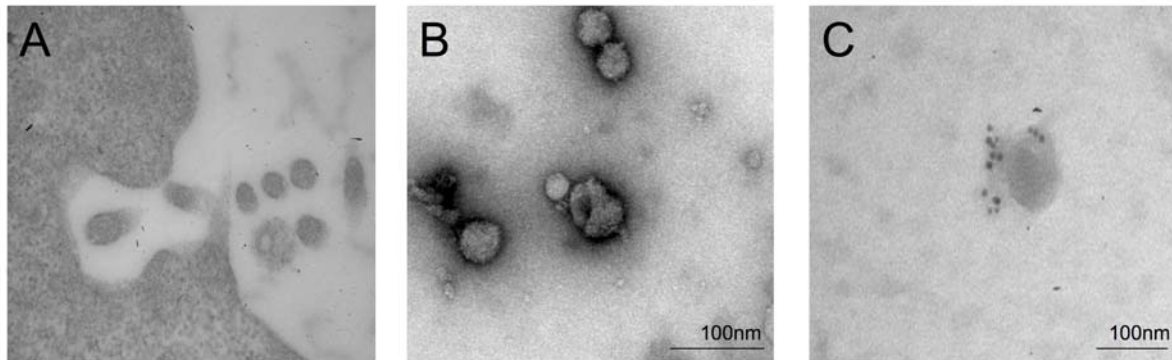
#### **3.1.1 Elektronenmikroskopischer Nachweis von Exosomen**

Ein Hauptmerkmal von Exosomen ist die charakteristische Form in der Elektronenmikroskopie. Exosomen weisen eine „Schlauchboot“-ähnliche Form auf und haben einen Durchmesser von 50 – 100 nm. Anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen von A375 Zellen konnte die Sekretion von Exosomen durch Fusion eines multivesikulären Körpers (MVB) mit der Zellmembran visualisiert werden (siehe Abb. 3.1A). Bei den Exosomen aus A375-Zellkulturüberständen war auch die charakteristische eingekerbte Form mit einer Größe von ca. 100nm deutlich zu erkennen (Abb. 3.1 B). Zusätzlich wurde mit Hilfe der Elektronenmikroskopie die Lokalisierung von Her2 auf BT474-Exosomen mittels Immunogoldmarkierung visualisiert (Abb. 3.1 C).

#### **3.1.2 Untersuchung der Dichte der präparierten Exosomen**

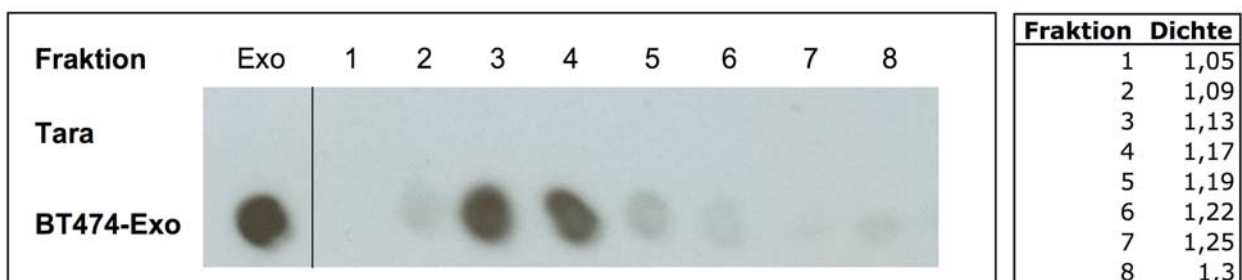
Ein weiteres Charakteristikum von Exosomen ist ihre, aufgrund des hohen Lipidanteils, relativ geringe spezifische Dichte, die in der Literatur mit 1,15 - 1,19 g/mL (in Saccharose) angegeben ist [121]. Um auch diese Eigenschaft zu bestätigen, wurden Exosomen aus BT474-Zellen mit Hilfe eines diskontinuierlichen linearen Saccharosegradienten aufgetrennt und die Fraktionen des Gradienten mittels Dot-Blot auf die Anwesenheit von Her2, das, wie oben gezeigt, auf BT474-

Exosomen zu finden ist, untersucht. Die Dichte der Fraktionen wurde refraktrometrisch bestimmt. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass das Antigen vorwiegend in den Fraktionen 3 (1,13 g/mL) und 4 (1,17 g/mL) und somit im erwarteten Dichtebereich zu finden war (Abb. 3.2).



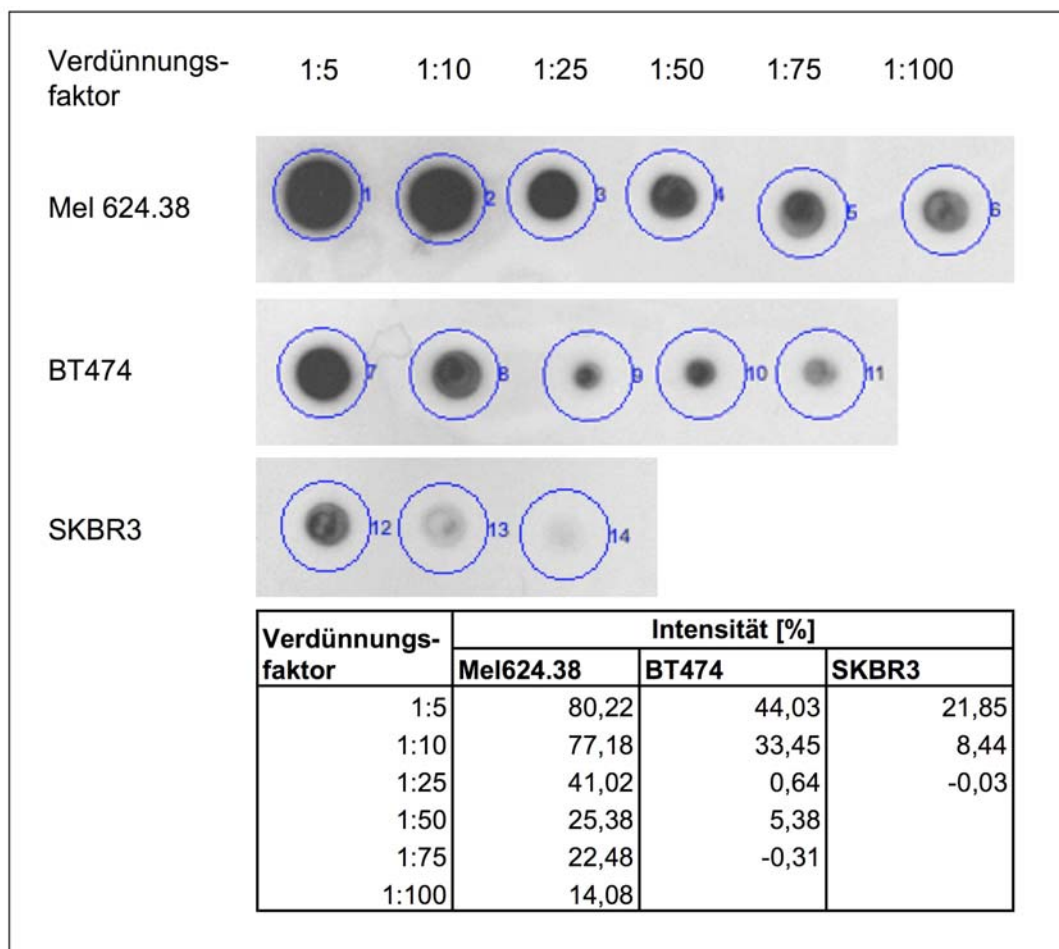
**Abbildung 3.1: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Exosomen.**

(A) Die Sekretion von Exosomen durch A375-Zellen wurde mittels Einbettung der Zellen in Araldit und Uranylacetatkontrastierung visualisiert. (B) Die Exosomen aus BT474-Zellen wurden auf Netzchen fixiert und ebenfalls mit Uranylacetat kontrastiert. Sie wiesen eine charakteristische Form und Größe auf. (C) Die Immunelektronmikroskopie von BT474-Exosomen zeigte eine deutliche Assoziation zwischen den durch Immunogoldpartikel angefärbten Her2-Molekülen und Exosomen. In diesem Fall wurden die Exosomen auf Netzchen fixiert und mit einem Her2-spezifischen Antikörper markiert.



**Abbildung 3.2: Bestimmung der Exosomendichte im Saccharosegradient.**

Exosomen aus BT474-Zellen wurden mit Hilfe eines diskontinuierlichen linearen Saccharosegradienten aufgereinigt. Der Gradient wurde in 8 Fraktionen aufgeteilt, die auf einer Nitrozellulosemembran im Dot-Blot-Verfahren mit einem Her2-spezifischen Antikörper angefärbt wurden und im Refraktrometer auf ihre Dichte untersucht wurden. Die Her2-positiven Tumorexosomen waren in den Fraktionen 3 und 4 zu finden und besaßen somit die für Exosomen charakteristische Dichte.



**Abbildung 3.3: Normalisierung der Exosomenkonzentrationen.**

Um die Exosomenkonzentrationen in verschiedenen Präparaten vergleichen zu können, wurden diese in verschiedenen Verdünnungen im Dot Blot mit HRP-gekoppeltem CTB gefärbt. Für jeden Probenpunkt wurde das gleiche Volumen (2 µL) an Exosomensuspension aufgetragen. Alle Probenpunkte befanden sich auf der gleichen Membran, wodurch die Expositionszeit für alle Punkte identisch war. Der entwickelte Film wurde elektronisch mit Hilfe eines Scanners erfasst und unter Verwendung der AIDA-Software ausgewertet. Die Berechnung der Intensitäten für die einzelnen Punkte erfolgte durch Festlegung kreisförmiger Bereiche mit einheitlichem Durchmesser, die zum Zwecke der Zuordnung der berechneten Werte durch die Software automatisch durchnummeriert wurden. Die Verdünnungen der Mel624.38-Exosomen wurden als Standard definiert. Der Nullwert ergab sich aus der Festlegung eines leeren Bereiches auf dem Film.

**3.1.3 Normalisierung von Exosomenkonzentrationen**

Einige der nachfolgenden Experimente basierten auf dem Vergleich von Exosomen aus Kulturüberständen unterschiedlicher Zelllinien. Es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass sich neben den Exosomen auch andere Proteinkomponenten aus dem

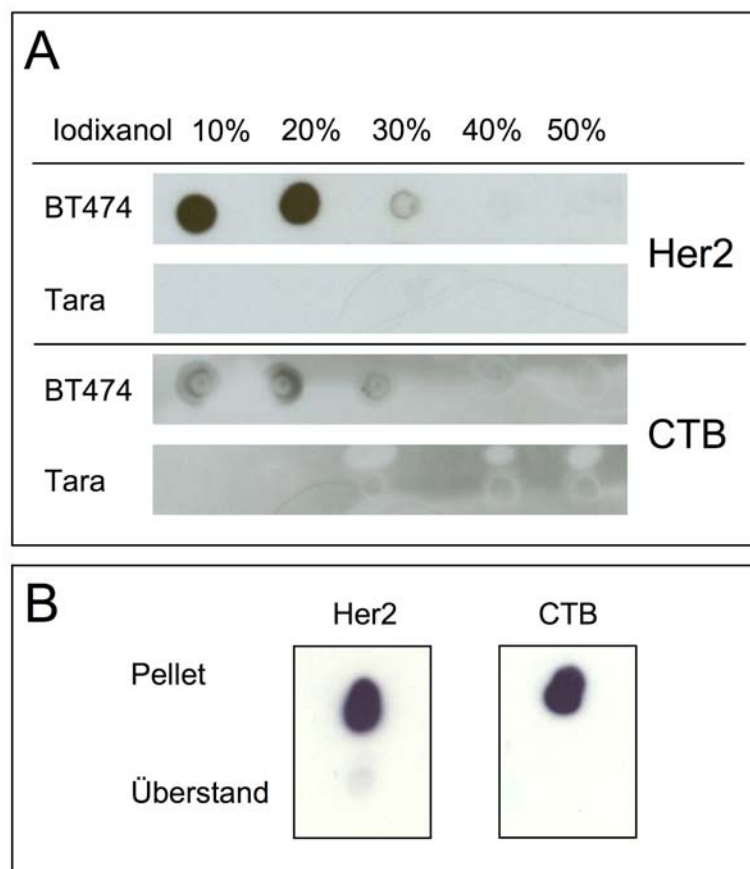
Zellkulturüberstand in den Exosomenpräparationen befanden. Zudem war die mittels BCA-Proteinnachweis ermittelte Proteinkonzentration nur ein Anhaltspunkt für die tatsächliche Konzentration von Exosomen. Während der Exosomenanteil in den einzelnen Präparationen einer Zelllinie weitestgehend konstant zu sein scheint, kann der Anteil zwischen verschiedenen Zelllinien stark variieren. Um die Exosomenkonzentrationen aus verschiedenen Zelllinien besser vergleichen zu können, wurde ein Verfahren entwickelt, das Exosomen unabhängig von Proteinen detektiert. Das Lipid Gangliosid GM1 ist in *lipid rafts* zu finden, die auf Exosomen stark angereichert vorkommen. GM1 kann mit Hilfe der Untereinheit B von Cholera toxin (CTB) spezifisch nachgewiesen werden. Für die Normalisierung der Konzentrationen wurden Exosomen in verschiedenen Verdünnungen auf eine Nitrozellulosemembran gegeben und mit CTB detektiert. Mit Hilfe der Software AIDA erfolgte anhand eingescannter Dot-Blot Filme die densitometrische Bestimmung der relativen Konzentrationen.

### **3.1.4 Etablierung eines Verfahrens zur Aufreinigung intakter Exosomen mittels Dichtegradientenzentrifugation**

In einigen Fällen war es besonders wichtig, zusätzlich zu der Exosomenextraktion mittels Ultrazentrifugation weitere Reinigungsschritte durchzuführen. So sind Exosomenisolate aus Seren nach der Ultrazentrifugation durch zahlreiche, teilweise unbekannte Serumkomponenten stark verunreinigt. Seren enthalten z.B. Antikörper in Form von Immunkomplexen, die bei sehr hohen Beschleunigungen präzipitieren und in anschließenden Experimenten unspezifische Signale erzeugen können. Die Methode der Gelfiltration von Seren zur Exosomengewinnung wurde zwar beschrieben, lieferte im Rahmen dieser Arbeit jedoch keinen erkennbaren Reinigungseffekt [176]. Ein weiteres Verfahren ist die Aufreinigung von Exosomen mit Hilfe von Antikörper-gekoppelten magnetischen Partikeln [117]. Diese Methode war für die vorgegebene Fragestellung nicht geeignet, da sich dann die mit den Exosomen assoziierten Antikörper als störend auf weitere Experimente auswirken könnten. Die Aufreinigung von Exosomen mittels Saccharosegradient ließ dagegen eine spezifische Abtrennung von Antikörpern und Immunkomplexen aus dem Serum zu und enthält zusätzlich eine interne Kontrollmöglichkeit über die Bestimmung der Fraktionsdichte. Als problematisch erwies sich jedoch die Extraktion der Exosomen aus den Saccharosefraktionen, da die Exosomen anschließend nicht mehr intakt



waren. Eine Ursache dafür können osmotische Effekte, die zum Platzen der Vesikel führen, darstellen. Aus diesem Grund wurde ein diskontinuierlicher linearer Gradient aus Iodixanol (Optiprep™) gewählt, da dieser im Gegensatz zu Saccharose über verschiedene Konzentrationen isoosmotisch ist. In den Fraktionen mit 10% und 20% Iodixanol eines Gradienten mit BT474-Exosomen konnte sowohl GM1 als auch Her2 nachgewiesen werden, was ein Indiz für die Anwesenheit von Exosomen in diesen Fraktionen darstellt (Abb. 3.4).



**Abbildung 3.4 Dot Blot von Fraktionen eines Iodixanolgradienten.**

(A) Fraktionen eines Gradienten mit BT474 Exosomen (BT474) und eines Gradienten ohne Exosomen (Tara) wurden auf eine Nitrozellulosemembran getropft und anschließend mit einem Her2-spezifischen Antikörper (Her2) bzw. HRP-konjugiertem Cholera toxin Untereinheit B (CTB) gefärbt. Die Fraktionen vom BT474-Gradient mit 10% und 20% Iodixanol wiesen positive Signale für beide Exosomenmarker auf, während bei dem unbeladenen Gradienten kein Signal zu detektieren war. (B) Um die Integrität der aufgereinigten Exosomen zu überprüfen, wurden aus dem mit BT474-Exosomen beladenen Gradienten die Fraktionen mit 10% und 20% Iodixanol vereint, mit PBS fünffach verdünnt und bei 100.000 x g zentrifugiert. Das Pellet und der Überstand wurden mit dem Her2-spezifischen Antikörper (Her2) und HRP-konjugiertem Cholera toxin Untereinheit B (CTB) auf Anwesenheit von Exosomen untersucht. Die Exosomen befanden sich hauptsächlich im Pellet und schienen daher intakt zu sein.

Die für die Exosomenmarker positiven Fraktionen wurden mit PBS verdünnt und zentrifugiert. Pellet und Überstand wurden nach der Ultrazentrifugation auf Anwesenheit von Her2 und GM1 untersucht. Beide Marker waren fast ausschließlich im Pellet aufzufinden und gibt somit einen deutlichen Hinweis darauf, dass die Exosomenintegrität erhalten blieb, da nur intakte Exosomen pelletiert werden können (Abb.3.4B).

### ***3.2 Generierung tumorspezifischer Antikörper mittels Immunisierung mit Tumorexosomen***

Es wurde mittlerweile sehr überzeugend gezeigt, dass Tumorexosomen eine Vielzahl bereits bekannter tumorassoziierter Antigene enthalten und sich daher prinzipiell als Immunogen für die Produktion tumorreaktiver und tumorassoziierter Antikörper eignen.

#### **3.2.1 Immunisierung von Ratten und Mäusen mit Exosomen aus Lungentumorzellen und Auswahlprüfverfahren für die Hybridomüberstände**

Um zu überprüfen, ob sich Exosomen als Immunogen für die Herstellung tumorassoziierter Antikörper eignen, wurden zwei Ratten und eine Maus mit Exosomen (je 10 µg i.p.) aus dem Überstand der Lungenkarzinomzelllinie A549 immunisiert. Aus den Milzzellen wurden anschließend Hybridome generiert. Es wurde sodann festgelegt, welche Eigenschaften die generierten Antikörper besitzen sollten und welche Nachweisverfahren für deren Validierung verwendet werden sollten. Zunächst sollte es sich bei dem Antikörper um einen IgG-Antikörper handeln, da diese im Allgemeinen wesentlich affiner sind als Antikörper des IgM-Isotyps. Außerdem sind IgG-Antikörper aufgrund ihrer stärkeren Bindung an Protein A und G sehr viel leichter zu reinigen. Weiterhin sollte der Antikörper Tumorzellen erkennen, nicht aber PBMCs aus gesunden Spendern. Die erste Ratte erhielt sechs Wochen nach der Immunisierung eine Booster-Immunisierung. Aus ihrer Milz konnten keine Hybridome generiert werden, deren Überstände die oben genannten Testkriterien erfüllten. Aus der zweiten Ratte, die erst neun Wochen nach der Erstimmunisierung geboostert wurde, konnten 4 Klone (5B8, 5E7, 5H2 und 8G7) mit den gewünschten

Eigenschaften generiert werden. Die Immunisierung einer Maus (Boost nach sieben Wochen) ergab einen positiven Klon (12B12).

Um mehr über die Eigenschaften der hergestellten Antikörper herauszufinden, wurden verschiedene weitere Tests durchgeführt. Im Folgenden werden hauptsächlich die Ergebnisse für den Antikörper aus dem Hybridom 8G7 (kurz Antikörper 8G7) dargestellt, da die übrigen Antikörper erst zu späteren Zeitpunkten erhalten wurden.

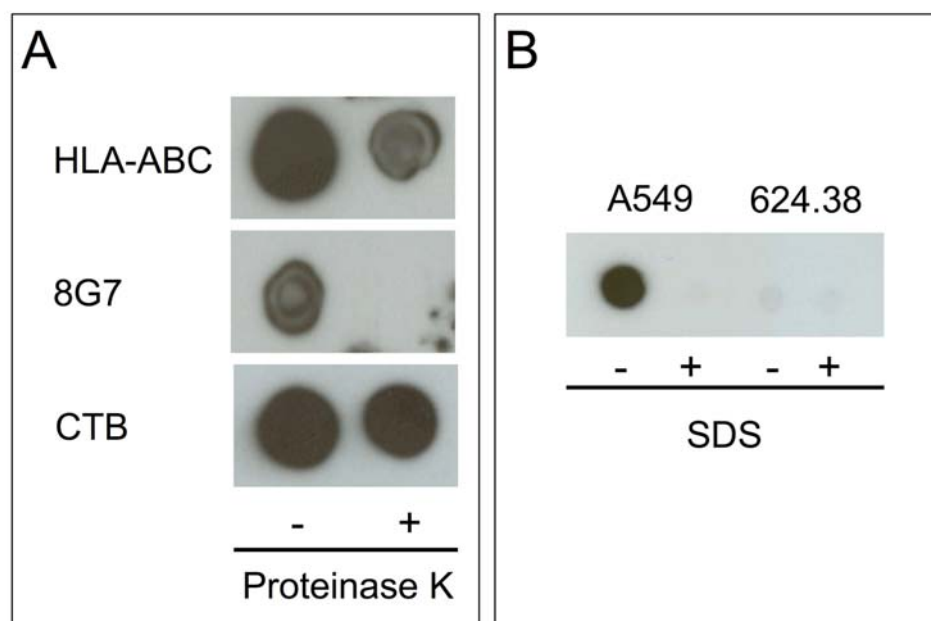
### **3.2.2 Der Antikörper 8G7 ist vom IgG2a-Subtyp.**

Die Hybridomüberstände wurden mittels ELISA unter Verwendung subklassenspezifischer Antikörper auf IgG-Subklassen getestet. Hybridome, die mehrere Antikörper-Subklassen enthielten, wurden erneut kloniert und auf ihre Spezifität getestet. Der Subklassentest ergab, dass es sich bei 8G7 um einen IgG2a-Antikörper handelte, ebenso wie die beiden Antikörper 5E7 und 5H2. Der Mausantikörper 12B12 war dagegen vom IgG2b-Subtyp. Die Subklasse des Antikörpers 5B8 war zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit noch nicht abschließend aufgeklärt.

### **3.2.3 Das von 8G7 erkannte Epitop wird bei Denaturierung mit SDS und bei Verdau mit Proteinase K zerstört.**

Als Nächstes sollte für den Antikörper 8G7 ein Western-Blot-Protokoll etabliert werden. Es zeigte sich jedoch, dass sich der Antikörper nicht für das Western-Blot-Verfahren mit SDS-PAGE nach Lämmli eignet [236]. Der Nachweis der Antikörperbindung war jedoch unter den gegebenen Bedingungen des Dot-Blot-Verfahrens, bei dem keine Denaturierung der Proteine erfolgt, möglich. Der wesentliche Unterschied zwischen den beiden Verfahren ist die Auftrennung des Proteingemisches beim Western-Blot-Verfahren. Dadurch ist in der Regel eine Unterscheidung zwischen spezifischen und unspezifischen Antikörperreaktionen möglich. Analog zum Färbeverhalten in der Durchflusszytometrie war der 8G7-Antikörper im Dot Blot positiv für A549-Zelllysate und negativ für Mel624.38-Zelllysate (Abb. 3.5B). Dies war ein Indiz dafür, dass es sich bei dem im Dot Blot erzeugten Signal um ein spezifisches Signal handelt.

Da es keine Informationen über die Zielstruktur von 8G7 gab, musste abgeklärt werden, ob es sich dabei, wie angenommen, tatsächlich um ein Protein handelt. A549-Zellen wurden lysiert und mit Proteinase K behandelt (Abb. 3.5A). Die verdauten Lysate wurden mit den unbehandelten Lysaten im Dot-Blot verglichen. Als Positivkontrolle für einen Protein-spezifischen Antikörper diente ein anti-HLA-ABC-Antikörper, als Kontrolle für Lipide diente der Nachweis von GM1 mit CTB. Die Zielstruktur von 8G7 war nach dem Verdau mit Proteinase K nicht mehr vorhanden, was auf ein Protein hindeutet.



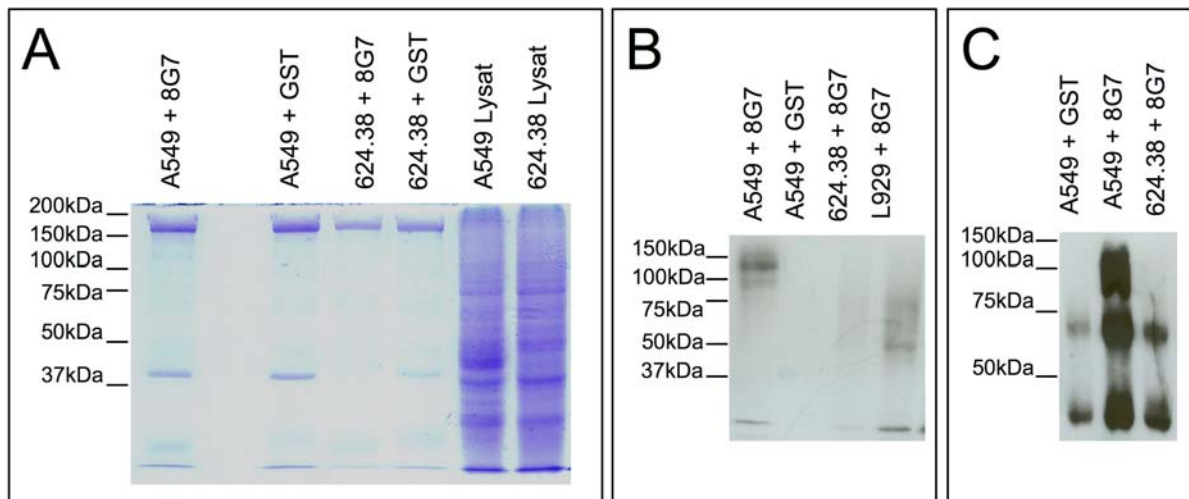
**Abbildung 3.5 Einfluss verschiedener Behandlungen auf die Erkennung der Zielstruktur durch 8G7**

(A) A549-Zelllysate in SF-Lysepuffer hergestellt wurden für 60 min bei 50°C mit Proteinase K behandelt und zusammen mit unbehandelten A549-Zelllysaten auf eine Nitrozellulosemembran aufgetragen. Die Membran wurde anschließend verschieden gefärbt: Mit 8G7, mit einem HLA-ABC-spezifischen Antikörper (HLA-ABC) oder mit CTB, das ein Lipid erkennt. Die Färbung durch CTB wurde von der Proteinase K – Behandlung nicht beeinträchtigt, während bei dem Antikörper gegen HLA-ABC und bei 8G7 eine deutliche Abnahme der Signalintensität durch die Behandlung mit Proteinase K zu erkennen war. (B) Außerdem wurden Zelllysate unter Verwendung von SF-Lysepuffer von A549-Zellen (A549) und Mel624.38-Zellen (624.38) hergestellt und mit SDS (0,1%) behandelt. Das Lysat der Zelllinie Mel624.38 wurde weder nach SDS-Behandlung noch unbehandelt im Dot Blot durch 8G7 erkannt. Das A549-Lysat zeigte unbehandelt ein sehr deutliches Signal, das in Anwesenheit von SDS nahezu vollständig verschwand. Beide Ergebnisse zusammen sind ein starkes Indiz dafür, dass es sich bei dem 8G7-Antigen um ein Protein handelt, dessen Epitop nur im nativen Zustand erkannt wird.

Ein weiterer Unterschied zwischen Western-Blot- und Dot-Blot-Verfahren ist, dass Proteine bei dem Western-Blot-Verfahren denaturiert und reduziert werden. Da die Lysate mit SDS-freiem Lysepuffer hergestellt wurden, fand in dem hier verwendeten Dot-Blot-Verfahren keine Denaturierung (und auch keine Reduzierung) der Proteine statt. Der Einfluss von SDS auf die Erkennung des 8G7-Epitops wurde mittels Dot-Blot untersucht (Abb 3.5B). Es stellt sich heraus, dass das Antigen in Lysaten, die mit SDS behandelt wurden, nicht mehr von dem Antikörper erkannt wurden, während Lysate ohne SDS ein deutliches Signal ergeben. Dies lässt darauf schließen, dass die Erkennung des Epitops durch 8G7 von der nativen Struktur des Zielproteins abhängt. Ob sich das Epitop nur aus Aminosäuren zusammensetzt, ist anhand der gezeigten Experimente nicht auszuschließen. Es ist jedoch denkbar, dass durch 8G7 z.B. auch ein glykosyliertes Protein erkannt wird.

### **3.2.4 Etablierung eines Protokolls für die Immunpräzipitation mit 8G7**

Die Identifizierung der Zielstruktur von 8G7 ist von äußerster Wichtigkeit, um die potentielle Anwendbarkeit des Antikörpers einschätzen zu können und auch, um für die spätere Vermarktung einen wirksamen Patentschutz zu erhalten. Eine mögliche Vorgehensweise für die Identifizierung ist die massenspektrometrische Analyse des Antigens. Das Antigen muss zu diesem Zweck in Reinform vorliegen. Besonders geeignet erschien die Reinigung durch Immunpräzipitation aus den Lysaten von A549-Zellen mit Hilfe des Antikörpers 8G7. Da ursprünglich keinerlei Informationen über das Molekulargewicht des Antigens vorlagen und die Gefahr bestand, dass eine spezifische Proteinbande durch das Signal der schweren Antikörperkette (ca. 50 kDa) überlagert werden könnte, wurde der Antikörper 8G7 bzw. ein Antikörper gegen die Glutathion-S-Transferase (GST) als Isotypkontrolle kovalent an Sepharose G Partikel gekoppelt und eine Immunpräzipitation (IP) aus A549-Zellysaten bzw. Mel624.38-Zellysaten (negative Zelllinie) durchgeführt. Im Coomassie-gefärbten SDS-Gel waren im Vergleich zu den Kontrollreaktionen jedoch nur sehr undeutlich spezifische Banden zu definieren (Abb. 3.6A).



**Abbildung 3.6: Immunpräzipitation mit 8G7**

(A) Die IP-Reaktionen mit kovalent gekoppelten Antikörpern aus Zelllysaten wurden auf einem 10%-SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie-Färbung visualisiert. Für die IP-Reaktionen wurden jeweils 2 mg Protein aus den Zelllysaten von A549 bzw. Mel624.38 (624.38) und 50  $\mu$ L Sepharose G Partikel (SGP, 50% Suspension) eingesetzt und der gesamte Reaktionsansatz wurde auf ein Gel aufgetragen. Bei den kompletten Zelllysaten aus A549 (A549 Lysat) bzw. Mel624.38 (624.38 Lysat) wurden 10 $\mu$ g Protein geladen. Zusätzlich zu dem IP-Ansatz mit A549-Lysat und dem Antikörper 8G7 wurden folgende Kontrollansätze durchgeführt: A549-Lysat mit Isotypantikörper (A549 + anti-GST); negative Zelllinie Mel624.38 mit 8G7 (624.38 + 8G7); negative Zelllinie Mel624.38 mit Isotypantikörper (624.38 + anti-GST). Ein eindeutig spezifisches Signal für A549 + 8G7 war nicht erkennbar. (B) Die Immunpräzipitation erfolgte aus den Zelllysaten im Anschluss an die Biotinylierung von Oberflächenproteinen. Biotinylierte Proteine wurden im Western Blot mittels HRP-gekoppeltem StrepTactin detektiert. Jeder IP-Ansatz bestand aus 0,5 mg Protein des entsprechenden Zelllysats und 10  $\mu$ L SGP. Im Gegensatz zu den Kontrollansätzen war bei A549 + 8G7 ein klares Signal im Bereich zwischen 100 kDa und 150 kDa zu erkennen. Die Beschriftungen entsprechen denen von Abb. A. Zusätzlich wurde eine Kontrollreaktion mit der negativen Zelllinie L929 (L929 + 8G7) durchgeführt. (C) Analog zu Abb. 3.6B wurde die Proteine aus Zelllysaten nach Oberflächenbiotinylierung präzipitiert. Statt der Verwendung eines kovalent an die SGP gekoppelten Antikörpers, wurden 2 mL Hybridomüberstand mit 10  $\mu$ L SGP vorinkubiert, gewaschen und für die IP eingesetzt. Der Western Blot zeigte eine Verstärkung des spezifischen Signals im Vergleich zu Abbildung 3.6B. Die Beschriftungen entsprechen denen in Abb. 3.6A.

