

**Der RIG-I Ligand 3pRNA aktiviert humane  
Natürliche Killerzellen zur Tumorlyse und  
induziert RIG-I/3pRNA tragende anti-tumorale  
Tumorexosomen**

**Dissertation**

zur  
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)  
der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Juliane Daßler**  
geboren in Gera

Bonn 2014

Angefertigt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms Universität Bonn.

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Gunther Hartmann
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. rer. nat. Michael Hoch

Tag der Promotion: 22.08.2014

Erscheinungsjahr: 2014



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
1.1	GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER HAUPTAUSSAGEN	3
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>4</b>
2.1	EXOSOMEN	4
2.1.1	<i>Aufbau von Exosomen</i>	4
2.1.2	<i>Biogenese von Exosomen</i>	6
2.1.3	<i>Die Funktion von Exosomen</i>	8
2.1.3.1	Die Funktion von Exosomen aus Immunzellen	9
2.1.3.2	Die Funktion von Exosomen aus Tumorzellen	9
2.1.4	<i>Exosomen in der Therapie von Tumorerkrankungen</i>	10
2.2	DAS IMMUNSYSTEM	14
2.2.1	<i>Rezeptoren des angeborenen Immunsystems</i>	15
2.2.2	<i>RIG-like receptors</i>	16
2.2.2.1	Signalkaskade und Effektormechanismen einer RIG-I Aktivierung	18
2.2.2.1.1	Signalkaskade der RIG-I Aktivierung	18
2.2.2.1.2	Die inflammatorische Antwort als Effektormechanismus	18
2.2.2.1.3	Apoptose und Nekroptose als mögliche Effektormechanismen einer RIG-I Aktivierung	19
2.2.3	<i>RIG-I in der Immuntherapie von Tumoren</i>	20
2.2.4	<i>Die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und ihr zytotoxisches Verhalten</i>	21
2.2.4.1	Aktivierende und Inhibierende Rezeptoren von NK-Zellen	23
2.2.4.2	Der Prozess der Zytotoxizität und Zytokinproduktion von NK-Zellen	25
2.2.4.3	NK-Zellen und <i>death-domain</i> -Rezeptoren: Die Tumornekrosefaktor-Superfamilie	26
2.2.4.4	NK-Zellen und <i>Pattern-recognition receptors</i> (PRR) als neue Therapie des malignen Melanoms?	27
<b>3</b>	<b>ZIEL DER ARBEIT</b>	<b>29</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL &amp; METHODEN</b>	<b>30</b>
4.1	MATERIAL	30
4.1.1	<i>Geräte</i>	30
4.1.2	<i>Chemikalien</i>	31
4.1.3	<i>Kits und Reagenzsysteme</i>	31
4.1.4	<i>Enzyme</i>	31
4.1.5	<i>Transfektionsreagenzien</i>	32
4.1.6	<i>Antikörper</i>	32
4.1.7	<i>Rekombinante Zytokine und chemische Inhibitoren</i>	34
4.1.8	<i>ELISA</i>	34
4.1.9	<i>MACS</i>	34
4.1.10	<i>Nukleinsäuren</i>	35
4.1.10.1	Plasmide	35
4.1.10.2	Oligonukleotide	35
4.1.11	<i>Puffer, Medien und Lösungen</i>	36
4.1.11.1	Molekularbiologie	36
4.1.11.2	Zellkultur	38
4.1.12	<i>Verwendete Zellsysteme</i>	38
4.2	METHODEN	38
4.2.1	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	38
4.2.1.1	Nukleinsäurepräparation	38
4.2.1.1.1	RNA-Extraktion	38
4.2.1.1.2	Short-RNA Extraktion	39
4.2.1.1.3	5'-Triphosphat-Nukleaseverdau	39
4.2.1.2	Quantitative <i>Real-time</i> PCR (qPCR)	39
4.2.2	<i>Proteinbiochemische Methoden</i>	41

4.2.2.1	Herstellung von Proteinlysaten	41
4.2.2.2	Proteinquantifizierung mittels Bradford	42
4.2.2.3	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) von Proteinen	42
4.2.2.4	Western Blot	43
<b>4.2.3</b>	<b>Zytologische Methoden</b>	<b>43</b>
4.2.3.1	Kultivierung von Zellen	43
4.2.3.2	Isolation von PBMCs	44
4.2.3.3	Separation von Zellpopulationen mittels MACS-Technologie	45
4.2.3.4	Isolation von Exosomen	45
4.2.3.5	Transfektion und Stimulation von Zellen	46
4.2.3.5.1	Transfektion von immunstimulatorischen (is) Oligonukleotiden	46
4.2.3.5.2	Stimulation mit rekombinanten Zytokinen	47
4.2.3.5.3	Stimulation mit PBMC Überständen	47
4.2.3.6	CFSE Färbung	47
<b>4.2.4</b>	<b>Virologische Methoden</b>	<b>47</b>
4.2.4.1	Herstellung lentiviraler shRNA-Vektoren	47
4.2.4.2	Herstellung transduzierter Zelllinien	48
<b>4.2.5</b>	<b>Analytische Assays</b>	<b>49</b>
4.2.5.1	ELISA	49
4.2.5.2	HEK Blue	50
4.2.5.3	Apoptose	50
4.2.5.4	DiO Lyse Assay	50
4.2.5.5	Durchflusszytometrie	51
4.2.5.5.1	Durchflusszytometrie von Zellen	51
4.2.5.6	CD107a Assay	52
4.2.5.6.1	Intrazelluläre Färbung	52
<b>4.2.6</b>	<b>In vivo Versuche</b>	<b>52</b>
4.2.6.1	Mausstämme	52
4.2.6.2	Tumorinjektionen	53
4.2.6.3	Therapie mit Exosomen	53
4.2.6.4	Depletion von NK-Zellen <i>in vivo</i>	53
<b>4.3</b>	<b>STATISTIK</b>	<b>54</b>
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>55</b>
5.1	RIG-I AKTIVIERTE TUMORZELLEN SEZERNIEREN FAKTOREN ZUR NK-ZELL-AKTIVIERUNG: MIKROVESIKEL UND ZYTOKINE	55
5.1.1	<i>Charakterisierung 3pRNA induzierter Melanomexosomen</i>	57
5.1.2	<i>Der NKp30-Ligand BAG6 ist verstärkt auf 3pRNA induzierten Melanomexosomen zu finden und aktiviert NK-Zellen zur Tumorlyse</i>	62
5.1.3	<i>Melanomexosomen enthalten 3pRNA nach Aktivierung von RIG-I in Melanomzellen</i>	65
5.1.4	<i>Die in Melanomexosomen beinhaltete 3pRNA aktiviert NK-Zellen</i>	69
5.1.5	<i>Der Mechanismus der 3pRNA vermittelten NK-Aktivierung</i>	70
5.1.6	<i>Exosomen aus 3pRNA behandelten Melanomzellen zeigen einen direkten Effekt auf Melanomzellen</i>	73
5.1.7	<i>3pRNA induzierte Exosomen induzieren pro-inflammatorische und anti-virale Zytokine/Chemokine in Immunzellen</i>	74
5.1.8	<i>Die durch 3pRNA in Immunzellen induzierten Zytokine führen zum Zelltod von Melanomzellen</i>	77
5.1.9	<i>3pRNA induziert auch in einer murinen Melanomzelllinie immunaktivierende BAG6 und 3pRNA enthaltende Exosomen</i>	80
5.1.10	<i>3pRNA Exosomen zeigen eine NK-Zell abhängige anti-tumorale Wirkung im Maus-Melanom-Modell in vivo</i>	82
<b>6</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>87</b>
6.1	3PRNA INDUZIERT LYSE VON TUMORZELLEN DURCH NK-ZELLEN	87
6.2	DIE DURCH 3PRNA INDUZIERTEN TH1-ZYTOKINE TNF $\alpha$ UND IFN $\gamma$ HABEN ZYTOTOXISCHES POTENTIAL	90
6.3	DIE AKTIVIERUNG VON RIG-I DURCH SEINEN LIGANDEN 3PRNA FÜHRT IN MELANOMZELLEN ZUR BILDUNG VON EXOSOMEN	92

6.4	3PRNA MELANOMEXOSOMEN AKTIVIEREN NK-ZELLEN ZUR LYSE VON TUMORZELLEN DURCH DIE EXPRESSION DES NKP30 LIGANDEN BAG6	93
6.5	RIG-I UND SEIN LIGAND 3PRNA WERDEN IN 3PRNA MELANOMEXOSOMEN VERPACKT UND INDUZIEREN ANTI-VIRALE UND ANTI-TUMORALE EFFEKTE	94
6.6	3PRNA INDUZIERT EXOSOMEN INHIBIEREN DAS TUMORWACHSTUM IN ABHÄNGKEIT VON NK-ZELLEN IN EINEM SUBKUTANEN MELANOMMODELL <i>IN VIVO</i>	96
6.7	EXOSOMEN ALS NATÜRLICHES DELIVERY TOOL	98
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>100</b>
<b>8</b>	<b>ABBILDUNGS-/TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>116</b>
8.1	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	116
8.2	TABELLENVERZEICHNIS	117
<b>9</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>118</b>
<b>10</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>121</b>
<b>11</b>	<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG</b>	<b>123</b>

# 1 Zusammenfassung

Exosomen sind 50 – 120 nm große Vesikel, die von vielen Körperzellen, einschließlich Tumorzellen, gebildet und in den extrazellulären Raum abgegeben werden. Sie sind von einer Lipiddoppelmembran umgeben und beinhalten funktionale Moleküle wie z.B. Proteine und miRNAs. Exosomen erfüllen über den Transfer dieser Moleküle verschiedenste Aufgaben in der Zellkommunikation, u. a. sind sie an der Regulation des Immunsystems beteiligt. Exosomen von Tumorzellen besitzen zwar grundsätzlich ein immunogenes Potential (z.B. durch enthaltene Tumorantigene), sie führen jedoch hauptsächlich zu vielfältigen pro-tumoralen und pro-metastatischen Effekten. Bisher fehlt eine Therapie, die in der Lage ist, auf der einen Seite diese pro-tumoralen Effekte zu inhibieren und auf der anderen Seite das immunogene Potential der Tumorexosomen in der Immuntherapie gegen Tumore zu nutzen.

Der Immunrezeptor *Retinoic Acid Inducible Gene-1* (RIG-I) ist eine ubiquitär exprimierte zytosolische Helikase, verantwortlich für die Detektion von pathogenen RNA-Viren. RIG-I bindet 5' triphosphorylierte RNA, die während des Replikationszyklus von RNA-Viren im Zytosol von infizierten Zellen auftritt. In der Folge kommt es zur Sekretion von Zytokinen (v.a. Typ I Interferonen) und Chemokinen (z.B. CXCL10), die eine anti-virale Immunantwort induzieren und im Weiteren zur Aktivierung und Rekrutierung von Immunzellen beitragen. In der Tumorthherapie konnte in einem Melanommodell *in vivo* gezeigt werden, dass die durch die Aktivierung von RIG-I ausgelöste Immunantwort zu einer starken Reduktion der Lungenmetastasen in Abhängigkeit von NK-Zellen und Typ I Interferonen führte.

In dieser Arbeit sollte nun am Beispiel des Melanoms untersucht werden, ob und wie die Aktivierung von RIG-I zur Aktivierung von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) beiträgt. Im weiteren sollte analysiert werden, ob die Imitierung einer viralen Infektion durch die Aktivierung von RIG-I einen Einfluss auf die Eigenschaften von Tumorexosomen hat und ob dies zu anti-tumoralen Effekten, insbesondere über NK-Zellen, führt.

Mit den hier vorliegenden Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass der RIG-I Ligand 3pRNA über verschiedene Mechanismen die anti-Tumoraktivität von NK-Zellen steuert:

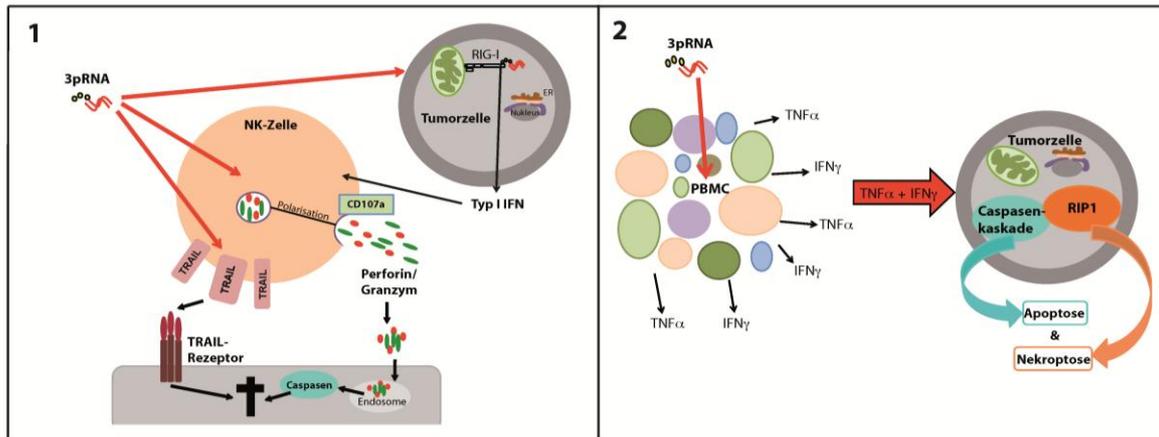
- (1.) 3pRNA induziert die Ausschüttung zytotoxischen Granula und somit die Caspasen-abhängige Lyse von Melanomzellen.
- (2.) Zusätzlich löst 3pRNA Apoptose in Melanomzellen über die Induktion des *Tumor necrosis factor- related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) auf NK-Zellen aus.
- (3.) Des Weiteren führt die Stimulation von Tumorzellen mit 3pRNA zur Sekretion von Typ I IFN und weiteren löslichen Faktoren, welche die Degranulation von NK-Zellen gegenüber Tumorzellen indirekt induzieren.
- (4.) Die Aktivierung von RIG-I durch seinen Liganden 3pRNA führt zur Produktion von Exosomen, die einen anti-tumoralen Phänotyp haben.

So induzierte die RIG-I Aktivierung in einer primären humanen Melanomzelllinie die Produktion von Melanomexosomen, die BAG6, einen aktivierenden Liganden des *Natural Cytotoxicity Receptor* NKp30 von NK-Zellen, tragen. Diese Exosomen stimulierten die NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität gegen Melanomzellen. Darüber hinaus zeigte sich, dass 3pRNA induzierte Melanomexosomen den Immunrezeptor RIG-I und dessen Liganden 3pRNA tragen und in Immun- und Tumorzellen die Produktion von anti-viralen Zytokinen (z.B. Typ I Interferonen) und Th1 Chemokinen (z.B. CXCL10) induzierten. Von den durch 3pRNA induzierten Zytokinen nahmen TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  eine besondere Stellung ein, da diese Kombination zum Zelltod der Melanomzellen durch Nekroptose und Apoptose führte.

Diese immunaktivierenden und NK-Zell-abhängigen anti-tumoralen Effekte konnten in dieser Arbeit in ein subkutanes murines Melanommodell übertragen werden. Durch RIG-I induzierte murine Melanomexosomen führten zur NK-Zell-Aktivierung und zur Inhibierung des Tumorwachstums in Abhängigkeit von NK-Zellen *in vivo*.