Im nächsten Experiment wurde vor der IP eine Biotinylierung der Zelloberflächenproteine durchgeführt, da es sich bei der Zielstruktur offensichtlich um ein Zelloberflächenprotein handelt und die Detektion der biotinylierten Proteine mit HRP-gekoppeltem Streptavidin sehr viel sensitiver ist als die Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blau. Die IP mit 8G7 aus A549-Zelllysaten lieferte zwei deutliche Banden zwischen 100 kDa und 150 kDa, die in den Kontrollreaktionen nicht erkennbar waren

(Abb. 3.6B). Das Antigen lag also deutlich entfernt vom Molekulargewichtsbereich der schweren Antikörperkette. Daher wurde die Immunpräzipitation wiederholt mit nicht-kovalent gekoppelten Antikörpern. In Abbildung 3.6C ist eine Intensivierung des Signals durch die Verwendung von nicht-kovalent gekoppeltem 8G7 zu erkennen. Eine Hochskalierung der Immunpräzipitation mit nicht-kovalent gekoppeltem 8G7 unter Verwendung der oberflächenspezifischen Biotinylierung als Markierung sollte eine massenspektrometrische Identifizierung des Antigens ermöglichen.

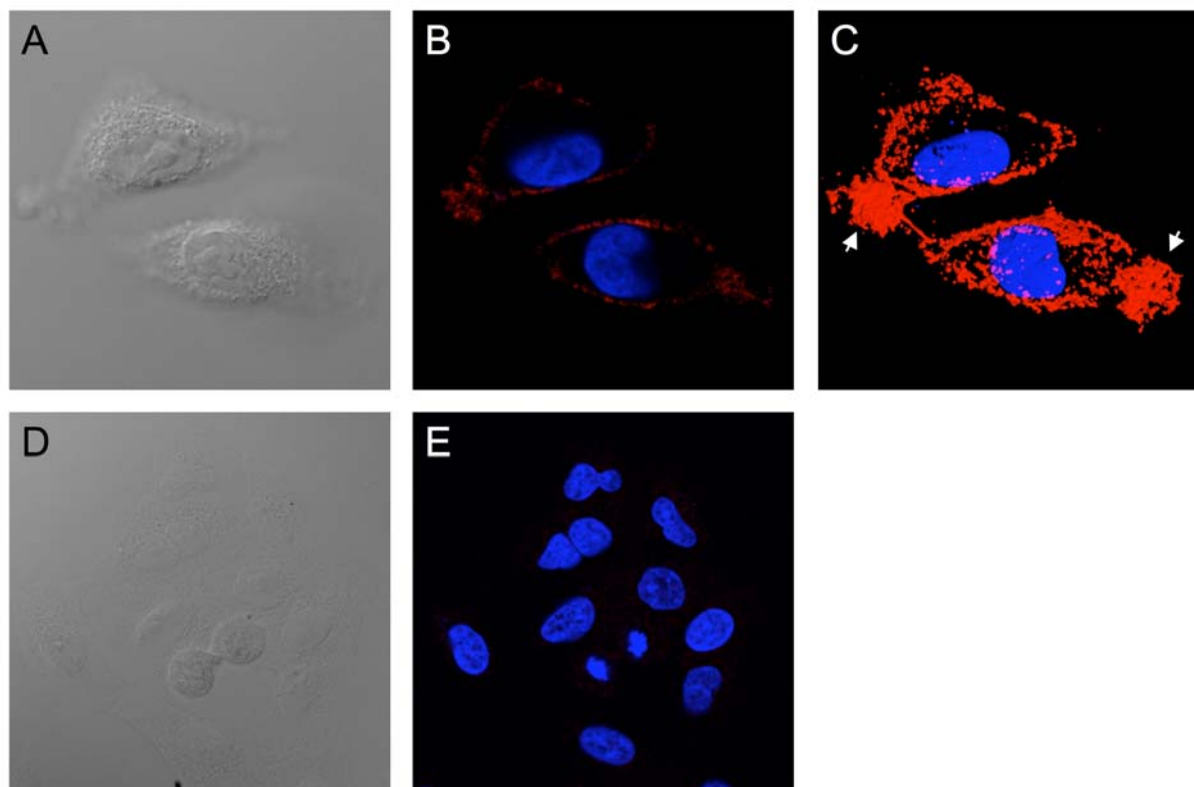
### **3.2.5 Der Antikörper 8G7 bindet spezifisch an die Zelloberfläche.**

Die Lokalisation der Zielstruktur eines therapeutischen Antikörpers ist entscheidend für dessen Wirksamkeit. Aus der durchflusszytometrischen Analyse des Antikörpers während des Auswahlprüfverfahrens (siehe auch Tab. 3.1) war bereits bekannt, dass die Zielstruktur an der Zelloberfläche zu finden ist. Es ist jedoch möglich, dass die Zielstruktur zusätzlich in bestimmten intrazellulären Kompartimenten lokalisiert ist. Die genaue Lokalisierung wurde daher mit Immunfluoreszenzfärbung und konfokaler Mikroskopie untersucht. Dabei zeigte sich, dass sich das Antigen vornehmlich an der Zelloberfläche befindet. Bei besonders stark adhärierten Zellen schien es, als ob sich das Antigen hauptsächlich in so genannten Lamellipodien konzentriert, die einen Vorschub der Zellmembran zum Zwecke der Zellmigration darstellen. Die Isotypkontrolle mittels eines Antikörpers, der die A549-Zellen nicht erkennt (anti-GST), war negativ und bestätigte somit die Spezifität der 8G7-Färbung.

### **3.2.6 Der Antikörper 8G7 bindet an verschiedene Tumorzelllinien und Tumorexosomen.**

Die potentielle Anwendbarkeit eines Antikörpers hängt insbesondere von den Tumorzelltypen, die er erkennt, ab. Werden nur bestimmte Tumorarten erkannt, sind die therapeutischen Einsatzmöglichkeiten natürlich begrenzter als bei der Erkennung einer größeren Anzahl verschiedenartiger Tumoren. Einige verfügbare Tumorzelllinien wurden daher durchflusszytometrisch auf die Bindung von der durch die Immunisierung mit Exosomen gewonnen Antikörper untersucht (Tab. 3.1). Die Antikörper 8G7 und 12B12 färbten alle Karzinomlinien mit starker Intensität. Mit Ausnahme der Nierenzellkarzinomlinie färbten 5H2 und 5E7, wenn auch in

geringerem Ausmaß, alle Karzinomzelllinien an. Das Melanom Mel624.38 wurde von den Antikörpern 8G7 und 12B12 nicht erkannt, während die Antikörper 5E7 und 5H2 schwach an die Zelllinie banden. Die beiden Sarkome verhielten sich unterschiedlich hinsichtlich der Erkennung durch die Antikörper. Das Osteosarkom (MG-63) wurde ähnlich stark wie die Karzinomlinien von allen Antikörpern markiert. Die Ewing-Sarkom-Linie (TC-71) dagegen war für alle Antikörper negativ. Die Antikörper 8G7 und 12B12 färbten zusätzlich die T-Zell-Leukämiezellen (Jurkat), wobei die Intensität im Vergleich zu den Karzinomlinien deutlich schwächer ausfiel.

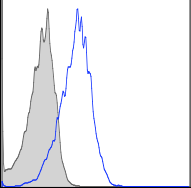
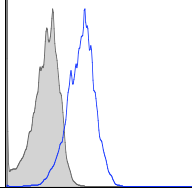
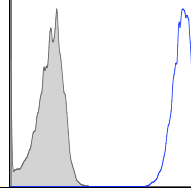
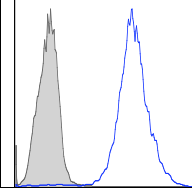
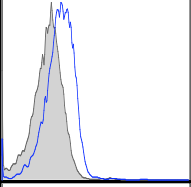
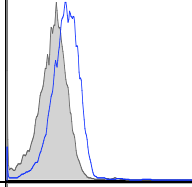
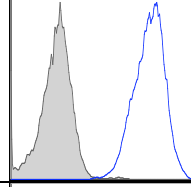
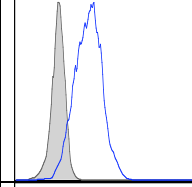
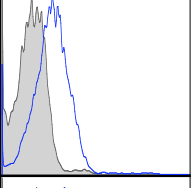
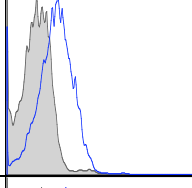
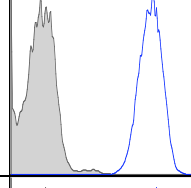
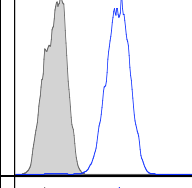
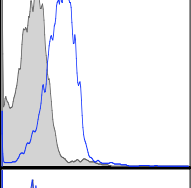
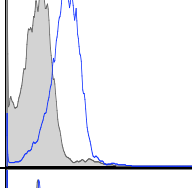
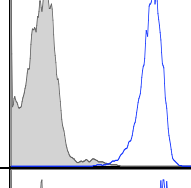
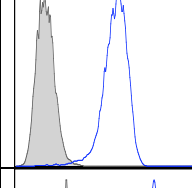
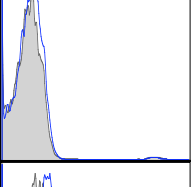
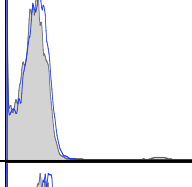
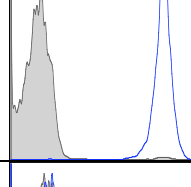
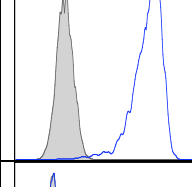
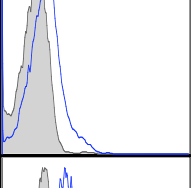
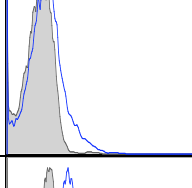
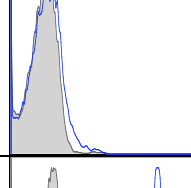
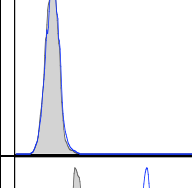
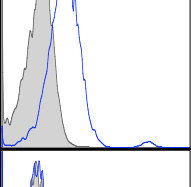
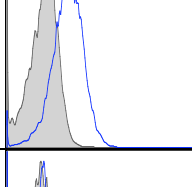
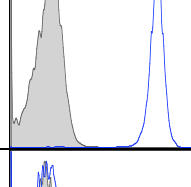
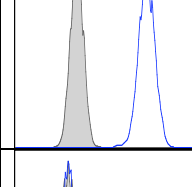
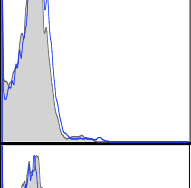
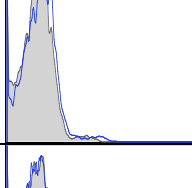
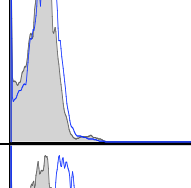
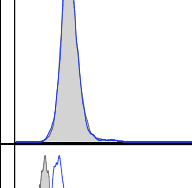
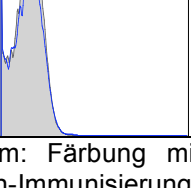
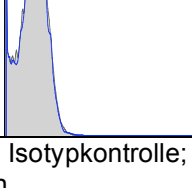
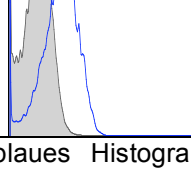
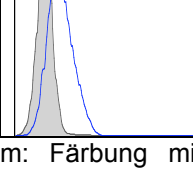


**Abbildung 3.7: Immunfluoreszenzfärbung von A549-Zellen.**

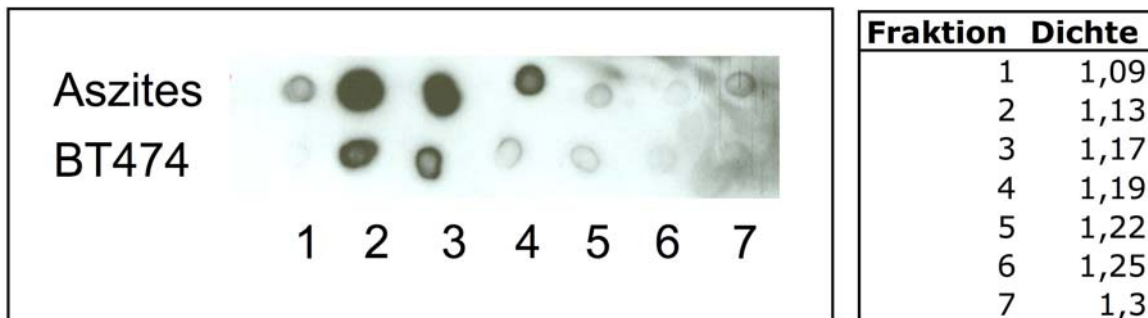
Objekträger wurden mit A549-Zellen bewachsen und in Paraformaldehyd fixiert. Die Antikörperfärbung wurde mit einem Cy3-gekoppelten Antikörper gegen Rattenimmunoglobulin (rot) visualisiert. Die Anfärbung der Zellkerne erfolgte mittels DAPI (blau). Die Abbildungen A-C zeigen eine Färbung mit 8G7 mit Durchlicht (A), mit übereinandergelagerten Fluoreszenzsignalen (B) und als 3-dimensionale Darstellung der Fluoreszenzsignale. Die Aufnahmen belegten, dass der Antikörper hauptsächlich an die Zelloberfläche bindet und dass eine besonders starke Ansammlung des Antikörpers an den Lamellipodien stattfindet (Pfeile). Die Abbildungen D und E zeigen eine Immunfluoreszenzfärbung mit dem Isotypkontrollantikörper anti-GST. Dieser Antikörper erzeugte kein Fluoreszenzsignal.



**Tabelle 3.1: Durchflusszytometrie mit verschiedenen Tumorzelllinien.**

Tumorart	Zelllinie	5E7	5H2	8G7	12B12
Lungenkarzinom	A549				
Mamma- karzinom	BT474				
Mamma- karzinom	SKBR3				
Hypo- pharynx- karzinom	PCI-1				
Nierenzell- karzinom	RCC 1.24				
Melanom	Mel 624.38				
Osteo- sarkom	MG-63				
Ewing- Sarkom	TC-71				
T-Zell- leukämie	Jurkat				

**Legende:** graues Histogramm: Färbung mit Isotypkontrolle; blaues Histogramm: Färbung mit Antikörpern aus den Exosomen-Immunsierungen.



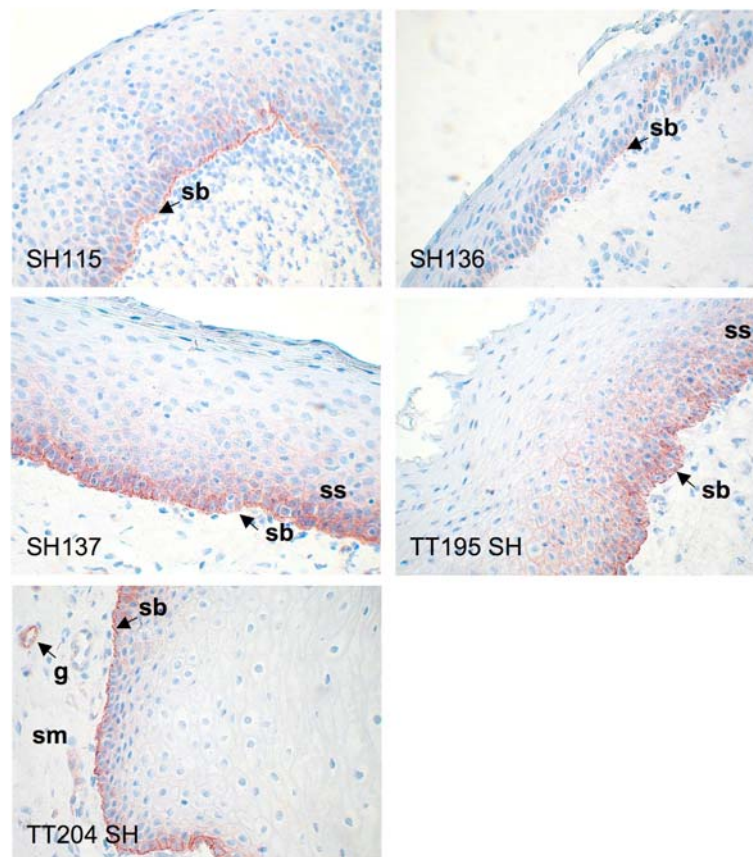
**Abbildung 3.8: Erkennung von Exosomen aus Aszitesflüssigkeit durch 8G7.**

Exosomen aus Aszites einer Tumorpatientin und Exosomen der Brustkrebszelllinie BT474 (BT474) wurden im Saccharosegradienten aufgetrennt. Die gewonnenen Fraktionen wurden im Dot Blot mit 8G7 analysiert. Der Aszitesgradient zeigte besonders intensive Signale in den Fraktionen 2 und 3, die eine für Exosomen typische Dichte aufwiesen. Auch für den Kontrollgradienten mit den BT474-Exosomen waren positive Signale in den Exosomenfraktionen sichtbar.

Nicht nur für therapeutische Zwecke, sondern auch zur Diagnostik von Tumorerkrankungen werden tumorspezifische Antikörper benötigt. In einem weiteren Experiment wurde daher untersucht, ob mit Hilfe des 8G7-Antikörpers Exosomen in Körperflüssigkeiten von Tumorpatienten detektiert werden können. Zu diesem Zweck wurde Aszitesflüssigkeit von einer Patientin mit Ovarialkarzinom zur Gewinnung von Exosomen aufgearbeitet. Das Exosomenpräparat wurde mit Hilfe eines diskontinuierlichen, linearen Saccharosegradienten fraktioniert und im Dot Blot auf die Bindung von 8G7 untersucht. Der Antikörper färbt spezifisch die Fraktionen mit der für Exosomen typischen Dichte an (Abb 3.8). Er könnte daher möglicherweise auch Anwendung in der Tumordiagnostik finden.

**3.2.7 Der Antikörper 8G7 färbt Bereiche in Normalgeweben und in Tumorgeweben an.**

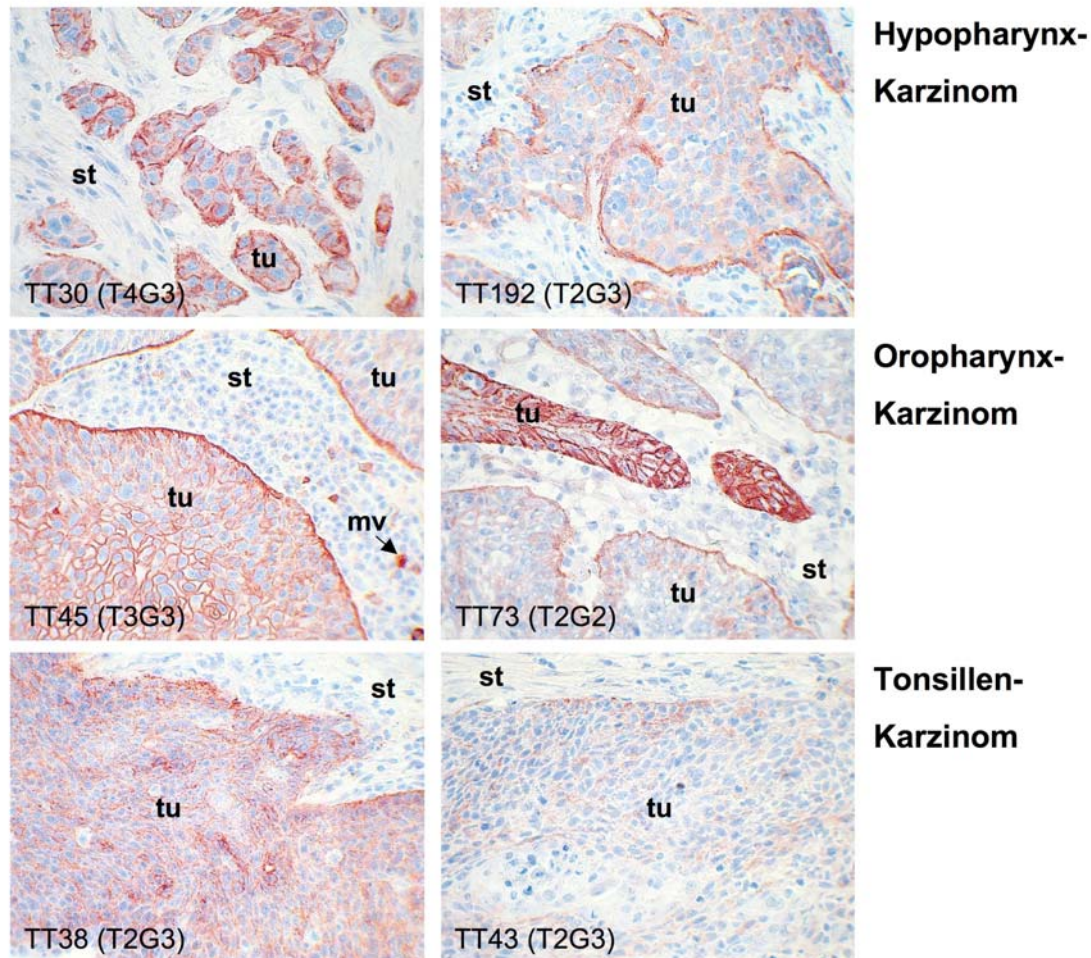
Entscheidend für die Anwendung eines Antikörpers in der Tumorthherapie ist die spezifische Erkennung von Tumorzellen und die Ignoranz bzw. schwächere Erkennung von Strukturen im gesunden Gewebe. Ein gängiges Verfahren für die Testung der Tumorspezifität eines Antikörpers ist die immunhistochemische Färbung von Tumorgewebeschnitten.



**Abbildung 3.9: Immunhistologische Färbung von gesunder Schleimhaut mit 8G7.**

Gefrierschnitte von Mundschleimhaut wurden mit dem Antikörper 8G7 gefärbt. Die Antikörperbindung wurde mittels ABC-Technik und Chromogen AEC-Substrat visualisiert (rot). Die Kerne sind durch Hämatoxilin färbung blau gekennzeichnet. Abkürzungen: sb = *stratum basale*; ss = *stratum spinosum*; sm = *submucosa*; g = Gefäßstruktur.

Die gefärbten Gewebeschnitte von gesunden Schleimhäuten stammten aus unterschiedlichen Lokalisationen im Kopf-Hals-Bereich. Alle Schnitte zeigten eine unterschiedlich stark ausgeprägte Färbung der Basalzellschicht (*stratum basale*) durch den Antikörper 8G7 (Abb 3.9). Bei dem Gewebeschnitt SH136 war die Färbung im Vergleich zu den anderen Schnitten eher schwächer. Bei den Gewebeschnitten SH137 und TT195 SH war besonders deutlich zu erkennen, dass auch das *Stratum spinosum* auslaufend durch den Antikörper angefärbt wurde. Außerdem war im Schnitt TT204 SH die Färbung einer Struktur unterhalb der Basalzellschicht zu erkennen. Dabei könnte es sich um ein Gefäß handeln. Eine genauere Definition des Gefäßes war anhand der vorliegenden Aufnahme nicht möglich.

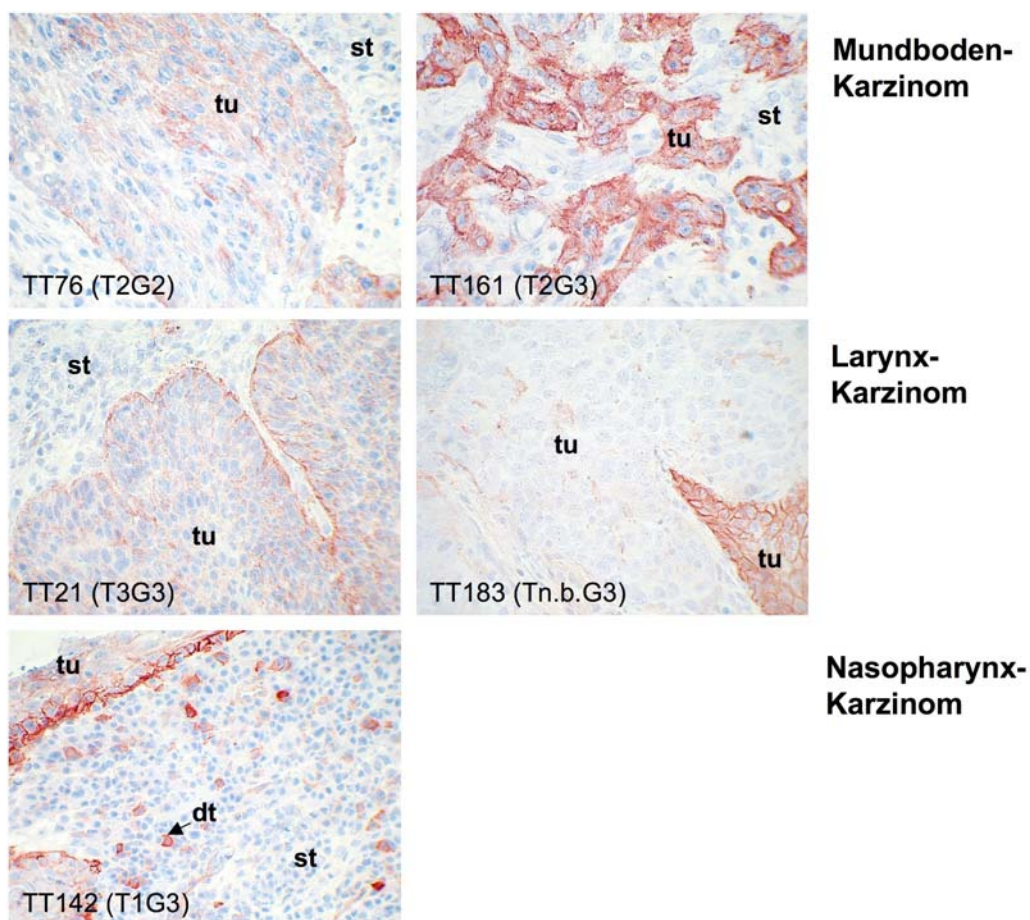


**Abbildung 3.10: Immunhistologische Färbung von HNO-Geweben mit 8G7.**

Gefrierschnitte von Geweben aus dem Hals-Nasen-Ohren-Bereich wurden mit dem Antikörper 8G7 gefärbt. Die Antikörperbindung wurde mittels ABC-Technik und Chromogen AEC-Substrat visualisiert (rot). Die Kerne sind durch Hämatoxylinfärbung blau gekennzeichnet. Abkürzungen: G = histopathologische Einstufung; st = Stroma; T = Ausbreitungsgrad des Primärtumors; tu = Tumor.

In den folgenden Abbildungen sind verschiedene HNO-Tumoren mit Angabe des Tumorstadiums (falls bekannt) gezeigt. Die Tumorklassifikation beinhaltet die Ausbreitung des Tumors (T), wobei die Nummerierung von 1 bis 4 eine zunehmende Ausbreitung indizieren, und die histopathologische Tumorggraduierung (G); wobei die Nummerierung von 1 bis 4 einen zunehmenden pathologischen Schweregrad kennzeichnen. Bei den gezeigten Hypopharynxkarzinomen (TT30 und TT192) war das Tumorgewebe durch den Antikörper 8G7 deutlich markiert (Abb. 3.10). Die Abgrenzung zum umgebenden Stroma war eindeutig erkennbar. Vor allem bei dem Gewebeschnitt TT192 war der Übergang zwischen Tumor und Stroma durch den Antikörper 8G7 besonders intensiv angefärbt. Diese Abgrenzung des Tumors fand sich auch bei den abgebildeten Oropharynxkarzinomen (TT45 und TT73) wieder

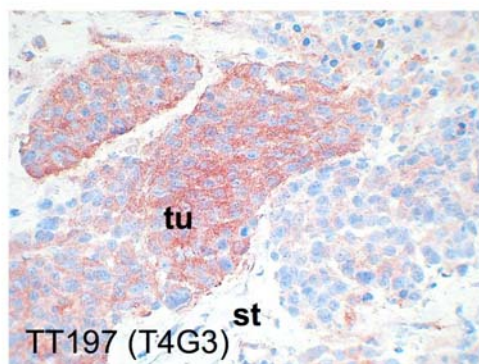
(Abb.3.10). Auffällig war die stark heterogene Färbung der einzelnen Tumorbereiche bei TT73. Das in der Mitte des Bildes liegende Tumorgewebe zeigte eine extrem starke Färbung, während die äußeren Tumorbereiche bis auf die Randzone relativ schwach gefärbt waren. In den Gewebeschnitten aus Tonsillenkarzinomen (TT38 und TT43) wurde ebenfalls der Tumor durch 8G7 angefärbt (Abb 3.10). Die Intensität der Tumorfärbung differierte jedoch stark bei TT38 und TT43. Ein Unterschied im Tumorstadium scheint nicht die Ursache für diese Ungleichheit zu sein, da beide Tumoren als T2G3 klassifiziert worden sind.



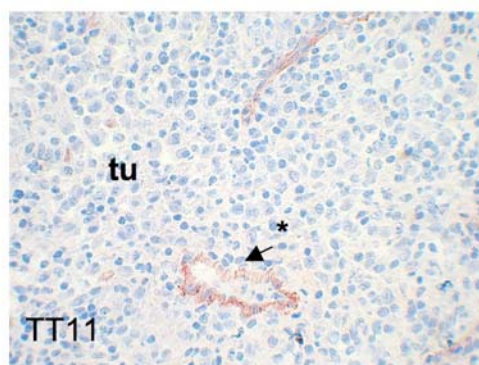
**Abbildung 3.11: Immunhistologische Färbung von HNO-Geweben mit 8G7.**

Gefrierschnitte von Geweben aus dem Hals-Nasen-Ohren-Bereich wurden mit dem Antikörper 8G7 gefärbt. Die Antikörperbindung wurde mittels ABC-Technik und Chromogen AEC-Substrat visualisiert (rot). Die Kerne sind durch Hämatoxilin färbung blau gekennzeichnet. Abkürzungen: dt = disseminierte Tumorzellen; G = histopathologische Einstufung; n.b. = nicht bekannt; st = Stroma; T = Ausbreitungsgrad des Primärtumors; tu = Tumor.

Für die Mundbodenkarzinome und das Larynxkarzinom TT21 in Abbildung 3.11 war die bereits beschriebene Differenzierung zwischen Tumor und Stroma ebenfalls zu beobachten. Die beiden Mundbodenkarzinome waren unterschiedlich stark durch 8G7 gefärbt, wobei eine Korrelation mit dem Tumorstadium hier nicht auszuschließen war, da der schwächer angefärbte Tumor (TT76) als G2 und der stärker angefärbte Tumor (TT161) als G3 eingestuft wurde. Das Larynxkarzinom TT183 wies eine stark heterogene Färbung des Tumors auf. Ein Teil des als Tumor identifizierten Gewebes offenbarte eine hohe Intensität, während der restliche Teil nicht nennenswert angefärbt war. Die Färbung des Nasopharynxkarzinoms TT142 gab eine deutliche Unterscheidung zwischen Tumor und Stroma zu erkennen. Es waren jedoch auch gefärbte Strukturen im Stroma zu erkennen. Dabei könnte es sich möglicherweise um disseminierte Tumorzellen aus dem Tumor handeln.



**Nasennebenhöhlen-Karzinom, undifferenziert, kein Plattenepithelkarzinom**



**Lymphosarkom des Larynx, Verdacht auf Rezidiv**

**Abbildung 3.12: Immunhistologische Färbung von HNO-Geweben mit 8G7.**

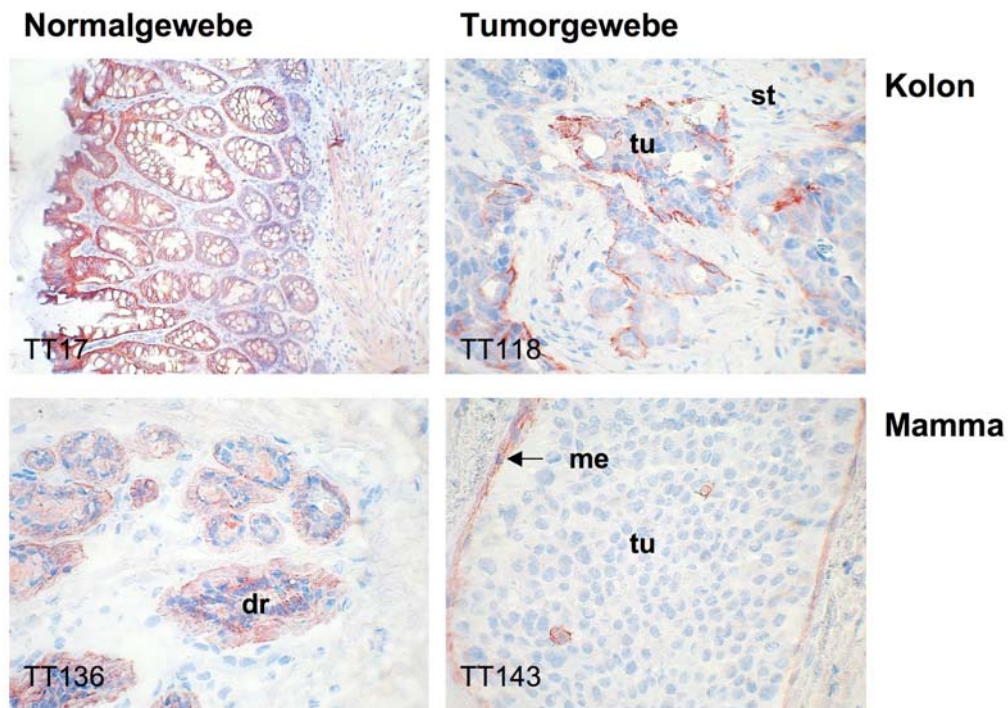
Gefrierschnitte von Geweben aus dem Hals-Nasen-Ohren-Bereich wurden mit dem Antikörper 8G7 gefärbt. Die Antikörperbindung wurde mittels ABC-Technik und Chromogen AEC-Substrat visualisiert (rot). Die Kerne sind durch Hämatoxilinfärbung blau gekennzeichnet. Abkürzungen: G = histopathologische Einstufung; st = Stroma; T = Ausbreitungsgrad des Primärtumors; tu = Tumor; \* = Sinusepithel.

Bei den bisher besprochenen Tumoren handelte es sich ausnahmslos um Plattenepithelkarzinome. Daher wurde auch ein Gewebeschnitt aus einem Nasennebenhöhlenkarzinom (TT197) miteinbezogen (Abb. 3.12), der kein Plattenepithelkarzinom darstellt. Auch in diesem Fall wurde der Tumor durch den Antikörper 8G7 erkannt. Die Zielstruktur scheint daher nicht spezifisch für Plattenepithelkarzinome zu sein. Als Beispiel für Tumoren hämatopoietischen Ursprungs wurde ein lymphoblastisches Non-Hodgkin-Lymphom (TT11) mit 8G7 gefärbt (Abb. 3.12). Hier war bis auf eine Substruktur, bei der es sich vermutlich um eine Sinusepithel handelt, keine signifikante Markierung zu erkennen.

Neben den HNO-Tumorgeweben wurden auch Brust- und Kolongewebe die Erkennung von Substrukturen durch 8G7 untersucht. Dabei war es auch möglich, Normalgewebe einzubeziehen. In Abb. 3.13 ist eine besonders intensive Färbung von allen epithelialen Zellen im Gewebeschnitt aus gesundem Kolon (TT17) zu sehen und auch in normalem Brustgewebe (TT136) sind gefärbte Bereiche zu erkennen, bei denen es sich um Drüsenstrukturen handelt. Bei dem abgebildeten Kolonkarzinom schien die ausnahmslos starke Färbung der Epithelzellen, die im Normalgewebe zu beobachten war, nicht vorhanden zu sein. Dagegen war eine, für viele der oben gezeigten HNO-Tumoren beschriebene Tumorspezifität des Antikörpers zu erkennen. Auch in diesem Fall war die Färbung der Tumorbereiche intensiv und eine klare Abgrenzung zwischen Tumor und Stroma erkennbar. Das Mammakarzinom (TT143) befand sich im Milchgang. Das Myoepithel des Milchgangs und einzelne Tumorzellen wurden durch 8G7 angefärbt.

### **3.2.8 Zytotoxizität des Antikörpers 8G7**

Die Wirkungsmechanismen von therapeutischen Antikörpern lassen sich grob in immunsystemabhängige und in vom Immunsystem unabhängige Wirkungsmechanismen unterteilen. Ob der Antikörper 8G7 in der Lage ist, direkt Zytotoxizität zu vermitteln, wurde mit Hilfe der Cellscreen<sup>®</sup>-Methode untersucht. Dabei wurde die zeitabhängige Veränderung der Wachstumsfläche von A549-Zellen bzw. L929-Zellen in Anwesenheit verschiedener Konzentration von 8G7 untersucht.



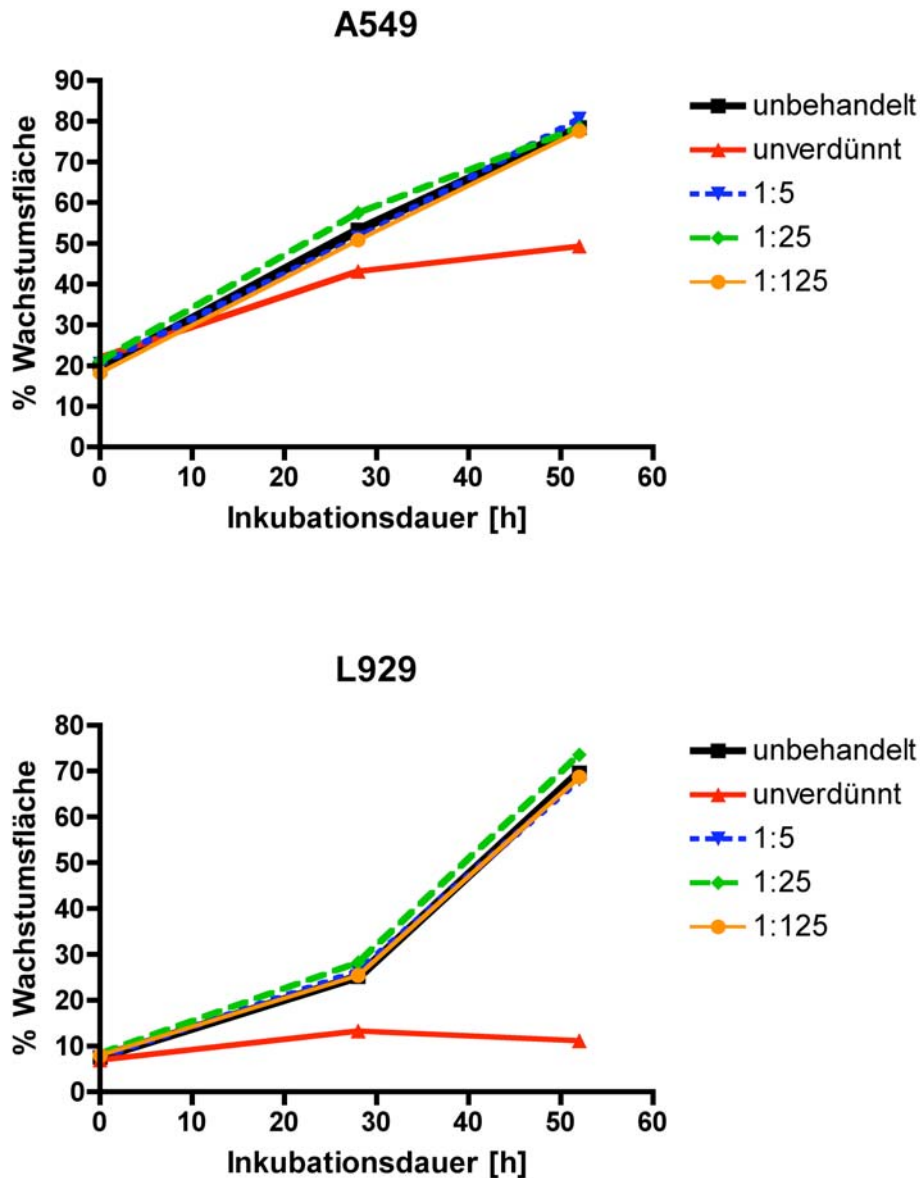
**Abbildung 3.13: Immunhistologische Färbung von Kolongeweben und Brustgeweben.**

Gefrierschnitte von Geweben aus dem Kolon bzw. aus der Brust wurden mit dem Antikörper 8G7 gefärbt. Die Antikörperbindung wurde mittels ABC-Technik und Chromogen AEC-Substrat visualisiert (rot). Die Kerne sind durch Hämatoxylinfärbung blau gekennzeichnet. Abkürzungen: dr = Drüse; me = Myoepithel; st = Stroma; tu = Tumor.

Bei Behandlung der A549-Zellen mit unverdünntem 8G7-Hybridomüberstand war eine deutlich Verlangsamung der Proliferation im Vergleich zu unbehandelten Zellen erkennbar, während die verschiedenen Verdünnungsstufen des Hybridomüberstands das Wachstum der Zellen nicht beeinflussten. Die für die Bindung von 8G7 negativen L929-Zellen zeigten ebenfalls eine Sensitivität gegenüber dem unverdünnten Hybridomüberstand und unverändertes Wachstum bei der Behandlung mit verdünntem Überstand. Da sowohl die für 8G7 positive Zelllinie A549 als auch die für 8G7 negative Zelllinie L929 auf den unverdünnten Hybridomüberstand reagierten, ist anzunehmen, dass der beobachtete Effekt nicht vom Antikörper 8G7 abhängig war. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte in dem Hybridomüberstand selbst liegen. Dieser stellt Medium, das mit Hybridomzellen für längere Zeit inkubiert wurde, dar. Es ist dabei nicht auszuschließen, dass einerseits wichtige Nährstoffe in dem Medium bereits verbraucht waren und andererseits auch evtl. zytotoxische Stoffwechselprodukte enthalten waren. Da die zytotoxische Wirkung mit der



Verdünnung des Überstands in frischem Medium praktisch verschwand, ist das Fehlen von Nährstoffen im Hybridomüberstand die wahrscheinlichere Erklärung. Eine zytotoxische Wirkung von 8G7 konnte in diesem Experiment nicht bestätigt werden, ist aber angesichts des starken Hintergrundeffekts durch den Hybridomüberstand letztendlich nicht auszuschließen.



**Abbildung 3.14: Zytotoxische Wirkung von 8G7.**

Die Zellen wurden in 96-Lochplatten ausgesät und mit dem Hybridomüberstand 8G7, verdünnt in dem Medium, das auch für die Hybridomkultur verwendet wurde, inkubiert. Der Wachstumsverlauf über drei Tage wurde mikroskopisch verfolgt und die Ausdehnung der Wachstumsfläche wurde als Maß für die Vitalität der Zellen aufgezeichnet. Abkürzungen: A549 = A549-Zellen; L929 = L929-Zellen.

### **3.3 Einfluss von Tumorexosomen auf tumorspezifische Antikörper**

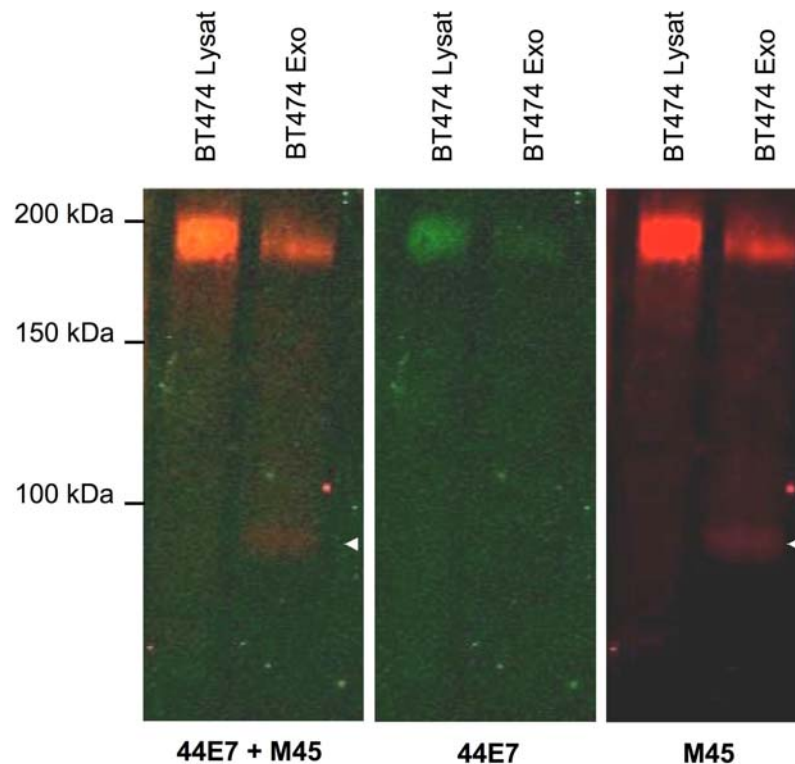
Für die Analyse der Bedeutung von Tumorexosomen für die Antikörper-vermittelte Immunantwort gegen Tumoren fiel die Entscheidung auf den Oberflächenrezeptor Her2. Für Her2 ist bereits bekannt, dass es auf Exosomen aus Aszites von Tumorpatienten vorkommt [170]. Zusätzlich existiert bereits ein sehr wirksamer therapeutischer Antikörper (Trastuzumab), der dieses Protein erkennt und der hervorragend für Fragestellungen, die sich auf funktionelle Aspekte beziehen, eingesetzt werden kann.

#### **3.3.1 Exosomen aus Zellkulturüberständen der Brustkrebszelllinie BT474 enthalten membranständiges Her2.**

Zunächst war es von Bedeutung zu überprüfen, ob Her2 auch auf den in den folgenden Experimenten eingesetzten Exosomen zu finden ist. Wie bereits im Dot-Blot-Verfahren gezeigt, enthielten BT474-Exosomen Her2 (Abb. 3.2). Die Analyse von Exosomen per Dot-Blot, die nicht über einen Saccharosegradienten aufgereinigt wurden, ermöglichte es jedoch nicht zu unterscheiden, ob es sich bei dem detektierten Her2 um das Vollängeprotein (p185 Her2) oder um evtl. die zusätzlich im Exosomenpräparat vorhandene, extrazelluläre Domäne (p95 Her2) handelte. Es ist bekannt, dass p95 Her2 in Form einer proteolytisch abgespalteten extrazellulären Domäne von Tumoren sezerniert wird [240].

Befindet sich das nachgewiesene Her2 auf Exosomen, so sollte das Protein auch die Transmembrandomäne und die intrazelluläre Domäne enthalten. Im Fluoreszenz-Western-Blot konnten sowohl p95 Her2 als auch das p185 Her2 in Exosomenpräparationen aus dem Überstand von BT474-Zellen nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.15). Dazu wurden BT474-Exosomen und BT474-Zellen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Detektion der Her2-Proteine erfolgte mittels Primärantikörpern, die den N-terminalen, extrazellulären bzw. den C-terminalen, intrazellulären Teil von Her2 erkennen. Beide Antikörper stammten aus unterschiedlichen Spezies, wodurch eine simultane Detektion mit zwei Sekundärantikörpern, die an zwei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt waren, möglich war. Der Antikörper M45, der

spezifisch für den extrazellulären Bereich von Her2 war, lieferte zwei Banden. Die höhere Bande entsprach dem Volllängeprotein (185kDa), während die Bande mit einem niedrigeren Molekulargewicht p95 Her2 kennzeichnete. Das Volllängeprotein wurde erwartungsgemäß auch von dem Antikörper 44E7 (spezifisch für die intrazelluläre Domäne) markiert.



**Abbildung 3.15: Anwesenheit unterschiedlicher Varianten des Her2 Proteins in Exosomenpräparationen.**

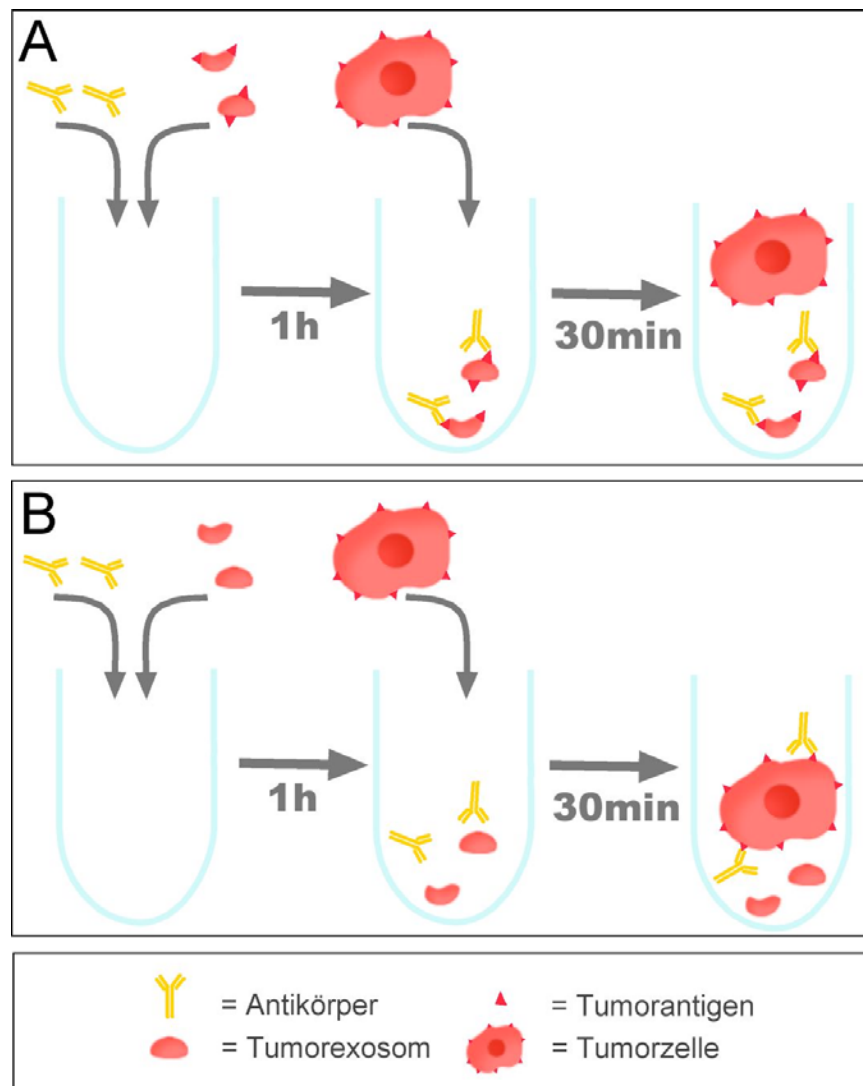
10  $\mu$ g BT474-Zellysat (BT474Lysat) bzw. Exosomen aus 40 ml BT474-Zellkulturüberstand (BT474Exo) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf einer Nitrozellulosemembran immobilisiert. Die Membran wurde gleichzeitig mit einem Her2-spezifischen Antikörper gegen ein intrazelluläres Epitop (44E7) und einem Her2-spezifischen Antikörper gegen ein extrazelluläres Epitop (M45) gefärbt. Die Detektion erfolgte mittels Infrarotfluoreszenz. Die Abbildung 44E7 + M45 zeigt die Überlagerung der Signale beider Antikörper und die Abbildung 44E7 bzw. M45 zeigen das Fluoreszenzsignal der einzelnen Antikörper. Für beide Antikörper war ein deutliches Signal im Bereich von 200 kDa, welches das Volllängeprotein darstellte, zu erkennen. Der Antikörper M45 lieferte für BT474 Exosomen zusätzlich ein Signal unterhalb von 100 kDa und bestätigte damit die Anwesenheit der extrazellulären, abgespalteten Form von Her2 in der Exosomenpräparation.

### 3.3.2 Tumorexosomen aus Zellkulturüberständen verhindern die Bindung tumorspezifischer Antikörper an Tumorzellen in Antigen-abhängiger Weise.

Die auf Exosomen befindlichen tumorassoziierten Antigene könnten mit zellulären tumorassoziierten Antigenen um die Bindung von tumorspezifischen Antikörpern konkurrieren. Das würde bedeuten, dass Exosomen Antikörper abfangen und deren Bindung an Tumorzellen verhindern können (Abb 3.16).

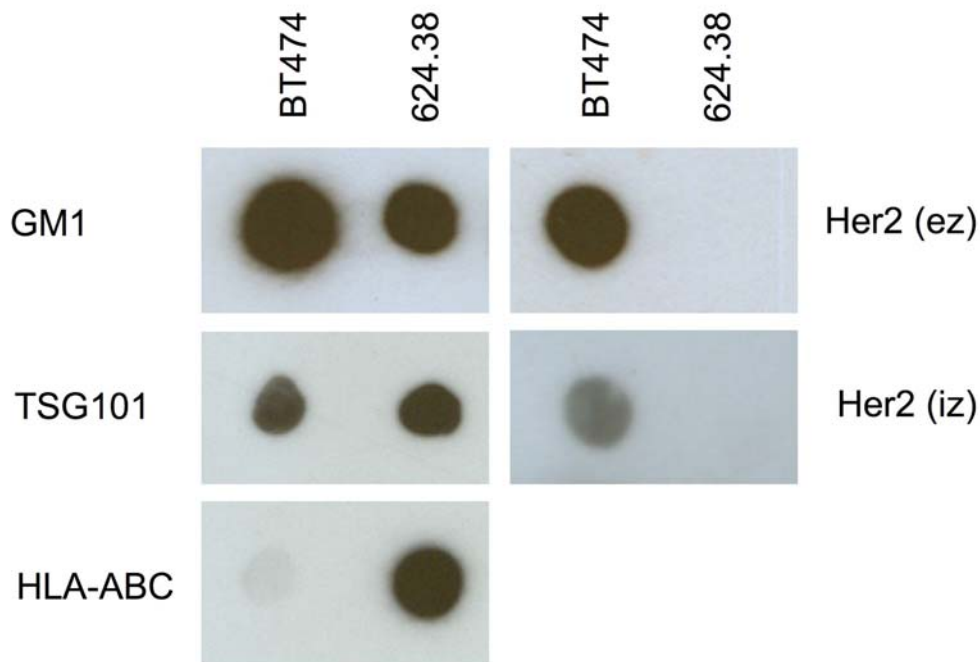
In den folgenden Experimenten wurden Exosomen verwendet, die entweder der Her2-positiven Zelllinie BT474 oder der Her2-negativen Zelllinie Mel624.38 entstammten. Beide Exosomen enthielten den *lipid raft*-Marker GM1 und den Exosomenmarker TSG101. HLA Klasse I-Moleküle waren nur auf Mel624.38-Exosomen vertreten, während Her2 nur in BT474-Exosomen zu finden war (Abb 3.17).

Normalerweise werden Antikörper bei einer Färbung für die Durchflusszytometrie im Überschuss zugegeben. Daher wurde zunächst mit Hilfe eines Titrationsexperiments eine geeignete Konzentration des Her2-Antikörpers bestimmt, um auszuschließen, dass ein möglicher Effekt durch eine zu hohe Antikörperkonzentration maskiert wird (Abb. 3.18A). Die Hypothese des Abfangens eines tumorspezifischen Antikörpers durch Tumorexosomen wurde überprüft, indem ein Her2-spezifischer Antikörper mit Exosomen aus Zellkulturüberständen vorinkubiert und anschließend eine Färbung der Her2-positiven Zelllinie BT474 durchgeführt wurde (Abb 3.18B). Dabei war in der Durchflusszytometrie eine deutliche Abnahme der Fluoreszenzintensität (auf ca. 20%) bei mit BT474-Exosomen vorbehandeltem Antikörper im Vergleich zur herkömmlichen Antikörperfärbung zu erkennen. Die Vorbehandlung des Antikörpers mit Exosomen aus Mel624.38-Überstand führte zu keiner erkennbaren Abnahme der Fluoreszenzintensität. In der Abbildung 3.18C sind die Ergebnisse mehrerer Einzelexperimente diagraphisch zusammengefasst. Der Signifikanztest ergab einen signifikanten Unterschied im Fluoreszenzsignal zwischen den Färbungen mit unbehandelten und mit BT474-Exosomen vorinkubierten Antikörpern.



**Abbildung 3.16: Schematische Darstellung des Experiments zur Untersuchung der Antikörperblockierung durch Tumorexosomen.**

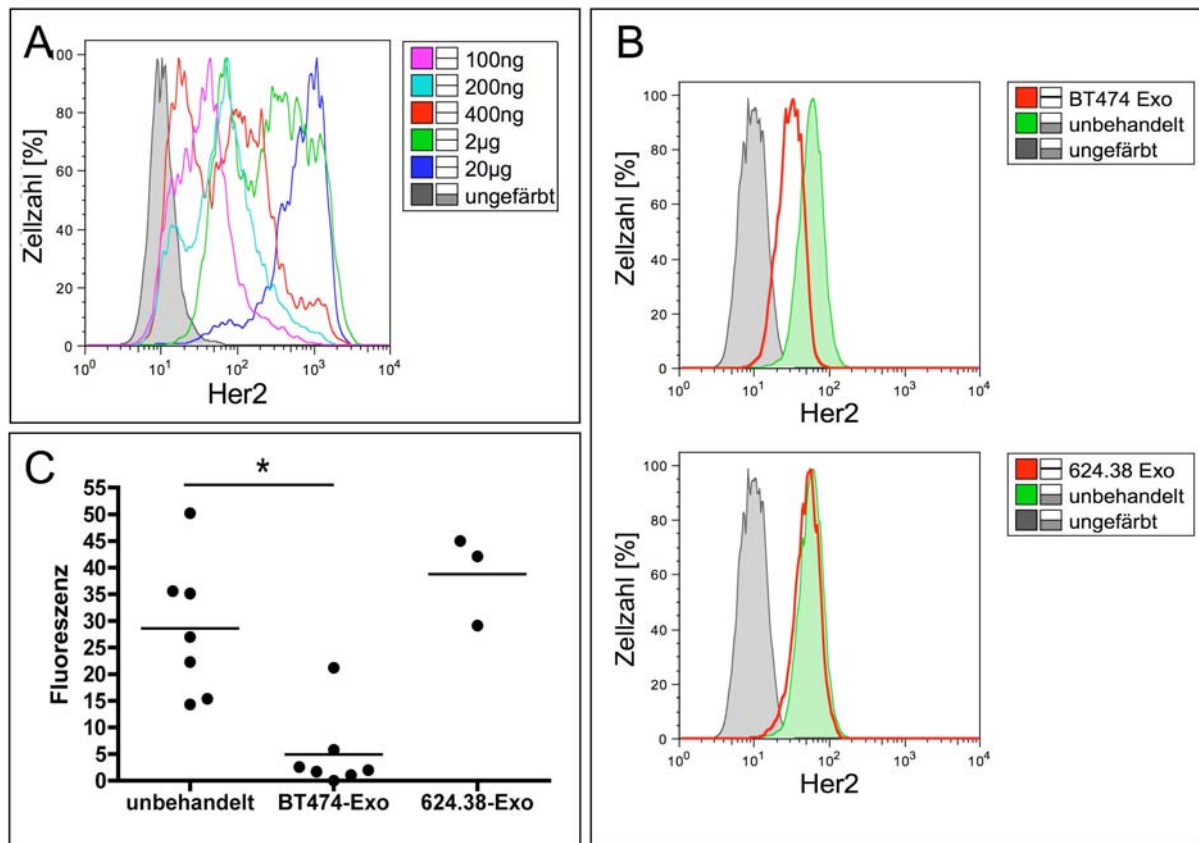
Tumorspezifische Antikörper werden mit den Tumorexosomen für 1h vorinkubiert. Anschließend werden Tumorzellen mit dem vorinkubierten Antikörper gefärbt. Bindet der Antikörper an die Tumorzelle, so ist diese Bindung in der Durchflusszytometrie (FACS) durch ein Fluoreszenzsignal nachweisbar. (A) Enthalten die Tumorexosomen das Tumorantigen, gegen den der Antikörper gerichtet ist, sollte während der Inkubationszeit der Antikörper an die exosomalen Tumorantigene binden. Werden anschließend die Tumorzellen zugegeben, so sollte kein freier Antikörper für die Bindung an die Tumorzelle zur Verfügung stehen. Im FACS sollte daher auch kein Fluoreszenzsignal oder ein im Vergleich zu unbehandelten Antikörpern schwächeres Fluoreszenzsignal detektiert werden. (B) Antikörper werden von Tumorexosomen, die das entsprechende Tumorantigen nicht enthalten, nicht gebunden. Alle Antikörper sollten somit frei zugänglich sein und können an die Tumorzelle binden. Das Fluoreszenzsignal im FACS sollte daher nicht schwächer sein als das einer Färbung mit unbehandelten Antikörpern.



**Abbildung 3.17: Vergleich der Exosomen aus BT474-Zellen und Mel624.38-Zellen.**

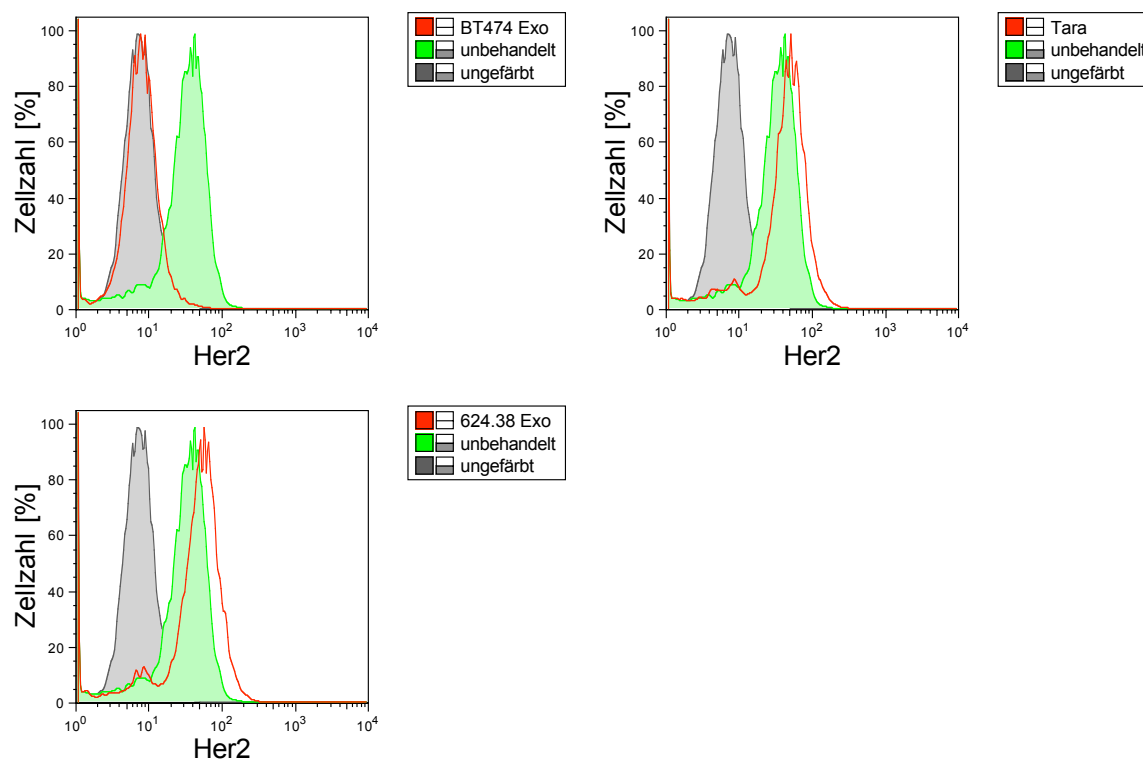
Exosomenpräparate aus BT474-Zellen (BT474) bzw. Mel624.38-Zellen (624.38) wurden wie unter 3.1.3 anhand des GM1-Gehalts normalisiert und im Dot Blot-Verfahren auf die Anwesenheit verschiedener, für Exosomen typischer Proteine untersucht. Das Lipid GM1 war auf den Exosomen beider Zelllinien vertreten. Auch das Markerprotein TSG101 war in beiden Fällen anwesend. Der HLA-Klasse I-Komplex (HLA-ABC) wurde nur von Mel624.38-Exosomen exprimiert. Der extrazelluläre Teil (ez) und der intrazelluläre Teil (iz) konnten in BT474-Exosomen, nicht aber in Mel524.38-Exosomen detektiert werden.

Exosomenpräparate, die nicht mit Hilfe eines Gradienten aufgereinigt wurden, enthalten neben den Exosomen auch lösliches Her2. Der oben demonstrierte Abfangeffekt könnte daher nicht nur auf Exosomen-assoziiertes Her2, sondern auch auf lösliches Her2 zurückzuführen sein. Aus diesem Grund wurde das oben beschriebene Experiment mit Tumorexosomen, die zuvor über einen Iodixanolgradienten gereinigt wurden, durchgeführt (Abb 3.19). Auch in diesem Fall beeinflussten BT474-Exosomen deutlich die Erkennung von Tumorzellen durch den Her2-spezifischen Antikörper. Die Behandlung mit aufgereinigten Mel624.38-Exosomen führte auch hier zu keiner Abnahme der Antikörperbindung an die Tumorzellen.



**Abbildung 3.18: Durchflusszytometrische Analyse des Einflusses von Tumorexosomen auf die Erkennung von Tumorzellen durch Antikörper**

(A) Zur Ermittlung einer geeigneten Antikörperkonzentration wurden BT474-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen des Her2-spezifischen Antikörpers (Klon 2502A) markiert. In den folgenden Experimenten wurden 200 ng/mL Her2-Antikörper und  $1 \times 10^5$  BT474-Zellen pro Ansatz eingesetzt. (B) BT474-Zellen wurden mit Her2-spezifischem Antikörper, der mit 200  $\mu$ g/mL Exosomen aus BT474-Zellen (BT474 Exo) bzw. aus Mel624.38-Zellen (624.38 Exo) vorinkubiert worden war, gefärbt. Als Kontrolle wurden BT474-Zellen mit dem Her2-spezifischen Antikörper (unbehandelt) oder ohne Primärantikörper (ungefärbt) markiert. Die Detektion erfolgte mittels FITC-gekoppelten Sekundärantikörpers am Durchflusszytometer. Für die Behandlung mit BT474-Exosomen war eine deutliche Abnahme der Fluoreszenzintensität zu beobachten. (C) Die aus mehreren Experimenten gewonnenen Mittelwerte der Fluoreszenzintensität wurden in einem Diagramm zusammengefasst. Von allen Werten wurde zuvor der Wert für ungefärbte Zellen subtrahiert. Die statistische Auswertung mittels gepaartem t-Test ergab einen signifikanten Unterschied zwischen der Vorbehandlung der Antikörper mit BT474-Exosomen (BT474-Exo) und unbehandelten Antikörpern (\* =  $P < 0,05$ ).