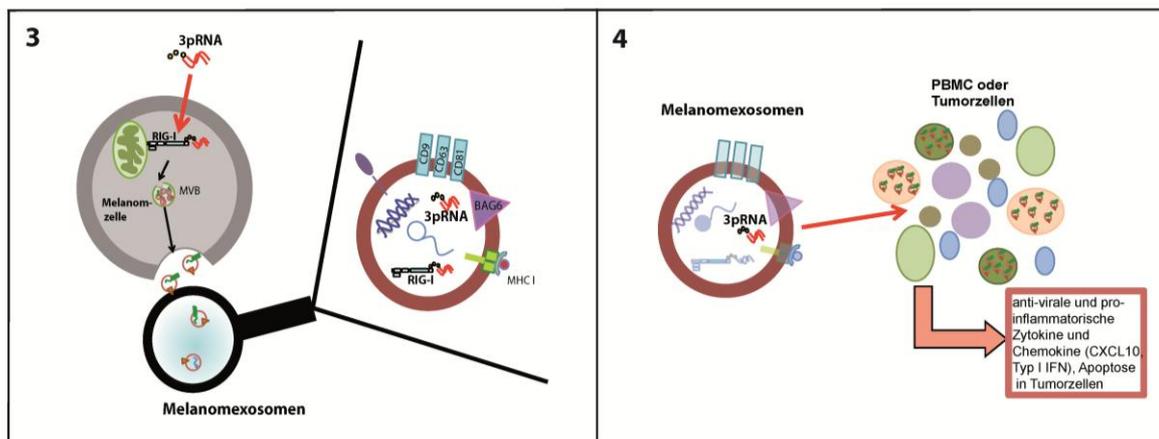
Damit konnte in dieser Arbeit dargelegt werden, dass und wie 3pRNA über RIG-I in der Lage ist, die anti-Tumoraktivität von NK-Zellen über verschiedene Signalwege zu induzieren. Erstmals konnte die exosomale Verpackung eines viralen Warnmoleküls (3pRNA) und des dazugehörigen Rezeptors (RIG-I) beschrieben werden. Damit beschreibt die Arbeit eine neue Strategie, wie Tumorexosomen in wirksame anti-tumorale Vehikel verwandelt werden können. Die Ergebnisse können dazu genutzt werden, die Ausbreitung anti-viraler Signale in Folge einer Virusinfektion besser zu verstehen und neue RIG-I basierte und exosomale Therapiestrategien für Tumorerkrankungen zu entwickeln.

## 1.1 Graphische Darstellung der Hauptaussagen



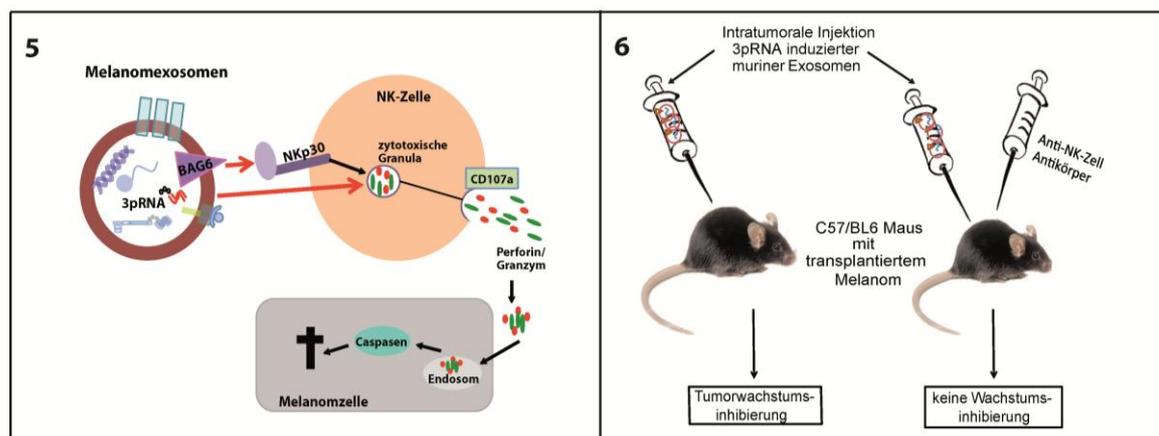
Eine Aktivierung von RIG-I trägt zur NK-Zell vermittelten Lyse von Tumorzellen bei.

Die Induktion der Th1 Zytokine  $TNF\alpha$  und  $IFN\gamma$  durch 3pRNA in Immunzellen führt zur Nekroptose und Apoptose in Melanomzellen.



Die Aktivierung von RIG-I in Melanomzellen führt zur Verpackung von RIG-I und 3pRNA in Melanomexosomen.

Die 3pRNA Melanomexosomen induzieren RIG-I abhängig anti-virale Zytokine und Chemokine sowie Apoptose in Tumorzellen.



Die 3pRNA vermittelte Aufregulation des NKp30 Liganden BAG6 auf den Melanomexosomen führt zur NKp30 abhängigen Lyse der Tumorzellen durch NK-Zellen.

Die 3pRNA/RIG-I tragenden Melanomexosomen inhibieren das Tumorstadium in einem Melanommodell abhängig von NK-Zellen.

---

## 2 Einleitung

### 2.1 Exosomen

Der Begriff der Exosomen wurde erstmalig von Trams et al. im Jahr 1981 geprägt<sup>1</sup>. Er beschreibt circa 40 nm große Vesikel, die von malignen und nicht-malignen Zellen sezerniert werden. Zwei Jahre später beschrieben auch Johnstone und Stahl dieser Vesikel im Zusammenhang der Retikulozytenreifung<sup>2,3</sup>. In den folgenden Jahren wurde für Exosomen hauptsächlich die Rolle in der Entsorgung von physiologisch nicht mehr verwertbaren Substanzen vermutet oder sie wurden als zufällig auftretende Vesikel in der Zellhomöostase angesehen. Erst im Jahr 1996 beschrieb die Gruppe von Raposo et al. eine physiologische Funktion von Exosomen. Sie erkannten, dass Exosomen, die aus B-Lymphozyten gewonnen wurden, eine Antigen-spezifische T-Zell Antwort induzieren können und untermauerten die Rolle der Antigenpräsentation von Exosomen *in vivo*<sup>4</sup>. In den folgenden Jahren wurden vielfältige weitere Funktionen beschrieben (s.u.).

#### 2.1.1 **Aufbau von Exosomen**

Exosomen sind Vesikel mit einer Größe von 50 - 120 nm, die in der elektronenmikroskopischen Aufnahme als *cup-shaped* Vesikel imponieren. Die von einer Lipiddoppelmembran umgebenen Vesikel können mittels Ultrazentrifugation von  $\geq 100.000$  g isoliert werden und zeichnen sich durch eine Dichte von 1,13 - 1,19 g/ cm<sup>3</sup> in Sucrose und dem Fehlen von Zellorganellen, wie z.B. Nukleus und Golgi, aus.

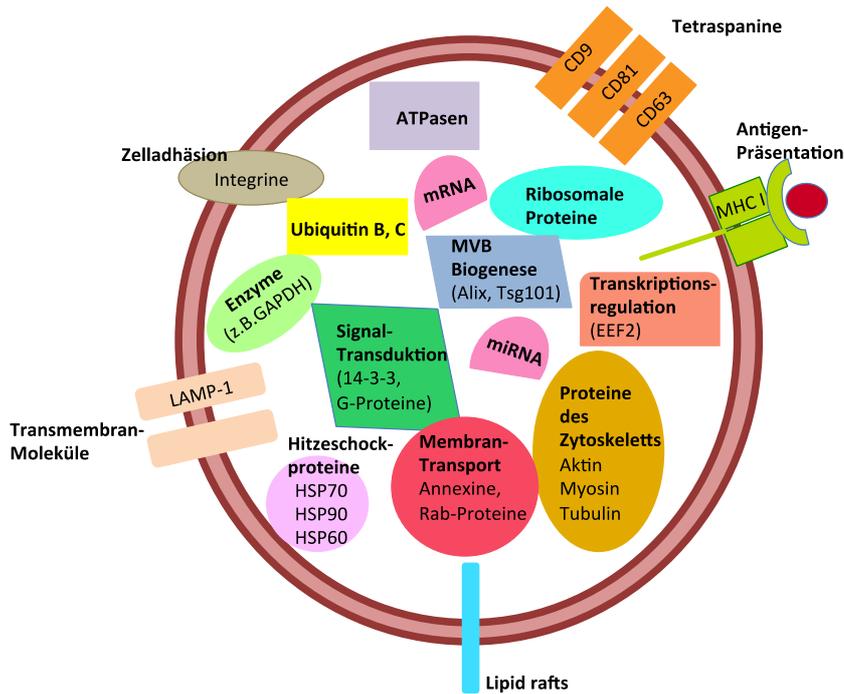
Exosomen können von anderen Vesikeln wie Mikrovesikeln, Ektosomen, Membranvesikeln und apoptotischen Partikeln über die in Tabelle 2-1 beschriebenen Charakteristika unterschieden werden.

	Exosomen	Mikrovesikel	Ektosomen	Membran-partikel	Exosome-ähnliche Vesikel	Apoptotische Vesikel
<b>Größe [nm]</b>	50 - 120	100 - 1000	50 - 200	50 - 80	20 - 50	50 - 500
<b>Dichte [g/ml]</b>	1,13 - 1,19	nicht bekannt	nicht bekannt	1,04 - 1,07	1,1	1,16 - 1,28
<b>Form im EM</b>	„cup-shaped“	unregelmäßige Struktur, Elektronendicht	bilamellare runde Strukturen	rund	irreguläre Form	heterogen
<b>Sedimentierung [g]</b>	100.000	10.000	160.000 – 200.000	100.000 – 200.000	175.000	1200, 10.000, 100.000
<b>Lipid-zusammensetzung</b>	Anreicherung von Cholesterin, Sphingomyelin, Ceramiden; besitzen lipid rafts; PS	PS	Anreicherung Cholesterin, Diacylglycerol; PS	nicht bekannt	Besitzen keine lipid rafts	nicht bekannt
<b>Markerproteine</b>	Tetraspanine (CD9, CD63), Alix, Tsg101	Integrine, Selektine, CD40L	CR1, kein CD63	CD133, kein CD63	TNFRI	Histone
<b>Intrazelluläre Herkunft</b>	Endosom	Plasma-membran	Plasma-membran	Plasma-membran	zelluläre Kompartimente?	Nicht bekannt
<b>Referenz</b>	5 und 6	7	8	9	10	11

**Tabelle 2-1: Vergleichende Darstellung von Membranvesikeln.** Tabelle modifiziert nach Théry et al.<sup>5</sup> Abkürzungen: EM – Elektronenmikroskopie, PS – Phosphatidylserin, Tsg101 - *tumor susceptibility antigen 101*, TNFRI – Tumornekrosefaktorrezeptor-1, CD40L – CD40-Ligand, CR1 – *complement receptor 1*

Grundsätzlich zeichnen sich Exosomen durch die Expression von Adhäsionsmolekülen wie Integrinen und Tetraspaninen (CD9, CD63), Alix und Tsg101, sowie Proteine des Membrantransports (Rab-Proteinfamilie, Annexine) aus.

Zusätzlich zu diesen Transmembranproteinen können Exosomen Enzyme (z.B. GAPDH), Hitzeschockproteine (z.B. HSP70), Komponenten des Zytoskeletts (z.B. Aktin) und ribosomale Proteine beinhalten. Neben diesen ubiquitär vorkommenden Proteinen exprimieren Exosomen in unterschiedlicher Menge Proteine ihrer Ursprungszelle, wie z.B. CD24 und Epcam auf Ovarialkarzinom-Exosomen<sup>12</sup>. Neben Proteinen können Exosomen verschiedene RNA-Spezies, wie mRNAs, miRNAs und kurze RNAs enthalten (Abbildung 2-1). Die Gruppe um Valadi et al. hat als Erste den Exosomen-vermittelten Transfer von RNAs beschrieben. In einem experimentellen Ansatz konnten sie zeigen, dass sowohl mRNAs als auch miRNAs in Exosomen vorhanden und nach dem Transfer zu anderen Zellen funktionell aktiv sind<sup>13,14</sup>. Diese Ergebnisse belegten einen neuen Mechanismus zum Austausch von Informationen zwischen Zellen mittels Exosomen.



**Abbildung 2-1: Schematische Darstellung der Proteinzusammensetzung eines Exosomes.** Das 50 – 120 nm große Exosomen, welches von einer Lipiddoppelschicht umgeben ist, zeichnet sich durch Moleküle diverser Proteinfamilien, z.B. für Zelladhäsion, Transmembranmoleküle und des Zytoskeletts aus. Daneben findet man unterschiedliche RNA-Spezies.

### 2.1.2 Biogenese von Exosomen

Abhängig vom Aktivierungsstatus einer Zelle sollten alle Körperzellen wie z.B. B-Zellen<sup>15</sup>, dendritischen Zellen<sup>16</sup>, Epithelzellen, Tumorzellen<sup>17</sup> und Neuronen in der Lage sein Exosomen zu produzieren. Man konnte Exosomen im Speichel<sup>18,19</sup>, Plasma<sup>20</sup>, Urin<sup>21,22</sup>, Muttermilch<sup>23</sup>, Fruchtwasser<sup>22</sup> und im malignen Aszites detektieren<sup>12</sup>.

Exosomen gehen aus dem physiologischen Prozess der Endozytose hervor. Es kommt bei der Entstehung des späten Endosomes zur Ausbildung von intraluminalen Vesikeln – dem sogenannten *multivesicular body* (MVB). Dabei wird für die Formierung *tumor susceptibility gene 101* (*tsg101*) und für die Akkumulierung der intraluminalen Vesikel *Hepatocyte growth factor receptor substrate* (*Hrs*) benötigt<sup>24</sup>. Die Proteine, die durch Endozytose in den MVB gelangt sind, können nach Verschmelzung mit dem Lysosom degradiert oder dem Recyclingprozess im Transgolginetzwerk zugeführt werden. Alternativ kann der MVB mit der Plasmamembran verschmelzen, wodurch die intraluminalen Vesikel, nun als Exosomen bezeichnet, freigesetzt werden (Abbildung 2-2). Die Signale, die den Prozess des Recyclings verhindern und stattdessen zur Ausschüttung der Vesikel des MVB als Exosomen führen,

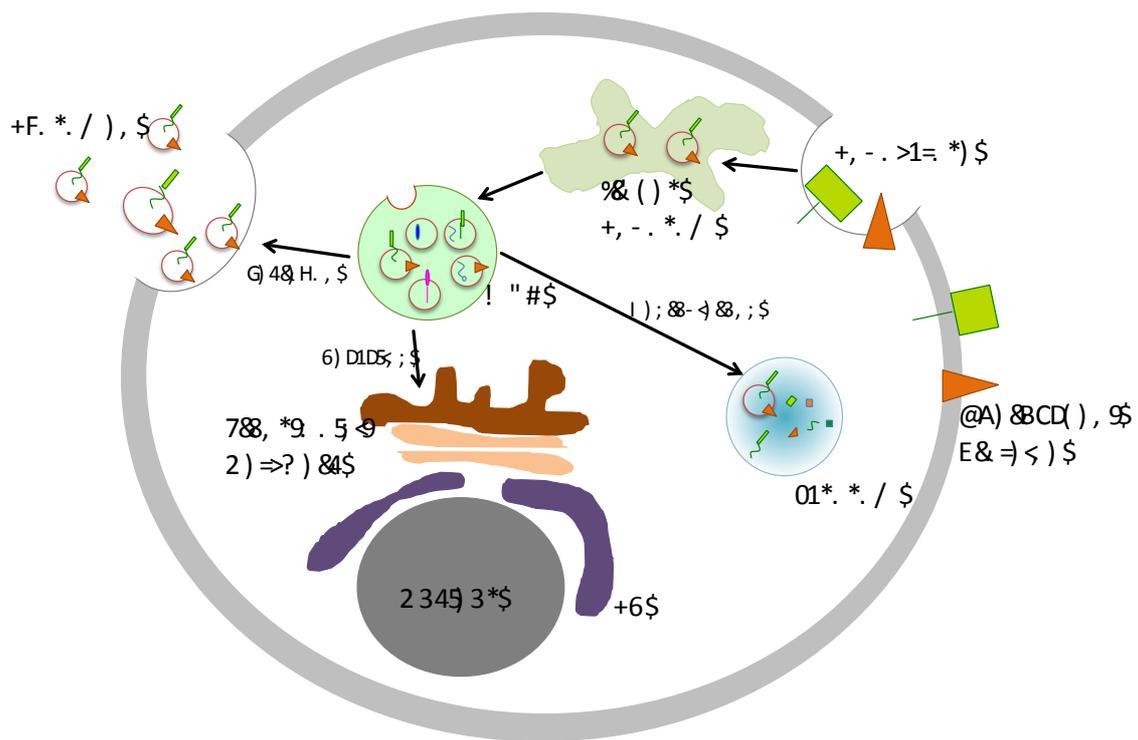
---

sind nicht bekannt. Allerdings gibt es Hinweise auf Moleküle, die an der Sekretion bzw. Proteinsortierung in die Exosomen eine bedeutende Rolle spielen. Mono-Ubiquitinierungen von Proteinen ist ein Erkennungssignal für den *endosomal sorting complex required for transport* (ESCRT), welcher die Sortierung der Proteine in die intraluminalen Vesikel des MVB vermittelt. Da aber nicht alle Proteine in Exosomen ein Ubiquitinierungsmuster aufweisen, muss es unabhängig davon weitere Mechanismen in der Proteinsortierung in den MVB geben, wie z.B. tetraspaninreiche Regionen<sup>25</sup> oder cholesterolreiche Membranmikrodomänen<sup>26</sup>.