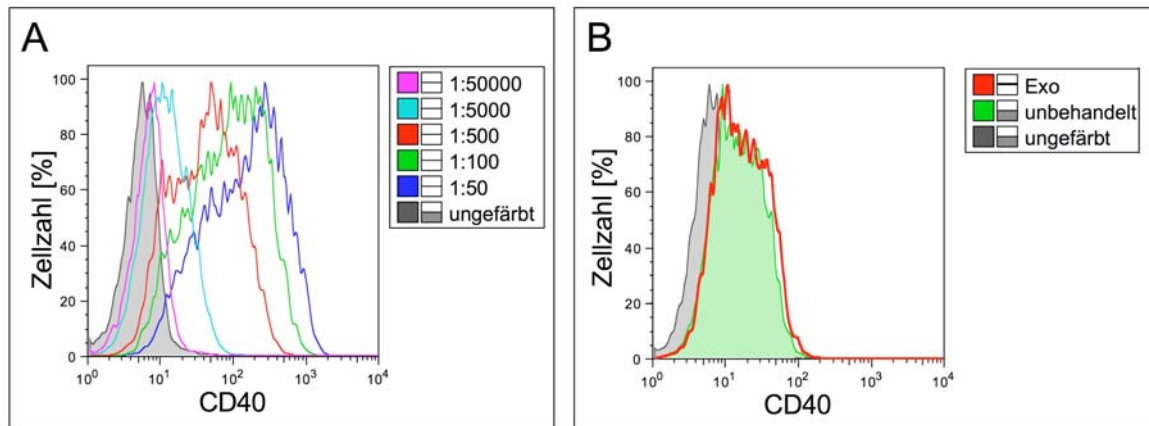
**Abbildung 3.19: Durchflusszytometrische Analyse des Einflusses von gereinigten Tumorexosomen auf die Erkennung von Tumorzellen durch Antikörper.**

BT474-Zellen wurden mit Her2-spezifischem Antikörper, der mit 200 µg/mL, über einen Iodixanolgradienten aufgereinigten, Exosomen aus BT474-Zellen (BT474 Exo) bzw. aus Mel624.38-Zellen (624.38 Exo) vorinkubiert worden war, gefärbt. Um auszuschließen, dass Iodixanol selbst die Fluoreszenzintensität beeinflusst, wurde mit der entsprechenden Fraktion eines unbeladenen Gradienten (Tara) ebenso verfahren wie mit den Exosomenfraktionen. Als Referenzen für die Fluoreszenzintensität wurden BT474-Zellen mit dem Her2-spezifischen Antikörper (unbehandelt) oder ohne Primärantikörper (ungefärbt) markiert. Die Detektion erfolgte mittels FITC-gekoppeltem Sekundärantikörper am Durchflusszytometer. Für die Behandlung mit BT474-Exosomen war eine deutliche Abnahme der Fluoreszenzintensität zu beobachten. Bei Koinkubation mit Mel524.38-Exosomen oder Tara ergab sich kein Effekt auf die Antikörperfärbung.

Da nicht auszuschließen war, dass auch nicht-antigenspezifische Interaktionen des Antikörpers mit den BT474-Exosomen (z.B. Bindung an einen Fc-Rezeptor) den oben gezeigten Effekt verursachen, wurde das gleiche Experiment mit einem CD40-spezifischen Antikörper durchgeführt (Abb. 3.20). Dieser Antikörper besitzt den gleichen Isotyp wie der Her2-Antikörper und bindet nicht auf den verwendeten Tumorexosomen. Der Antikörper wurde auf B-Blasten (BBL) wieder titriert. BT474-Exosomen wurden mit Antikörper in der entsprechenden Konzentration vorinkubiert



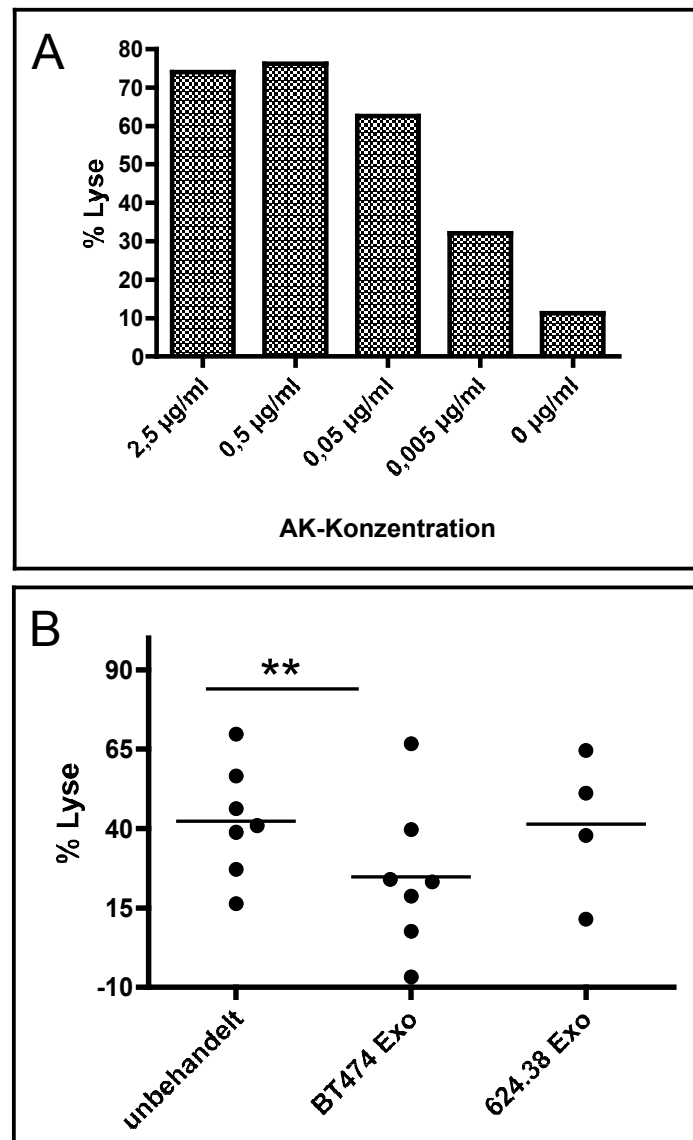
und für eine Färbung von BBL eingesetzt. In diesem Fall wurde die Fluoreszenzintensität der Färbung nicht durch die BT474-Exosomen beeinträchtigt.



**Abbildung 3.20 Durchflusszytometrische Analyse des isotypabhängigen Einflusses von Tumorexosomen auf Antikörper.**

(A) Zur Ermittlung einer geeigneten Antikörperkonzentration wurden BBL RZ-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen des CD40-spezifischen Antikörpers (mit dem gleichen Isotyp wie 2502A) markiert. Für die folgenden Experimente wurde der Antikörper 1:5000 verdünnt. (B) BBL RZ-Zellen wurden mit CD40-spezifischem Antikörper, der mit 200 µg/mL Exosomen aus BT474-Zellen (Exo) vorinkubiert worden war, gefärbt. Als Kontrolle wurden BBL RZ-Zellen mit dem CD40-spezifischen Antikörper (unbehandelt) oder ohne Primärantikörper (ungefärbt) markiert. Die Detektion erfolgte mittels FITC-gekoppelten Sekundärantikörpers am Durchflusszytometer. Für die Behandlung mit BT474-Exosomen war kein Unterschied in der Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Färbung mit unbehandeltem Antikörper zu beobachten.

Aus diesen Experimenten ergibt sich, dass Tumorexosomen, die ein entsprechendes Tumorantigen auf der Oberfläche tragen, Antikörper, die gegen das Tumorantigen gerichtet sind, binden können und somit die Bindung des Antikörpers an eine Tumorzelle verhindern.



**Abbildung 3.21: Einfluss von Tumorexosomen auf die Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität.**

(A) Für die Bestimmung einer geeigneten Konzentration von Trastuzumab wurden calceinmarkierte BT474-Zellen mit PBMCs im Verhältnis 1:40 und mit Trastuzumab in den angegebenen Konzentrationen (AK-Konzentration) gemischt und für 6 h bei 37°C inkubiert. Die Ermittlung des Anteils getöteter Zellen erfolgte über die Messung der Fluoreszenzintensität im Überstand. Bei den folgenden Experimenten wurde eine Antikörperkonzentration von 0,05 µg/mL eingesetzt. Die Berechnung des prozentualen Anteils lysierter Zellen erfolgte mit Hilfe der Referenzwerte aus unbehandelten Zellen (Nullwert) und mit 0,5% Triton-X100 behandelten Zellen (Maximallylyse) unter Anwendung folgender Formel:  $(\text{Wert} - \text{Nullwert}) / (\text{Maximallylyse} - \text{Nullwert})$ . (B) Mit den unter A beschriebenen Bedingungen wurde die zytotoxische Wirkung des Antikörpers in Abhängigkeit von Tumorexosomen analysiert. Der Antikörper wurde dazu vor der Zugabe zum ADCC-Ansatz mit 200 µg/mL Exosomen aus BT474-Zellen (BT474-Exo) bzw. aus Mel624.38-Zellen (624.38 Exo) für 1 h inkubiert. Mittels gepaartem t-Test wurde der Unterschied zwischen der ADCC-Reaktion mit unbehandeltem Antikörper und der ADCC-Reaktion mit Antikörper nach Behandlung mit BT474-Exosomen als hoch signifikant (\*\* =  $P < 0,01$ ) bewertet.

### **3.3.3 Die Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität auf Tumorzellen wird durch Tumorexosomen in Antigen-abhängiger Weise gestört.**

Die Interaktion zwischen Tumorexosomen und Antikörpern könnte auch die Wirkungsmechanismen von tumorspezifischen Antikörpern beeinträchtigen. Ein Mechanismus der zur Elimination von Tumorzellen durch tumorspezifische Antikörper führt, ist die Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC, antibody-dependent cellular cytotoxicity). Bei der ADCC bindet der tumorspezifische Antikörper an die Tumorzelle; der Fc-Teil wird dann durch spezielle Fc-Rezeptoren auf der Oberfläche von Effektorzellen erkannt. Als Effektorzellen kommen z.B. Natürliche Killerzellen oder Makrophagen in Frage. Die durch den Fc-Rezeptor aktivierten Effektorzellen zerstören schließlich die Tumorzellen.

Bei dem ADCC-Experiment wurden als Effektorzellen PBMCs und als Antikörper Trastuzumab eingesetzt. Vor dem eigentlichen Experiment wurde eine geeignete Antikörperkonzentration in einem Titrationsexperiment ermittelt (Abb. 3.21A). Um den Einfluss von Tumorexosomen auf die ADCC zu untersuchen, wurde der Antikörper mit Tumorexosomen vorinkubiert und anschließend zusammen mit den Effektorzellen auf die calceinmarkierten Zielzellen gegeben (Abb. 3.21B). Das Ausmaß der Zelllyse wurde über die Konzentration des fluoreszierenden Calceins im Kulturüberstand gemessen. Her2-positive Exosomen aus BT474-Überständen beeinträchtigen signifikant die Lyse der Tumorzellen, während Her2-negative Exosomen aus Mel624.38-Überständen keinen Einfluss auf die ADCC-vermittelte Zerstörung der Zielzellen haben. Der unter 3.3.2 beschriebene Effekt der Antikörperbindung durch Tumorexosomen wirkt sich also auch auf die Wirkung tumorspezifischer Antikörper *in vitro* aus.

### **3.4 Einfluss von Tumorexosomen auf tumorspezifische CD8+ T-Zellen**

Als Modellantigen zur Untersuchung der Bedeutung von exosomalen Antigenen für die spezifische T-Zellantwort wurde MelanA gewählt. Andre et al. zeigten, dass Exosomen aus Aszites von Tumorpatienten MelanA und HLA Klasse I-Moleküle enthalten [170]. Zudem finden sich MelanA-spezifische T-Zellen regelmäßig auch im

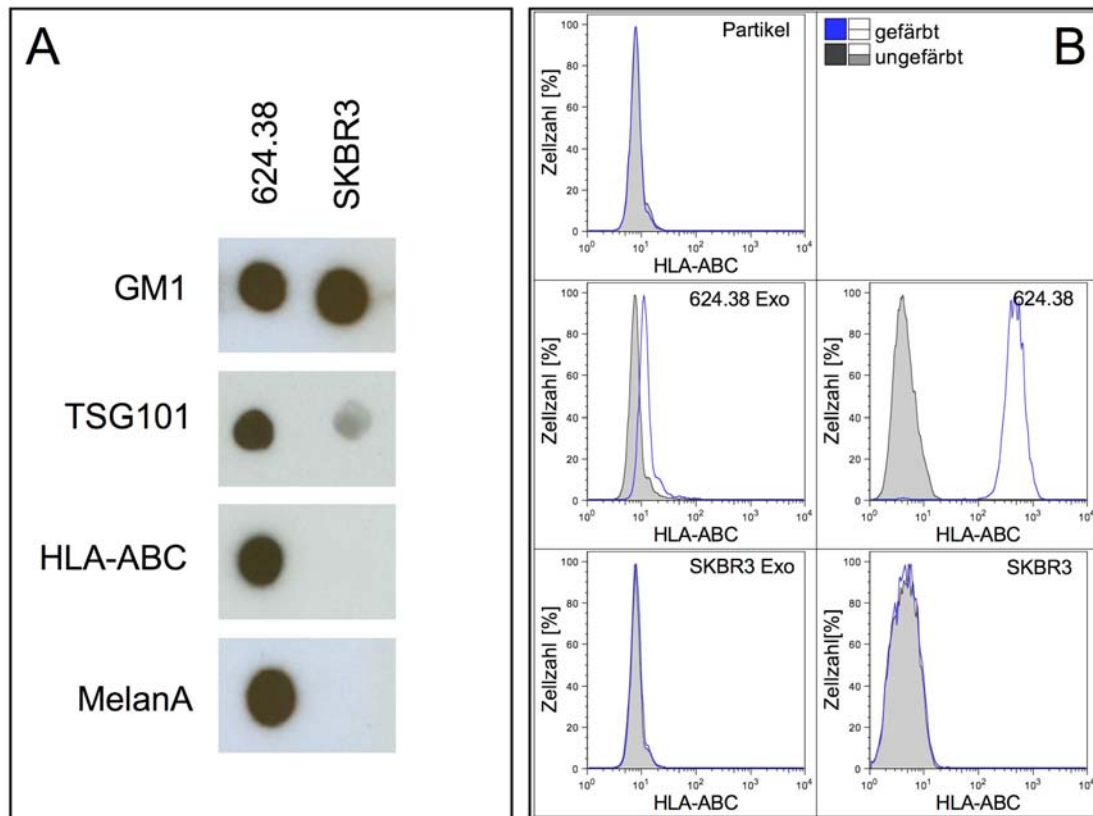
Blut gesunder Spender und können nach einem bereits etablierten Protokoll aus dem Blut von gesunden Spendern isoliert werden.

### **3.4.1 Etablierung von MelanA-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellklonen**

Für die Etablierung MelanA-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellklone wurden PBMCs aus dem Blut eines gesunden Spenders nach zwei unterschiedlichen Verfahren stimuliert. Bei dem ersten Stimulationsansatz wurden zu den PBMCs mit ELA-Peptid beladene autologe B-Blasten (BBL) gegeben. Bei dem zweiten Ansatz wurde das ELA-Peptid zusammen mit einem Hilfspeptid (NLV-Peptid) direkt zu den PBMCs gegeben. Nach ca. dreiwöchiger Stimulation lag der Anteil von CD8<sup>+</sup> MelanA-spezifischen T-Zellen für die mit BBL stimulierten PBMCs bei 5,26% und für die direkt stimulierten PBMCs bei 1,81% (siehe Anhang Abb. 7.1 und Abb. 7.2). Da die Ausbeute bei der BBL-Stimulation deutlich besser war als die Ausbeute bei der direkten Stimulation, wurde nur der BBL-Ansatz für die Klonierung eingesetzt. Die ausgewachsenen Klone wurden auf IFN $\gamma$  - Sekretion und auf die Erkennung des Mart1-Pentamers getestet (siehe Anhang Abb. 7.3 ). Anschließend wurde noch einmal auf die Anwesenheit MelanA-spezifischer T-Zellen analysiert (siehe Anhang Abb. 7.4) und die ausgewählten Klone in einem Calcein-Freisetzungstest auf ihre zytotoxische Aktivität untersucht (siehe Anhang Abb. 7.5). Mit Ausnahme des Klons I3 proliferierten alle T-Zellen nur sehr schwach und konnten daher nicht auf eine ausreichende Zellzahl expandiert werden, um die folgenden Versuche inklusive der benötigten Kontrollen durchzuführen.

### **3.4.2 Tumorexosomen bewirken keine deutliche Blockierung des T-Zellrezeptors und beeinträchtigen die Oberflächenexpression von CD3 und CD8 in Antigen-unabhängiger Weise.**

Tumorassoziierte Antigene, die von Exosomen auf HLA Klasse I-Molekülen präsentiert werden, könnten an den T-Zellrezeptor tumorspezifischer T-Zellen binden und dadurch deren Wirksamkeit beeinträchtigen.



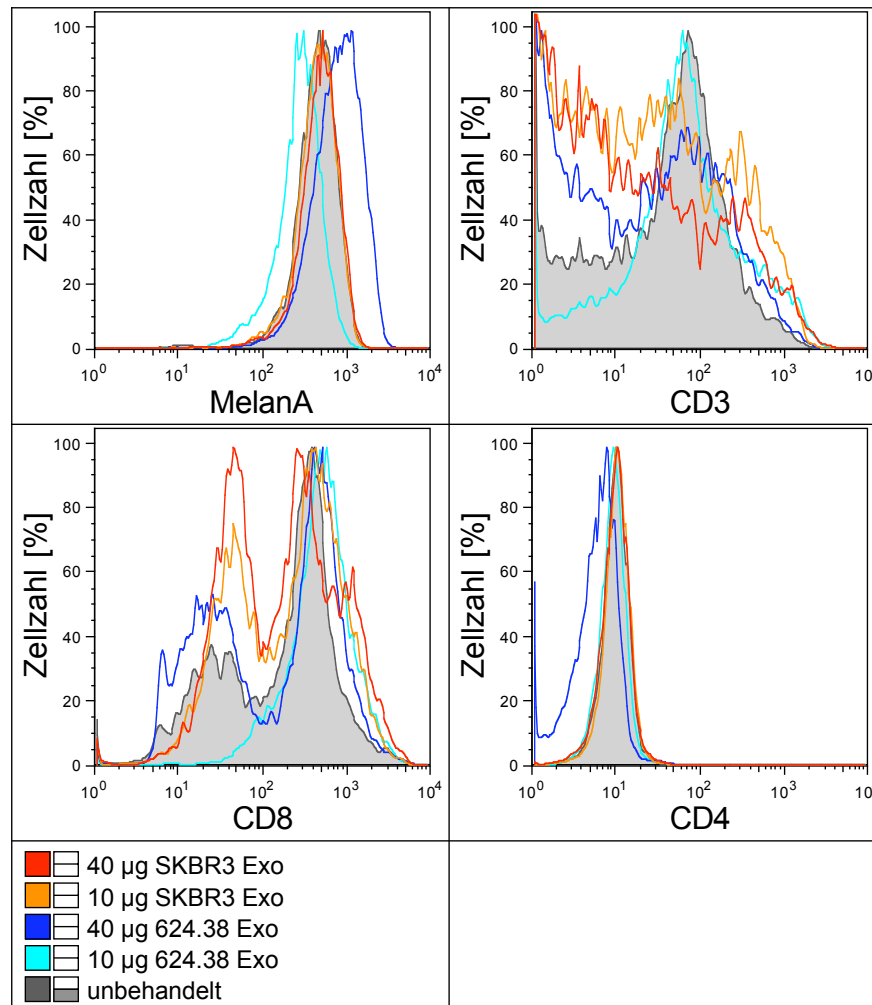
**Abbildung 3.22: Vergleich der Exosomen aus Mel624.38-Zellen und SKBR3-Zellen.**

(A) Exosomenpräparate aus Mel624.38-Zellen (624.38) bzw. aus SKBR3-Zellen (SKBR3) wurden normalisiert und im Dot-Blot-Verfahren auf die Anwesenheit verschiedener, für Exosomen typische Proteine untersucht. Das Lipid GM1 war auf den Exosomen beider Zelllinien vertreten. Auch das Markerprotein TSG101 war in beiden Fällen anwesend, wobei die Expression auf SKBR3-Exosomen sehr viel schwächer war als die auf Mel624.38-Exosomen. Der HLA-Klasse I-Komplex (HLA-ABC) und MelanA wurden nur von Mel624.38-Exosomen exprimiert. (B) Für den durchflusszytometrischen Nachweis der Expression von HLA Klasse I-Molekülen auf Exosomen, wurden die Exosomen an Aldehyd-Sulfat-Latex-Partikel gekoppelt. Die Partikel selbst und an Partikel gekoppelte SKBR3-Exosomen (SKBR3 Exo) waren negativ für HLA-ABC, während an Partikel gekoppelte Mel624.38-Exosomen (624.38) positiv für HLA-ABC waren. Auch Mel624.38-Zellen (624.38) und SKBR3-Zellen (SKBR3) wurden auf die Expression von HLA Klasse I-Molekülen untersucht. Auch hier zeigten nur die Mel624.38-Zellen eine starke Expression.

Die für die folgenden Experimente verwendeten Exosomen stammten aus Zellkulturüberständen der Zelllinien Mel624.38 und SKBR3. Mel624.38 Exosomen wiesen in der Dot-Blot-Analyse eine hohe Expressionsrate für HLA Klasse I-Moleküle und MelanA auf, während beide Proteine auf SKBR3 Exosomen nicht vorhanden waren (siehe Abb. 3.22A). Als Referenz für vergleichbare Exosomenkonzentrationen diente wiederum die Färbung des Gangliosids GM1 durch HRP-gekoppeltes Cholera-toxin (Untereinheit B; CTB). Auffällig war auch, dass SKBR3 Exosomen im

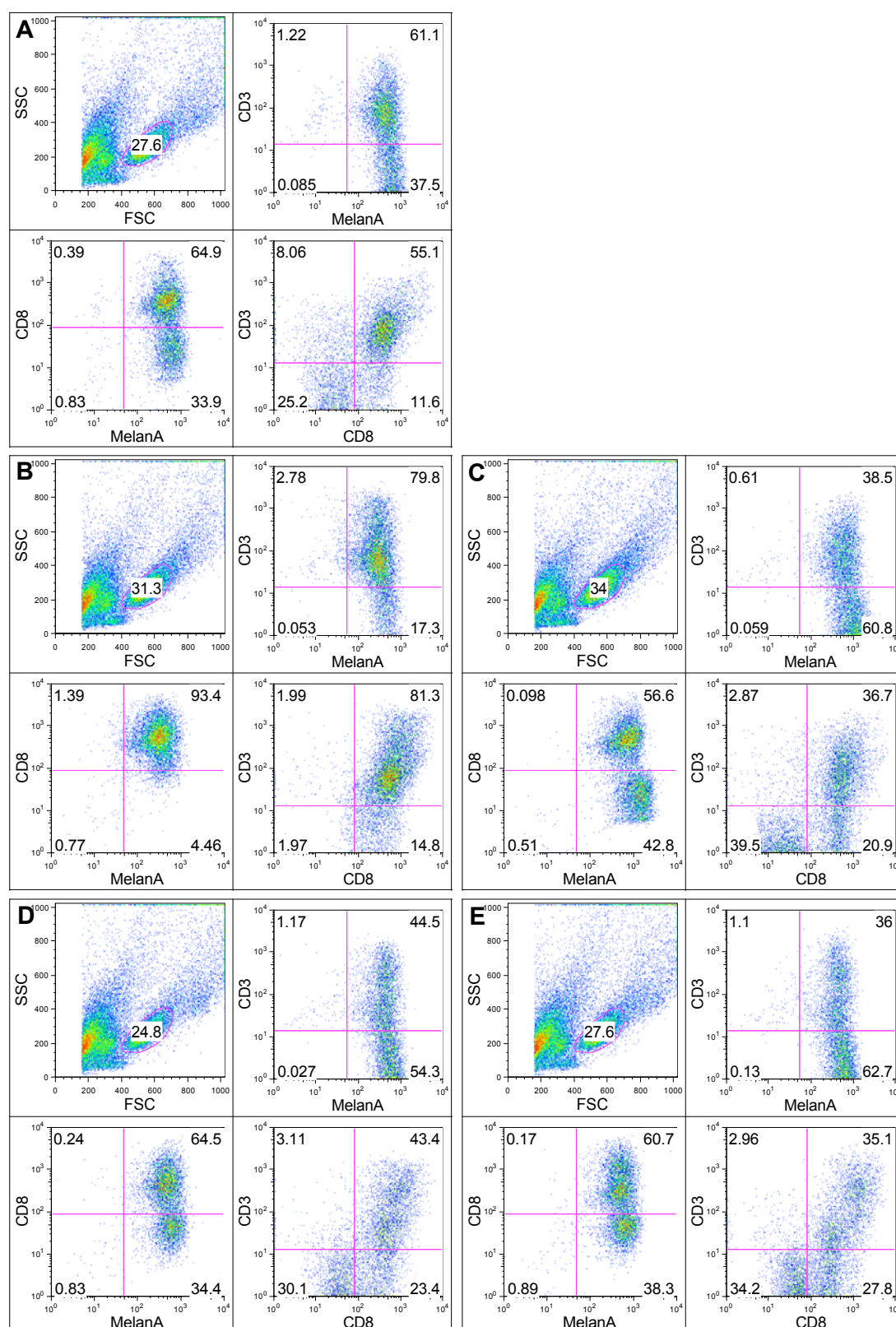
Vergleich zu GM1 nur sehr wenig von dem exosomalen Markerprotein TSG101 enthalten. Des Weiteren wurde die Expression von HLA Klasse I Molekülen auf Exosomen, die auf Aldehyd-Sulfat-Latex-Partikeln immobilisiert wurden, mittels FACS untersucht (siehe Abb. 3.22B). Auch hier war der Expressionsunterschied für HLA Klasse I Moleküle sowohl auf den Exosomen als auch auf den Zellen selbst zu erkennen.

Die Behandlung der T-Zellklone mit Tumorexosomen und anschließender Färbung mit ELA-Pentamer sollte Hinweise geben, ob die Zugänglichkeit des T-Zellrezeptors für das Pentamer durch Tumorexosomen beeinträchtigt wird. Die T-Zellklone wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Exosomen vorinkubiert und anschließend mit einem ELA-beladenen HLA-A2 Komplex in Form eines Pentamers gefärbt. Durch das Pentamer kann die Expression von T-Zellrezeptoren, die MelanA auf HLA-A2 Molekülen erkennen, ermittelt werden. Die durchflusszytometrische Analyse der mit Exosomen behandelten Klone in Abbildung 3.23 zeigte Abweichungen in der Fluoreszenzintensität im Vergleich zu unbehandelten Klonen. Die Fluoreszenzintensität nach Behandlung mit 10µg Mel624.38 Exosomen nahm im Vergleich zu unbehandelten T-Zellen ab, während die Fluoreszenzintensität bei Behandlung mit 40µg Mel624.38 Exosomen verstärkt wurde. Eine klare Tendenz für den Effekt von MelanA-positiven Exosomen auf MelanA-spezifische T-Zellen war daher nicht zu erkennen. Es ist jedoch möglich, dass der aus der Exosomenbehandlung resultierende Effekt dosisabhängig ist. Da bei der höheren Exosomenkonzentration die Fluoreszenz durch das MelanA-Pentamer verstärkt wurde, ist eine signifikante Blockierung des T-Zellrezeptors durch Tumorexosomen unwahrscheinlich. Die Fluoreszenzintensität nach der Behandlung mit den Kontrollexosomen (SKBR3) unterschied sich nicht von der unbehandelten T-Zellen.



**Abbildung 3.23: Einfluss von Tumorexosomen auf die Bindung von HLA-Peptidkomplexen an den T-Zellrezeptor.**

T-Zellen (Klon I3) wurden für 2h mit den angegebenen Exosomenmengen inkubiert und anschließend mit dem ELA-Pentamer und mit Antikörpern gegen CD3, CD8 und CD4 gefärbt. Für die Fluoreszenzintensität der Färbung mit ELA-Pentamer (MelanA) war nach Behandlung mit 10 µg Mel624.38-Exosomen (10 µg 624.38 Exo) eine leichte Abnahme der Fluoreszenzintensität im Vergleich zu unbehandelten T-Zellen zu erkennen, während die Fluoreszenzintensität nach Behandlung mit 40 µg Mel624.38-Exosomen (40 µg 624.38 Exo) leicht zunahm. Bei der Behandlung mit SKBR3-Exosomen (10 µg SKBR3 Exo bzw. 40 µg SKBR3 Exo) trat keinerlei Veränderung in der Pentamerbindung gegenüber unbehandelten T-Zellen auf. SKBR3-Exosomen beeinträchtigten stattdessen die Expression von CD3 und CD8. Bei CD3 war eine deutliche Abnahme durch die Behandlung mit SKBR3-Exosomen zu erkennen. Bei CD8 führte die Behandlung mit SKBR3-Exosomen zur Bildung eines zweiten fluoreszenzschwächeren Gipfels, der eine T-Zellpopulation mit einer niedrigeren CD8-Expression darstellte. Die gleichen Effekte auf die CD3-Expression und auf die CD8-Expression waren auch für T-Zellen, die mit 40 µg Mel624.38-Exosomen inkubiert wurden, zu beobachten. Bei der Behandlung mit 10 µg Mel624.38-Exosomen war keine Veränderung in der CD3-Expression und in der CD8-Expression zu erkennen. Außerdem bewirkte die Behandlung mit 40 µg Mel624.38-Exosomen die Abnahme der CD4-Expression, während die anderen Behandlungen keinen Einfluss auf die CD4-Expression zeigten.



**Abbildung 3.24** Dot Plot Ansicht von T-Zellen nach Behandlung mit Tumorexosomen.

(A) unbehandelte T-Zellen; (B) 10 µg Mel624.38-Exosomen; (C) 50 µg Mel624.38-Exosomen (D) 10 µg SKBR3-Exosomen; (E) 40 µg SKBR3-Exosomen. T-Zellen (Klon 13) wurden für 2h mit den angegebenen Exosomenmengen inkubiert und anschließend mit dem ELA-Pentamer und mit Antikörpern gegen CD3, CD8 und CD4 gefärbt.



Neben dem Einfluss der Tumorexosomen auf die Zugänglichkeit des T-Zellrezeptors wurde auch der Effekt von Tumorexosomen auf die Oberflächenexpression von CD3 und CD8 untersucht (Abb. 3.23). Dabei zeigte sich, dass die Anzahl der CD3-Moleküle auf der Zelloberfläche nach Vorinkubation der T-Zellen mit Exosomen aus Mel624.38 (40µg) bzw. SKBR3 (10µg bzw. 40µg) abnahm. Dieser Effekt scheint unabhängig von der Präsentation des MelanA-Epitops zu sein, da er sowohl für MelanA-positive (Mel624.38) als auch für MelanA-negative (SKBR3) Exosomen zu beobachten war und da das Ausmaß des Effektes für MelanA-negative (SKBR3) Exosomen stärker war als für MelanA-positive (Mel624.38) Exosomen. Darüber hinaus war, wie bereits für die Pentamererkennung beobachtet, eine Abweichung von diesem Effekt bei einer niedrigeren Mel624.38 Exosomenkonzentration zu erkennen. Bei Vorinkubation der T-Zellen mit 10µg Mel624.38 Exosomen schien die CD3-Oberflächenexpression sogar positiv beeinflusst zu werden.

Für CD8-Moleküle war ein ähnlicher Effekt wie für CD3 zu beobachten. Auch hier wirkte sich die Behandlung der T-Zellen mit 40 µg Mel624.38 Exosomen bzw. mit SKBR3 Exosomen negativ auf die Detektion der CD8-Moleküle an der Zelloberfläche aus, während die Behandlung der T-Zellen mit 10 µg Mel624.38 Exosomen die CD8-Detektion verstärkte. Bei der Betrachtung der CD3- und CD8-Expression im Dot-Plot-Modus (Abb. 3.24) war zu erkennen, dass sich eine eigene CD3<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> Population ausgebildet hatte. Das heißt, dass sich die Anzahl der beiden Markermoleküle nicht auf allen T-Zellen gleichermaßen verringert hatte, sondern dass eine Streuung von T-Zellen mit unterschiedlich starker Expression von CD3 und CD8 entstanden war.