Neben der Verpackung von Proteinen scheinen auch RNA-Spezies in Exosomen gezielt aufgenommen zu werden. Der Mechanismus ist jedoch unklar. Bisher konnte lediglich für miRNAs eine Assoziation zwischen dem miRNA-Regulationsprozess und der Exosomenbildung beschrieben werden. Für die an der miRNA-Regulation beteiligten Proteine *trinucleotide repeat-containing gene 6A* (GW182) und *association of argonaut* (AGO) 2 wurde eine Interaktion mit dem MVB gezeigt. Dieser Zusammenhang deutet einen Verpackungsmechanismus der miRNA in die Exosomen an<sup>27,28</sup>. Für andere RNA-Spezies gibt es bisher keinen Hinweis auf einen Verpackungsmechanismus.

Hingegen ist die Exosomensekretion ein besser verstandener Prozess. Das oben bereits erwähnte Hrs, ein weiterer Bestandteil des ESCRT-Komplexes, hat Einfluss auf die Bildung von Exosomen aus dendritischen Zellen<sup>29</sup>. Trajkovic et al. verifizierte die an der Ceramidbildung beteiligte neutrale Sphingomyelinase als einen Mediator in der Exosomenproduktion<sup>30</sup>. Erst kürzlich konnte eine Rolle von Heparansulfat-Proteoglykan Syndecan-4 an der Formierung von Exosomen gezeigt werden<sup>31</sup>. Desweiteren wurde auch eine Beteiligung von Rab GTPasen an der Exosomensekretion beobachtet<sup>32,33</sup>. Daneben konnte eine Abhängigkeit der Sekretion von Exosomen von intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Spiegeln und des pH-Wertes beschrieben werden<sup>34,35</sup>.

Die Regulation der Verpackung von Proteinen und RNA-Spezies in Exosomen ist bis ins Detail nicht verstanden und muss zukünftig genauer untersucht werden.



**Abbildung 2-2: Biogenese von Exosomen.** Membranproteine werden über den Prozess der Endozytose aufgenommen und gelangen in das frühe Endosom. Die Invagination der äußeren Membran führt zur Ausbildung von intraluminalen Vesikeln im nun so genannten MVB. Die Vesikel können Proteine und verschiedene RNA-Spezies beinhalten, welche über bisher nicht genau identifizierte Mechanismen verpackt werden. Der MVB kann durch Verschmelzung die Vesikel ausschütten, die nun als Exosomen bezeichnet werden. Alternativ können die Proteine innerhalb der Vesikel im MVB auch über das Trans-Golgi-Netzwerk recycelt oder im Lysosom degradiert werden. Modifiziert nach<sup>36</sup>

### 2.1.3 Die Funktion von Exosomen

Die Tatsache, dass Exosomen je nach Art der Ursprungszelle ganz unterschiedliche molekulare Zusammensetzungen haben können, weist auf verschiedene spezifische Funktionen der Exosomen in Abhängigkeit ihres Ursprungs hin. Ihre Größe gibt ihnen die Möglichkeit, eine Vielzahl von Organen zu erreichen und dort zelluläre Prozesse zu beeinflussen. Im Folgenden wird die Funktion von Exosomen aus gesunden Zellen am Beispiel der Immunzellen und im Kontext einer Erkrankung am Beispiel von Tumorzellen beschrieben.

### 2.1.3.1 Die Funktion von Exosomen aus Immunzellen

Durch die Expression von Proteinen, die an der Antigenpräsentation beteiligt sind, beeinflussen Exosomen die spezifische Immunantwort. B-Zell Exosomen exprimieren MHC I und II, ko-stimulatorische Moleküle und Adhäsionsmoleküle. Über ihre MHC II Expression sind sie in der Lage eine T-Zell-Antwort *in vitro* zu initialisieren<sup>4,37</sup>. Wie B-Zell-Exosomen tragen auch DC-Exosomen (DEX genannt) MHC I und II. Nach Beladung der DEX mit Tumorantigenen können sie eine T-Zell Antwort *in vivo* induzieren<sup>38</sup>. Desweiteren fördern DEX das Überleben von CD4+ T-Zellen<sup>39</sup>. Auch T-Zellen sekretieren Exosomen, die auf ihrer Oberfläche den pro-apoptotischen Fas-Liganden tragen und damit Fas-abhängig Apoptose induzieren können<sup>40,41</sup>. Diese Beispiele verdeutlichen, dass Immunzellen über Exosomen kommunizieren und die Immunreaktion koordinieren.

### 2.1.3.2 Die Funktion von Exosomen aus Tumorzellen

Die Effekte von Exosomen aus Tumorzellen (TEX) sind divers und reichen von immunstimulatorischen Prozessen bis hin zur Förderung des Tumorwachstums.

Insgesamt überwiegen in der Literatur Effekte, die zu einer Förderung des Tumorwachstums führen: TEX sind mitverantwortlich in der malignen Progression von Tumorerkrankungen, indem sie sich immunsuppressiv, pro-angiogenetisch und pro-metastatisch verhalten. Für TEX in einem murinen Mammakarzinom- als auch in einem Glioblastom-Modell konnte eine Förderung des Tumorwachstums gezeigt werden<sup>42,43</sup>. Sie induzieren ein immunsuppressives Tumormikromilieu, in dem sie CD8+ T-Zellen durch die Expression von Fas-Ligand töten und das Vorhandensein von myeloide Suppressorzellen begünstigen<sup>44,45</sup>. Auch die Anzahl von NK-Zellen und die Expression des aktivierenden NK-Rezeptors NKG2D kann durch Tumorexosomen im Sinne des Tumorwachstums moduliert werden<sup>42,46</sup>. Für die optimale Versorgung des Tumors mit Nährstoffen können Exosomen den Transport von pro-angiogenen Faktoren vermitteln und Hilfe bei der Proliferation von Endothelzellen in Vaskularisierungsprozessen durch den Transport von Zell-Zyklus relevanten miRNAs leisten<sup>43,47</sup>. Zusätzlich sind Exosomen in der Lage, zur Metastasierung des Tumors beizutragen. Durch exosomal transferierte miRNAs wird im Lymphknoten die Zellmatrix so verändert, dass Metastasen begünstigt werden. Außerdem werden Knochenmarksverläuferzellen in einen pro-metastatischen Status umgewandelt<sup>48,49</sup>. Diese

---

aktuellen Studien sind Beispiele, wie TEX das zelluläre Milieu in entfernten Organen konditionieren und damit den Prozess der Metastasierung potenzieren.

Nur wenige anti-tumorale Funktionen sind beschrieben. Dazu gehört, dass TEX – anders als DEX – grundsätzlich Tumorantigene tragen. Diese können von DCs aufgenommen werden, wodurch es zur Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen in einem Tumormodell *in vivo* nach Re-Injektion der *ex vivo* beladenen DCs kommt<sup>50</sup>.

Die Tatsache, dass TEX eine Tumorstimulation vermitteln können, ohne dass sie wie DEX erst mit Antigen beladen werden müssen, macht sie zu einer interessanten therapeutischen Option. Allerdings wäre die Inhibition der pro-tumoralen Effekte eine zwingende Voraussetzung zur therapeutischen Nutzung. Daher wird versucht TEX in der Kombination mit weiteren immunmodulierenden Substanzen einzusetzen, um den pro-tumoralen Effekt der TEX zu verhindern<sup>51,52</sup> (vgl. 2.1.4). Diese Ansätze sind jedoch noch alle in der Entwicklungsphase.

### **2.1.4 Exosomen in der Therapie von Tumorerkrankungen**

Exosomen haben Eigenschaften, die sie attraktiv für den Einsatz in der Therapie von Tumorerkrankungen machen. Ein Vorteil ist ihre Größe von 50 – 120 nm, so dass sie zur Applikation von aktiven Substanzen im Sinne eines *nanoscale drug delivery system* genutzt werden können. Zusätzlich ermöglicht die geringe Größe von Exosomen ihren Transport über Biobarrieren, wie z.B. der Blut-Hirn-Schranke<sup>53,54</sup>. Durch spezifische Modifikationen der Exosomen kann zusätzlich eine Aktivierung des Immunsystems erreicht werden<sup>55</sup>. Damit bieten Exosomen die Möglichkeit als neue *delivery* Strategie entwickelt zu werden, um genetisches Material, Medikamente und Antigene in den Körper und in Zellen einzubringen. Betrachtet man therapeutisch modifizierte Exosomen als zellfreie Partikel, so zeichnen sich diese durch ihre Generierung aus autologen Zellen als keine körperfremden Partikel aus und können vom Organismus toleriert werden.

In der therapeutischen Anwendung unterscheidet man bisher Exosomen, die aus DCs (DEX), aus Tumorzellen (TEX) oder aus Aszitis (AEX) gewonnen wurden. Mit AEX und DEX wurden drei klinische Phase I Studien in der Behandlung von Tumoren durchgeführt. AEX bzw. AEX + GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) wurden von Dai et al. in der Behandlung des kolorektalen Karzinoms angewandt. Dabei konnte die Induktion einer Tumorantigen-spezifischen T-Zell Antwort nur in der Kombination von AEX und GM-CSF

---

beobachtet werden<sup>51</sup>. Die in Frankreich um Escudier et al. durchgeführte Studie mit DEX an Melanompatienten beschrieb erstmalig die Realisierbarkeit der Herstellung von *clinical grade* Exosomen in ausreichenden Mengen nach den Richtlinien der *good manufacturing practice*. Die Beladung der DEX mit einem spezifischen Tumorantigen induzierte keine Tumorantigen-spezifische T-Zell-Antwort im Blut. Allerdings konnte durch DEX die Anzahl und die Funktion von NK-Zellen wiederhergestellt werden<sup>56,57</sup>. Die dritte klinische Studie, durchgeführt von Morse et al., konnte in der Anwendung von DEX bei Patienten mit einem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) eine Tumorantigen-spezifische T-Zell-Antwort und eine erhöhte lytische NK-Zell-Aktivität zeigen<sup>58</sup>. Alle Studien zeigten eine gute Verträglichkeit der DEX oder AEX in Patienten. Die aufgetretenen Nebenwirkungen beschränkten sich auf lokale Reaktionen an der Injektionsstelle und schwaches Fieber<sup>57-59</sup>. Da bisher nur Pilotstudien mit kleinen Fallzahlen durchgeführt worden sind, kann bisher keine endgültige Aussage zur Wirksamkeit dieses Therapieprinzips getroffen werden. Trotzdem zeigen die Studien, die in Tabelle 2-2 zusammengefasst sind, die Realisierbarkeit von Exosomen basierten Therapien in der Behandlung von Tumoren.

Tumorerkrankung	Exosomenart	Anzahl Patienten	Ergebnisse	Referenz
NSCLC	DEX mit TU-AG beladen	13	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Realisierbarkeit der Exosomenherstellung</li> <li>- gute Verträglichkeit mit geringen Nebenwirkungen</li> <li>- Aktivierung von Immunzellen</li> </ul>	58
Melanom	DEX mit TU-AG beladen	15	<ul style="list-style-type: none"> <li>- GMP Exosomenherstellung</li> <li>- Gute Verträglichkeit mit geringer Toxizität</li> <li>- gesteigerte Anzahl und Funktion von NK-Zellen</li> <li>- keine TU-AG spezifische T-Zell-Antwort</li> </ul>	56,57
Kolorektales Karzinom	AEX vs. AEX+GM-CSF	40	<ul style="list-style-type: none"> <li>- gute Verträglichkeit</li> <li>- nur AEX+GM-CSF induzieren TU-AG spezifische T-Zell Antwort</li> </ul>	51

**Tabelle 2-2: Die Anwendung von Exosomen in klinischen Phase I Studien zur Behandlung von Tumoren.**  
Abkürzungen: TU-AG – Tumorantigen, GMP – *good manufacturing practice*

Im Gegensatz zu DEX oder AEX gibt es für TEX noch wenig Erfahrung in klinischen Studien. Da TEX anders als DEX wie oben beschrieben bereits Tumorantigene tragen, können sie einen vielversprechenden Therapieansatz darstellen. Allerdings stellen bei TEX die vielfach beschriebenen pro-tumoralen Eigenschaften den Einsatz in Frage. Diese werden so kritisch gesehen, dass sogar versucht wird, Exosomen aus dem Blutkreislauf durch extrakorporale Filtration zu entfernen, um einen therapeutischen Effekt zu erzielen<sup>60</sup>. Unklar ist jedoch, ob es aufgrund der vielen physiologischen Bedeutungen von Exosomen zu Nebenwirkungen durch die Entfernung kommt. Unbeachtet dabei bleibt das beschriebene Potential der TEX zur Tumorstimulation. Daher wird derzeit aktiv versucht, therapeutische Ansätze mit TEX zu entwickeln, die deren Potential nutzen aber die pro-tumorigen Wirkungen inhibieren, wozu es bisher jedoch lediglich erste Ansätze *in vitro* und *in vivo* gibt (Tabelle 2-3). Eine Therapie, die das Stimulationspotential der TEX ausnutzt ohne das die grundsätzlich

vorhandenen pro-tumoralen Eigenschaften zum Tragen kommen, hätte ein hohes therapeutisches Potential.