### **3.4.3 Tumorexosomen beeinträchtigen die Effektorfunktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellklonen.**

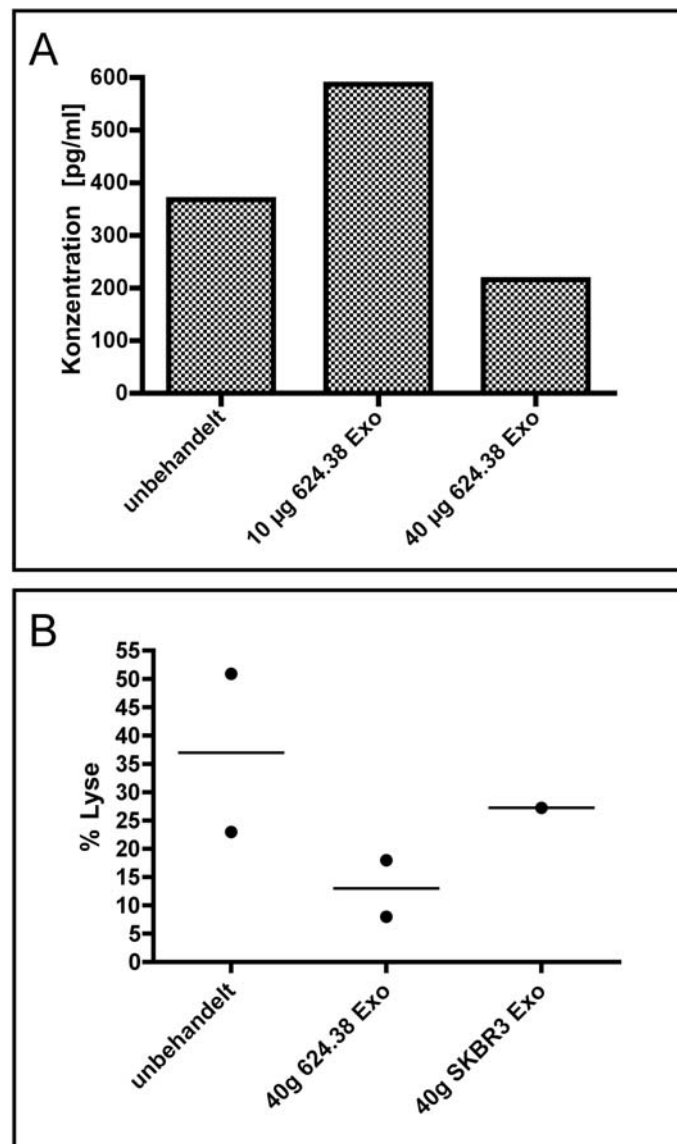
Als nächstes sollte geklärt werden, ob die durch Exosomen beeinträchtigte Expression von CD3 und CD8 auf T-Zellklonen auch Folgen für die Effektorfunktion der T-Zellen ergibt. Dazu wurde die durch Zielzellen induzierte IFN $\gamma$ -Sekretion der T-Zellklone und die zytotoxische Wirkung der T-Zellklone auf Zielzellen bei Koinkubation mit Exosomen untersucht (Abb. 3.25). Nach einer dreistündigen Inkubationszeit wurden die IFN $\gamma$ -Sekretion mittels ELISA und die Zytotoxizität mittels Calceinfreisetzung der Zielzellen bestimmt. Die Behandlung der T-Zellen mit 10 µg

Mel624.38 Exosomen zeigte kaum einen Effekt auf  $\text{IFN}\gamma$ -Freisetzung oder Zytotoxizität im Vergleich zu unbehandelten T-Zellen, während die  $\text{IFN}\gamma$ -Freisetzung und besonders die zytotoxische Wirkung durch die Koinkubation mit 40  $\mu\text{g}$  Mel624.38 Exosomen beeinträchtigt wurden. Auch die Behandlung mit 40  $\mu\text{g}$  SKBR3 Exosomen hatte eine verminderte zytotoxische Wirkung der T-Zellen zur Folge und weist somit auf einen Antigen-unabhängigen Wirkmechanismus der Exosomen hin.

#### **3.4.4 $\text{CD8}^+$ T-Zellklone werden nicht durch Tumorexosomen aktiviert.**

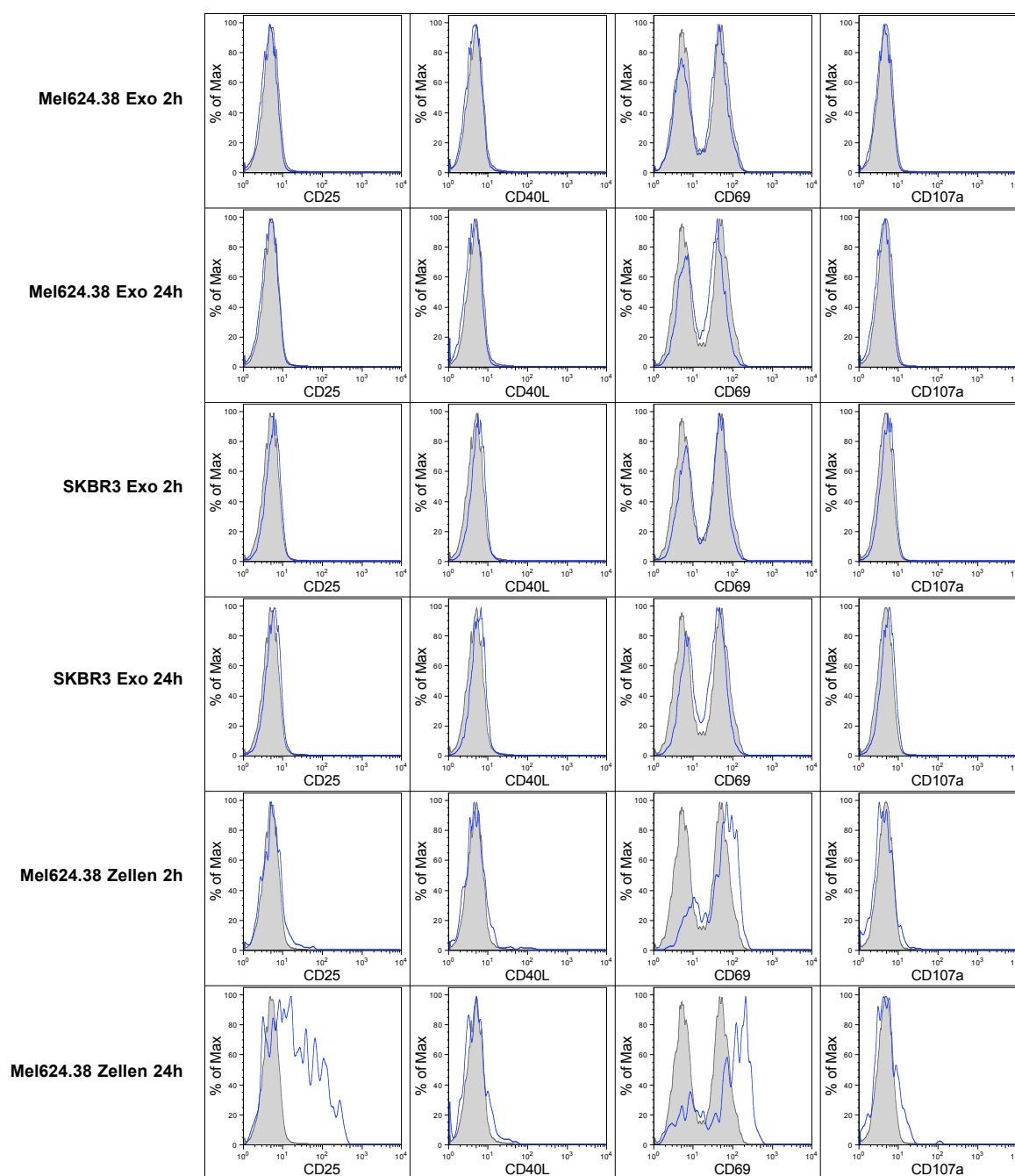
Ein bekannter Mechanismus, der eine Ursache für die Herabregulierung von CD3 darstellen könnte, ist der Aktivierungs-induzierte Zelltod. Um herauszufinden, ob eine Aktivierung der T-Zellen durch die Exosomen für den beschriebenen Effekt verantwortlich ist, wurden T-Zellen mit 40 $\mu\text{g}$  Mel624.38 Exosomen bzw. SKBR3 Exosomen für 2 oder 24 Stunden behandelt und anschließend die Expression verschiedener Aktivierungsmarker mittels Durchflusszytometrie untersucht (Abb. 3.26).

CD25, ein früher Aktivierungsmarker, zeigte bei T-Zellen, die für 24h mit Mel624.38 Zellen vorbehandelt wurden, einen deutlichen Aktivierungsstatus an. Bei einer kurzzeitigeren Behandlung mit Mel 624.38 Zellen bzw. bei Behandlung mit Exosomen war keine Aktivierung der T-Zellen zu erkennen. CD40L wird normalerweise ebenfalls kurz nach der Aktivierung von T-Zellen induziert. Die Färbung mit CD40L-Antikörper zeigte aber weder bei den Kontrollbehandlungen mit Melanomzellen noch bei den Exosomenbehandlungen ein positives Signal. Einer der am frühesten bei T-Zellaktivierung hochregulierten Marker ist CD69. Dieser wurde bei beiden Kontrollreaktionen hochreguliert, während die Expression bei den Exosomenbehandlungen im Vergleich zu unbehandelten T-Zellen unverändert blieb. Der Degranulationsmarker CD107a zeigte weder bei den Kontrollreaktionen noch bei Behandlung der T-Zellen mit Exosomen eine deutliche Induktion. So wurde zumindest für die Aktivierungsmarker CD25 und CD69 gezeigt, dass Tumorexosomen alleine die  $\text{CD8}^+$  T-Zellklone nicht aktivieren können.



**Abbildung 3.25: Einfluss von Tumorexosomen auf die Effektorfunktion von MelanA-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen.**

(A) T-Zellen (Klon I3) wurden mit Mel624.38-Zellen in Anwesenheit von 10 µg bzw. 40 µg Mel624.38-Exosomen (10 µg 624.38 Exo bzw. 40 µg 624.38 Exo) für 3h inkubiert und die IFN $\gamma$ -Konzentration mittels ELISA bestimmt. Die Koinkubation mit 10 µg Mel624.38-Exosomen führte zu einer Zunahme der IFN $\gamma$ -Sekretion, während die Koinkubation mit 40 µg Mel624.38-Exosomen eine Abnahme der IFN $\gamma$ -Sekretion im Vergleich zu der Stimulation mit Mel624.38-Zellen alleine (unbehandelt) zur Folge hatte. (B) Calceinmarkierte Mel624.38-Zellen wurden für 3h mit T-Zellen im Verhältnis Effektorzellen : Zielzellen = 20:1 koinkubiert. Nach 3h wurde die Calceinfreisetzung im Überstand mittels Plattenfluorimeter gemessen. Die Berechnung des prozentualen Anteils lysierter Zellen erfolgte mit Hilfe der Referenzwerte aus unbehandelten Zellen (Nullwert) und mit 0,5% Triton-X100 behandelten Zellen (Maximallyse) unter Anwendung folgender Formel:  $(\text{Wert} - \text{Nullwert}) / (\text{Maximallyse} - \text{Nullwert})$ . Die Koinkubation mit Exosomen aus Mel624.38-Zellen (40 µg 624.38 Exo) bzw. aus SKBR3-Zellen (40 µg SKBR3 Exo) führte in Bezug auf die Abwesenheit von Exosomen (unbehandelt) zu einer verringerten Zelllyse durch T-Zellen.



**Abbildung 3.26: Einfluss von Tumorexosomen auf die Expression von T-Zell-Aktivierungsmarkern.**

MelanA-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit Tumorexosomen bzw. Tumorzellen für 2 h bzw. 24 h kokubiert und anschließend mit Antikörpern gegen die Aktivierungsmarker CD25, CD40L, CD69 und CD107a gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Die Inkubation mit den Mel624.38-Zellen diente dabei als Positivkontrolle für die Antikörperfärbung. Da die Antikörper gegen CD40L und CD107a auch in Positivkontrollen kein positives Signal ergaben, ist davon auszugehen, dass diese für die Bestimmung des Aktivierungsstatus von T-Zellen nicht geeignet sind. Als Antwort auf die Inkubation mit Mel624.38-Zellen für 24h wurden die beiden Aktivierungsmarker CD25 und CD69 verstärkt exprimiert. Bei den Behandlungen mit Exosomen zeigte sich keinerlei Veränderung in der Expression dieser Aktivierungsmarker.

## 4. Diskussion

### **4.1 Generierung tumorspezifischer Antikörper mittels Immunisierung mit Exosomen**

Der Fokus der Pharmaindustrie im Bereich der Behandlung von Krebs liegt auf der Entwicklung und Anwendung therapeutischer monoklonaler Antikörper, auch weil die bisher zugelassenen Antikörper sehr gute Erfolge zeigen. Seit dem Jahr 2004 wurde nur ein neuer therapeutischer Antikörper, nämlich Removab<sup>®</sup> im Jahr 2009, zugelassen [82, 94]. Ein Grund für die niedrige Zulassungsrate ist unter anderem der Mangel an geeigneten Zielstrukturen für spezifische therapeutische Antikörper. Geeignete Zielstrukturen sollten auf malignen Zellen sehr viel stärker als auf gesunden Zellen exprimiert werden, um eine deutliche Diskriminierung der beiden Zelltypen zuzulassen und die Nebenwirkungen möglichst gering zu halten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Verfahren etabliert, das die Anwesenheit von Tumorantigenen auf Tumorexosomen für die Identifikation von Zielstrukturen nutzt. Der Vorteil der Tumorexosomen gegenüber anderen Vakzinen (z.B. in Form von Zelllysaten) ist die Anreicherung eines breiten Spektrums von Oberflächenantigenen. Durch die intakte Membranstruktur von Exosomen werden die Transmembranproteine zusätzlich stabilisiert. Durch die Immunisierung von Versuchstieren und anschließender Herstellung von klonalen Hybridomen konnte eine Vielzahl an monoklonalen Antikörpern generiert werden. Diese Antikörper wurden auf die Bindung an Tumorzellen und auf die Ignoranz von PBMCs getestet. Von Bedeutung war auch, dass die gewonnenen Antikörper Immunglobuline der Klasse G waren, da dadurch die Etablierung der Hybridomklone und die anschließende Charakterisierung der Antikörper erleichtert wurden. Diese Kriterien wurden von fünf Antikörpern erfüllt.

Die Identifizierung der Antikörperzielstrukturen ist unerlässlich für die Evaluierung von therapeutischen Antikörpern. Bei den durchgeführten Experimenten zur Charakterisierung lag das Hauptaugenmerk auf dem Hybridomklon 8G7 (Antikörper 8G7). Leider war die Identifizierung zum Zeitpunkt der Beendigung dieser Arbeit

noch nicht vollständig abgeschlossen. Das Epitop, welches durch 8G7 erkannt wird, ist diskontinuierlich und somit abhängig von der nativen Struktur des Proteins (Abb. 3.5). Hinsichtlich einer potentiellen Therapie ist dies ein klarer Vorteil, da somit sichergestellt ist, dass das Epitop, das auf den Zielzellen in nativer Form vorliegt, auch erkannt wird. Andererseits wurde dadurch die Identifizierung erschwert, da so keine Informationen über das Molekulargewicht und den Erfolg einer Immunpräzipitation gewonnen werden konnten. Mit Hilfe der Biotinylierung von Oberflächenproteinen und der Detektion der biotinylierten Proteine mittel StrepTactin-HRP-Konjugat war es jedoch möglich ein Protokoll für die Immunpräzipitation zu etablieren, das die massenspektrometrische Identifizierung des Tumorantigens ermöglichen sollte (Abb. 3.6).

Die Selektivität eines tumorspezifischen Antikörpers hinsichtlich verschiedener Tumorarten ist entscheidend für dessen Anwendung in der Therapie. Es ist von Nachteil, wenn die Spezifität sich nur auf wenige Tumoren begrenzt. Da es sich bei der Zelllinie A549, deren Exosomen für die Immunisierung verwendet wurden, um ein nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom handelt, wurden verschiedene Tumorzelllinien auf die Bindung von 8G7 untersucht (Tab. 3.1). Dabei zeigt sich, dass der Antikörper 8G7 eine große Bandbreite an Tumorzelllinien erkennt und dass das zugehörige Antigen von verschiedenen Tumorzelllinien unterschiedlich stark exprimiert wird. Die Erkennung von Tumorzelllinien durch 8G7 ist zwar ein wichtiges Kriterium für die Eignung zur Tumorthherapie, aber nicht ausreichend für eine Bewertung der Anwendbarkeit *in vivo*. Es gilt auszuschließen, dass durch 8G7 Strukturen erkannt werden, die ausschließlich in kultivierten Zelllinien auftreten. Außerdem sollten Zellen aus gesundem Gewebe nicht oder nur deutlich schwächer durch den Antikörper erkannt werden. Immunhistochemische Färbungen von Tumorgewebeschnitten mit 8G7 zeigten, dass eine klare Abgrenzung zwischen Tumorgewebe und gesundem Gewebe in der Nähe des Tumors möglich ist. Dabei wurden Tumorzellen in unterschiedlichen Intensitäten angefärbt. Innerhalb eines Schnittes war teilweise auch eine stark heterogene Färbung des Tumors zu erkennen. Dieses Phänomen wurde aber auch z.B. für die Expression von Her2 beschrieben, weshalb auch die Wirksamkeit von Trastuzumab stark von dem Her2-Expressionstatus des Tumors abhängt [78, 86, 241]. Der Antikörper 8G7 erkennt zum Teil auch Bereiche in gesunden Geweben (Abb. 3.9; Abb. 3.13). Dies ist für einen therapeutischen

Antikörper nicht ideal, jedoch sind auch Antigene, wie z.B. Her2 oder EpCAM, gegen die bereits zugelassene Antikörper existieren, in gesundem Gewebe vorhanden. So wird EpCAM zum Beispiel sehr stark in verschiedenen Bereichen des Gastrointestinaltrakts exprimiert ([www.proteinatlas.org/tissue\\_profile.php?antibody\\_id=3809&g\\_no=ENSG00000119888](http://www.proteinatlas.org/tissue_profile.php?antibody_id=3809&g_no=ENSG00000119888)). Da sich der Tumorpatient zum Zeitpunkt der Therapie meist in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium befindet, ist es vertretbar, eventuelle Schädigungen in gesunden Geweben bis zu einem gewissen Maß als Nebenwirkung in Kauf zu nehmen. Es ist anzunehmen, dass echte tumorspezifische Antigene, die nicht in gesundem Gewebe vorzufinden sind, nur in sehr begrenzter Menge existieren. In der Regel bedienen sich maligne Zellen eines Genrepertoires, das dem von gesunden Zellen entspricht. Da alle Gene im Laufe der Entwicklung eines Organismus irgendwann benötigt werden, werden diese auch alle exprimiert. Ein tumorspezifischer Antikörper kann, unter Erfüllung aller anderen Kriterien, nur dann kein gesundes Gewebe erkennen, wenn das Antigen nur in frühen Entwicklungsstadien und in Tumorzellen exprimiert wird (z.B. CEA [242]) oder wenn das Antigen eine tumorspezifische Mutation aufweist (z.B. bcr-abl [243]).

Die am häufigsten für Antikörper beschriebenen Wirkmechanismen sind die ADCC und das Blockieren von überlebensnotwendigen Signalen [82]. Das bedeutet für die Zielstruktur, dass diese entweder in sehr hoher Anzahl auf der Tumorzelloberfläche anwesend oder in für die Zelle besonders wichtigen Signaltransduktionswegen involviert sein sollte. Aus der FACS-Analyse ist bekannt, dass das 8G7-Antigen auf einigen Zelllinien in sehr hoher Anzahl exprimiert wird (Tab. 3.1). Eine zusätzliche Voraussetzung für die ADCC ist ein Antikörperisotyp, der von den Fc-Rezeptoren der Effektorzellen erkannt wird. Die variablen Bereiche des 8G7 Antikörpers müssten hierzu mittels Klonierung mit den konstanten Bereichen eines humanen IgG1-Antikörpers vereint werden [243]. Das heißt, der Antikörper müsste für die Induktion einer ADCC *in vivo* humanisiert werden. Bei Fehlen eines entsprechenden Isotyps könnten Tumorzellen auch durch an den Antikörper gekoppelte Radionuklide oder zytotoxische Substanzen abgetötet werden [104, 245-248]. Der Antikörper 8G7 wurde zusätzlich auf eine direkte zytotoxische Wirkung auf Tumorzellen untersucht. Der Hybridomüberstand erzeugte selbst einen zytotoxischen bzw. antiproliferativen Effekt auf die Zielzelllinie und die Kontrollzelllinie, so dass kein eindeutiger zytotoxischer Effekt durch den Antikörper selbst nachgewiesen werden konnte (Abb.

3.14). Durch eine Aufreinigung des Antikörpers aus dem Hybridomüberstand könnte der Hintergrundeffekt umgangen und eine klare Aussage über die zytotoxische Aktivität getroffen werden. Die Aussagekraft von *in vitro* Zytotoxizitätstests mit Antikörpern ist insgesamt sehr begrenzt. Die tatsächliche Wirksamkeit eines Antikörpers kann letztendlich nur durch *in vivo* Testreihen in Form von Tierversuchen und klinischen Studien beurteilt werden.

Neben der therapeutischen Anwendung von Antikörpern, die gegen exosomale Antigene gerichtet sind, ist auch der Einsatz in der Diagnostik denkbar. Die Zielstruktur wird in diesem Fall häufig als Tumormarker bezeichnet. Es gibt dabei prinzipiell zwei verschiedenen Arten von Tumormarkern. Einige Tumormarker dienen dazu, um an einer Tumorbiopsie den Status des bereits diagnostizierten Tumors genauer zu charakterisieren und daran anschließende Therapieverfahren auszurichten (z.B. Her2 zur Entscheidung über die Anwendung von Trastuzumab) [249]. Die andere Klasse von Tumormarkern wird eingesetzt, um Tumorerkrankungen in möglichst frühen Stadien diagnostizieren zu können (z.B. PSA bei Prostatakarzinom) [250]. Die Detektion von Tumoren in sehr frühen Stadien ist von großer Bedeutung, da dadurch die Überlebensrate von Patienten stark verbessert werden kann. Die 5-Jahresüberlebensrate von Patientinnen mit Ovarialkarzinom des Stadiums I beträgt z.B. 90%, während sie bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom in fortgeschritteneren Stadien nur noch bei 21% liegt [251]. Besonders für diese Art der Anwendung eignen sich Antikörper gegen exosomale Tumorantigene hervorragend. Der Vorteil von Tumorexosomen ist dabei, dass sie relativ einfach und nicht-invasiv aus dem Serum oder anderen Körperflüssigkeiten von Patienten gewonnen werden können. Mit Hilfe des Antikörpers 8G7 konnten Tumorexosomen auch im Aszites einer Patientin mit Ovarialkarzinom nachgewiesen werden (Abb. 3.8). Es gibt bereits mehrere Publikationen, die sich mit dem Einsatz von Exosomen und Mikrovesikeln aus Körperflüssigkeiten als prognostische bzw. diagnostische Marker beschäftigen [117, 252, 253]. Für das Ovarialkarzinom wurde auch eine positive Korrelation der Exosomenmenge im Serum mit dem Tumorstatus gezeigt [253]. Doch nicht nur der Exosomengehalt im Serum ist für die Tumordiagnostik von Bedeutung, sondern auch die spezifische Zusammensetzung der Tumorexosomen bei verschiedenen Tumorstadien könnte wichtige Informationen liefern. Bisher existieren noch keine genauen Daten über die Lebensdauer von



Exosomen *in vivo* und deren Abbau. Durch intensivere Studien in diesem Bereich könnten Tumorexosomen zu einem viel versprechenden diagnostischen Werkzeug werden.

Mit dem in dieser Arbeit entwickelten Verfahren konnten einige potenziell für die Tumorthherapie bzw. Tumordiagnostik brauchbare monoklonale Antikörper generiert werden. Um mit anderen, in der Industrie üblichen Verfahren zur Identifizierung von Zielstrukturen konkurrieren zu können, müsste das Verfahren möglichst effizienter gestaltet werden. Für die Immunisierung können neben Exosomen aus Zellkulturüberständen auch Exosomen aus Patientenseren oder Aszites verwendet werden. Dadurch können einige Nachteile von Zellkulturen (z.B. Aufwand der Etablierung oder Entstehung von Zellkulturartefakten) umgangen und eine höhere Bandbreite an Tumoren durchsucht werden. Theoretisch kann auf diese Weise sogar eine individualisierte Antikörpertherapie von Tumorpatienten ermöglicht werden. Dabei würde dem Patienten ein individuell auf Basis des Exosomenprofils zusammengestellter Cocktail aus verschiedenen, zuvor validierten, tumorspezifischen Antikörpern appliziert. Des Weiteren wäre bei der Verwendung von antikörperproduzierenden Phagenbibliotheken (*phage display*) keine aufwändige Immunisierung von Versuchstieren mit anschließender Hybridomherstellung nötig und die konstanten Bereiche des Antikörpers können nach Bedarf gewählt werden [254-256]. Nicht-humane monoklonale Antikörper sind aufgrund ihrer starken Immunogenität und der mangelnden Fähigkeit Immuneffektormechanismen hervorzurufen, weniger wirksam als humane oder humanisierte Antikörper [257-259]. Für therapeutische Zwecke ist also die Humanisierung der generierten Antikörper empfehlenswert. Schließlich kann durch Auswahlprüfverfahren und Identifizierungsmethoden, die sich für die Hochdurchsatzanwendung eignen, die Identifizierung (vor allem einer hohen Antikörperzahl) stark beschleunigt werden. Eine derartige Methode ist die Herstellung von cDNA-Banken aus Tumorbiopsien und die Expression der cDNA-Bank im eukaryotischen System.

---

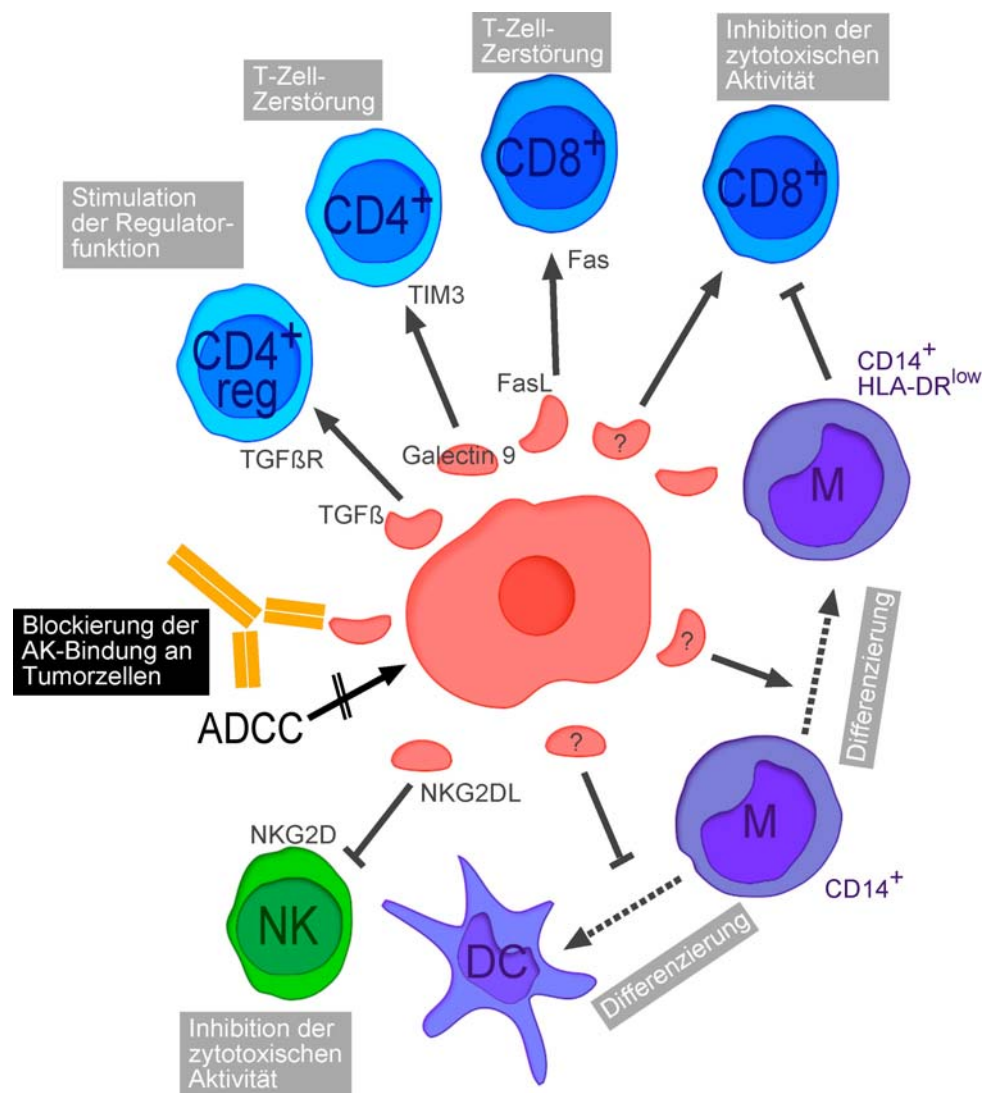
## **4.2 Einfluss von Tumorexosomen auf die tumorspezifische Immunantwort**

Die Immunevasion von Tumoren ist ein komplexes Zusammenspiel zwischen tumoreigenen Faktoren und dem Immunsystem. Zahlreiche Untersuchungen belegen, dass auch Tumorexosomen in diesem Zusammenspiel involviert sind. Hauptsächlich basieren die für Tumorexosomen beobachteten Effekte der Immunsuppression auf der Präsentation von immunsuppressiven Molekülen oder Todesrezeptorliganden durch die Exosomen (Abb. 4). Tumorexosomen enthalten neben den immunsuppressiven Molekülen auch Tumorantigene [170]. Angenommen, die in den Tumorexosomen an die Umgebung abgegebenen Tumorantigene besitzen eine Funktion, muss man zunächst bedenken, dass diese in dieser Form sezernierten Tumorantigene von APCs aufgenommen werden könnten und zur Stimulation entsprechender Effektorzellen präsentiert werden könnten, was sich letztendlich nachteilig für den Tumor auswirken würde. Ein Nachteil für den Tumor durch die Sekretion exosomaler Tumorantigene scheint jedoch nicht zu bestehen, da die Tumorexosomenkonzentration im Serum von Patienten mit fortschreitender Tumorerkrankung zunimmt [117]. Ein für den Tumor positiver Effekt durch die exosomalen Tumorantigene könnte allerdings in der Ablenkung des Immunsystems vom eigentlichen Tumor bestehen. Das Fehlen kostimulatorischer Moleküle könnte gleichzeitig zu einer Anergisierung von Effektorzellen führen.

Im Serum von Tumorpatienten sind häufig große Mengen an tumorspezifischen Antikörpern zu finden, die letztendlich aber nicht zur Abstoßung des Tumors führen [260, 261]. Eine Möglichkeit, wie diese potentiell für den Tumor gefährlichen Antikörper entschärft werden können, ist das Abfangen durch Tumorexosomen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass exosomale Tumorantigene die Bindung von Antikörpern an Tumorzellen verhindern (Abb. 3.18). Die logische Konsequenz ist die Reduktion der sich an die Antikörperbindung anschließenden Effektormechanismen, wie die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) und die komplementabhängige Zytotoxizität. Die Effizienz der ADCC wird *in vitro* erwartungsgemäß durch die Anwesenheit von exosomalen Tumorantigenen beeinträchtigt (Abb. 3.21). Die Bindung und Blockierung von tumorspezifischen Antigenen stellt also einen weiteren, durch Tumorexosomen vermittelten Mechanismus der Immunevasion von Tumoren dar (siehe Abb.4). Neben dem

Blockieren der tumorspezifischen Antikörper durch Tumorexosomen kann die ADCC auch beeinträchtigt werden durch Antigen-unabhängige Einflüsse auf die Effektorzellen, wie z.B. NK-Zellen, für die auch eine inhibitorische Wirkung von Tumorexosomen beschrieben wurde [199]. Die in dieser Arbeit beobachtete Beeinträchtigung der ADCC ist hauptsächlich auf einen Antigen-abhängigen Effekt zurückzuführen, da Tumorexosomen ohne das Her2-Antigen keinen nennenswerten Einfluss auf die Effizienz der ADCC ausübten. Es ist dennoch nicht auszuschließen, dass evtl. zu einem späteren Zeitpunkt oder unter anderen Bedingungen die Aktivität der NK-Zellen durch die Tumorexosomen zusätzlich verringert wird. Neben der ADCC existiert auch ein zellunabhängiger, zytotoxischer Wirkmechanismus von Antikörpern unter Beteiligung der Komplementkaskade. In diesem Fall wird die Zellyse durch den Proteinkanal, dem sogenannten *membrane attack complex* (MAC), der sich aus den fünf Komplementproteinen C5b, C6, C7, C8 und C9 zusammensetzt, vermittelt [262]. *In vitro* ist dieser Mechanismus aufgrund hoher Ansprüche an die entsprechenden Substanzen (Instabilität des Komplements, Glykosylierung des Antikörpers etc.) nur sehr schwer darstellbar [263]. Die meisten Tumorzelllinien sind zudem resistent gegenüber der Komplementlyse. Diese Resistenz wird unter anderem auch durch die Eliminierung von MAC über die Sekretion in Membranvesikeln (z.B. Exosomen) bewerkstelligt [264]. Hinsichtlich der *in vivo*-Relevanz des beschriebenen Abfangeffekts könnte eine Wiederholung der Experimente mit Tumorexosomen aus den Seren von Brustkrebspatientinnen mit Her2-positivem bzw. Her2-negativem Mammakarzinom genauere Informationen liefern. Die nötigen Methoden zur Isolation der Exosomen aus dem Serum wurden in dieser Arbeit bereits etabliert. Dabei wäre auch interessant, ob das im Serum nachweisbare Her2 tatsächlich an Exosomen gebunden vorliegt. Dies muss nicht zwingend der Fall sein. Es wurde z.B. gezeigt, dass die in Zellkulturüberständen vorhandenen "löslichen" HLA-Moleküle hauptsächlich auf Exosomen zu finden sind, während in Körperflüssigkeiten zirkulierende HLA-Moleküle nicht mit Exosomen assoziiert sind, sondern mittels Proteasen von der Zelloberfläche abgespalten werden [265]. Auch „lösliches“ Her2 ist im Serum von Tumorpatienten zu finden und wird als diagnostischer Marker für die Tumorthherapie eingesetzt [249, 266]. Dabei wird die extrazelluläre Domäne mittels Proteasen von der Membrandomäne abgespalten [240]. Ob die extrazelluläre Domäne von Her2, oder Her2 auf Exosomen den Hauptanteil im Serum einnimmt, bleibt abzuklären. Es ist denkbar, dass die

abgespaltene extrazelluläre Domänen von Membranproteinen einen ähnlichen Effekt wie exosomale Proteine bewirken.