Tumorart [Referrenz]	Herkunft TEX und Applikationsroute	Spezies	<i>In vitro/ in vivo</i>	Ergebnisse
Pankreaskarzinom [61]	Intraktion TEX mit Tumorzellen	human	<i>in vitro</i>	Induktion von Apoptose
Melanom [50]	Inkubation TEX mit DCs	human und Maus	<i>in vitro</i>	Tranfer Tumorantigen auf DCs gefolgt von einem CTL-abhängigen anti-tumor Effekt
Myelom [62]	HSP70-exprimierende TEX; Inkubation HSP70-TEX mit DC	Maus	<i>in vitro + in vivo</i>	CTL-anti-tumor Antwort, NK-Zell anti-tumor Antwort
Lymphom [55]	Superantigen-exprimierende TEX; Vakzinierung	Maus	<i>in vitro + in vivo</i>	Inhibierung Tumorwachstum, AG-spezifische Zytokinsekretion von T-Zellen, Aktivierung von CD4+ und CD8+ T-Zellen
Fibrosarkom [63]	Tumor-AG exprimierende TEX, Vakzinierung	Maus	<i>in vivo</i>	Immunantwort besser bei AG-Expression auf TEX als lösliches AG
Leukämie [64]	Vakzinierung mit TEX <i>in vivo</i>	Maus	<i>in vitro + in vivo</i>	Inhibierung Tumorwachstum, CTL induzierte Tumorzelllyse
Lymphom [65]	Vakzinierung mit TEX und HS-TEX <i>in vivo</i>	Maus	<i>in vitro + in vivo</i>	HS-TEX besser als TEX, Immunantwort hauptsächlich durch CTL
Kolonkarzinom/Melanom [66]	Inkubation HS-TEX mit DCs	Maus	<i>in vitro + in vivo</i>	Th1-Immunantwort
Kolonkarzinom [67]	Expression humanes AG durch murine TEX	Human und Maus	<i>in vitro + in vivo</i>	Stimulation von Immunzellen; Inhibierung Tumorwachstum

**Tabelle 2-3: TEX verwendende *in vitro* und *in vivo* Studien.** Abkürzungen: DC – Dendritische Zellen; CTL – zytotoxische Lymphozyten; AG – Antigen; HS – *heat shock*

## 2.2 Das Immunsystem

Der menschliche Organismus ist jeden Tag einer Vielzahl von Pathogenen wie Bakterien, Pilzen, Viren sowie entarteten Zellen ausgesetzt. Im Laufe der Evolution hat sich das hoch komplexe Immunsystem entwickelt, um den Schutz vor diesen Gefahren gewährleisten zu können. Das Immunsystem wird in zwei miteinander vernetzte Teile, das angeborene und das adaptive Immunsystem unterteilt. Die angeborene Immunantwort ist die erste und schnell einsetzende Verteidigungsfront des Organismus. Sie besteht aus den natürlichen Barrieren, die das Eindringen von Pathogenen erschweren (z.B. die Haut), aus zellulären Bestandteilen (z.B. Natürliche Killer (NK) -Zellen, Makrophagen) und dem Komplementsystem. Das angeborene Immunsystem ist die Voraussetzung, um eine Antwort des adaptiven Immunsystems zu initiieren. Diese findet zeitlich verzögert nach der angeborenen Immunantwort statt und besteht vor allem aus einer hoch spezifischen Aktivierung von B- und T-Zellen gegen das eingedrungene Pathogen. Die Kommunikation und die Interaktion von beiden Systemen ist eine Voraussetzung für ein funktionierendes Immunsystem<sup>68,69</sup>.

Im Mittelpunkt des angeborenen Immunsystems steht die Erkennung von pathogenen Strukturen, die nicht im natürlichen Mikromilieu des Organismus vorkommen und damit als fremd eingeordnet werden<sup>68,69</sup>. Bei diesen Motiven handelt es sich um hoch konservierte Strukturen von Pathogenen, so genannte *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), wie z.B. spezielle Zellwandbestandteile, Nukleinsäurestrukturen oder mikrobielle Membranen. Die Erkennung der PAMPs erfolgt über evolutionär hoch konservierten, keimbahnkodierten Rezeptoren, den *pattern-recognition receptors* (PRRs). Die Aktivierung der PRRs der verschiedensten Zelltypen führt zur intrazellulären Signalverarbeitung, Opsonierung, Chemotaxis und Endozytose<sup>70</sup>. Die zellulären Mediatoren der angeborenen Immunantwort sind Makrophagen, dendritische Zellen, Neutrophile und NK-Zellen, die zum Ort der Infektion wandern. Makrophagen kommen auch in gesunden Geweben vor und können über die Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen, die Anwesenheit von Pathogenen signalisieren<sup>1</sup>. Neutrophile zeichnen sich durch ihre direkte Effektorfunktion gegenüber den Pathogenen durch anti-mikrobielle Proteine und proteolytischen Enzyme aus<sup>1</sup>. Apoptose-induzierende Proteine können auch von NK-Zellen sezerniert werden. Die angeborene Immunantwort verfolgt dabei das Ziel, die erste Bekämpfung der Pathogene vorzunehmen, das adaptive Immunsystem zu initialisieren und die Zeit bis zu dessen voller

---

Funktionsfähigkeit zu überbrücken. Der bedeutenste Zelltyp im Zusammenspiel des angeborenen und adaptiven Immunsystems ist die dendritische Zelle (DC). Sie kann durch Makropinozytose Pathogene in sich aufnehmen und degradiert diese in Proteinfragmente, welche sie über *major histocompatibility complex* (MHC)-Moleküle als Antigene an der Oberfläche präsentieren kann. Die Effektoren des adaptiven Immunsystems – T- und B-Zellen – zeichnen sich durch die Expression von somatisch rekombinierten Antigen-spezifischen Rezeptoren aus<sup>71</sup>. Die Ausübung ihrer Funktion besteht in einem zweistufigen Prozess, der in der ersten Instanz die Erkennung von Antigen im Kontext eines MHC-Moleküls voraussetzt. Dies führt zur Aktivierung und Differenzierung der naiven T- oder B-Zellen und mündet in einer zweiten Stufe in der Ausübung ihrer Effektorfunktion als zytotoxische T-Zelle oder Antikörper-sezernierende B-Zelle<sup>72</sup>.

### **2.2.1 Rezeptoren des angeborenen Immunsystems**

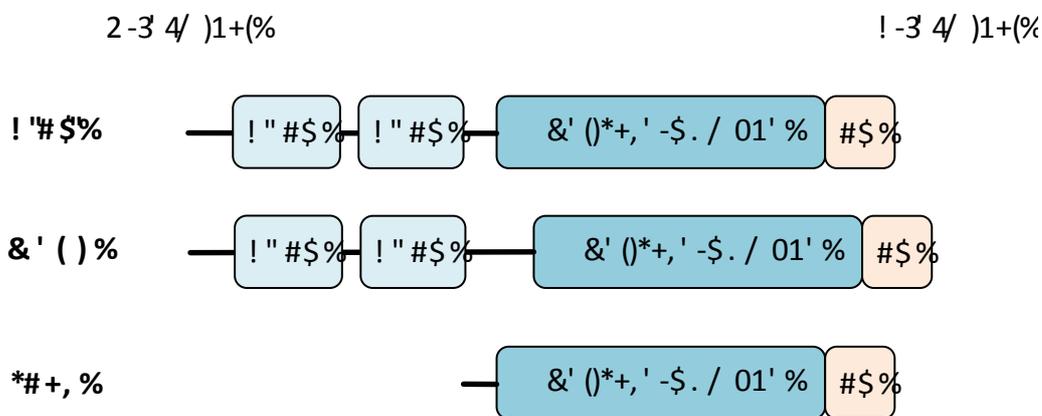
Das angeborene Immunsystem hat die Aufgabe, alle eindringenden Substanzen und Pathogene auf eine Bedrohung für den Organismus zu überprüfen. Diese Überprüfung der eindringenden Pathogene/Substanzen wird anhand ihrer PAMPs durch ein Repertoire an hoch konservierter Rezeptoren (PRRs) durchgeführt, die 1989 von Janeway erstmals postuliert und erstmalig 1997 bewiesen wurden<sup>68,69</sup>. Die PRRs weisen eine unterschiedliche Verteilung entsprechend ihrer Funktion auf. Am deutlichsten wird dies an der Gruppe der *Toll-like receptors* (TLRs), wobei TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6 und TLR11 an der Zelloberfläche zu finden sind und TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und Endolysosom lokalisiert sind<sup>73</sup>. Ihre zelluläre Verteilung ist maßgeblich für die Erkennung der verschiedenen PAMPs verantwortlich. TLRs an der Zelloberfläche erkennen hauptsächlich Lipide, Lipoproteine und Proteine von Mikroben und im Gegensatz dazu detektieren die intrazellulären TLRs vor allem fremdartige Nukleinsäuren von z.B. Viren<sup>74,75</sup>. Ebenfalls ein membranständige PRR ist der Scavenger- Rezeptor, der die Diskriminierung von polyanionischen Liganden bakterieller Herkunft vermittelt<sup>76</sup>. Für die Detektion von viralen, bakteriellen und fungiziden Bestandteilen wie Mannose, Fucose und Glucanen sind die C-Typ Lektin Rezeptoren verantwortlich<sup>77</sup>. Der in löslicher Form vorkommende Mannose-Rezeptor vermittelt die Erkennung von Sacchariden sowie Zellwandbestandteilen von Bakterien<sup>78</sup>.

Die beschriebenen Rezeptoren ermöglichen nur die Erkennung von Pathogenen die sich an der Zelloberfläche oder im Lumen von intrazellulären Vesikeln auftreten. Doch auch das Zytosol ermöglicht die Erkennung von eindringenden Pathogen über die Familie der *retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-I) like receptors (RLRs)* und die Familie der *nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)- like receptors (NLRs)*. RLRs erkennen zytosolische RNA-Strukturen, die von Viren stammen<sup>79-84</sup>. Die große Familie der NLRs erkennt bakterielle Zellprodukte aber auch organische und anorganische Kristalle<sup>79,85,86</sup>. Für die Detektion von zytosolischer DNA viralen oder bakteriellen Ursprungs sind diverse Rezeptoren beschrieben, doch eine endgültige Identifikation eines DNA-erkennenden Rezeptors ist bislang nicht gelungen<sup>87-91</sup>.

### **2.2.2 RIG-like receptors**

Die Familie der *RIG-I like receptors* besteht aus den drei Rezeptoren RIG-I, MDA5 (*melanoma differentiation-associated gene 5*) und LGP2 (*laboratory of genetics and physiology 2*), die für die Erkennung der Nukleinsäure vom ins Zytosol eingedrungen Viren zuständig sind<sup>92</sup>. Die Replikation vieler RNA Viren findet im Zytosol der Zelle statt. Daher haben sich die RLRs im Laufe der Evolution spezialisiert, Viren anhand ihrer Nukleinsäuren zu erkennen. Während der Virusreplikation im Zytosol treten virale Nukleinsäuren mit körperfremden Eigenschaften auf. Diese werden von den RLRs erkannt. Eine Besonderheit der RLRs im Gegensatz zu den TLRs ist ihre Expression im Organismus: während die TLR vor allem in spezialisierten Immunzellen exprimiert werden, kommen RIG-I und MDA5 in nahezu allen Körperzellen vor. Die Rezeptoren MDA5 und RIG-I zeichnen sich durch eine sehr ähnliche Rezeptorstruktur aus. Sie besitzen zwei *caspase recruiting domain (CARD) like domains* am N-terminus, die für die Initialisierung der Signaltransduktion essentiell sind, sowie einer *repressor domain (RD)* am C-terminus. Die RD ist für die Inhibierung der Signalweitergabe verantwortlich, wenn keine Virusinfektion in der Zelle vorliegt<sup>93</sup>. Außerdem vermittelt sie die Spezifität in der RNA-Erkennung, - Bindung und ATPase Aktivierung<sup>94-97</sup>. Zwischen den CARD-Domänen und der RD ist die DExD/H-Box Helikasedomäne lokalisiert, die ein ATP-Bindemotiv aufweist. Die Bedeutung und Funktion ist bisher nicht eindeutig geklärt<sup>98,99</sup>. Grundsätzlich unterscheidet sich LGP2 von RIG-I und MDA5 durch das Fehlen der beiden CARD-Domänen (Abbildung 2-3). Daraus ergibt sich, dass LGP2 keine direkte Signaltransduktion durchführen kann. Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die RD von LGP2 an die RD von RIG-I binden kann und deutet

damit die Rolle von LGP2 als negativer RIG-I Regulator an. Dadurch wird die Autoaktivierung von RIG-I in Abwesenheit von Virusinfektionen verhindert<sup>83,100</sup>. Im Gegensatz dazu stehen *in vivo* Ergebnisse, die einen positiven Effekt von LGP2 auf die IFN-Produktion nach Viruserkennung durch RIG-I oder MDA5 zeigen<sup>101</sup>. Für die Erkennung der viralen Infektionen von z.B. Vesicular stomatitis Virus<sup>102,103</sup> und Influenza-A<sup>104,105</sup> ist RIG-I verantwortlich, MDA5 hingegen für Picornaviren (z.B. Encephalomyocarditis Virus, EMCV)<sup>82</sup>. Dabei erfolgt die Diskriminierung zwischen viraler und körpereigener RNA über Strukturelemente der RNA. Für RIG-I konnte dafür ein Triphosphatmotiv (3p), welches bei der Replikation von Viren am 5'-Ende entsteht, identifiziert werden<sup>80,84</sup>. In den folgenden Jahren konnte eine genauere Beschreibung durch synthetisch hergestellte RIG-I Liganden nach Vorbild der Viren auf eine doppelsträngige 3pRNA mit einer Mindestlänge von 19 Nukleotiden und einer *blunt-end* Konformation am 5'-Ende der 3p-Gruppe gegeben werden<sup>106-108</sup>. Neben der Interaktionsbeschreibung zwischen RNA und dem Rezeptor MDA5 ist die genaue Motiveingrenzung für MDA5 bisher nicht gelungen<sup>109-111</sup>. Es gibt Hinweise, dass MDA5 für die Erkennung höherer Struktur motive verantwortlich ist, aber eine eindeutige Definition des MDA5 Liganden ist ausstehend<sup>112</sup>.