**Abbildung 4: Exosomen-abhängige Immunevasionsmechanismen.**

Tumorzellen sezernieren Exosomen, die auf verschiedene Weisen mit Komponenten des Immunsystems interagieren. TGF $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* ) auf Tumorexosomen stimuliert die Regulatorfunktion von regulatorischen T-Zellen (CD4 $^{+}$ reg) über den TGF $\beta$ -Rezeptor (TGF $\beta$ R). Die Zerstörung von T-Zellen wird bei CD4 $^{+}$  T-Zellen über Galectin 9 auf Exosomen über den Rezeptor TIM3 bzw. bei CD8 $^{+}$  T-Zellen über Fas-Ligand (FasL) auf Exosomen über Fas vermittelt. Tumorexosomen inhibieren die zytotoxische Aktivität von CD8 $^{+}$  T-Zellen (CD8 $^{+}$ ) und NK-Zellen (NK). Im Fall der NK-Zellen ist die Interaktion von NKG2D (*NK group 2, member D*) mit dem exosomal NKG2D-Ligand (NKG2DL) für diesen Effekt verantwortlich. Auch die Differenzierung von Monozyten (M) in Dendritische Zellen (DC) wird zugunsten der Entwicklung eines suppressiven Monozytenphänotyps (M CD14 $^{+}$  HLA-DR $^{low}$ ) durch Tumorexosomen inhibiert. Tumorantigene auf Tumorexosomen binden tumorspezifische Antikörper und verhindern dadurch die Bindung der Antikörper an Tumorzellen. Antikörperabhängige Effektormechanismen (ADCC), die die Tumorzelle zerstören, können somit nicht stattfinden. (modifiziert nach Thery 2009 [120])

Nicht nur die Antikörper-abhängige Immunantwort, sondern auch die T-Zell-abhängige Immunantwort könnte durch exosomale Tumorantigene beeinträchtigt werden. Ein eindeutiger Beweis für die Blockierung der T-Zellantwort durch exosomale Antigene konnte in dieser Arbeit nicht geliefert werden, da kein klarer Blockierungseffekt durch Exosomen beobachtet wurde (Abb. 3.23). Die genaue Aufklärung des Sachverhalts benötigt eine Erhöhung der Zahl an Einzelexperimenten, was im Rahmen dieser Arbeit aufgrund limitierter T-Zellzahlen nicht mehr möglich war. Eine detaillierte Analyse des Effekts unterschiedlicher Exosomenkonzentrationen könnte außerdem Klarheit verschaffen, ob der Effekt dosisabhängig ist, da bei 10 µg Exosomen und 40 µg Exosomen aus Mel624.38-Exosomen gegenteilige Beobachtungen gemacht wurden. Es hat sich jedoch gezeigt, dass die T-Zellaktivität von Tumorexosomen unabhängig von dem entsprechenden Antigen beeinträchtigt wurde (Abb. 3.25). Theoretisch könnte bei den Tumorexosomen mit Antigen auch ein additiver Effekt aus Antigen-abhängigen und Antigen-unabhängigen Mechanismen bestehen. Um das abzuklären, müssten die Effekte von Exosomen aus der gleichen Zelllinie ohne und mit dem entsprechenden Antigen verglichen werden. Verschiedene Antigen-unabhängige Mechanismen zur Unterdrückung der Immunantwort durch Tumorexosomen wurden bereits beschrieben und trugen sicherlich auch zu den in dieser Arbeit beobachteten Effekten bei [174, 192, 193, 199-205]. Die beobachtete Abnahme der CD3-Oberflächenexpression wurde bereits in ähnlicher Form für Jurkat-Zellen (T-Zellleukämie) beschrieben (Abb 3.23). Taylor et al. zeigten die FasL-vermittelte Apoptose und Verringerung der Gesamtexpression von CD3- $\zeta$  in Jurkat-T-Zellen nach viertägiger Behandlung mit Exosomen aus Seren von Patientinnen mit Ovarialkarzinom [267]. CD3- $\zeta$  ist verantwortlich für die Transduktion von Aktivierungssignalen bei Antigenbindung an den T-Zellrezeptor. In Tumorpatienten wurde gezeigt, dass der Verlust von CD3- $\zeta$  zu einer verringerten T-Zellantwort führt [268, 269]. Der Verlust von CD3- $\zeta$  und die Apoptoseinduktion durch FasL ist jedoch nur bei aktivierten T-Zellen zu beobachten [270]. Zwar wurde durch Behandlung von T-Zellen mit Tumorexosomen keine Aktivierung im Vergleich zu unbehandelten T-Zellen beobachtet (Abb. 3.26), es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die T-Zellen durch die Kultivierung mit *Feeder*-Zellen bereits voraktiviert waren. Es ist auch denkbar, dass die Effektivität der T-Zellantwort unabhängig von der Vitalität der T-Zellen durch Tumorexosomen beeinflusst wird. Liu et al. zeigten, dass

Tumorexosomen die Perforinfreisetzung von IL-2-stimulierten NK-Zellen durch Inhibition von Jak3-abhängigen Signalwegen verhinderten [199]. Ein ähnlicher Mechanismus käme auch für T-Zellen in Frage, da diese ebenfalls Zielzellen über die Freisetzung von Perforin eliminieren. Welche Moleküle letztendlich für die Hemmung der T-Zellantwort verantwortlich sind, bleibt ebenfalls zu klären. Inhibitorische Effekte wurden bereits mit der Anwesenheit von FasL, Galectin-9 und TRAIL auf Tumorexosomen assoziiert [192, 201]. Dabei ist nicht ausgeschlossen, dass auch andere immunsuppressive Moleküle, wie z.B. PD-L1, beteiligt sind [271].

Die bisher beschriebenen Einflüsse von Tumorexosomen auf die Immunantwort basieren hauptsächlich auf Beobachtung aus *in vitro* Experimenten. Dabei wurden fast ausschließlich Effekte auf einzelne Zellpopulationen untersucht. Neben den unmittelbaren Einflüssen von Tumorexosomen auf Effektorzellen (T-Zellen, NK-Zellen) werden auch Regulatorzellen (regulatorische Zellen, MDSCs), die eine mögliche Immunantwort unterdrücken können, aktiviert. Dies gibt bereits einen Hinweis auf die *in vivo* Situation, bei der ein komplexes Netzwerk aus verschiedenen Zelltypen und löslichen Molekülen besteht. Aufgrund der vielschichtigen Zusammenhänge ist es schwer vorherzusagen, welche Auswirkungen Tumorexosomen letztendlich auf die Immunevasion von Tumoren besitzen. Abhängig von der Ausgangssituation können sich die oben beschriebenen Effekte addieren und zu einer sehr effizienten Hemmung des Immunsystems führen. Andererseits kann durch die Interaktion von Tumorexosomen mit APCs (Antigen-präsentierende Zellen) auch eine tumorspezifische Immunantwort stimuliert werden. Entscheidend scheint dabei die spezifische Zusammensetzung der Exosomen zu sein. Durch die Induktion von Stress im Tumor kann die Immunogenität von Tumorexosomen aufgrund verstärkter Expression kostimulatorischer Moleküle erhöht werden [194-198]. Auch ist unklar, ob die Zusammensetzung von Exosomen, die aus dem Kulturüberstand von Tumorzelllinien gewonnen werden, den Exosomen aus den Körperflüssigkeiten von Tumorpatienten entsprechen [265]. Die Zusammensetzung von Exosomen aus Kulturüberständen ist weitestgehend konstant. Bei Exosomen aus Körperflüssigkeiten ist dagegen anzunehmen, dass sich die Zusammensetzung im Laufe der Tumorentwicklung verändert. So könnten die Tumorexosomen, abhängig vom Tumorstatus, stark unterschiedliche Effekte auf das Immunsystem ausüben. Zusätzlich ist unklar, inwiefern die *in vitro* eingesetzten

Exosomenkonzentrationen und Zellzahlen der tatsächlichen Situation *in vivo* entsprechen. Aufgrund von Diffusionseffekten kann die Konzentration von Tumorexosomen, mit denen Immunzellen konfrontiert werden, variieren. Wenn man bedenkt, dass manche Effekte von Tumorexosomen dosisabhängig sein können (siehe 10 µg vs 40 µg Mel624.38-Exosomen in Abb. 3.23), kann die lokale Tumorexosomenkonzentration *in vivo* über den Einfluss auf das Immunsystem entscheiden. Auch sind *in vivo* eher Langezeiteffekte zu erwarten, während man *in vitro* nur Kurzzeitexperimente durchführen kann.

### **4.3 Bedeutung der Ergebnisse hinsichtlich der Immuntherapie von Tumoren**

Mit Hilfe des in dieser Arbeit etablierten Verfahrens zu Gewinnung von Antikörpern gegen exosomale Tumorantigene ist es möglich, neue Zielantigene für die Tumorthherapie und die Tumordiagnostik zu identifizieren. Besonders in der Tumordiagnostik kann es von Vorteil sein, Antikörper gegen exosomale Tumorantigene zu besitzen, denn mit deren Hilfe ist es theoretisch möglich, ein einfaches Verfahren für diagnostische und prognostische Zwecke zu etablieren. Der besondere Vorteil von Exosomen als diagnostische Zielstruktur gegenüber löslichen Proteinen, die bisher als diagnostische Marker eingesetzt werden, ist, dass aufgrund ihrer komplexen Zusammensetzung gleichzeitig eine Vielzahl an Parametern analysiert werden kann. Neben verschiedenen Proteinen enthalten Tumorexosomen auch verschiedenen RNA-Spezies, die ebenfalls wichtige Informationen über den Krankheitsstatus liefern könnten [117, 253]. Es ist denkbar, dass durch den Einsatz von Tumorexosomen eine zunehmende Individualisierung von Tumortherapien ermöglicht wird. Durch die einfache Zugänglichkeit von Tumorexosomen kann in kurzer Zeit ein detailliertes Profil des Patienten erstellt und die Therapie entsprechend angepasst werden. Exosomenspezifische Antikörper würden dabei einen wichtigen Beitrag für die Isolation von Tumorexosomen und Charakterisierung des Tumorexosomenprofils leisten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein neuer Mechanismus der Immunsuppression durch Tumorexosomen beschrieben. Ob die Blockierung tumorspezifischer Antikörper durch Tumorexosomen einen Einfluss auf die Wirksamkeit von

Antikörpertherapien besitzt, ist jedoch unklar. In der Regel werden therapeutische Antikörper adjuvant (d.h. nach der Entfernung des Tumors) und in relativ hohen Konzentrationen angewandt [78]. Angesichts der vielschichtigen Wirkungsweise von Tumorexosomen kann die Effizienz einer Antikörpertherapie und auch anderer Immuntherapien durch Inhibition der Exosomensekretion bzw. durch Entfernen der Tumorexosomen verbessert werden. Die Freisetzung von Exosomen kann beispielsweise verringert werden durch die Anwendung von Medikamenten, die die Stabilität von Mikrotubuli stören und damit die Stabilität von Endosomen beeinträchtigen [272, 273]. Zu derartigen Medikamenten zählen unter anderem Taxane und Vinkaalkaloide. Auch durch Inhibitoren von vakuolären ATPasen kann die Prozessierung und damit Sekretion von Exosomen gestört werden [272, 274]. Bei der Kombination von therapeutischen Antikörpern mit Taxanen wird die Wirksamkeit synergistisch gesteigert [275, 276]. Es ist denkbar, dass der Erfolg dieser Kombinationstherapien auf die Inhibition der Tumorexosomensekretion und somit der Verhinderung der oben beschriebenen Effekte auf das Immunsystem zurückzuführen ist. Auch die Entfernung von Exosomen aus der Körperperipherie mittels Filtration ist eine mögliche Variante zur Reduktion der Exosomenlast [277]. Allerdings kann bei der Hemmung der Exosomensekretion bzw. beim Entfernen von Exosomen aus der Körperperipherie nicht ausgeschlossen werden, dass neben der Konzentration der Tumorexosomen auch die Konzentration von Exosomen aus anderen Zellarten, wie z.B. Immunzellen, dezimiert wird. Exosomen aus B-Zellen und Dendritischen Zellen bewirken eine Aktivierung von Effektorzellen [276-284]. Inwiefern diese Exosomen für eine effiziente Immuntherapie von Bedeutung sind, muss zunächst abgeklärt werden, um negative Auswirkungen auf die Immuntherapie durch die Verringerung der Exosomenzahl auszuschließen. Neben der Absenkung der Exosomenkonzentration existieren auch andere Mechanismen, die die Wirkungsweise von Tumorexosomen zugunsten einer Immuntherapie beeinflussen können. Bei der Anwendung von Curcumin kann die Zusammensetzung von Exosomen derart verändert werden, dass immunsuppressive Effekte aufgehoben werden [285]. Insbesondere zur Vermeidung der durch Tumorexosomen induzierten Apoptose von T-Zellen hat sich die immunotherapeutische Substanz IRX-2, eine Mischung aus verschiedenen Zytokinen, als wirksam erwiesen [286]. IRX-2 verhindert dabei die Inaktivierung von Akt, das eine besondere Bedeutung für das Überleben von T-Zellen besitzt, durch Tumorexosomen.



## 5. Zusammenfassung

Exosomen sind nanometergroße Membranvesikel, die unter Beteiligung endosomaler Strukturen von den meisten Zellarten sezerniert werden. Die exakte Bedeutung von Exosomen *in vivo* ist nicht vollständig geklärt. Sie scheinen, wie ursprünglich vermutet, zur Eliminierung überflüssiger Proteine ebenso zu dienen wie der interzellulären Kommunikation. Auch Tumorzellen sezernieren Exosomen, die einerseits die Immunantwort zu unterdrücken scheinen, andererseits aber Tumorantigene tragen, gegen die in Tumorpatienten spezifische T-Zellen und Antikörper vorhanden sind. Diese Kombination erscheint zunächst paradox, lässt sich aber durch die Hypothese erklären, dass Tumorexosomen tumorassoziierte Antigene tragen, um das Immunsystem von den Tumorzellen abzulenken und dadurch die Erkennung des Tumors selbst verhindern.

Diese Hypothese konnte im Rahmen dieser Arbeit gestützt werden. Es wurde zum ersten Mal demonstriert, wie durch exosomale Tumorantigene tumorspezifische Antikörper abgefangen werden und somit die antikörperabhängige Zerstörung von Tumorzellen *in vitro* verhindert wird. Ein eindeutiger Einfluss exosomaler Tumorantigene auf die Effizienz der T-Zell-abhängigen Immunantwort konnte dagegen nicht demonstriert werden. Stattdessen wurde ein bereits bekannter, Antigen-unabhängiger Effekt von Tumorexosomen auf die T-Zellantwort beobachtet, der die T-Zellantwort durch Verringerung der CD3-Oberflächenexpression auf T-Zellen beeinträchtigt.

Da Tumorexosomen, wie erwähnt, eine Vielfalt an tumorassoziierten Antigenen tragen, sollte es möglich sein, sie für die Identifizierung bisher unbekannter Tumorantigene, die essentiell für die Entwicklung neuer Therapieansätze sind, zu nutzen. Zu diesem Zweck wurde ein neuartiges Verfahren zur Gewinnung tumorspezifischer Antikörper durch die Immunisierung von Versuchstieren unter Verwendung von Tumorexosomen etabliert. Mit Hilfe dieses Verfahrens wurden mehrere tumorspezifische Antikörper generiert, die sich potentiell für den Einsatz in der Tumordiagnostik und der Tumorthherapie eignen.

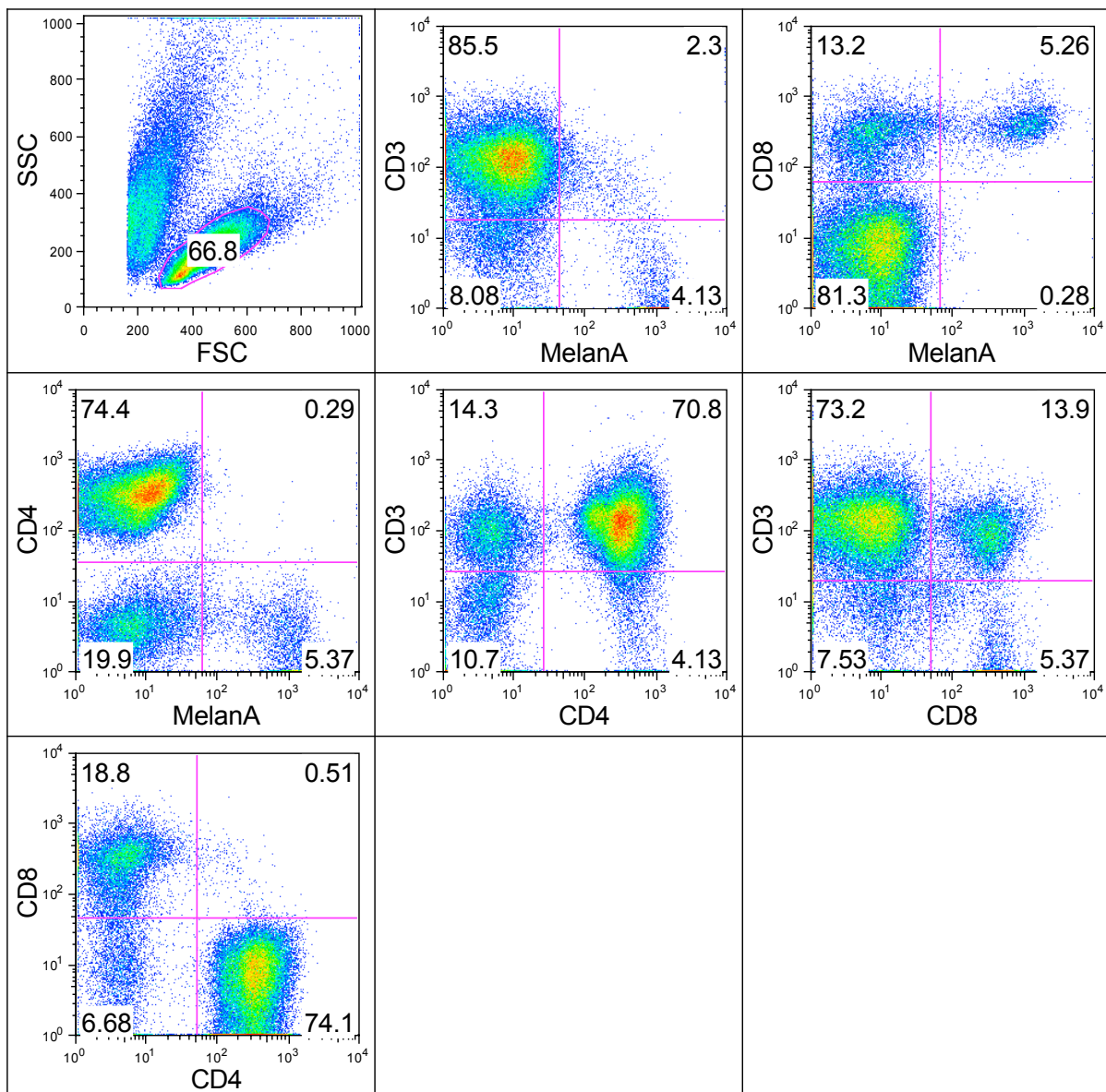
## 6. Abstract

Exosomes are nanometer-sized vesicles of endosomal origin secreted by almost all cell types. The *in vivo* role of these vesicles has not been elucidated so far. It seems that they are tools for the elimination of obsolete cellular proteins but are as well mediators of intercellular communication. Also tumor cells secrete exosomes, that on the one hand can be immunosuppressive and on the other hand contain tumor antigens. This combination seems paradox as a high number of antibodies and T cells specific for these tumor antigens are present in cancer patients. A hypothesis explaining this paradoxon is that tumors secrete large amounts of exosomes in order to distract tumor-reactive antibodies and T cell receptors thereby inhibiting their binding to the tumor itself.

During my doctoral thesis I obtained data, which for the first time, clearly support this hypothesis. It has been demonstrated, that exosomal tumor antigens intercept tumor specific antibodies, preventing them from binding to the tumor cell. As a functional consequence *in vitro* antibody dependent cytotoxicity is impaired by tumor exosomes in an antigen-dependent manner. In contrast, experiments on the influence of tumor exosomes on T-cell activity showed no evidence for an antigen-dependent T-cell receptor blocking. Apart from that, I could demonstrate that tumor exosomes downregulate CD3 on T cell surface in an antigen-independent manner, an effect, that has been described previously.

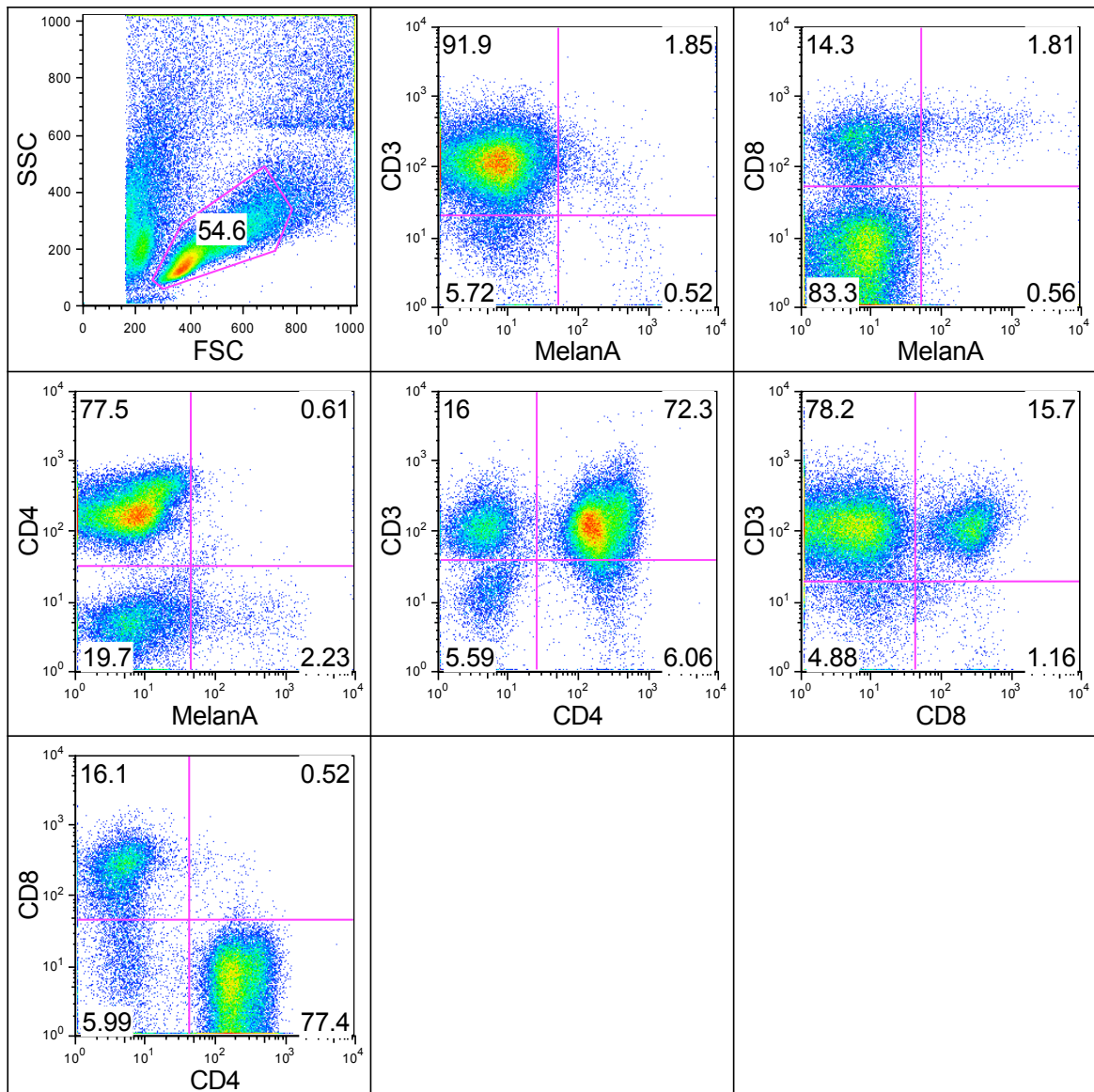
Due to their high content in surface tumor antigen, tumor exosomes should, in principle, be ideal tools for the identification of hitherto unknown tumor-associated antigens. For this purpose a novel technical procedure for target identification using tumor exosomes as a vaccine for laboratory animals has been established. This immunization gave rise to five monoclonal, tumorspecific antibodies. The results from descriptive and functional studies suggest an applicability for these generated antibodies in immunotherapy and tumordiagnosics.

## 7. Anhang



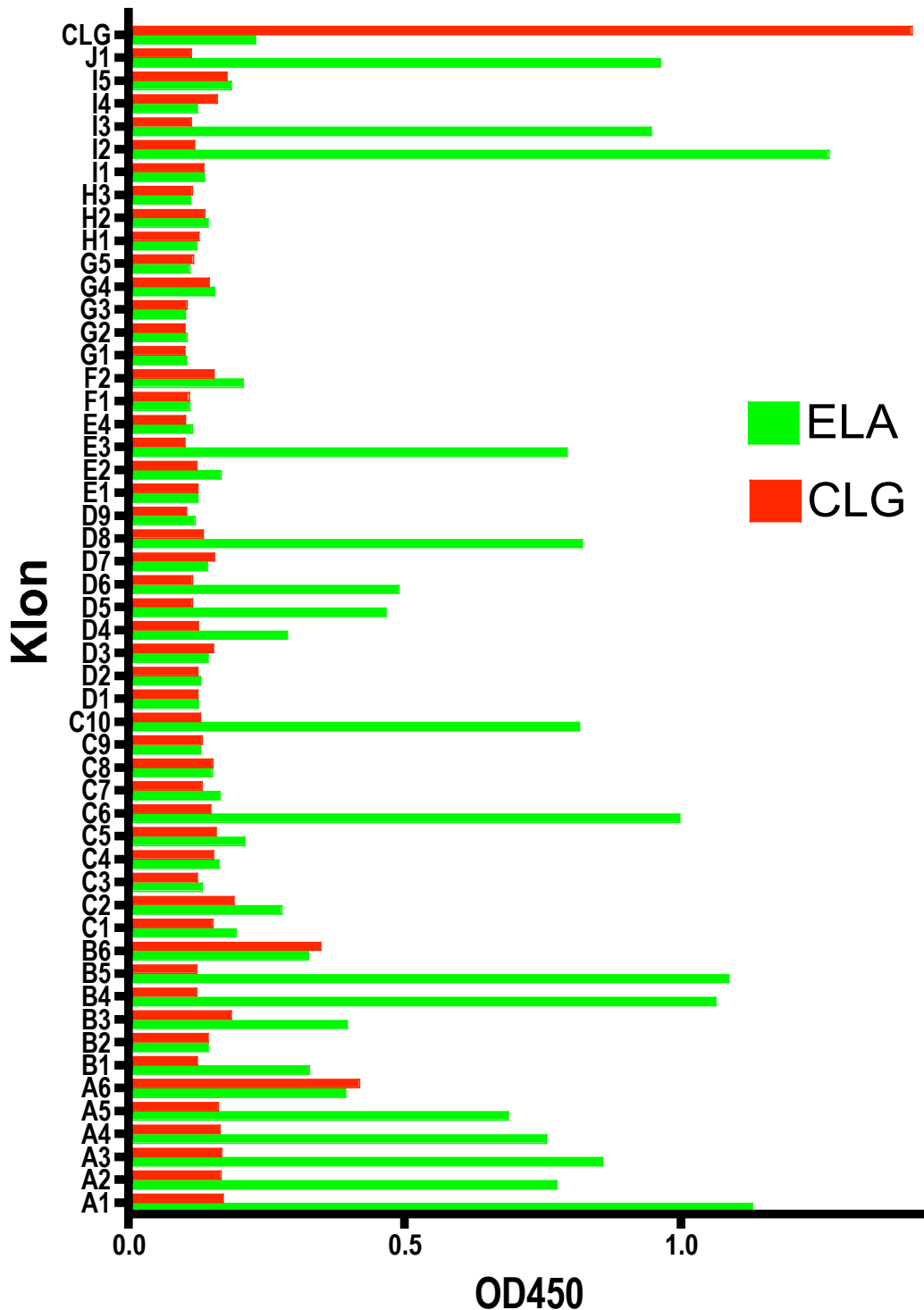
**Abbildung 7.1 T-Zellklonierung – Tag 23 nach BBL-Stimulation: Bestimmung der Häufigkeit der CD8<sup>+</sup> MelanA-spezifischen Zellen**

Die mit Peptid-beladenen BBL stimulierten PBMCs wurden an Tag 23 mit T-Zellspezifischen Markern CD3, CD4 und CD8 und dem MelanA-Pentamer gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Es ist zu erkennen, dass der Anteil der CD8<sup>+</sup> MelanA-spezifischen Zellen in der ausgewählten Population 5,26% beträgt.



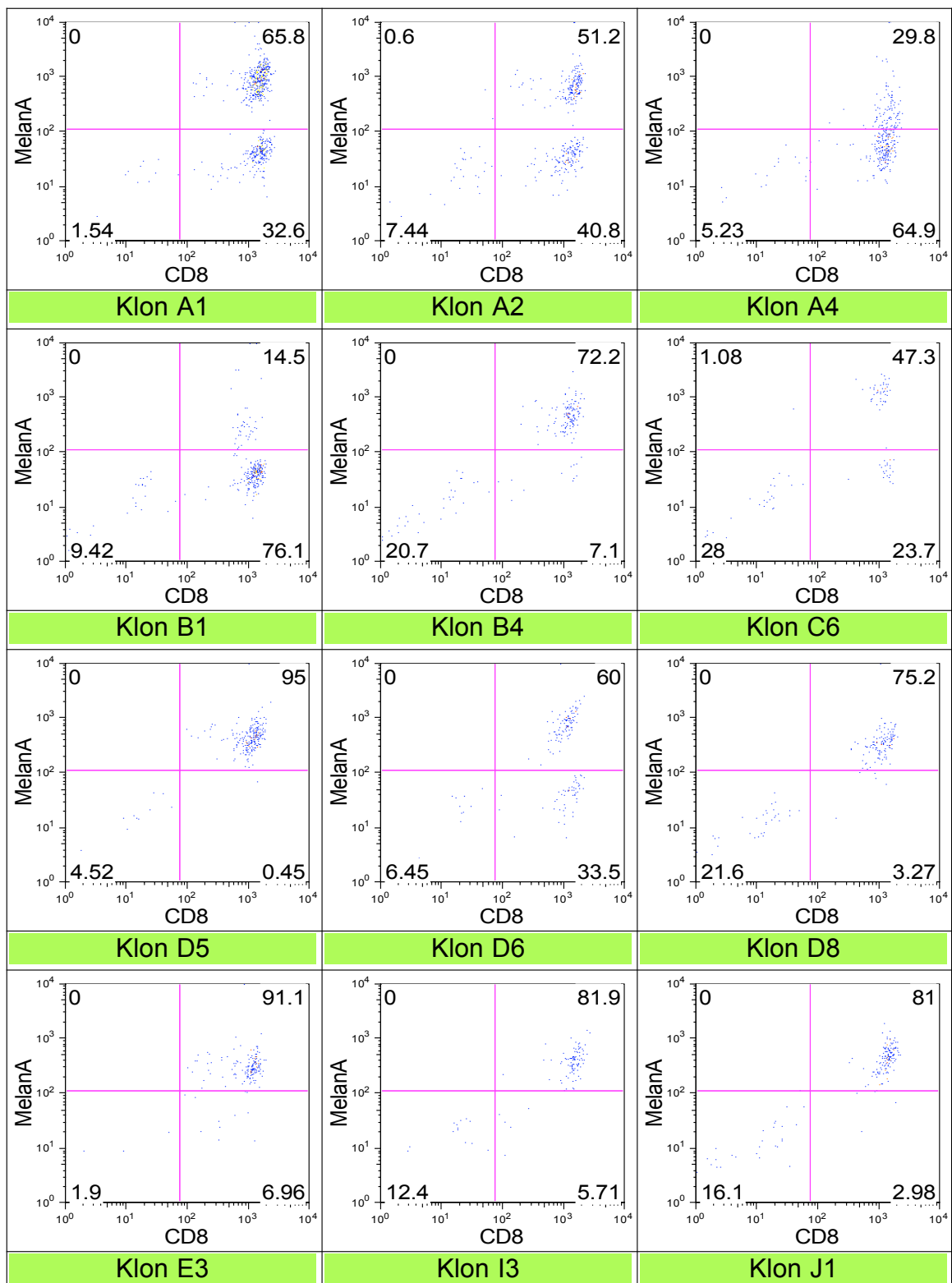
**Abbildung 7.2 T-Zellklonierung – Tag 23 nach direkter Peptid-Stimulation: Bestimmung der Häufigkeit der CD8<sup>+</sup> MelanA-spezifischen Zellen**

Die mit Peptid-beladenen BBL stimulierten PBMCs wurden an Tag 23 mit T-zellspezifischen Markern CD3, CD4 und CD8 und dem MelanA-Pentamer gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Es ist zu erkennen, dass der Anteil der CD8<sup>+</sup> MelanA-spezifischen Zellen in der ausgewählten Population 1,81% beträgt.