**Abbildung 2-3: Die Familie der RIG-I like Rezeptoren.** Zu den RLRs zählen RIG-I, MDA5 und LGP2. RIG-I und MDA5 besitzen N-terminal zwei CARD-Domänen, die für die Signalweiterleitung essentiell sind. Es schließt sich die DExD/H-Box Helikasedomäne und die N-terminale RD an. LGP2 zeichnet sich durch das Fehlen der CARD Domänen aus. CARD = *caspase recruiting domain*; RD = *repressor domain*

### 2.2.2.1 Signalkaskade und Effektormechanismen einer RIG-I Aktivierung

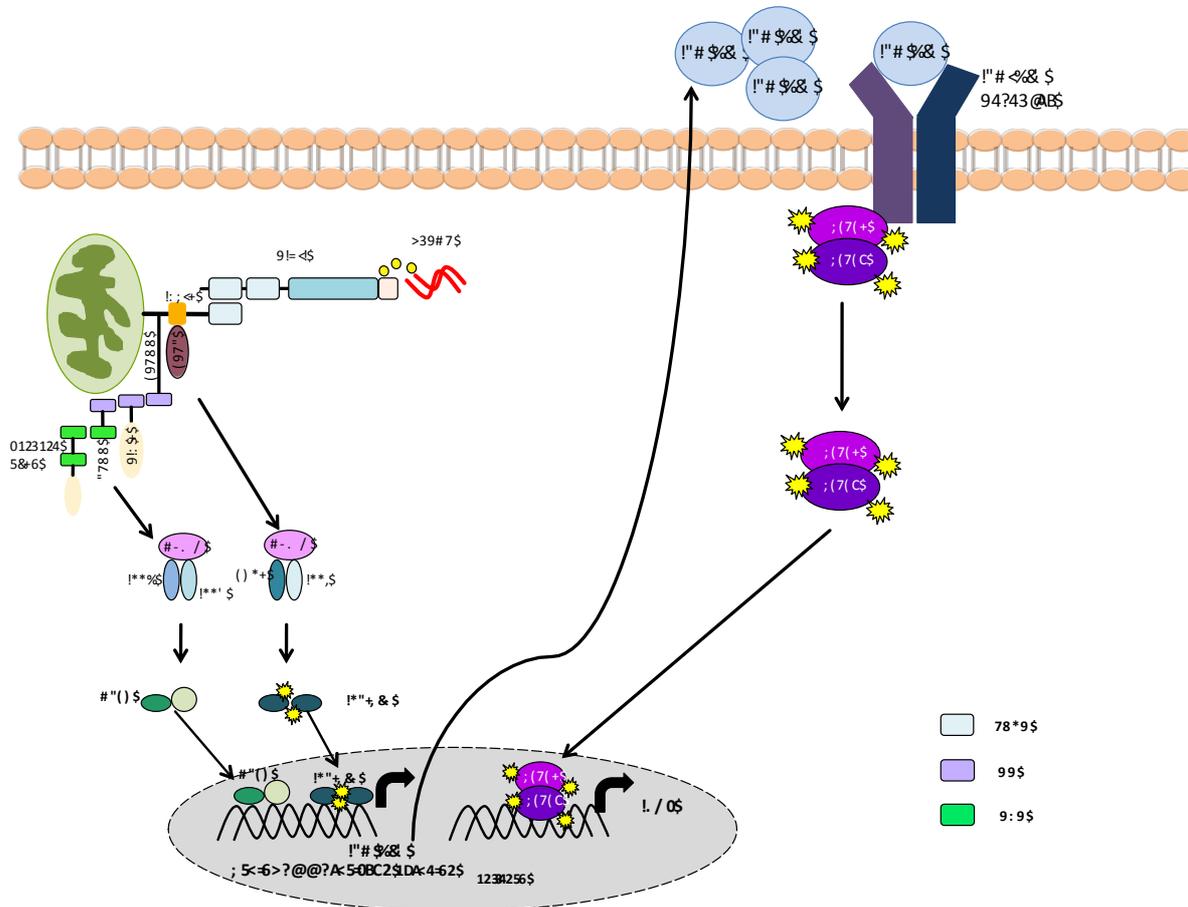
#### 2.2.2.1.1 Signalkaskade der RIG-I Aktivierung

Die Bindung der aktivierenden RNA-Spezies an RIG-I löst eine Vielzahl an Prozessen innerhalb einer Zelle aus, die alle dazu beitragen, eine adäquate Immunantwort gegen das Virus auszulösen. Das initiale Ereignis in der RIG-I vermittelten Signaltransduktion ist die Translokation der CARD-Domänen zu ihrem mitochondrial assoziierten Adapterprotein IFN- $\beta$ -*promoter stimulator 1* (IPS-1) (oder auch MAVS, VISA, Cardif)<sup>113-116</sup>. IPS-1 kann sowohl über die TRADD-FADD-Caspase 8/10 vermittelte Translokation von NF $\kappa$ B in den Nukleus zu einer pro-inflammatorischen Antwort führen<sup>117 118</sup> als auch über die Aktivierung der IKK-Kinasen TBK1/IKKi, zur Aktivierung von IRF3/IRF7 führen (Abbildung 2-4, links) und die Transkription von Typ I Interferonen über TRAF3 anstoßen<sup>1</sup>.

#### 2.2.2.1.2 Die inflammatorische Antwort als Effektormechanismus

Die Aktivierung von RIG-I dirigiert eine inflammatorische Antwort, die v.a. von pro-inflammatorischen Zytokinen, Chemokinen, Typ I IFN induzierten Genen und der Modelierung des RIG-I Signalings getragen wird. Typ I IFN (IFN $\alpha$ -Familie und IFN $\beta$ ) spielt in der anti-viralen Immunantwort eine zentrale Rolle<sup>119</sup>. Mit ihren parakrinen und autokrinen Eigenschaften schaffen die Typ I Interferone einen anti-viralen Zustand<sup>120</sup>. Das sezernierte Typ I IFN bindet an den IFN-Rezeptor und initiiert die Transkription von Interferon-abhängigen Genen (ISG) (z.B. RIG-I, PKR, OAS) (Abbildung 2-4, rechts). Die Induktion von ISGs zusammen mit den Typ I IFN versetzt sowohl gesunde als auch infizierte Zellen in einen anti-viralen Status mittels Modulation von zellulären Prozessen<sup>121</sup> (z.B. Inhibierung der Virusreplikation, Induktion von Apoptose in virusinfizierten Zellen, verstärkte Aktivierung von NK-Zellen, Aufregulation von MHC I Molekülen von T-Zellen zur verbesserten Antigenerkennung sowie die Modulation weiterer Arme des adaptiven Immunsystems<sup>122</sup>). Bei den pro-inflammatorischen Zytokinen handelt es sich um Proteine mit diversen Funktionen, wie z.B. TNF $\alpha$  und IL-6. Sie sind an der Initialisierung und Koordinierung der Immunreaktion, der Rekrutierung und Aktivierung von professionellen Immunzellen (z.B. Makrophagen und dendritische Zellen), der Destruktion von inflammatorischen Geweben und an der Permeabilität von Blutgefäßen beteiligt<sup>79,123</sup>. Eine ähnliche Funktion besitzen

Chemokine, wie z.B. CXCL10, welches durch RIG-I Aktivierung von Tumorzellen sezerniert wird<sup>124</sup>.



**Abbildung 2-4: Übersicht des RIG-I Signalweges.** Die Aktivierung von RIG-I durch den Liganden 3pRNA führt zur Interaktion der RIG-I CARD mit der CARD von IPS-1 und initialisiert die Signalkaskade. Über die Interaktion von IPS-1 mit TRADD-FADD-Caspase 8/10 transloziert NFκB in den Zellkern und führt zur Expression von proinflammatorischen Zytokinen. Über die Interaktion zwischen IPS-1-IKKi/TBK1-TRAF kann eine Aktivierung von IRF-3/7 erfolgen und die Transkription von Typ I IFN (IFNα, IFNβ) induzieren. Typ I IFN können nun in einer autokrinen oder parakrinen Wirkung durch die Bindung an den IFN-Rezeptor über die STAT1/2 vermittelte Signalweitergabe die Induktion von ISGs bewirken. CARD = *caspase recruiting domain*, DD = *death domain*, DED = *death effector domain*. Modifiziert nach <sup>125,126</sup>

### 2.2.2.1.3 Apoptose und Nekroptose als mögliche Effektormechanismen einer RIG-I Aktivierung

Zellen können sowohl durch Apoptose als auch durch Nekrose sterben. Bei der Apoptose können zwei grundlegende Initiatorsignalkaskaden unterschieden werden. Der extrinsische Weg wird durch *death-receptors* (z.B. TRAIL-Rezeptor, TNF-Rezeptor) wie in 2.2.4.3 beschrieben ausgelöst. Der intrinsische Weg wird unter Beteiligung der Mitochondrien und

der Formierung des Apoptosoms, das aus Apaf-1 und Procaspase 9 besteht, initiiert. Das Apoptosom bewirkt im Anschluss die Aktivierung der Caspasen-Kaskade, die zum apoptotischen Tod der Zelle führt<sup>127</sup>. Die Aktivierung von RIG-I durch seinen Liganden 3pRNA löst den intrinsischen Apoptoseweg mit Beteiligung von Caspase 9 und Apaf-1 aus. Dieser ist in Melanomzellen unabhängig von p53 und wird durch die pro-apoptotischen Proteine NOXA und PUMA induziert. Bemerkenswerterweise sind dabei Melanomzellen anfälliger als nicht-maligne Melanozyten. In diesen wurde die 3pRNA abhängige Apoptoseinduktion durch erhöhte Expression eines Überleben-fördernden Proteins (Bcl-xL) verhindert<sup>128</sup>. Diese tumorspezifische Apoptoseinduktion durch 3pRNA konnte *in vitro* für Glioblastom- und Ovarialkarzinomzellen bestätigt werden<sup>124,128,129</sup>.

Unter dem Prozess der Nekrose verstand man ursprünglich einen unkoordinierten Prozess des Zelluntergangs, der durch eine typische Morphologie der Zellen beschrieben werden konnte<sup>130</sup>. Die Gruppe um Jürg Tschopp beschrieb bereits 2000 einen Caspasen-Kaskaden unabhängigen Zelltod, der das Protein RIP involvierte<sup>131</sup>. Mittlerweile ist akzeptiert, dass der durch die Kinasen RIP1 und RIP3 induzierte Zelltod als Nekroptose bezeichnet wird<sup>132</sup>. Die Nekroptose kann durch den spezifischen RIP1 Inhibitor Necrostatin-1 blockiert und damit nachgewiesen werden<sup>133</sup>. Für eine Vielzahl an Stimuli wurde die Induktion von Nekroptose beschrieben. Neben der Induktion durch Zytokine bzw. spezifischen Rezeptorliganden (TNF, FasL, TRAIL) konnte eine Induktion von Nekroptose auch für diverse Pathogene (West-Nil-Virus, Vaccinia-Virus) und PAMPs (z.B. TLR3 und 4) gezeigt werden<sup>131,134-139</sup>. Der RIG-I Signaltransduktionskomplex beinhaltet mit RIP1, FADD und TRADD wichtige Proteine der Nekroptose<sup>118,140</sup>. Ob die Aktivierung von RIG-I zur Nekroptose führt ist aber bisher nicht untersucht worden.

### **2.2.3 RIG-I in der Immuntherapie von Tumoren**

Das Immunsystem hat die Fähigkeit entartete Zellen zu erkennen und zu eliminieren. Diese Fähigkeit des Immunsystems wird vor allem durch T- und B- Zellen, NK-Zellen, dendritische Zellen und Makrophagen, die für die Erkennung, Eliminierung und Aufrechterhaltung des status quo verantwortlich sind, getragen. Trotzdem können Tumore der Erkennung durch das Immunsystem entkommen<sup>141,142</sup>. Das Immunsystem so zu beeinflussen, dass es Tumorzellen erkennt und beseitigt, ist Ziel der Immuntherapie. Man unterscheidet dabei die spezifische Aktivierung des adaptiven Immunsystems gegenüber dem Tumor oder die

---

Versetzung des Immunsystems in einen Alarmzustand durch die Aktivierung des angeborenen Immunsystems<sup>143</sup>.

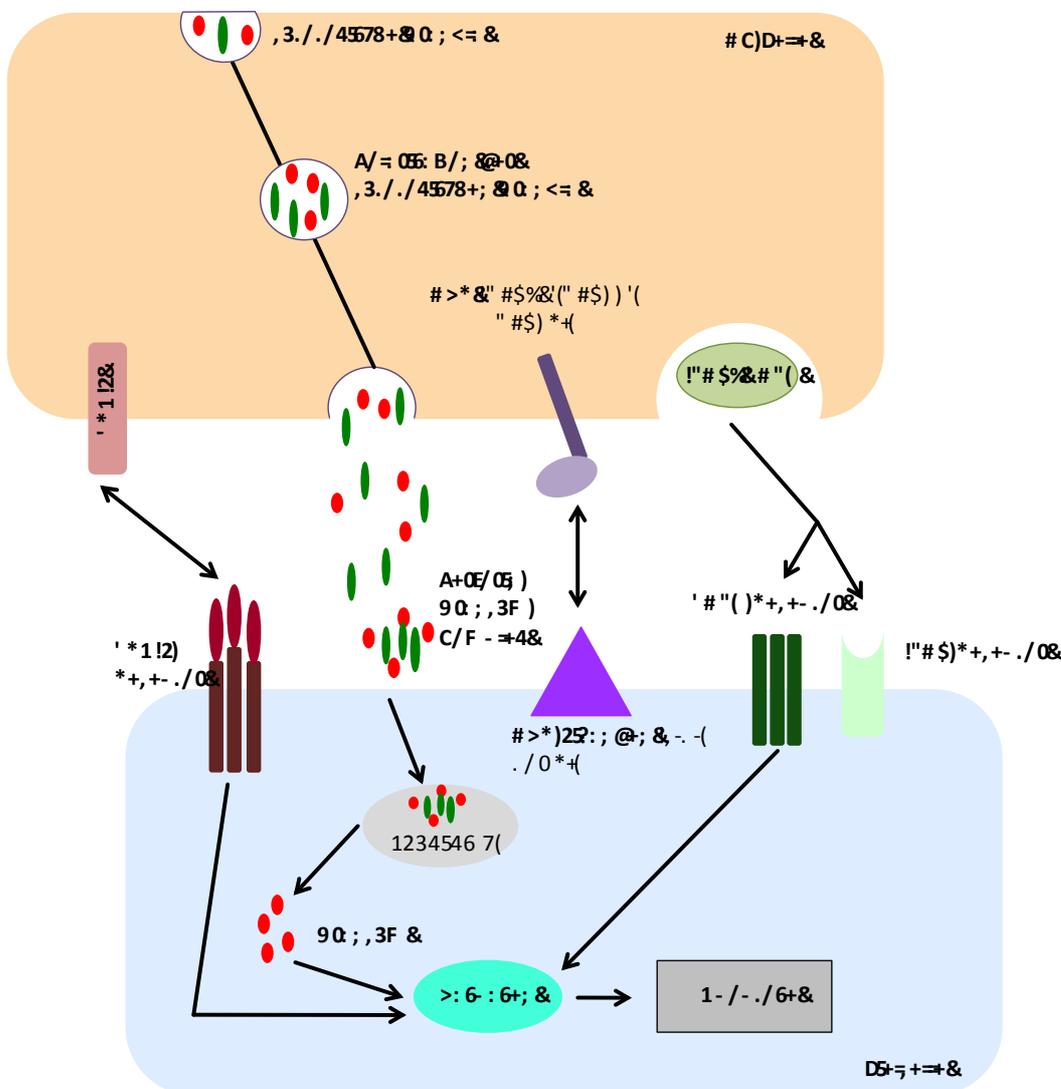
Der Alarmzustand des angeborenen Immunsystems, gekennzeichnet durch die Aktivierung von Immunzellen und löslichen Mediatoren (z.B. Zytokine, Interferone), kann das Tumormikromilieu beeinflussen. Die anti-tumoralen Effekte von bestimmten Zytokinen werden therapeutisch genutzt. Rekombinante Zytokine wie Typ I IFN oder IL-2 sind z.B. im malignen Melanom eine zugelassene Therapie. Sie haben jedoch ein Nebenwirkungsprofil, das oft den Abbruch der Therapie bedingt<sup>144,145</sup>. Die Aktivierung von Rezeptoren des angeborenen Immunsystems wie z.B. der TLRs, ist eine seit vielen Jahren bekannte Variante, um DC-Reifung, Proliferation von T-Zellen und den Einfluss von regulatorischen T-Zellen zu koordinieren<sup>146,147</sup>. Dabei befinden sich Liganden des TLR9 in der späten klinischen Erprobung. Die Nutzung dieser Liganden ist in der Anwendung sehr sicher, zeigt aber anders als in der Anwendung als Vakzin-Adjuvant bisher keine überzeugenden therapeutischen Effekte bei malignen Erkrankungen<sup>148,149,150</sup>.

Anders als TLR9 wird der Rezeptor RIG-I nicht nur in spezialisierten Immunzellen sondern in Immunzellen und Nicht-Immunzellen, einschließlich Tumorzellen, exprimiert. Wie unter 2.2.2.1.3 beschrieben, induziert RIG-I anders als TLR9 spezifisch Apoptose in malignen Zellen von verschiedenen Tumorentitäten<sup>128,129,151,152</sup>. In ersten *in vivo* Versuchen für die Therapie des Melanoms im Mausmodell zeigte sich ein deutlicher therapeutischer Effekt. Die Applikation des RIG-I Liganden 3pRNA führte zur Regression von Lungenmetastasen in Abhängigkeit von NK-Zellen und Typ I IFN.