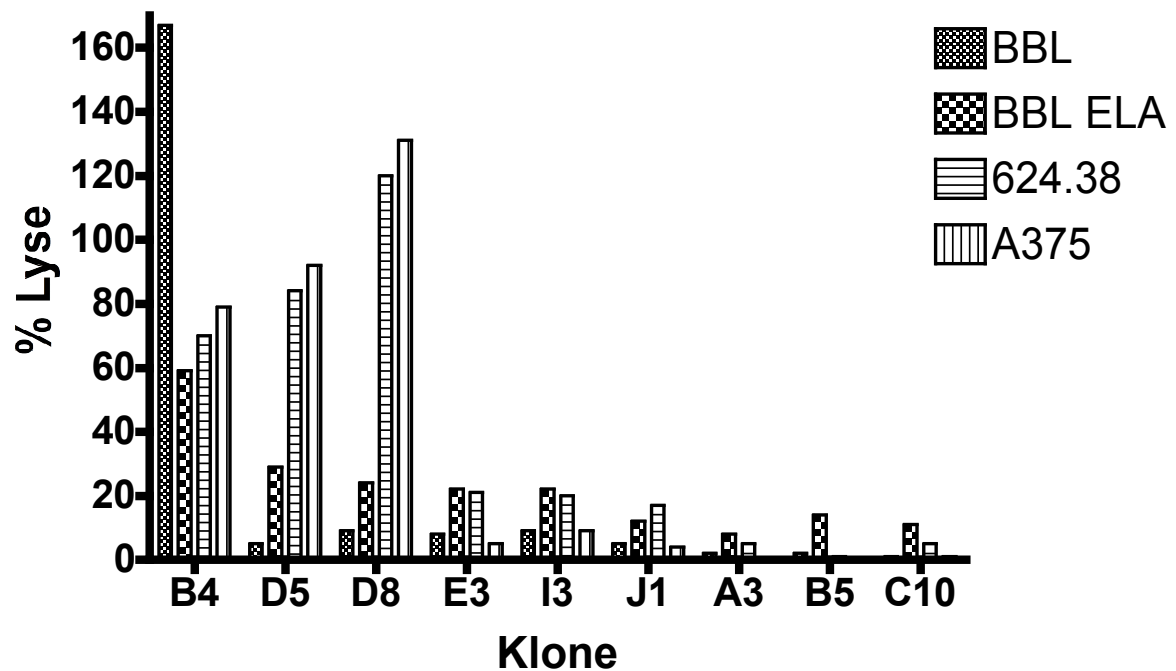
### Abbildung 7.3 T-Zellklonierung – Tag 24: IFN $\gamma$ -ELISA

Die T-Zellklone wurden mit peptidbeladenen BBL über Nacht inkubiert und anschließend der IFN $\gamma$ -Gehalt im Überstand mittels ELISA (OD450) gemessen. ELA diente als Peptid zum Nachweis MelanA-spezifischer Klone. Das Peptid CLG wurde eingesetzt, um zwischen spezifischen und unspezifischen Reaktionen der T-Zellklone auf die peptidbeladenen BBL zu unterscheiden. Klone, die auf ELA, aber nicht auf CLG mit einer IFN $\gamma$ -Antwort reagierten, wurden näher analysiert. Als Kontrolle für die Antwort auf CLG-beladene BBL dient ein CLG-spezifischer T-Zellklon (CLG).



**Abbildung 7.4 T-Zellklonierung: Testung der T-Zellklone auf CD8<sup>+</sup> MelanA-spezifischen Phänotyp**

Nach dem Klonierungsschritt wurden die Klonierungsansätze mit MelanA-Pentamer und CD8-Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Es sind alle Klonierungsansätze abgebildet, die CD8<sup>+</sup> MelanA-spezifische T-Zellen enthalten.



**Abbildung 7.5: T-Zellklonierung: Testung der T-Zellklone auf antigenspezifische zytotoxische Aktivität**

Die Calceinfreisetzung von Calcein-markierten Zielzellen ist ein Indikator für die lytische Aktivität von T-Zellen. Die T-Zellen sollten dabei nur mit Peptid-beladene B-Blasten (BBL ELA) und MelanA-positive Melanomzellen der Linie Mel624.38 (624.38), nicht jedoch unbeladene B-Blasten (BBL) und MelanA-negative Melanomzellen der Linien A375 (A375) lysieren. Das Verhältnis von Effektorzellen zu Zielzellen betrug 20:1.

## 8. Literaturverzeichnis

1. Ehrlich, P. Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung. Beiträge zur experimentellen Pathologie und Chemotherapie 112-164 (1909).
2. Burnet, F. M. The concept of immunological surveillance. Prog Exp Tumor Res 13, 1-27 (1970).
3. Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J. & Schreiber, R. D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. Nat Immunol 3, 991-8 (2002).
4. Fuchs, E. J. & Matzinger, P. Is cancer dangerous to the immune system? Semin Immunol 8, 271-80 (1996).
5. Chen, L. Immunological ignorance of silent antigens as an explanation of tumor evasion. Immunol Today 19, 27-30 (1998).
6. Sogn, J. A. Tumor immunology: the glass is half full. Immunity 9, 757-63 (1998).
7. Rocha, G., Deschenes, J. & Rowsey, J. J. The immunology of corneal graft rejection. Crit Rev Immunol 18, 305-25 (1998).
8. Ochsenbein, A. F. et al. Immune surveillance against a solid tumor fails because of immunological ignorance. Proc Natl Acad Sci U S A 96, 2233-8 (1999).
9. Ochsenbein, A. F. et al. Roles of tumour localization, second signals and cross priming in cytotoxic T-cell induction. Nature 411, 1058-64 (2001).
10. Whiteside, T. L. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. Oncogene 27, 5904-12 (2008).
11. Uyttenhove, C., Van Snick, J. & Boon, T. Immunogenic variants obtained by mutagenesis of mouse mastocytoma P815. I. Rejection by syngeneic mice. J Exp Med 152, 1175-83 (1980).
12. Urban, J. L., Holland, J. M., Kripke, M. L. & Schreiber, H. Immunoselection of tumor cell variants by mice suppressed with ultraviolet radiation. J Exp Med 156, 1025-41 (1982).
13. Kim, U., Baumler, A., Carruthers, C. & Bielat, K. Immunological escape mechanism in spontaneously metastasizing mammary tumors. Proc Natl Acad Sci U S A 72, 1012-6 (1975).
14. Stackpole, C. W., Cremona, P., Leonard, C. & Stremmel, P. Antigenic modulation as a mechanism for tumor escape from immune destruction: identification of modulation-positive and modulation-negative mouse



- lymphomas with xenoantisera to murine leukemia virus gp70. *J Immunol* 125, 1715-23 (1980).
15. Vasmel, W. L., Sijts, E. J., Leupers, C. J., Matthews, E. A. & Melief, C. J. Primary virus-induced lymphomas evade T cell immunity by failure to express viral antigens. *J Exp Med* 169, 1233-54 (1989).
  16. Maeurer, M. J. et al. Tumor escape from immune recognition: lethal recurrent melanoma in a patient associated with downregulation of the peptide transporter protein TAP-1 and loss of expression of the immunodominant MART-1/Melan-A antigen. *J Clin Invest* 98, 1633-41 (1996).
  17. Natali, P. G. et al. Selective changes in expression of HLA class I polymorphic determinants in human solid tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 6719-23 (1989).
  18. Blanchet, O. et al. Altered binding of regulatory factors to HLA class I enhancer sequence in human tumor cell lines lacking class I antigen expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 3488-92 (1992).
  19. Seung, S., Urban, J. L. & Schreiber, H. A tumor escape variant that has lost one major histocompatibility complex class I restriction element induces specific CD8<sup>+</sup> T cells to an antigen that no longer serves as a target. *J Exp Med* 178, 933-40 (1993).
  20. Bicknell, D. C., Rowan, A. & Bodmer, W. F. Beta 2-microglobulin gene mutations: a study of established colorectal cell lines and fresh tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4751-5 (1994).
  21. Garrido, F. et al. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today* 18, 89-95 (1997).
  22. Bosshart, H. & Jarrett, R. F. Deficient major histocompatibility complex class II antigen presentation in a subset of Hodgkin's disease tumor cells. *Blood* 92, 2252-9 (1998).
  23. Hicklin, D. J., Marincola, F. M. & Ferrone, S. HLA class I antigen downregulation in human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story. *Mol Med Today* 5, 178-86 (1999).
  24. Ishido, S. et al. Inhibition of natural killer cell-mediated cytotoxicity by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K5 protein. *Immunity* 13, 365-74 (2000).
  25. Restifo, N. P. et al. Identification of human cancers deficient in antigen processing. *J Exp Med* 177, 265-72 (1993).
  26. Rotem-Yehudar, R., Groettrup, M., Soza, A., Kloetzel, P. M. & Ehrlich, R. LMP-associated proteolytic activities and TAP-dependent peptide transport for class I MHC molecules are suppressed in cell lines transformed by the highly oncogenic adenovirus 12. *J Exp Med* 183, 499-514 (1996).

27. Seliger, B., Maeurer, M. J. & Ferrone, S. TAP off--tumors on. *Immunol Today* 18, 292-9 (1997).
28. Cromme, F. V. et al. Loss of transporter protein, encoded by the TAP-1 gene, is highly correlated with loss of HLA expression in cervical carcinomas. *J Exp Med* 179, 335-40 (1994).
29. Johnsen, A. K., Templeton, D. J., Sy, M. & Harding, C. V. Deficiency of transporter for antigen presentation (TAP) in tumor cells allows evasion of immune surveillance and increases tumorigenesis. *J Immunol* 163, 4224-31 (1999).
30. Farrell, H. E. et al. Inhibition of natural killer cells by a cytomegalovirus MHC class I homologue in vivo. *Nature* 386, 510-4 (1997).
31. Cretney, E. et al. m144, a murine cytomegalovirus (MCMV)-encoded major histocompatibility complex class I homologue, confers tumor resistance to natural killer cell-mediated rejection. *J Exp Med* 190, 435-44 (1999).
32. Ranges, G. E., Figari, I. S., Espevik, T. & Palladino, M. A., Jr. Inhibition of cytotoxic T cell development by transforming growth factor beta and reversal by recombinant tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 166, 991-8 (1987).
33. Torre-Amione, G. et al. A highly immunogenic tumor transfected with a murine transforming growth factor type beta 1 cDNA escapes immune surveillance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 1486-90 (1990).
34. Loeffler, C. M. et al. Immunoregulation in cancer-bearing hosts. Down-regulation of gene expression and cytotoxic function in CD8+ T cells. *J Immunol* 149, 949-56 (1992).
35. Tada, T. et al. Transforming growth factor-beta-induced inhibition of T cell function. Susceptibility difference in T cells of various phenotypes and functions and its relevance to immunosuppression in the tumor-bearing state. *J Immunol* 146, 1077-82 (1991).
36. Gorelik, L. & Flavell, R. A. Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells. *Nat Med* 7, 1118-22 (2001).
37. Pasche, B. Role of transforming growth factor beta in cancer. *J Cell Physiol* 186, 153-68 (2001).
38. Gabrilovich, D. I. et al. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med* 2, 1096-103 (1996).
39. Plescia, O. J., Smith, A. H. & Grinwich, K. Subversion of immune system by tumor cells and role of prostaglandins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 1848-51 (1975).

40. Young, M. R. & Knies, S. Prostaglandin E production by Lewis lung carcinoma: mechanism for tumor establishment in vivo. *J Natl Cancer Inst* 72, 919-22 (1984).
41. McLemore, T. L. et al. Profiles of prostaglandin biosynthesis in normal lung and tumor tissue from lung cancer patients. *Cancer Res* 48, 3140-7 (1988).
42. Sotomayor, E. M. et al. Role of tumor-derived cytokines on the immune system of mice bearing a mammary adenocarcinoma. II. Down-regulation of macrophage-mediated cytotoxicity by tumor-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol* 147, 2816-23 (1991).
43. Oghiso, Y., Yamada, Y., Ando, K., Ishihara, H. & Shibata, Y. Differential induction of prostaglandin E2-dependent and -independent immune suppressor cells by tumor-derived GM-CSF and M-CSF. *J Leukoc Biol* 53, 86-92 (1993).
44. Matsuda, M. et al. Interleukin 10 pretreatment protects target cells from tumor- and allo-specific cytotoxic T cells and downregulates HLA class I expression. *J Exp Med* 180, 2371-6 (1994).
45. Zeidler, R. et al. Tumor cell-derived prostaglandin E2 inhibits monocyte function by interfering with CCR5 and Mac-1. *Faseb J* 14, 661-8 (2000).
46. Martinez, F. O., Sica, A., Mantovani, A. & Locati, M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* 13, 453-61 (2008).
47. Antonia, S. J., Extermann, M. & Flavell, R. A. Immunologic nonresponsiveness to tumors. *Crit Rev Oncog* 9, 35-41 (1998).
48. Kiessling, R. et al. Tumor-induced immune dysfunction. *Cancer Immunol Immunother* 48, 353-62 (1999).
49. Willimsky, G. & Blankenstein, T. Sporadic immunogenic tumours avoid destruction by inducing T-cell tolerance. *Nature* 437, 141-6 (2005).
50. Chen, L. et al. Costimulation of antitumor immunity by the B7 counterreceptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4. *Cell* 71, 1093-102 (1992).
51. Guinan, E. C., Gribben, J. G., Boussiotis, V. A., Freeman, G. J. & Nadler, L. M. Pivotal role of the B7:CD28 pathway in transplantation tolerance and tumor immunity. *Blood* 84, 3261-82 (1994).
52. Becker, J. C., Brabletz, T., Czerny, C., Termeer, C. & Brocker, E. B. Tumor escape mechanisms from immunosurveillance: induction of unresponsiveness in a specific MHC-restricted CD4+ human T cell clone by the autologous MHC class II+ melanoma. *Int Immunol* 5, 1501-8 (1993).
53. Staveley-O'Carroll, K. et al. Induction of antigen-specific T cell anergy: An early event in the course of tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 1178-83 (1998).

54. Shrikant, P., Khoruts, A. & Mescher, M. F. CTLA-4 blockade reverses CD8+ T cell tolerance to tumor by a CD4+ T cell- and IL-2-dependent mechanism. *Immunity* 11, 483-93 (1999).
55. Takahashi, K., Ono, K., Hirabayashi, Y. & Taniguchi, M. Escape mechanisms of melanoma from immune system by soluble melanoma antigen. *J Immunol* 140, 3244-8 (1988).
56. Matsui, S. et al. A model for CD8+ CTL tumor immunosurveillance and regulation of tumor escape by CD4 T cells through an effect on quality of CTL. *J Immunol* 163, 184-93 (1999).
57. Sakaguchi, S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 101, 455-8 (2000).
58. Serafini, P., Borrello, I. & Bronte, V. Myeloid suppressor cells in cancer: recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression. *Semin Cancer Biol* 16, 53-65 (2006).
59. Ochoa, A. C., Zea, A. H., Hernandez, C. & Rodriguez, P. C. Arginase, prostaglandins, and myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 13, 721s-726s (2007).
60. Tsai, C. S. et al. Macrophages from irradiated tumors express higher levels of iNOS, arginase-I and COX-2, and promote tumor growth. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 68, 499-507 (2007).
61. Bogen, B. Peripheral T cell tolerance as a tumor escape mechanism: deletion of CD4+ T cells specific for a monoclonal immunoglobulin idiotype secreted by a plasmacytoma. *Eur J Immunol* 26, 2671-9 (1996).
62. Lauritzsen, G. F., Hofgaard, P. O., Schenck, K. & Bogen, B. Clonal deletion of thymocytes as a tumor escape mechanism. *Int J Cancer* 78, 216-22 (1998).
63. Kirchhoff, S., Muller, W. W., Krueger, A., Schmitz, I. & Krammer, P. H. TCR-mediated up-regulation of c-FLIPshort correlates with resistance toward CD95-mediated apoptosis by blocking death-inducing signaling complex activity. *J Immunol* 165, 6293-300 (2000).
64. Singer, G. G. & Abbas, A. K. The fas antigen is involved in peripheral but not thymic deletion of T lymphocytes in T cell receptor transgenic mice. *Immunity* 1, 365-71 (1994).
65. Brunner, T. et al. Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature* 373, 441-4 (1995).
66. Dhein, J., Walczak, H., Baumler, C., Debatin, K. M. & Krammer, P. H. Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature* 373, 438-41 (1995).

67. Li-Weber, M. et al. A regulatory element in the CD95 (APO-1/Fas) ligand promoter is essential for responsiveness to TCR-mediated activation. *Eur J Immunol* 28, 2373-83 (1998).
68. Nagata, S. Apoptosis by death factor. *Cell* 88, 355-65 (1997).
69. Ryan, A. E., Shanahan, F., O'Connell, J. & Houston, A. M. Addressing the "Fas counterattack" controversy: blocking fas ligand expression suppresses tumor immune evasion of colon cancer in vivo. *Cancer Res* 65, 9817-23 (2005).
70. Igney, F. H., Behrens, C. K. & Krammer, P. H. CD95L mediates tumor counterattack in vitro but induces neutrophil-independent tumor rejection in vivo. *Int J Cancer* 113, 78-87 (2005).
71. Das, T. et al. Renal cell carcinoma tumors induce T cell apoptosis through receptor-dependent and receptor-independent pathways. *J Immunol* 180, 4687-96 (2008).
72. Gastman, B. R., Johnson, D. E., Whiteside, T. L. & Rabinowich, H. Tumor-induced apoptosis of T lymphocytes: elucidation of intracellular apoptotic events. *Blood* 95, 2015-23 (2000).
73. Strater, J. et al. CD95 ligand (CD95L) immunohistochemistry: a critical study on 12 antibodies. *Cell Death Differ* 8, 273-8 (2001).
74. Chen, J. J., Sun, Y. & Nabel, G. J. Regulation of the proinflammatory effects of Fas ligand (CD95L). *Science* 282, 1714-7 (1998).
75. Miwa, K. et al. Caspase 1-independent IL-1beta release and inflammation induced by the apoptosis inducer Fas ligand. *Nat Med* 4, 1287-92 (1998).
76. Zhang, Y. et al. Fas signal promotes lung cancer growth by recruiting myeloid-derived suppressor cells via cancer cell-derived PGE2. *J Immunol* 182, 3801-8 (2009).
77. Igney, F. H. & Krammer, P. H. Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *J Leukoc Biol* 71, 907-20 (2002).
78. Carter, P., Smith, L. & Ryan, M. Identification and validation of cell surface antigens for antibody targeting in oncology. *Endocr Relat Cancer* 11, 659-87 (2004).
79. Simpson, A. J., Caballero, O. L., Jungbluth, A., Chen, Y. T. & Old, L. J. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat Rev Cancer* 5, 615-25 (2005).
80. Jager, D. & Knuth, A. Antibodies and vaccines--hope or illusion? *Breast* 14, 631-5 (2005).

81. Sato, N. et al. Molecular pathological approaches to human tumor immunology. *Pathol Int* 59, 205-17 (2009).
82. Weiner, L. M., Dhodapkar, M. V. & Ferrone, S. Monoclonal antibodies for cancer immunotherapy. *Lancet* 373, 1033-40 (2009).
83. Romond, E. H. et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 353, 1673-84 (2005).
84. Cobleigh, M. A. et al. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 17, 2639-48 (1999).
85. Slamon, D. J. et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344, 783-92 (2001).
86. Vogel, C. L. et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 20, 719-26 (2002).
87. Miller, R. A., Maloney, D. G., Warnke, R. & Levy, R. Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotypic antibody. *N Engl J Med* 306, 517-22 (1982).
88. Figlin, R. A. et al. ABX-EGF, a fully human anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) monoclonal antibody (mAb) in patients with advanced cancer: phas 1 clinical results. *Proceedings ASCO* 21, 35 Abstract (2002).
89. Hurwitz, H. et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 350, 2335-42 (2004).
90. Lundin, J. et al. Phase II trial of subcutaneous anti-CD52 monoclonal antibody alemtuzumab (Campath-1H) as first-line treatment for patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood* 100, 768-73 (2002).
91. Coiffier, B. Rituximab in combination with CHOP improves survival in elderly patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Semin Oncol* 29, 18-22 (2002).
92. Witzig, T. E. Efficacy and safety of 90Y ibritumomab tiuxetan (Zevalin) radioimmunotherapy for non-Hodgkin's lymphoma. *Semin Oncol* 30, 11-6 (2003).
93. Sievers, E. L. et al. Selective ablation of acute myeloid leukemia using antibody-targeted chemotherapy: a phase I study of an anti-CD33 calicheamicin immunoconjugate. *Blood* 93, 3678-84 (1999).

94. Sebastian, M. et al. Treatment of malignant pleural effusion with the trifunctional antibody catumaxomab (Removab) (anti-EpCAM x Anti-CD3): results of a phase 1/2 study. *J Immunother* 32, 195-202 (2009).
95. Steplewski, Z., Lubeck, M. D. & Koprowski, H. Human macrophages armed with murine immunoglobulin G2a antibodies to tumors destroy human cancer cells. *Science* 221, 865-7 (1983).
96. Clynes, R. A., Towers, T. L., Presta, L. G. & Ravetch, J. V. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 6, 443-6 (2000).
97. Heath, W. R. & Carbone, F. R. Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 19, 47-64 (2001).
98. Dhodapkar, K. M. & Dhodapkar, M. V. Recruiting dendritic cells to improve antibody therapy of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 6243-4 (2005).
99. Selenko, N. et al. Cross-priming of cytotoxic T cells promoted by apoptosis-inducing tumor cell reactive antibodies? *J Clin Immunol* 22, 124-30 (2002).
100. Banerjee, D. et al. Enhanced T-cell responses to glioma cells coated with the anti-EGF receptor antibody and targeted to activating FcγRs on human dendritic cells. *J Immunother* 31, 113-20 (2008).
101. Adams, G. P. & Weiner, L. M. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol* 23, 1147-57 (2005).
102. Yan, L., Hsu, K. & Beckman, R. A. Antibody-based therapy for solid tumors. *Cancer J* 14, 178-83 (2008).
103. Lien, S. & Lowman, H. B. Therapeutic anti-VEGF antibodies. *Handb Exp Pharmacol*, 131-50 (2008).
104. Carter, P. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat Rev Cancer* 1, 118-29 (2001).
105. Wang, X. B. et al. A new recombinant single chain trispecific antibody recruits T lymphocytes to kill CEA (carcinoma embryonic antigen) positive tumor cells in vitro efficiently. *J Biochem* 135, 555-65 (2004).
106. Jager, M., Schoberth, A., Ruf, P., Hess, J. & Lindhofer, H. The trifunctional antibody ertumaxomab destroys tumor cells that express low levels of human epidermal growth factor receptor 2. *Cancer Res* 69, 4270-6 (2009).
107. Zeidler, R. et al. The Fc-region of a new class of intact bispecific antibody mediates activation of accessory cells and NK cells and induces direct phagocytosis of tumour cells. *Br J Cancer* 83, 261-6 (2000).

108. Zeidler, R. et al. Simultaneous activation of T cells and accessory cells by a new class of intact bispecific antibody results in efficient tumor cell killing. *J Immunol* 163, 1246-52 (1999).
109. Trams, E. G., Lauter, C. J., Salem, N., Jr. & Heine, U. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim Biophys Acta* 645, 63-70 (1981).
110. Johnstone, R. M., Adam, M., Hammond, J. R., Orr, L. & Turbide, C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem* 262, 9412-20 (1987).
111. Thery, C., Zitvogel, L. & Amigorena, S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* 2, 569-79 (2002).
112. Andersen, M. H., Berglund, L., Rasmussen, J. T. & Petersen, T. E. Bovine PAS-6/7 binds alpha v beta 5 integrins and anionic phospholipids through two domains. *Biochemistry* 36, 5441-6 (1997).
113. Pisitkun, T., Shen, R. F. & Knepper, M. A. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 13368-73 (2004).
114. Caby, M. P., Lankar, D., Vincendeau-Scherrer, C., Raposo, G. & Bonnerot, C. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int Immunol* 17, 879-87 (2005).
115. Taylor, D. D., Akyol, S. & Gercel-Taylor, C. Pregnancy-associated exosomes and their modulation of T cell signaling. *J Immunol* 176, 1534-42 (2006).
116. Admyre, C. et al. Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. *J Immunol* 179, 1969-78 (2007).
117. Taylor, D. D. & Gercel-Taylor, C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 110, 13-21 (2008).
118. Thery, C., Ostrowski, M. & Segura, E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* (2009).
119. Mitchell, P., Petfalski, E., Shevchenko, A., Mann, M. & Tollervey, D. The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'-->5' exoribonucleases. *Cell* 91, 457-66 (1997).
120. Thery, C., Amigorena, S., Raposo, G. & Clayton, A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 3, Unit 3 22 (2006).
121. Heijnen, H. F., Schiel, A. E., Fijnheer, R., Geuze, H. J. & Sixma, J. J. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface



- shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood* 94, 3791-9 (1999).
122. Gasser, O. et al. Characterisation and properties of ectosomes released by human polymorphonuclear neutrophils. *Exp Cell Res* 285, 243-57 (2003).
123. Marzesco, A. M. et al. Release of extracellular membrane particles carrying the stem cell marker prominin-1 (CD133) from neural progenitors and other epithelial cells. *J Cell Sci* 118, 2849-58 (2005).
124. Hawari, F. I. et al. Release of full-length 55-kDa TNF receptor 1 in exosome-like vesicles: a mechanism for generation of soluble cytokine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 1297-302 (2004).
125. They, C. et al. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol* 166, 7309-18 (2001).
126. Chaput, N. et al. Exosome-based immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 53, 234-9 (2004).
127. Conde-Vancells, J. et al. Characterization and comprehensive proteome profiling of exosomes secreted by hepatocytes. *J Proteome Res* 7, 5157-66 (2008).
128. Harding, C., Heuser, J. & Stahl, P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol* 97, 329-39 (1983).
129. Pan, B. T., Teng, K., Wu, C., Adam, M. & Johnstone, R. M. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol* 101, 942-8 (1985).
130. Raposo, G. et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* 183, 1161-72 (1996).
131. van Niel, G., Porto-Carreiro, I., Simoes, S. & Raposo, G. Exosomes: a common pathway for a specialized function. *J Biochem* 140, 13-21 (2006).
132. Schorey, J. S. & Bhatnagar, S. Exosome Function: From Tumor Immunology to Pathogen Biology. *Traffic* (2008).
133. Wubbolts, R. et al. Opposing motor activities of dynein and kinesin determine retention and transport of MHC class II-containing compartments. *J Cell Sci* 112 (Pt 6), 785-95 (1999).
134. Reddy, A., Caler, E. V. & Andrews, N. W. Plasma membrane repair is mediated by Ca(2+)-regulated exocytosis of lysosomes. *Cell* 106, 157-69 (2001).

135. Savina, A., Vidal, M. & Colombo, M. I. The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rab11. *J Cell Sci* 115, 2505-15 (2002).
136. Savina, A., Furlan, M., Vidal, M. & Colombo, M. I. Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. *J Biol Chem* 278, 20083-90 (2003).
137. Faure, J. et al. Exosomes are released by cultured cortical neurones. *Mol Cell Neurosci* 31, 642-8 (2006).
138. Peters, P. J. et al. Molecules relevant for T cell-target cell interaction are present in cytolytic granules of human T lymphocytes. *Eur J Immunol* 19, 1469-75 (1989).
139. Raposo, G. et al. Accumulation of major histocompatibility complex class II molecules in mast cell secretory granules and their release upon degranulation. *Mol Biol Cell* 8, 2631-45 (1997).
140. Blanchard, N. et al. TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/zeta complex. *J Immunol* 168, 3235-41 (2002).
141. Rialland, P., Lankar, D., Raposo, G., Bonnerot, C. & Hubert, P. BCR-bound antigen is targeted to exosomes in human follicular lymphoma B-cells. *Biol Cell* 98, 491-501 (2006).
142. Muntasell, A., Berger, A. C. & Roche, P. A. T cell-induced secretion of MHC class II-peptide complexes on B cell exosomes. *Embo J* 26, 4263-72 (2007).
143. Arita, S. et al. B cell activation regulates exosomal HLA production. *Eur J Immunol* 38, 1423-34 (2008).
144. Saunderson, S. C. et al. Induction of exosome release in primary B cells stimulated via CD40 and the IL-4 receptor. *J Immunol* 180, 8146-52 (2008).
145. Zitvogel, L. et al. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med* 4, 594-600 (1998).
146. Bhatnagar, S. & Schorey, J. S. Exosomes released from infected macrophages contain *Mycobacterium avium* glycopeptidolipids and are proinflammatory. *J Biol Chem* 282, 25779-89 (2007).
147. Yu, X., Harris, S. L. & Levine, A. J. The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein. *Cancer Res* 66, 4795-801 (2006).
148. Lehmann, B. D. et al. Senescence-associated exosome release from human prostate cancer cells. *Cancer Res* 68, 7864-71 (2008).
149. Katzmann, D. J., Sarkar, S., Chu, T., Audhya, A. & Emr, S. D. Multivesicular body sorting: ubiquitin ligase Rsp5 is required for the modification and sorting of carboxypeptidase S. *Mol Biol Cell* 15, 468-80 (2004).

150. Buschow, S. I., Liefhebber, J. M., Wubbolts, R. & Stoorvogel, W. Exosomes contain ubiquitinated proteins. *Blood Cells Mol Dis* 35, 398-403 (2005).
151. Liu, Y. et al. COP9-associated CSN5 regulates exosomal protein deubiquitination and sorting. *Am J Pathol* 174, 1415-25 (2009).
152. Piper, R. C. & Katzmann, D. J. Biogenesis and function of multivesicular bodies. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23, 519-47 (2007).
153. Williams, R. L. & Urbe, S. The emerging shape of the ESCRT machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 355-68 (2007).
154. Hurley, J. H. ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies. *Curr Opin Cell Biol* 20, 4-11 (2008).
155. Vidal, M., Mangeat, P. & Hoekstra, D. Aggregation reroutes molecules from a recycling to a vesicle-mediated secretion pathway during reticulocyte maturation. *J Cell Sci* 110 (Pt 16), 1867-77 (1997).
156. Trajkovic, K. et al. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* 319, 1244-7 (2008).
157. Simons, M. & Raposo, G. Exosomes - vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol* (2009).
158. Fevrier, B. & Raposo, G. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr Opin Cell Biol* 16, 415-21 (2004).
159. Wubbolts, R. et al. Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. *J Biol Chem* 278, 10963-72 (2003).
160. Mears, R. et al. Proteomic analysis of melanoma-derived exosomes by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 4, 4019-31 (2004).
161. Futter, C. E. & White, I. J. Annexins and endocytosis. *Traffic* 8, 951-8 (2007).
162. Subra, C., Laulagnier, K., Perret, B. & Record, M. Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. *Biochimie* 89, 205-12 (2007).
163. Valadi, H. et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 9, 654-9 (2007).
164. Skog, J. et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* (2008).