#### **2.2.4 Die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und ihr zytotoxisches Verhalten**

NK-Zellen sind große granuläre Lymphozyten, die dem angeborenen Immunsystems zugerechnet werden<sup>153</sup>. Im Vergleich zu T-Zellen besitzen sie nur ein limitiertes Repertoire an Keimbahn kodierten Rezeptoren, welche nicht durch somatische Rekombination beeinflusst werden<sup>154</sup>. Ähnlich zu CD8+ T-Zellen ist jedoch ihre Fähigkeit, andere Zellen durch die Exozytose von Vesikeln, die mit lytischen Proteinen (z.B. Perforin, Granzym, Fas-Ligand) beladen sind, abzutöten indem die lytischen Proteine direkt die Apoptosekaskade in der Zielzelle aktivieren<sup>155</sup> (Abbildung 2-5). Dieser Prozess wird durch aktivierende und inhibitorische NK-Zell-Rezeptoren reguliert. Daneben können NK-Zellen direkt über *death-*

*domain-receptors* Zielzellen attackieren.  $TNF\alpha$ , *Fas-cell surface death receptor* (Fas) und *TNF-related apoptosis inducing ligand* (TRAIL) führen durch die Bindung an ihren entsprechenden *death-domain-receptor* zur Apoptose in der Zielzelle (Abbildung 2-5). NK-Zellen stellen damit eine erste wichtige Verteidigungslinie gegen intrazelluläre Infektionen (z.B. Herpesvirusinfektionen) und gegenüber einigen Arten von Tumoren dar<sup>156</sup>. Daneben sind NK-Zellen wichtige Produzenten des proinflammatorischen Zytokins  $TNF\alpha$  und des Immunantwort modulierenden  $IFN\gamma$ . Zusätzlich werden IL-5, IL-10, IL-13 und GM-CSF von ihnen gebildet, die zur Rekrutierung von Immunzellen beitragen. Durch diese Eigenschaften sind NK-Zellen nicht nur Effektorzellen des angeborenen Immunsystems, sondern können das angeborene wie das adaptive Immunsystem modulieren<sup>157-159</sup>.



**Abbildung 2-5: Schematische Darstellung der Interaktion einer NK-Zelle mit einer Zielzelle.** Die Interaktion zwischen einer NK-Zelle und einer Zielzelle kann zum Zelltod der Zielzelle durch die zytotoxische NK-Zelle führen. Die Ausübung zytotoxischer Aktivität einer NK-Zelle gegenüber einer potentiellen Zielzelle beginnt mit

der Aktivierung eines aktivierenden NK-Rezeptors (z.B. *natural cytotoxicity receptors*, NCR) durch die Erkennung des entsprechenden Liganden auf der Zielzelle. Diese Interaktion führt zur Polarisation der zytotoxischen Granula, die mit zytotoxischen Proteinen wie Granzym und Perforin gefüllt sind, in Richtung der immunologischen Synapse. Die Verschmelzung der Granula führt zur Sekretion des lytischen Inhalts und kann durch Aufnahme von der Zielzelle zu einer direkten Caspasen-Aktivierung und damit zum Zelltod der Zielzelle führen. Daneben kann in der NK-Zelle durch die Aktivierung der aktivierenden Rezeptoren die Bildung von Zytokinen (z.B. TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$ ) initiiert werden. Im Weiteren zeichnet sich das zytotoxische Potential einer NK-Zelle auch durch die Expression von Liganden der TNF-Superfamilie aus. Dazu gehören u.a. TRAIL und TNF $\alpha$ , die durch die Bindung an ihre entsprechenden *death-domain* Rezeptoren auf der Zielzelle (TRAIL-Rezeptor, TNF-Rezeptor) den Tod der Zielzelle durch die Aktivierung der Caspasen-Kaskade auslösen können.

#### 2.2.4.1 Aktivierende und Inhibierende Rezeptoren von NK-Zellen

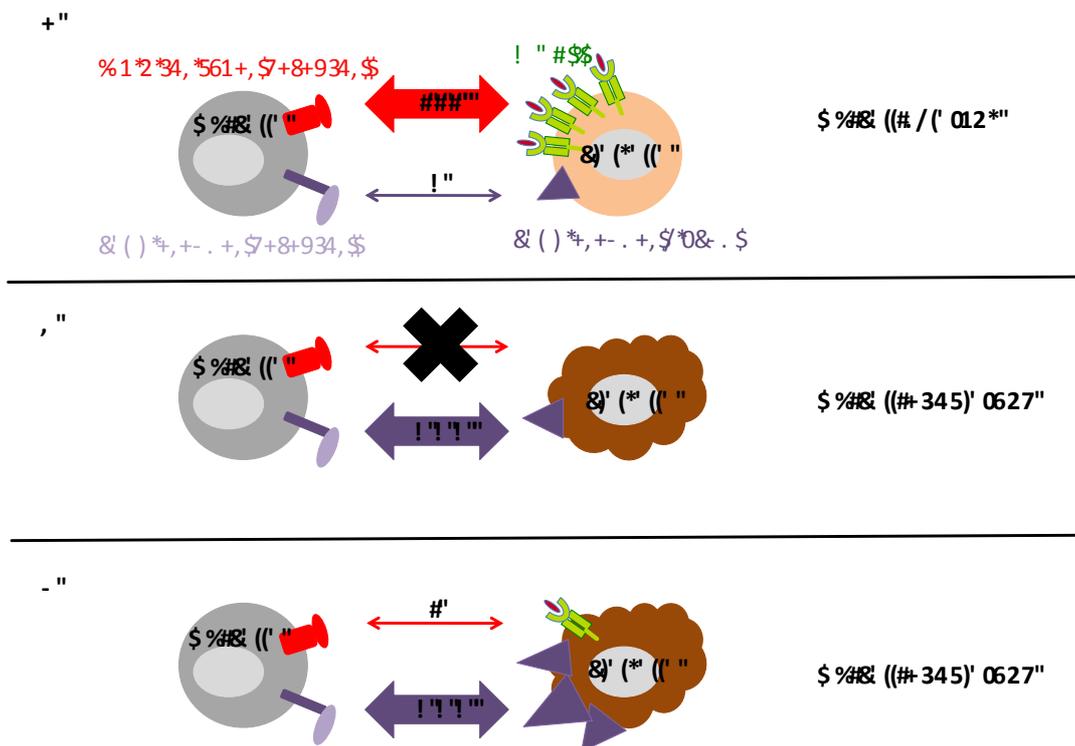
Es wurde vermutet, dass NK-Zellen körpereigene gesunde von veränderten kranken Zellen durch das Fehlen von MHC-Molekülen über ihre inhibitorischen Rezeptoren unterscheiden können (so genannte „*missing-self*“ Hypothese). In den folgenden Jahren konnte man aber zeigen, dass NK-Zellen auch Zellen mit sehr hoher MHC-Expression lysieren und zog die Schlussfolgerung, dass diese Zellen weitere aktivierende Faktoren zur NK-Zell-Aktivierung tragen müssen. Zusätzlich kann die Anwesenheit von körperfremden pathogenen Strukturen in eine NK-Zell-Aktivierung münden. Zusammenfassend stellt die NK-Aktivierung eine Verrechnung von Signale dar, die die NK-Zelle von ihren inhibitorischen und aktivierenden Rezeptoren erhält (Abbildung 2-6). Das so ermittelte Netto-Signal entscheidet ob die Zielzelle lysiert wird oder nicht<sup>160-162</sup>. Der molekulare Mechanismus, der die Verrechnung der positiven und negativen Signale vornimmt, ist bisher nicht bekannt.

Für die Ausübung ihrer zytotoxischen Aktivität erhalten NK-Zellen aktivierende Signale durch den Kontakt mit ihrer Zielzelle, die sie über die aktivierenden Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche aufnehmen (Abbildung 2-6, B und C). Im Vergleich zu den nicht aktivierenden inhibitorischen Rezeptoren werden die aktivierenden Rezeptoren von allen NK-Zellen exprimiert.

Eine Gruppe der aktivierenden Rezeptoren stellen die *natural cytotoxicity receptors* (NCR) dar. Sie wurden aufgrund ihres natürlichen Zytotoxizitätsverhalten gegenüber Tumorzellen identifiziert<sup>163</sup>. Zu den NCRs zählen NKp30, NKp44 und NKp46. Die NCRs zeigen ein gemeinsames Verhalten in der direkten oder indirekten Erkennung von pathogen-assoziierten Strukturen. NKp46 erkennt Vaccinia-Virus infizierte Zellen im Zusammenspiel mit NKp30 und NKp44<sup>164</sup>. Für NKp44 konnte neben der Interaktion mit Bakterien auch eine Erkennung von West-Nil- und Dengue-Virus infizierten Zellen nachgewiesen werden<sup>165,166</sup>. Für NKp30 sind auch nicht pathogen-assoziierte Liganden beschrieben. Der Ligand B7-H6

wird ausschließlich auf verschiedenen Tumorzellen exprimiert (z.B. Lymphom, Melanom) und wird direkt von NKp30 erkannt<sup>167,168</sup>. Das intrazelluläre Protein BAG6, welches in Prozessen der Apoptose und des Stress des Endoplasmatischen Retikulums (ER) beschrieben ist, kann durch Verlagerung auf Exosomen zu einem Liganden für NKp30 werden<sup>169,170</sup>. Weitere aktivierende Rezeptoren sind u.a. NKG2D, CD2, 2B4 und DNAM-1. Die Liganden (MIC A/B sowie ULBP1-3) für den aktivierenden Rezeptor NKG2D können durch DNA-Schäden induziert werden und sind häufig auf Tumorzellen sowie virusinfizierten Zellen zu finden<sup>171</sup>. DNAM-1 kann durch die Erkennung von PVR oder Nectin-2 zu einer gesteigerten Zytotoxizität und Zytokinsekretion in Kooperation mit anderen aktivierenden Rezeptoren beitragen<sup>172</sup>.

Die Vermittlung der Toleranz gegenüber dem Selbst wird durch inhibitorische NK-Zell-Rezeptoren gewährleistet. Die NK-Zell-Aktivität wird neben den Signalen aus den aktivierenden Rezeptoren zusätzlich durch die spezifische Erkennung von verschiedenen MHC I Allelen über die inhibitorischen Rezeptoren reguliert<sup>173</sup>. Für die Erkennung der klassischen MHC I Allele (HLA A,B,C) sind die *killer cell immunoglobulin-like* Rezeptoren (KIR) verantwortlich<sup>154</sup>. HLA E, ein nicht klassisches MHC I Allel, kann über den inhibitorischen Rezeptorkomplex von CD94 und NKG2A erkannt werden<sup>174,175</sup>. Das inhibitorische Signal, welches NK-Zellen durch die Erkennung von körpereigenen MHC I Allelen erhalten ist ausreichend, um sie in einen inaktiven Zustand zu versetzen (Abbildung 2-6, A). Trotzdem sind weitere inhibitorische Rezeptoren, wie z.B. KLRG1, LAIR-1, Singlec-7 und 9 und IRp60 beschrieben<sup>176,177,178,179-181</sup>.



**Abbildung 2-6: Die Regulation der NK-Zellaktivierung durch aktivierende und inhibierende Signale.** NK-Zellen interagieren mit Zielzellen durch ein breites Spektrum an aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren. Die Verrechnung dieser Signale bestimmt die Aktivierung oder Toleranz der NK-Zelle gegenüber der Zielzelle. (A) Interagiert die NK-Zelle mit einer gesunden Körperzelle, werden die inhibitorischen Rezeptoren durch die Expression von MHC I Molekülen auf der Zielzelle stark aktiviert und führen zur Toleranz. (B) Die Interaktion mit einer veränderten Zelle, die z.B. durch den Prozess der Transformation keine MHC I Moleküle mehr exprimiert, kann den inhibitorischen Rezeptor nicht aktivieren. Das Signal, welches durch den aktivierenden Rezeptor aufgenommen wird, überwiegt und aktiviert die NK-Zelle. (C) Gestresste Körperzellen regulieren Liganden für aktivierende NK-Rezeptoren auf. Sollte dieses Signal das inhibitorische Signal durch ein MHC I Molekül überwiegen, wird die NK-Zelle aktiviert.

#### 2.2.4.2 Der Prozess der Zytotoxizität und Zytokinproduktion von NK-Zellen

Das erste notwendige Ereignis zur Ausübung der zytotoxischen Funktion von NK-Zellen ist die Aufnahme des Kontaktes mit der Zielzelle. Es ist beschrieben, dass die Interaktion von ICAM-1 auf der Zielzelle mit LFA-1 auf der NK-Zelle den Kontakt vermitteln kann<sup>182</sup>. Der nächste Schritt ist die Adhäsion an die Zielzelle gefolgt von der Ausbildung der immunologischen Synapse. Die Aufnahme des Kontaktes und die Adhäsion an die Zielzelle tragen gemeinsam zur Initiierung der Weiterleitung von Rezeptorsignalen bei<sup>183</sup>. Der folgende Prozess der Polarisation der zytotoxischen Granula ist entscheidend für die Ausübung der Zytotoxizität von zytotoxischen Zellen<sup>184</sup>. Dabei bildet sich als erstes die immunologische Synapse zwischen NK- und Zielzelle aus, die eine gerichtete Ausschüttung

der zytotoxischen Granula gewährleistet<sup>185</sup>. Der nächste Schritt ist die Polarisation der lytischen Granula in Richtung der immunologischen Synapse gefolgt von der Bindung an die Plasmamembran (Abbildung 2-5). Anschließend erfolgt die Fusion der lytischen Granula mit der Plasmamembran und ermöglichen die Ausschüttung der zytotoxischen Moleküle<sup>186</sup>. Die Degranulation, ein anderes Wort für die Ausschüttung der lytischen Granula, kann durch das Vorhandensein von Granzymen im Überstand oder von CD107a (*lysosomal membrane glycoprotein-1*) auf der Zelloberfläche von NK-Zellen detektiert werden. CD107a ist ein mit Perforin ko-lokalisierendes lysosomales Protein in den zytotoxischen Vesikeln, welches durch die Verschmelzung der Granula mit der Plasmamembran auf der Zelloberfläche erscheint<sup>187</sup>. Neben den degranulations-induzierenden Schritten gibt es andere bisher nicht vollkommen verstandene Signale, die zur Produktion und Sekretion von Zytokinen und Chemokinen führen. Zusammenfassend lässt sich aus den kontrollierten sequenziellen Aktivierungsschritten feststellen, dass nicht eine einzige Rezeptor-Ligand-Interaktion zur vollständigen Aktivierung von NK-Zellen ausreicht, sondern nur die Kombination und Verrechnung der Signale von inhibitorischen und aktivierenden NK-Rezeptoren (Abbildung 2-6). Dies verhindert eine unspezifische Tötung von Zellen.