165. Johnstone, R. M., Adam, M. & Pan, B. T. The fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro. *Can J Biochem Cell Biol* 62, 1246-54 (1984).
166. Johnstone, R. M. Exosomes biological significance: A concise review. *Blood Cells Mol Dis* 36, 315-21 (2006).
167. Vincent-Schneider, H. et al. Exosomes bearing HLA-DR1 molecules need dendritic cells to efficiently stimulate specific T cells. *Int Immunol* 14, 713-22 (2002).
168. Skokos, D. et al. Mast cell-dependent B and T lymphocyte activation is mediated by the secretion of immunologically active exosomes. *J Immunol* 166, 868-76 (2001).
169. Wolfers, J. et al. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med* 7, 297-303 (2001).
170. Andre, F. et al. Tumor-derived exosomes: a new source of tumor rejection antigens. *Vaccine* 20 Suppl 4, A28-31 (2002).
171. Walker, J. D., Maier, C. L. & Pober, J. S. Cytomegalovirus-infected human endothelial cells can stimulate allogeneic CD4+ memory T cells by releasing antigenic exosomes. *J Immunol* 182, 1548-59 (2009).
172. Dukers, D. F. et al. Direct immunosuppressive effects of EBV-encoded latent membrane protein 1. *J Immunol* 165, 663-70 (2000).
173. Monleon, I. et al. Differential secretion of Fas ligand- or APO2 ligand/TNF-related apoptosis-inducing ligand-carrying microvesicles during activation-induced death of human T cells. *J Immunol* 167, 6736-44 (2001).
174. Andreola, G. et al. Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *J Exp Med* 195, 1303-16 (2002).
175. Peche, H., Heslan, M., Usal, C., Amigorena, S. & Cuturi, M. C. Presentation of donor major histocompatibility complex antigens by bone marrow dendritic cell-derived exosomes modulates allograft rejection. *Transplantation* 76, 1503-10 (2003).
176. Kim, J. W. et al. Fas ligand-positive membranous vesicles isolated from sera of patients with oral cancer induce apoptosis of activated T lymphocytes. *Clin Cancer Res* 11, 1010-20 (2005).
177. Kim, S. H., Bianco, N. R., Shufesky, W. J., Morelli, A. E. & Robbins, P. D. Effective treatment of inflammatory disease models with exosomes derived from dendritic cells genetically modified to express IL-4. *J Immunol* 179, 2242-9 (2007).
178. Karlsson, M. et al. "Tolerosomes" are produced by intestinal epithelial cells. *Eur J Immunol* 31, 2892-900 (2001).

179. Van Niel, G. et al. Intestinal epithelial exosomes carry MHC class II/peptides able to inform the immune system in mice. *Gut* 52, 1690-7 (2003).
180. Pelchen-Matthews, A., Raposo, G. & Marsh, M. Endosomes, exosomes and Trojan viruses. *Trends Microbiol* 12, 310-6 (2004).
181. Porto-Carreiro, I., Fevrier, B., Paquet, S., Vilette, D. & Raposo, G. Prions and exosomes: from PrPc trafficking to PrPsc propagation. *Blood Cells Mol Dis* 35, 143-8 (2005).
182. Deneka, M., Pelchen-Matthews, A., Byland, R., Ruiz-Mateos, E. & Marsh, M. In macrophages, HIV-1 assembles into an intracellular plasma membrane domain containing the tetraspanins CD81, CD9, and CD53. *J Cell Biol* 177, 329-41 (2007).
183. Chen, B. J. & Lamb, R. A. Mechanisms for enveloped virus budding: can some viruses do without an ESCRT? *Virology* 372, 221-32 (2008).
184. Beatty, W. L., Ullrich, H. J. & Russell, D. G. Mycobacterial surface moieties are released from infected macrophages by a constitutive exocytic event. *Eur J Cell Biol* 80, 31-40 (2001).
185. Beatty, W. L. et al. Trafficking and release of mycobacterial lipids from infected macrophages. *Traffic* 1, 235-47 (2000).
186. Rhoades, E. et al. Identification and macrophage-activating activity of glycolipids released from intracellular *Mycobacterium bovis* BCG. *Mol Microbiol* 48, 875-88 (2003).
187. Almqvist, N., Lonnqvist, A., Hultkrantz, S., Rask, C. & Telemo, E. Serum-derived exosomes from antigen-fed mice prevent allergic sensitization in a model of allergic asthma. *Immunology* 125, 21-7 (2008).
188. Escudier, B. et al. Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial. *J Transl Med* 3, 10 (2005).
189. Morse, M. A. et al. A phase I study of dexosome immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Transl Med* 3, 9 (2005).
190. Dai, S. et al. Phase I clinical trial of autologous ascites-derived exosomes combined with GM-CSF for colorectal cancer. *Mol Ther* 16, 782-90 (2008).
191. Andre, F. et al. Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. *Lancet* 360, 295-305 (2002).
192. Huber, V. et al. Human colorectal cancer cells induce T-cell death through release of proapoptotic microvesicles: role in immune escape. *Gastroenterology* 128, 1796-804 (2005).

193. Valenti, R. et al. Human tumor-released microvesicles promote the differentiation of myeloid cells with transforming growth factor-beta-mediated suppressive activity on T lymphocytes. *Cancer Res* 66, 9290-8 (2006).
194. Dai, S. et al. More efficient induction of HLA-A\*0201-restricted and carcinoembryonic antigen (CEA)-specific CTL response by immunization with exosomes prepared from heat-stressed CEA-positive tumor cells. *Clin Cancer Res* 11, 7554-63 (2005).
195. Gastpar, R. et al. Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells. *Cancer Res* 65, 5238-47 (2005).
196. Bu, N., Li, Q. L., Feng, Q. & Sun, B. Z. Immune protection effect of exosomes against attack of L1210 tumor cells. *Leuk Lymphoma* 47, 913-8 (2006).
197. Vega, V. L. et al. Hsp70 translocates into the plasma membrane after stress and is released into the extracellular environment in a membrane-associated form that activates macrophages. *J Immunol* 180, 4299-307 (2008).
198. Cho, J. A., Lee, Y. S., Kim, S. H., Ko, J. K. & Kim, C. W. MHC independent anti-tumor immune responses induced by Hsp70-enriched exosomes generate tumor regression in murine models. *Cancer Lett* 275, 256-65 (2009).
199. Liu, C. et al. Murine mammary carcinoma exosomes promote tumor growth by suppression of NK cell function. *J Immunol* 176, 1375-85 (2006).
200. Klibi, J. et al. Blood diffusion and Th1-suppressive effects of galectin-9-containing exosomes released by Epstein-Barr virus-infected nasopharyngeal carcinoma cells. *Blood* 113, 1957-66 (2009).
201. Clayton, A., Mitchell, J. P., Court, J., Mason, M. D. & Tabi, Z. Human tumor-derived exosomes selectively impair lymphocyte responses to interleukin-2. *Cancer Res* 67, 7458-66 (2007).
202. Wang, G. J. et al. Thymus exosomes-like particles induce regulatory T cells. *J Immunol* 181, 5242-8 (2008).
203. Clayton, A. et al. Human tumor-derived exosomes down-modulate NKG2D expression. *J Immunol* 180, 7249-58 (2008).
204. Yu, S. et al. Tumor exosomes inhibit differentiation of bone marrow dendritic cells. *J Immunol* 178, 6867-75 (2007).
205. Xiang, X. et al. Induction of myeloid-derived suppressor cells by tumor exosomes. *Int J Cancer* 124, 2621-33 (2009).
206. Al-Nedawi, K. et al. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol* 10, 619-24 (2008).

207. Qu, J. L. et al. Gastric cancer exosomes promote tumour cell proliferation through PI3K/Akt and MAPK/ERK activation. *Dig Liver Dis* (2009).
208. Giard, D. J. et al. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 51, 1417-23 (1973).
209. Wiesner, M. et al. Conditional immortalization of human B cells by CD40 ligation. *PLoS ONE* 3, e1464 (2008).
210. Lasfargues, E. Y., Coutinho, W. G. & Redfield, E. S. Isolation of two human tumor epithelial cell lines from solid breast carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 61, 967-78 (1978).
211. Garrone, P. et al. Fas ligation induces apoptosis of CD40-activated human B lymphocytes. *J Exp Med* 182, 1265-73 (1995).
212. Weiss, A., Wiskocil, R. L. & Stobo, J. D. The role of T3 surface molecules in the activation of human T cells: a two-stimulus requirement for IL 2 production reflects events occurring at a pre-translational level. *J Immunol* 133, 123-8 (1984).
213. Earle, W.R., Changes induced in a strain of fibroblasts from a strain C3H mouse by the action of 20-methylcholanthrene. *J Natl Cancer Inst* 3, 555-8 (1943)
214. Rivoltini, L. et al. Quantitative correlation between HLA class I allele expression and recognition of melanoma cells by antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res* 55, 3149-57 (1995).
215. Billiau, A. et al. Human interferon: mass production in a newly established cell line, MG-63. *Antimicrob Agents Chemother* 12, 11-5 (1977).
216. Rabinowich, H., Vitolo, D., Altarac, S., Herberman, R. B. & Whiteside, T. L. Role of cytokines in the adoptive immunotherapy of an experimental model of human head and neck cancer by human IL-2-activated natural killer cells. *J Immunol* 149, 340-9 (1992).
217. Jaffee, E. M. et al. High efficiency gene transfer into primary human tumor explants without cell selection. *Cancer Res* 53, 2221-6 (1993).
218. Trempe, G. L. Human breast cancer in culture. *Recent Results Cancer Res*, 33-41 (1976).
219. Scotlandi, K. et al. Blockage of insulin-like growth factor-I receptor inhibits the growth of Ewing's sarcoma in athymic mice. *Cancer Res* 58, 4127-31 (1998).
220. Valmori, D. et al. Enhanced generation of specific tumor-reactive CTL in vitro by selected Melan-A/MART-1 immunodominant peptide analogues. *J Immunol* 160, 1750-8 (1998).

221. Wills, M. R. et al. The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL. *J Virol* 70, 7569-79 (1996).
222. Maeurer, M. J. et al. Improved detection of melanoma antigen-specific T cells expressing low or high levels of CD8 by HLA-A2 tetramers presenting a Melan-A/Mart-1 peptide analogue. *Int J Cancer* 97, 64-71 (2002).
223. Lee, S. P. et al. HLA A2.1-restricted cytotoxic T cells recognizing a range of Epstein-Barr virus isolates through a defined epitope in latent membrane protein LMP2. *J Virol* 67, 7428-35 (1993).
224. Boyum, A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 97, 7 (1968).
225. Van Veldhoven, P. P., Baumgart, E. & Mannaerts, G. P. Iodixanol (Optiprep), an improved density gradient medium for the iso-osmotic isolation of rat liver peroxisomes. *Anal Biochem* 237, 17-23 (1996).
226. de Gassart, A., Geminard, C., Fevrier, B., Raposo, G. & Vidal, M. Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. *Blood* 102, 4336-44 (2003).
227. Harder, T., Scheiffele, P., Verkade, P. & Simons, K. Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J Cell Biol* 141, 929-42 (1998).
228. Neri, S., Mariani, E., Meneghetti, A., Cattini, L. & Facchini, A. Calcein-acetyloxymethyl cytotoxicity assay: standardization of a method allowing additional analyses on recovered effector cells and supernatants. *Clin Diagn Lab Immunol* 8, 1131-5 (2001).
229. Garrett, J. T. et al. Novel engineered trastuzumab conformational epitopes demonstrate in vitro and in vivo antitumor properties against HER-2/neu. *J Immunol* 178, 7120-31 (2007).
230. Brinkmann, M., Lutkemeyer, D., Gudermann, F. & Lehmann, J. New technologies for automated cell counting based on optical image analysis; The Cellscreen'. *Cytotechnology* 38, 119-27 (2002).
231. Engvall, E. & Perlmann, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8, 871-4 (1971).
232. Alcaraz, C., De Diego, M., Pastor, M. J. & Escribano, J. M. Comparison of a radioimmunoprecipitation assay to immunoblotting and ELISA for detection of antibody to African swine fever virus. *J Vet Diagn Invest* 2, 191-6 (1990).
233. Updyke, T. V. & Nicolson, G. L. Immunoaffinity isolation of membrane antigens with biotinylated monoclonal antibodies and immobilized streptavidin matrices. *J Immunol Methods* 73, 83-95 (1984).



234. Schneider, C., Newman, R. A., Sutherland, D. R., Asser, U. & Greaves, M. F. A one-step purification of membrane proteins using a high efficiency immunomatrix. *J Biol Chem* 257, 10766-9 (1982).
235. Smith, P. K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76-85 (1985).
236. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5 (1970).
237. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4 (1979).
238. Fazekas de St Groth, S., Webster, R. G. & Datyner, A. Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. *Biochim Biophys Acta* 71, 377-91 (1963).
239. Kohler, G. & Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-7 (1975).
240. Pupa, S. M. et al. The extracellular domain of the c-erbB-2 oncoprotein is released from tumor cells by proteolytic cleavage. *Oncogene* 8, 2917-23 (1993).
241. Ross, J. S. et al. The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. *Oncologist* 8, 307-25 (2003).
242. Gold, P. & Freedman, S. O. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J Exp Med* 122, 467-81 (1965).
243. Druker, B. J. Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. *Blood* 112, 4808-17 (2008).
244. Gussow, D. & Seemann, G. Humanization of monoclonal antibodies. *Methods Enzymol* 203, 99-121 (1991).
245. Milenic, D. E. Monoclonal antibody-based therapy strategies: providing options for the cancer patient. *Curr Pharm Des* 8, 1749-64 (2002).
246. Presta, L. G. Engineering antibodies for therapy. *Curr Pharm Biotechnol* 3, 237-56 (2002).
247. Glennie, M. J. & van de Winkel, J. G. Renaissance of cancer therapeutic antibodies. *Drug Discov Today* 8, 503-10 (2003).
248. Ross, J. et al. Antibody-based therapeutics in oncology. *Expert Rev Anticancer Ther* 3, 107-21 (2003).
249. Marx, D. et al. Detection of p105 (c-erbB-2, HER2/neu) serum levels by a new ELISA in patients with ovarian carcinoma. *Anticancer Res* 18, 2891-4 (1998).

250. Wang, M. C., Valenzuela, L. A., Murphy, G. P. & Chu, T. M. Purification of a human prostate specific antigen. *Invest Urol* 17, 159-63 (1979).
251. Berek, J. S., Schultes, B. C. & Nicodemus, C. F. Biologic and immunologic therapies for ovarian cancer. *J Clin Oncol* 21, 168s-174s (2003).
252. Koga, K. et al. Purification, characterization and biological significance of tumor-derived exosomes. *Anticancer Res* 25, 3703-7 (2005).
253. Nilsson, J. et al. Prostate cancer-derived urine exosomes: a novel approach to biomarkers for prostate cancer. *Br J Cancer* 100, 1603-7 (2009).
254. Parmley, S. F. & Smith, G. P. Filamentous fusion phage cloning vectors for the study of epitopes and design of vaccines. *Adv Exp Med Biol* 251, 215-8 (1989).
255. Clackson, T., Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. D. & Winter, G. Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* 352, 624-8 (1991).
256. Marks, J. D. et al. By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol* 222, 581-97 (1991).
257. Badger, C. C., Anasetti, C., Davis, J. & Bernstein, I. D. Treatment of malignancy with unmodified antibody. *Pathol Immunopathol Res* 6, 419-34 (1987).
258. Khazaeli, M. B., Conry, R. M. & LoBuglio, A. F. Human immune response to monoclonal antibodies. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 15, 42-52 (1994).
259. Lee, J., Fenton, B. M., Koch, C. J., Frelinger, J. G. & Lord, E. M. Interleukin 2 expression by tumor cells alters both the immune response and the tumor microenvironment. *Cancer Res* 58, 1478-85 (1998).
260. Schlichtholz, B. et al. The immune response to p53 in breast cancer patients is directed against immunodominant epitopes unrelated to the mutational hot spot. *Cancer Res* 52, 6380-4 (1992).
261. Chen, Y. T. et al. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 1914-8 (1997).
262. Muller-Eberhard, H. J. The membrane attack complex of complement. *Annu Rev Immunol* 4, 503-28 (1986).
263. Liu, X.Y., Pop, L.M. & Vitetta, E.S. Engineering therapeutic monoclonal antibodies. *Immunol Rev* 222, 9-27 (2008)
264. Pilzer, D. Emission of membrane vesicles: roles in complement resistance, immunity and cancer. *Springer Semin Immunopathol* 27, 375-87 (2005)

265. MacKay, P. A. et al. Circulating, soluble forms of major histocompatibility complex antigens are not exosome-associated. *Eur J Immunol* 36, 2875-84 (2006).
266. Kushlinskii, N. E. et al. Soluble fragment of HER2/neu receptor in the serum of patients with breast cancer with different levels of this protein expression in the tumor. *Bull Exp Biol Med* 143, 449-51 (2007).
267. Taylor, D.D. et al. T-cell apoptosis and suppression of T-cell receptor/CD3-zeta by Fas ligand-containing membrane vesicles shed from ovarian tumors. *Clin Cancer Res* 9, 5113-9 (2003).
268. Lai, P. et al. Alterations in expression and function of signal-transducing proteins in tumor-associated T and natural killer cells in patients with ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 2, 161-73 (1996).
269. Rabinowich, H. et al. Expression and activity of signaling molecules in T lymphocytes obtained from patients with metastatic melanoma before and after interleukin 2 therapy. *Clin Cancer Res* 2, 1263-74 (1996).
270. She, J., Matsui, K., Terhorst, C. & Ju, S. T. Activation-induced apoptosis of mature T cells is dependent upon the level of surface TCR but not on the presence of the CD3 zeta ITAM. *Int Immunol* 10, 1733-40 (1998).
271. Sabapatha, A., Gercel-Taylor, C. & Taylor, D. D. Specific isolation of placenta-derived exosomes from the circulation of pregnant women and their immunoregulatory consequences. *Am J Reprod Immunol* 56, 345-55 (2006).
272. Huber, V., Filipazzi, P., Iero, M., Fais, S. & Rivoltini, L. More insights into the immunosuppressive potential of tumor exosomes. *J Transl Med* 6, 63 (2008).
273. Groth-Pedersen, L., Ostenfeld, M. S., Hoyer-Hansen, M., Nylandsted, J. & Jaattela, M. Vincristine induces dramatic lysosomal changes and sensitizes cancer cells to lysosome-destabilizing siramesine. *Cancer Res* 67, 2217-25 (2007).
274. Luciani, F. et al. Effect of proton pump inhibitor pretreatment on resistance of solid tumors to cytotoxic drugs. *J Natl Cancer Inst* 96, 1702-13 (2004).
275. Baselga, J. et al. Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin™) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Res* 58, 2825-31 (1998)
276. Pegram, M. et al. Inhibitory effects of combinations of HER2/neu antibody and chemotherapeutic agents used for treatment of human breast cancers. *Oncogene* 18, 2241-51 (1999)
277. Ichim, T. E. et al. Exosomes as a tumor immune escape mechanism: possible therapeutic implications. *J Transl Med* 6, 37 (2008).

278. Luketic, L. et al. Antigen presentation by exosomes released from peptide-pulsed dendritic cells is not suppressed by the presence of active CTL. *J Immunol* 179, 5024-32 (2007).
279. Admyre, C., Johansson, S. M., Paulie, S. & Gabrielsson, S. Direct exosome stimulation of peripheral human T cells detected by ELISPOT. *Eur J Immunol* 36, 1772-81 (2006).
280. Utsugi-Kobukai, S., Fujimaki, H., Hotta, C., Nakazawa, M. & Minami, M. MHC class I-mediated exogenous antigen presentation by exosomes secreted from immature and mature bone marrow derived dendritic cells. *Immunol Lett* 89, 125-31 (2003).
281. Hsu, D. H. et al. Exosomes as a tumor vaccine: enhancing potency through direct loading of antigenic peptides. *J Immunother* 26, 440-50 (2003).
282. Chaput, N. et al. Exosomes as potent cell-free peptide-based vaccine. II. Exosomes in CpG adjuvants efficiently prime naive Tc1 lymphocytes leading to tumor rejection. *J Immunol* 172, 2137-46 (2004).
283. They, C. et al. Indirect activation of naive CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat Immunol* 3, 1156-62 (2002).
284. Bedford, P., Garner, K. & Knight, S. C. MHC class II molecules transferred between allogeneic dendritic cells stimulate primary mixed leukocyte reactions. *Int Immunol* 11, 1739-44 (1999).
285. Zhang, H. G. et al. Curcumin reverses breast tumor exosomes mediated immune suppression of NK cell tumor cytotoxicity. *Biochim Biophys Acta* 1773, 1116-23 (2007).
286. Czystowska, M. et al. IRX-2, a novel immunotherapeutic, protects human T cells from tumor-induced cell death. *Cell Death Differ* (2009).

## 9. Abkürzungsverzeichnis

<b>A</b>	Ampère
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>ABC</b>	Avidin-Biotin-Komplex (avidin biotin complex)
<b>ADCC</b>	<i>antibody dependent cellular cytotoxicity</i> (Antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität)
<b>AEC</b>	3-Amino-9-Ethylcarbazol
<b>AICD</b>	<i>activation induced cell death</i> (Aktivierungs-induzierter Zelltod)
<b>AM</b>	Acetoxymethylgruppe
<b>ALP</b>	alkalische Phosphatase
<b>APC</b>	Allophycocyanin; <i>antigen presenting cell</i> (antigenpräsentierende Zelle)
<b>APS</b>	Ammoniumpersulfat
<b>BBL</b>	B-Blasten
<b>BCA</b>	<i>bicinchoninic acid</i> (Bicinchoninsäure)
<b>bp</b>	Basenpaar
<b>BSA</b>	bovines Serumalbumin
<b>BTBST</b>	TBST mit BSA
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>ca.</b>	<i>circa</i>
<b>cDNA</b>	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
<b>CD</b>	<i>cluster of differentiation</i> (Oberflächenmarker)
<b>CD40L</b>	CD40-Ligand
<b>CEA</b>	<i>carcinoembryonic antigen</i> (Karzinoembryonales Antigen)
<b>CLG</b>	CLGLLTMV (Peptid aus EBV LMP2)
<b>CMV</b>	Cytomegalovirus
<b>CPG</b>	Cytosinphosphatylguanidin
<b>CR1</b>	<i>complement receptor 1</i> (Komplementrezeptor 1)
<b>CTA</b>	<i>cancer/testis antigen</i> (Tumor/Testis Antigen)
<b>CTB</b>	Choleratoxin Untereinheit B
<b>Cy</b>	Cyanin
<b>Da</b>	Dalton (Proteingrößeneinheit)
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidino-2-phenylindol
<b>DC</b>	<i>dendritic cell</i> (Dendritische Zelle)
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>DMP</b>	Dimethylpimelimidat
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
<b>dr</b>	Drüsen
<b>dt</b>	disseminierte Tumorzellen
<b>DTT</b>	Dithiotreitol
<b>EBV</b>	Epstein-Barr Virus
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>EGF</b>	<i>epidermal growth factor</i> (epidermaler Wachstumsfaktor)

<b>ELA</b>	ELAGIGILTV (Peptid aus MelanA)
<b>ELISA</b>	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i> (Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)
<b>EM</b>	Elektronenmikroskopie
<b>EpCAM</b>	<i>epithelial cell adhesion molecule</i> (epitheliales Zelladhäsionsmolekül)
<b>ERK</b>	<i>extracellular signal regulated kinase</i> (Kinase, die über extrazelluläres Signal reguliert wird)
<b>ESCRT</b>	<i>endosomal sorting complex required for transport</i> (Endosomaler Komplex zur Sortierung in Transportvesikel)
<b>ESI</b>	Elektronensprayionisierung
<b>esRNA</b>	<i>exosomal shuttle RNA</i> (durch Exosomen übertragene RNA)
<b>et al.</b>	<i>et alii</i> (und andere)
<b>evtl.</b>	eventuell
<b>Exo</b>	Exosomen
<b>FACS</b>	<i>fluorescence activated cell sorter</i> (Fluoreszenz-aktivierter Zellsorter)
<b>FasL</b>	Fas-Ligand
<b>Fc</b>	<i>fragment crystallizable</i> (kristallisierbares Fragment eines Antikörpers)
<b>FKS</b>	fötales Kälberserum
<b>FLAG</b>	Peptid mit Sequenz DYKDDDDK
<b>FITC</b>	Fluorescein-Isothiocyanat
<b>g</b>	Gramm; Gefäßstruktur
<b>g</b>	Konstante für Schwerebeschleunigung der Erde ( $g = 9,81 \text{ m/s}^2$ )
<b>GM1</b>	Gangliosid GM1
<b>GST</b>	Glutathion-S-Transferase
<b>GTP</b>	Guanointriphosphat
<b>Gy</b>	Gray (Einheit für Energiedosis; 1J/kg)
<b>h</b>	Stunde
<b>H+L</b>	schwere und leichte Kette von Antikörpern
<b>HBS</b>	<i>HEPES buffered saline</i> (HEPES-gepufferte Salzlösung)
<b>HEPES</b>	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
<b>HIS</b>	Polyhistidin
<b>HLA</b>	humanes Leukozytenantigen
<b>HRP</b>	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
<b>HSP</b>	Hitzeschockprotein
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon- $\gamma$
<b>Ig</b>	Immunglobulin
<b>IL</b>	Interleukin
<b>IP</b>	Immunpräzipitation
<b>i.p.</b>	intraperitoneal
<b>k</b>	Kilo (1000 g)
<b>L</b>	Liter
<b>LCL</b>	<i>lymphoblastoid cell line</i> (lymphoblastoide Zelllinie)
<b>LMP2</b>	<i>latent membrane protein 2</i> (latentes Membranprotein aus EBV)

<b>m</b>	milli-
<b>m</b>	Meter
<b>M</b>	Molar (Mol pro Liter)
<b>MACS</b>	<i>magnetic activated cell separation</i> (magnetische Zellseparation)
<b>MAPK</b>	<i>mitogen activated protein kinase</i> (durch Mitogen aktivierte Proteinkinase)
<b>M-CSF</b>	<i>macrophage colony stimulating factor</i> (Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor)
<b>MDSC</b>	<i>myeloid derived suppressor cell</i> (myeloische Suppressorzelle)
<b>me</b>	Myeloepithel
<b>min</b>	Minute
<b>MVB</b>	<i>multivesicular body</i> (multivesikulärer Körper)
<b>mLCL</b>	mini-LCL (lymphoblastoide Zelllinie, die mit replikationsdefizientem EBV hergestellt wurde)
<b>mRNA</b>	<i>messengerRNA</i> (RNA für die Proteinsynthese)
<b>miRNA</b>	<i>microRNA</i> (RNA-Molekül mit inhibitorischer Funktion)
<b>MS</b>	Massenspektrometrie
<b>MTBST</b>	TBST mit Magermilchpulver
<b>n</b>	nano
<b>NHS</b>	N-hydroxysuccinimid
<b>NKG2D</b>	<i>NK group 2, member D</i> (NK Gruppe 2 D)
<b>NK Zelle</b>	natürliche Killerzelle
<b>NLV</b>	NLVPMTATV (Peptid aus CMV pp65)
<b>NY-ESO-1</b>	<i>New York oesophageal squamous cell carcinoma 1</i>
<b>OD</b>	optische Dichte
<b>PAGE</b>	Polyacrylamid – Gelelektrophorese
<b>PAMP</b>	<i>pathogen associated molecular pattern</i> (Pathogenassoziierte Moleküle)
<b>PBMC</b>	<i>peripheral blood mononuclear cells</i> (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
<b>PBS</b>	<i>phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
<b>PCR</b>	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
<b>PE</b>	Phycoerythrin
<b>PEG</b>	Polyethylenglykol
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>pH</b>	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenaktivität
<b>PI3K</b>	Phosphoinositid 3-Kinase
<b>pp65</b>	Phosphoprotein 65 aus CMV
<b>PSA</b>	<i>prostate specific antigen</i> (Prostata-spezifisches Antigen)
<b>RNA</b>	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
<b>RPMI</b>	<i>Rosswell Park Memorial Institute Medium</i>
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>sb</b>	<i>stratum basale</i>
<b>SDS</b>	<i>sodium dodecylsulfate</i> (Dodecylsulfat Natriumsalz)
<b>sec</b>	Sekunde
<b>SGP</b>	Sepharose G Partikel
<b>sm</b>	<i>submucosa</i>

---

<b>ss</b>	<i>stratum spinosum</i>
<b>st</b>	Stroma
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>TAE</b>	Tris-Acetat-EDTA
<b>TAP</b>	<i>transporter associated with antigen processing</i> (Transporter für die Antigen Prozessierung)
<b>Taq</b>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
<b>TBS</b>	<i>tris buffered saline</i> (Tris-gepufferte Kochsalzlösung)
<b>TBST</b>	TBS mit Tween 20
<b>TCR</b>	<i>T cell receptor</i> (T-Zell-Rezeptor)
<b>TEMED</b>	N,N,N',N', Tetramethyl-Ethyldiamin
<b>TGFβ</b>	<i>transforming growth factor β</i> (Transformierender Wachstumsfaktor β)
<b>TIM3</b>	<i>T cell immunoglobulin domain and mucin domain protein 3</i> (T-Zellimmunoglobulindomäne und Mucindomäne Protein 3)
<b>TNF-α</b>	Tumornekrosefaktor α
<b>TNFR1</b>	TNF-Rezeptor 1
<b>TRAIL</b>	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i> (TNF-ähnlicher Apoptose-induzierender Ligand)
<b>Tris</b>	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
<b>TSG101</b>	<i>tumor susceptibility gene 101</i> (Tumorsuszeptibilitätsgen 101)
<b>tu</b>	Tumor
<b>U</b>	Enzymeinheit (Unit)
<b>ÜN</b>	über Nacht
<b>Upm</b>	Umdrehungen pro Minute
<b>V</b>	Volt
<b>v/v</b>	<i>volume per volume</i> (Volumenprozent)
<b>VEGF</b>	<i>vascular endothelial growth factor</i> (vascular-endothelialer Wachstumsfaktor)
<b>w/v</b>	<i>weight per volume</i> (Gewichtsprozent)
<b>z.B.</b>	zum Beispiel
<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>α</b>	anti
<b>μ</b>	mikro
<b>ρ</b>	Dichte



## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Reinhard Zeidler für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und die zahlreichen wissenschaftlichen Denkanstöße.

Bei Herrn Prof. Dr. Dirk Eick möchte ich mich für die Vertretung der Arbeit an der biologischen Fakultät der LMU bedanken.

Ein herzliches Dankeschön geht an Herrn Josef Mautner und Herrn Andreas Moosmann, die stets ein offenes Ohr für meine wissenschaftlichen Fragestellungen hatten.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt möchte ich für die Möglichkeit, die Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen, und die wissenschaftliche Beratung danken.

Für die Durchführung und wertvolle Hilfestellung wichtiger Experimente für diese Arbeit bin ich folgenden Personen zu Dank verpflichtet:

Frau Dr. Elisabeth Kremmer und ihrer Arbeitsgruppe (insbesondere Andrew Flatley) für die Durchführung der Immunisierungen und Herstellung der Antikörper. Herzlichen Dank auch für die zahlreichen Informationen und wertvollen Tipps rund um Antikörper.

Frau Brigitte Mack für die stets ausgezeichneten immunhistologischen Aufnahmen.

Den Arbeitsgruppen von Herrn Prof. Dr. Gerhard Wanner und Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Ulrich Welsch für die elektronenmikroskopische Visualisierung meiner Exosomenpräparate.

Manuel Deutsch für die Hilfe am konfokalen Mikroskop.

Janine Griese und Andreas Thomae für zahlreiche Ratschläge im Zusammenhang mit der Immunpräzipitation.

Ich möchte mich auch bei allen Kollegen der Abteilung Genvektoren für die angenehme Atmosphäre und die wissenschaftlichen Diskussionen bedanken. Ein besonderer Dank gilt meiner Diplomandin Ulrike Kaufmann, die sich ebenfalls mit der Identifizierung der in dieser Arbeit erzeugten Antikörper beschäftigt hat.

Ein herzliches Dankeschön geht an Frau Roswitha Neumann, die für jedes bürokratische Problem eine Lösung findet.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, ohne deren Unterstützung und Verständnis die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

## Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Name: Christina Battke geb. Eiglsperger  
Geburtsdatum: 12.12.1981  
Geburtsort: Straubing  
Familienstand: verheiratet  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Ausbildung

2006 – 2009 Promotion an der Fakultät für Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München mit dem Titel „Exosomale Tumorantigene: Bedeutung bei der Tumormunevasion und Mittel zur Generierung tumorassoziierter Antikörper“ in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Reinhard Zeidler am Helmholtz Zentrum München

2005 – 2006 Diplomarbeit am Helmholtz Zentrum München über das Thema „Charakterisierung des Tumorassozierten Antigens Elongin A2“

2001 – 2006 Studium der Molekularen Biotechnologie an der Technischen Universität München

1999 – 2001 Johannes-Turmair-Gymnasium in Straubing mit Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife

1992 – 1999 Ludwigsgymnasium in Straubing