#### 2.2.4.3 NK-Zellen und *death-domain*-Rezeptoren: Die Tumornekrosefaktor-Superfamilie

Die Eliminierung von veränderten Zellen stellt eine bedeutende Funktion von NK-Zellen dar. Neben der Diskriminierung von körpereigenen und körperfremden Zellen durch die NK-spezifischen aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren, können NK-Zellen auch Liganden für *death-domain* Rezeptoren tragen. Diese Liganden und die entsprechenden Rezeptoren gehören zur Tumornekrosefaktor (TNF)-Superfamilie, die insgesamt 19 Liganden und 29 Rezeptoren umfasst<sup>1</sup>. Die zur TNF-Superfamilie gehörenden Liganden der NK-Zelle sind v.a. Fas Ligand, TRAIL und TNF $\alpha$ . Dabei bindet Fas Ligand an Fas (CD95), für TRAIL sind 4 humane Rezeptoren beschrieben (DR4, DR5, DcR1 und DcR2) und TNF $\alpha$  an TNF-R1<sup>188</sup>. Die Aktivierung der Rezeptoren bedingt eine Aktivierung verschiedenster Transkriptionsfaktoren und/oder den Zelltod der Zelle. Nach Ligandenbindung führt die Trimerisierung des Rezeptors zur Clusterausbildung der intrazellulär-lokaliserten *death-domains* und initialisiert die Ausbildung des *death-inducing signaling complex* (DISC). Dieser Prozess führt zur Rekrutierung von FADD und mündet in der Bindung und Aktivierung von Caspase 8 und 10,

---

die anschließend durch die Spaltung von Pro-Caspase 3 den Zelltod einleitet<sup>188</sup> (Abbildung 2-5). Eine Besonderheit von TRAIL gegenüber den anderen Liganden ist die Selektivität bezüglich der Zielwahl. TRAIL besitzt die Eigenschaft, nur Tumorzellen zu attackieren und nicht transformierte Zellen nicht zu schädigen und unterdrückt so das Wachstum bestimmter Tumoren<sup>189,190</sup>.

#### 2.2.4.4 NK-Zellen und *Pattern-recognition receptors* (PRR) als neue Therapie des malignen Melanoms?

Das maligne Melanom zeigt eine steigende Inzidenz über die letzten Jahre<sup>191</sup>. Das Fehlende Ansprechen auf Radio- und Chemotherapie macht die Etablierung neuer Therapieansätze notwendig<sup>192,193</sup>. Dies ist in den letzten Jahren über den Braf Inhibitor Verumafenib und dem T-Zell Aktivator Ipilimumab gelungen. Jedoch kommt es nach einiger Behandlungsdauer zu Therapierezidiven, so dass ergänzende Therapieansätze notwendig sind. Die Expression von Tumorantigenen als auch von NK-aktivierenden Liganden im Melanom sollte eine ideale Voraussetzung für die Erkennung durch T- und NK-Zellen darstellen. Doch viele Tumoren haben Mechanismen entwickelt, um einer Erkennung durch T- und NK-Zellen zu entkommen. Dazu gehören die verringerte Expression von MHC I Molekülen und die Produktion von immunsuppressiven Molekülen, um nur zwei Beispiele der Immuntoleranz zu nennen<sup>194-196</sup>. Da die verringerte Expression von MHC I Molekülen eine gute Voraussetzung für eine NK-Zell-Aktivierung im Melanom darstellt, sind besonders NK-aktivierende Therapieansätze von Interesse<sup>197</sup>. NK-Zellen können durch PRR in einen aktiven Zustand versetzt werden. Für NK-Zellen ist beschrieben, dass sie TLRs und NODs exprimieren<sup>198-202</sup>. Eine funktionale Aktivierung wurde für TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 beschrieben<sup>198,199,203,204</sup>. Die Aktivierung der NK-Zellen durch diese TLRs kann abhängig von assoziierten Zellen (z.B. Monozyten, Dendritische Zellen) sein<sup>198,199,203</sup>. Desweiteren entscheidet der angesprochenen TLR, ob es zur Zytokininduktion (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ) und/oder zur Zytotoxizität der NK-Zelle gegenüber Tumorzellen kommt<sup>202</sup>. In einem murinen Melanom-Modell konnte für einen kombinierten TLR7/8 Agonisten eine gesteigerte NK-Zell-Zytotoxizität in Abhängigkeit von IFN $\gamma$  gegenüber dem Melanom gezeigt werden<sup>205</sup>. Neben der Induktion von Zytokinen konnte nur für TLR3 die Aufregulation des aktivierenden NK-Zell-Rezeptors TRAIL gezeigt werden<sup>206</sup>. Ähnliche Beobachtungen wurden auch für die RLRs RIG-I und MDA5 gemacht: Der Ligand für MDA5 als auch für RIG-I kann NK-Zellen durch

assoziierte Zellen zur Zytokinproduktion aktivieren und *in vivo* das Tumorwachstum in einem murinen Melanommodell beeinträchtigen<sup>151,207-209</sup>. Ob RLRs die Fähigkeit besitzen, aktivierende Rezeptoren auf NK-Zellen zu regulieren, ist nicht untersucht. Damit stellt die Aktivierung von immunaktivierenden Rezeptoren einen neuen vielversprechenden Ansatz in der Therapie des Melanoms dar. Hierbei sind besonders die zytosolischen Helikasen zu nennen, da diese wie oben beschrieben zusätzlich zur Aktivierung von Immunzellen über das Potential verfügen, eine direkte Apoptose in den Tumorzellen auszulösen.

---

### 3 Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit wurden zwei miteinander verbundene zentrale Fragestellungen verfolgt. Die Identifikation des Liganden des Immunrezeptors RIG-I eröffnet neue Möglichkeiten in der Immuntherapie von Tumoren wie dem malignen Melanom. *In vitro* Studien zeigten, dass die Aktivierung von RIG-I zur direkten Induktion von Apoptose in Tumorzellen führt. Erste Studien beschreiben ein starkes anti-tumorales Potential des RIG-I Liganden 3pRNA in der Therapie des murinen Melanoms auch *in vivo*. Man erkannte dabei, dass NK-Zellen und myeloide Zellen als Effektorzellen des angeborenen Immunsystems eine entscheidende Rolle in der Tumorregression durch 3pRNA spielen. Ein Effekt auf B- und T-Zellen konnte bisher nicht beobachtet werden. Damit sollte in dieser Arbeit als erste Fragestellung untersucht werden, ob und über welche Signalwege der RIG-I Ligand 3pRNA NK-Zellen zur Zytotoxizität gegenüber Melanomzellen anregt. Nach den ersten Daten im murinen System sollte hier die Untersuchung von primären humanen Melanomzelllinien im Fokus stehen, um eine Aussage über das humane System treffen zu können.

Exosomen fungieren als Signalmoleküle zwischen Zellen, in dem sie funktionelle Moleküle übertragen. Tumorexosomen fördern dadurch das Wachstum von Tumorzellen. Daher wird nach Therapien gesucht, die diese pro-tumoralen Eigenschaften von Exosomen inhibieren. Da bekannt ist, dass Viren die Eigenschaften von Exosomen verändern können, RIG-I ein in Tumorzellen exprimierter zentraler anti-viraler Rezeptor ist und wie oben beschrieben das Tumorstadium inhibieren kann, sollte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Elke Pogge von Strandmann als zweite Fragestellung dieser Arbeit analysiert werden, ob eine Aktivierung von RIG-I die Eigenschaften von Tumorexosomen beeinflusst und darüber zu anti-tumoralen Effekten führt. Damit würde erstmalig die Aktivierung eines PRR (RIG-I) auf die Generierung und die Eigenschaften von Tumorexosomen untersucht. Insbesondere sollte dabei untersucht werden, ob die Tumorexosomen einen Einfluss auf die Aktivierung von NK-Zellen ausüben und ob damit beide Fragestellungen der Arbeit in direkten Zusammenhang stehen.

## 4 Material & Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 *Geräte*

Gerät	Firma
ABI 7500 HAT Real-time PCR System	Applied Biosystems
Analysewaage TE 601	Sartorius AG (Göttingen)
Autoklav Vx-150	Systec (Wettenberg)
ELISA-Reader Apollo LB912	Bethold (Bergisch Gladbach)
Gefrierschrank (-80°C)	Hettlich (Tuttlingen)
Gefrierschrank (-20°C)	AEG-Elektrolux (Nürnberg)
Gewindeflaschen	Schott (Mainz)
Heinzschüttler Thermomixer Comfort	Eppendorf (Hamburg)
Horizontalschüttler POS-300	Grant-bio (London, England)
Kolbenhubpipetten Research	Eppendorf (Hamburg)
Kolbenhubpipetten Pipet Lite	Rainin Mettler Toledo (Gießen)
LC480 Lightcycler	Roche (Mannheim)
LSR II Durchflusszytometer	BD Biosciences (Heidelberg)
MACS Multistand	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
Magnetrührer VWR Stirrer	VWR (Darmstadt)
Mehrkanalpipette Matrix Impact2	Thermo Scientific (Bonn)
Mikroskop Eclipse TS100	Nikon (Düsseldorf)
Mr. Frosty Cryo 1°C Freezing Container	Nalgene (Roskilde, Dänemark)
Neubauer Zählkammer	Brand (Wertheim)
pH-Meter HI 8424	HANNA Instruments (Kehl am Rhein)
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Biosciences (Fernwald)
Quadro MACS	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
Reagenzglasschüttler Vortex Zx <sup>3</sup>	VELP Scientifica (Usmate, Italien)
Reinstwasseranlage Purelab Classic	ELGA (Celle)
Rotationsschüttler Tube Rotator H5600	VWR (Darmstadt)
Spektralphotometer NanoDrop ND-1000	Peqlab (Erlangen)

Sterilbank HSC-Advance	Thermo Scientific (Bonn)
Thermalcycler FlexCycler	Analytik Jena (Jena)
Ultrazentrifuge Beckman Coulter L-80	Beckman Coulter (Krefeld)
Vertikale Gelelektrophorese MGV-202	CBS-Scientific (Del Mar, Kalifornien, USA)
Vertikales Blotting System	BioRad (München)
Wasserbad Julabo TW 20	Julabo (Seelbach)
Western-Blot Entwickler CAWOMAT 2000 IR	CAWO (Schrobenhausen)
Zellkulturinkubator Heracell 240/ Herasafe KS-15	Hereaus Instruments (Hanau)
Zentrifugen 5415 R/ 5430 R/ 5810 R	Eppendorf (Hamburg)

#### 4.1.2 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien von den Firmen Carl Roth (Darmstadt), AppliChem (Darmstadt), Invitrogen (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Steinheim), Braun (Melsungen) und der Biochrom AG (Berlin) bezogen. Entsprechend der Herstellerangabe wurden die Lösungen mit Millipore-Wasser, Ethanol oder DMSO angesetzt.

#### 4.1.3 Kits und Reagenzsysteme

Kit/Reagenzsystem	Firma
SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
MasterMix Lightcycler 480	Roche (Mannheim)

#### 4.1.4 Enzyme

Enzym	Firma
Fast-AP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase	Fermentas (St. Leon Roth)

#### 4.1.5 Transfektionsreagenzien

Transfektionsreagenz	Firma	Anwendungen
Lipofectamine® 2000	Invitrogen (Karlsruhe)	Is Oligo
In vivo-JetPEI	Polyplus (Illkirch, Frankreich)	<i>In vivo</i>

#### 4.1.6 Antikörper

Antikörper	Anwendung	Firma
anti human CD3 Horizon	FACS	BD Biosciences (Heidelberg)
anti human CD56 APC oder PE	FACS	BD Biosciences (Heidelberg)
anti human CD107a PE	FACS	BD Biosciences (Heidelberg)
anti human CD14 PE-Cy7	FACS	BD Biosciences (Heidelberg)
anti human CD4 APC-Cy7	FACS	BD Biosciences (Heidelberg)
anti human CD8 PerCp-Cy5.5	FACS	BD Biosciences (Heidelberg)
anti human HLA ABC FITC	FACS	BD Biosciences (Heidelberg)
anti human HLA DR PerCp-Cy5.5	FACS	BioLegend (London, UK)
anti human ICAM-1	FACS	BioLegend (London, UK)
anti human Vimentin	FACS	BioLegend (London, UK)
anti human CD9	FACS	BioLegend (London, UK)
anti human BAG6	FACS	Zur Verfügung gestellt von Elke Pogge von Strandmann
anti human CD81	WB (Western Blot)	BioLegend
anti human Annexin V PE	FACS	BioLegend (London, UK)
anti human MIC A/B	FACS	BioLegend (London, UK)
anti human ULBP-1	FACS	BamMoMab (Gräfelfing)
anti human ULBP-2	FACS	BamMoMab (Gräfelfing)
anti human ULBP-3	FACS	BamMoMab (Gräfelfing)

anti human fc Cy3	FACS	Dianova (Hamburg)
goat anti mouse PE	FACS	BioLegend (London, UK)
anti human NKp30	FACS, BE (Blockierungsexperimente)	BioLegend (London, UK)
anti human TNF $\alpha$ PE	FACS	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
anti human Perforin PE	FACS	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
anti human TRAIL PE	FACS	eBioscience (Frankfurt)
anti human HLA ABC	BE	BD Biosciences (Heidelberg)
anti mouse CD9 PE	FACS	BioLegend (London, UK)
anti mouse CD81 PE	FACS	BioLegend (London, UK)
anti mouse CD80 PerCP/Cy5.5	FACS	BioLegend (London, UK)
anti mouse CD86 PE-Cy7	FACS	BioLegend (London, UK)
anti mouse CD54 APC	FACS	BioLegend (London, UK)
anti mouse MHC-Ia Pacific Blue	FACS	BioLegend (London, UK)
anti mouse MHC-IIa PE	FACS	BioLegend (London, UK)
anti human CD9	WB	BioLegend (London, UK)
anti human CD63	WB	BioLegend (London, UK)
anti human RIG-I	WB	Hybridomüberstand
anti mouse HRP	WB	Jackson ImmunoResearch (Newmarket, UK)
anti rat HRP	WB	Jackson ImmunoResearch (Newmarket, UK)
anti mouse NK1.1	Depletion <i>in vivo</i>	Bio X cell (Libanone, USA)
anti human RIP1	WB	Cell Signaling (Danvers, USA)

### 4.1.7 Rekombinante Zytokine und chemische Inhibitoren

Rekombinante Zytokine	Firma
human IFN $\alpha$ 2a	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
human TNF $\alpha$	Immuno Tools (Friesoythe)
human IFN $\gamma$	Immuno Tools (Friesoythe)

Chemischer Inhibitor	Firma
Infliximab	Janssen Biologics (Leiden, Niederlande)
Necrostatin-1	Enzo Life Sciences (Lörrach)
Z-VAD-FMK	PeptaNova (Sandhausen)

### 4.1.8 ELISA

ELISA	Firma
Human ELISA Set (CXCL10, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ )	BD Biosciences (Heidelberg)
Human IFN $\alpha$ Module Set	Bender MedSystems (Wien, Österreich)
Costar ELISA-Platten	Biomedical Diagnostics (Marnes Valeé, Frankreich)

### 4.1.9 MACS

MACS	Firma
MACS Separationssäulen (MS, LS, LD)	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
MACS NK Isolation Kit	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
MACS CD14 MicoBeads human	Miltenyi (Bergisch Gladbach)

## 4.1.10 Nukleinsäuren

### 4.1.10.1 Plasmide

Plasmid	Typus	Bezug
	<b>Hilfsplasmide</b>	
pMD2G	Lentivirales Pseudo-Typisierungsplasmid	Addgene
pRSV.Rev	Lentivirales Hilfssplasmid	Addgene
pMDLg/pRRE	Lentivirales Verpackungsplasmid	Addgene
	<b>Lentivirale Genomplasmide</b>	
SHC 505	pLKO.1 + shRNA gegen RIG-I	Sigma Aldrich
SHC 002	pLKO.1 + shRNA ohne Zielsequenz in Mensch und Maus	Sigma Aldrich

### 4.1.10.2 Oligonukleotide

Die verwendeten DNA-Oligonukleotide wurden alle von den Firmen Metabion (Martinsried) bezogen.

Das RNA-Oligonukleotid wurde von der Firma Biomers (Ulm) erhalten. Die 3pRNA wurde durch *in vitro* Transkription in unserem Labor produziert.

Die siRNAs zum *knock down* von RIG-I sowie einer Kontroll-siRNA wurden von der Firma Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland) bezogen.

Oligonukleotid	Typ	Sequenz (5'-3')
3pRNA template	DNA	TTGTAATACGACTCACTATAGGGACGCTGACCCAGAAGATCTACTA GAAA
ctrl RNA	RNA	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
human RIG-I Primer 1	DNA	GAAAGACTTCTTCAGCAATGTCC
human RIG-I Primer 2	DNA	CTTTCTAGTTCCTGCAGCTTTTCT
Maus beta- Aktin Primer 1	DNA	CCACCGATCCACACAGAGTA
Maus beta- Aktin Primer 2	DNA	GGATGCAGAAGGAGATTACTG
Maus CXCL10 Primer 1	DNA	GCTGCCGTCATTTTCTGC
Maus CXCL10 Primer 2	DNA	TCTCACTGGCCCGTCATC

#### 4.1.11 *Puffer, Medien und Lösungen*

##### 4.1.11.1 Molekularbiologie

<b>Lyse-Puffer</b>
2 mM MgCl <sub>2</sub>
50 mM Tris HCl pH 7,4
150 mM NaCl
1 mM DTT
1% CHAPES
1 x Proteaseinhibitor
→ in H <sub>2</sub> O angesetzt

<b>Protein-SDS-PA Gel</b>		
	Trenngel (8%)	Sammelgel
Acrylamid 30%	2,67 ml	0,35 ml
1M Tris-HCl pH 8,8	3,75 ml	-
1M Tris-HCl pH 6,8	-	0,44 ml
10% SDS	0,1 ml	0,035 ml
Wasser	3,38 ml	2,64 ml
10% APS	0,1 ml	0,035 ml
Temed	0,008 ml	0,0035 ml

<b>5x Lämmli Ladepuffer</b>
4% Dithioerythrit
50% Glyzerin
125 mM Tris HCl pH 6,8
10% SDS
0,05% Bromphenolblau

<b>Western Blot Puffer</b>	
10x Tris-Glycin	29 g Tris 144 g Glycin auf 1 l mit Wasser auffüllen
10x SDS Laufpuffer	29 g Tris 144 g Glycin 10 g SDS auf 1 l mit Wasser auffüllen
1x Transferpuffer	100 ml 10x Tris-Glycin 200 ml Methanol 700 ml H <sub>2</sub> O

#### 4.1.11.2 Zellkultur

#### 4.1.12 **Verwendete Zellsysteme**

Zellsystem	Zellkulturmedium
D04mel, D41mel	RPMI + 10% FCS + 1% Penecillin/Streptomycin
A549	DMEM + 10% FCS + 1% Penecillin/Streptomycin
HEKBlue	DMEM + 10% FCS + 1% Penecillin/Streptomycin
PBMC aus primären Blut	RPMI + 10% FCS + 1% Penecillin/Streptomycin
NK-Zellen/ Monozyten	RPMI + 10 %FCS + 1% Penecillin/Streptomycin
HCMel12 (Mausmelanom)	RPMI + 10% FCS + 1% Penecillin/Streptomycin
MA-Mel 86	RPMI + 10% FCS + 1% Penecillin/Streptomycin
HEK293T	DMEM + 10% FCS + 1% Penecillin/Streptomycin

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 **Molekularbiologische Methoden**

#### 4.2.1.1 Nukleinsäurepräparation

##### 4.2.1.1.1 RNA-Extraktion

Die klassische RNA-Aufreinigungsmethode der Phenol-Chloroform-Extraktion wird heute oft durch ein Säulen-basiertes System ersetzt. Dabei bindet die RNA an das Säulenträgermaterial und kann schlussendlich in Wasser eluiert werden. Beginnend wurden  $5 \cdot 10^6$  Zellen gut in 350  $\mu$ l RLT-Puffer, für mehr Zellen 700  $\mu$ l RLT-Puffer der Firma Quiagen resuspendiert und anschließend für mindestens 5 min bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren. Im Folgenden wird dem Lysat ein Volumen 70%iger Ethanol zugegeben wobei eine gute Durchmischung erfolgen sollte. Nachdem die Ethanolfällung auf die Zymo IIIC Säule gegeben wurde (1 min, 10.000 rpm), wird die nun an das Säulenträgermaterial gebundene RNA einmal mit 350  $\mu$ l RW1 Waschpuffer von Quiagen und einmal mit 350  $\mu$ l RNA Waschpuffer der Firma Zymo gewaschen. Anschließend erfolgt die Elution der RNA mit 35  $\mu$ l RNase-freiem Wasser nach einer einminütigen Inkubation. Die Bestimmung der RNA Menge und Reinheit wurde mit Hilfe des NanoDrop bei 260/280 nm ermittelt.

#### 4.2.1.1.2 Short-RNA Extraktion

Die Gewinnung von kurzen RNA Sequenzen aus den Exosomen wurden mit Hilfe des miRCURY<sup>TM</sup> RNA Isolation Kits gewonnen, welches bereits für die Isolation exosomaler RNA eingesetzt wurde<sup>210</sup>. Dafür werden die Exosomen in 350 µl Lyse Puffer aufgenommen und für 15 s gevortext. Nach der Zugabe von 200 µl 95%igem Ethanol und erneuten vortexen für 10 s wurden die lysierten Exosomen auf die Aufreinigungssäule gegeben und dreimal mit 400 µl Waschpuffer gewaschen (1 min, 14.000 g). Um mögliche Ethanolreste aus der Säule zu entfernen, folgte ein Zentrifugationsschritt für 2 min bei 14.000 g. Anschließend wurde auf die Säule 35 µl Elutionspuffer gegeben und die RNA durch zweimalige Zentrifugation (für 2 min bei 200 g, gefolgt von 1 min bei 14.000 g) eluiert. Die Bestimmung der RNA-Menge erfolgte anschließend im NanoDrop bei 260nm/280 nm.

#### 4.2.1.1.3 5'-Triphosphat-Nukleaseverdau

Im Hinblick auf die Untersuchung des immunstimulatorischen Potentials der 3pRNA ist die Triphosphatgruppe am 5'-Ende von besonderer Bedeutung. Für die gezielte Inaktivierung dieser immunstimulatorischen Gruppe benötigt man die Hilfe von 5'-abhängigen Nukleasen. Dabei wird das Triphosphatmotiv entfernt und es bleiben nur 5'-OH-Enden übrig. Um das Triphosphatmotiv von 1 µg RNA zu entfernen, erfolgte eine Inkubation der RNA mit 1x Fast-AP<sup>TM</sup>-Puffer und 1 U Fast-AP<sup>TM</sup> (Fermentas) für 30 min bei 37°C. Die Inaktivierung der Reaktion erfolgte für 5 min bei 75°C.

#### 4.2.1.2 Quantitative Real-time PCR (qPCR)

Bei der quantitativen *Real-time*-PCR handelt es sich um eine PCR-Methode, die nach der Amplifikation der Zielsequenz zusätzlich eine quantitative Bestimmung der zu untersuchenden mRNA erlaubt. Diese Bestimmung wird ermöglicht, indem nach jedem Amplifikationszyklus die Menge an vorhandener DNA-Doppelstränge durch einen in die DNA interkalierenden Fluoreszenz-Farbstoff ermittelt wird. In dieser Arbeit finden TaqMan-Sonden ihre Verwendung. Diese Art von Sonden werden durch 8 Basen mit einem Reporterfarbstoff und einem Quencher an den gegenüberliegenden Enden charakterisiert. Befinden sich Reporterfarbstoff und Quencher in räumlicher Nähe, kommt das System des strahlungsfreien Energietransfers (FRET; *Förster resonance energy transfer*) zum tragen, bei

dem das angeregte Licht des Reporters durch den Quencher emittiert wird. Im Laufe einer PCR-Reaktion bindet die Sonde an die zu amplifizierende Zielsequenz und wird dabei von der Polymerase während der Generierung des Doppelstrangs abgebaut. Dieser Prozess resultiert in der räumlichen Separation von Reporterfarbstoff und Quencher und führt nach Anregung zu einer Lichtemission, die detektiert und quantifiziert werden kann.

Nach der unter 4.2.1.1.1 beschriebenen RNA-Aufreinigung, wird diese mittels einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase in cDNA umgeschrieben. Für diese reverse Transkription wurde das SuperScript VILO cDNA Synthese-Kit analog der Herstellerangaben von Invitrogen verwendet.

Mit der so generierten cDNA kann die qualitative Bestimmung der mRNA im LightCycler LC480 der Firma Roche gestartet werden. Dafür wird die cDNA in einer 1:5 Verdünnung (in Wasser) im 96-wells Format eingesetzt. Die Quantifizierung des zu untersuchenden Zielgens wird relativ zu einem unbeteiligten Referenzgen ausgedrückt.

<b>qPCR-Ansatz für ein 96-well</b>		
	Zielprotein	<i>Housekeeping</i>
Primer (Zielprotein, 20 µM)	2 x 0,2 µl	-
Sonde (Zielprotein)	0,2 µl	-
Primermix ( <i>Housekeeping</i> )	-	0,2 µl
Sonde ( <i>Housekeeping</i> )	-	0,2 µl
Roche <i>Master-Mix</i> (2x)	10 µl	10 µl
Wasser	8,4 µl	8,6 µl
cDNA	1 µl	1 µl

<b>qPCR-Protokoll</b>		
Denaturierung	95°C	10 min
Amplifikation (45x)	95°C	10 s
	57°C	30 s
	72°C	1s
Abkühlen	4°C	30c

**Tabelle 4-1: Standard PCR-Mix und Laufprotokoll für die qPCR**

Das Design und die Kombination von Primer und Sonde basiert auf einem Algorithmus der Roche Universal-Probe-Library. Für eine genaue Ergebnissinterpretation wurden von allen verwendeten Primerpaaren die Effizienzkorrektur ermittelt (Tabelle 4-2).

Zielprotein	Primer 1 (5'-3')	Primer 2 (5'-3')	Sonde	Effizienz
human RIG-I	gaaagacttcttcagcaatgtcc	ctttctagttcctgcagcttttct	18	2,013
Maus CXCL10	gctgccgtcattttctgc	tctcactggcccgtcatc	18	1,864
Maus $\beta$ -Aktin	ccaccgatccacacagaata	ggatgcagaaggagattactg	63	2,093
human $\beta$ -Aktin	Roche Set human $\beta$ -Aktin	Roche Set human $\beta$ -Aktin	Roche Set human $\beta$ -Aktin	1,993

**Tabelle 4-2: Primer und Sonden der durchgeführten qPCRs**

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Auswerteformat qGene96<sup>211</sup> basierend auf der Gleichung dargestellt in Formel 1 und Formel 2<sup>212</sup>.

**Formel 1: Berechnung der relativen Expression (*mean normalized expression*) in der qPCR**

$$MNE = \frac{\frac{(E_{target})^{CT_{target, well1}}}{(E_{ref})^{CT_{ref, well1}}} + \frac{(E_{target})^{CT_{target, well2}}}{(E_{ref})^{CT_{ref, well2}}} + \frac{(E_{target})^{CT_{target, well3}}}{(E_{ref})^{CT_{ref, well3}}}}{3}$$

**Formel 2: Berechnung des Standardfehlers in der qPCR**

$$\Delta x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n \cdot (n - 1)}}$$

## 4.2.2 Proteinbiochemische Methoden

### 4.2.2.1 Herstellung von Proteinlysaten

Für die Bestimmung von Proteinmengen in Zellen bzw. Exosomen bedarf es eines Aufschlussverfahrens zur Gewinnung der reinen Proteinfraction. Dafür werden die isolierten Exosomen bzw. Zellen in Lyse Puffer (4.1.9.1) resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert.

Bei der Verwendung von Zellen werden die Zellbestandteile für 20 min, 4°C, 18.000 g zentrifugiert und der Überstand mit der enthaltenen Proteinfraction abgenommen. Die entstandenen Proteinlösungen können nun im Bradford-Assay auf ihre Konzentration untersucht werden.

### 4.2.2.2 Proteinquantifizierung mittels Bradford

Der Bradford-Assay ist eine Methode, um die Proteinmenge in einer zu untersuchenden Proteinlösung zu bestimmen. Hierfür wird als erstes der Bradford-Standard (Carl Roth) 1:5 mit H<sub>2</sub>O verdünnt. Anschließend wird eine BSA-Standardreihe (BSA-Stock: 12 mg/ml) über eine 1:2 Verdünnung mit insgesamt 7 Stufen angelegt, wobei der höchste Standard 800 µg/ml entspricht. Jetzt wird die Standardreihe (5 µl) und die zu untersuchende Proben (0,5-5 µl, abhängig von der erwarteten Konzentration) jeweils in Duplikaten in eine U-Boden Platte vorgelegt und anschließend 200 µl der Bradford-Arbeitsverdünnung zugegeben. Nach einer Inkubation von ca. 15 min kann der Bradford-Assay im Mikroplattenreader bei 570 nm ausgelesen werden. Die zu bestimmende Proteinmenge lässt sich anschließend mittels der BSA- Standardgeraden errechnen.

### 4.2.2.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) von Proteinen

Für die Auftrennung von Proteinen in einem elektrischen Feld nach der Molekülmasse wird eine denaturierende SDS-PAGE angewendet. SDS ist ein anionisches Detergent, welches die Eigenladung der Proteine überdeckt und die damit zu untersuchenden Proteine einheitlich geladen erscheinen lässt. Dies ermöglicht eine Auftrennung der Proteine anhand ihrer Größe im Polyacrylamid-Gel. Die zu untersuchenden Zellen bzw. Exosomen wurden dafür im Lyse-Puffer lysiert. Dafür werden die Zellen/Exosomen für 30 min auf Eis in Lyse-Puffer inkubiert und anschließend bei 18.000 g, 20 min, 4°C zentrifugiert. Der Überstand, der das Proteinlysate enthält, wird abgenommen und mittels Bradford auf die Menge an vorhandenen Protein analysiert (vgl. Abschnitt 4.2.2.1 und 4.2.2.2). Die zu verwendende Proteinmenge wird nun mit 5x Lämmli versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Danach werden die Protein-Proben auf das Polyacrylamid-Gel geladen. Als Größenstandard wurde von Fermentas die *PageRuler Plus Prestained Protein Ladder* verwendet. Getrennt werden die Proteine bei 30 mA für 2 h pro Gel. Anschließend kann ein Western Blot durchgeführt werden.

#### 4.2.2.4 Western Blot

Proteine, die mittels PAGE-Gel nach ihrer Größe aufgetrennt wurden, können im Western Blot durch den Transfer auf eine Trägermembran immunologisch nachweisbar und quantifizierbar gemacht werden. Dabei wandern die Proteine durch ein senkrecht angelegtes elektrisches Feld vom Gel auf die Membran.

Im ersten Schritt wird das unter 4.2.2.3 beschriebene Trenngel vom Sammelgel entfernt und das Trenngel in 1x Transferpuffer äquilibriert. Ebenfalls wird die Nitrozellulosemembran (Porengröße: 0,45 µm), zwei Stück Whatmannpapier und die Schwämme in Transferpuffer getränkt. Anschließend werden in einem luftblasenfreien Verfahren die einzelnen Komponenten in folgender Reihenfolge zusammengebaut: Schwamm – Whatmannpapier – PAGE-Gel mit aufgetrennten Proteinen – Nitrozellulosemembran – Whatmannpapier – Schwamm, wobei dies die Reihenfolge von der Kathode zur Anode widerspiegelt. Der durch den richtigen Zusammenbau gewährleistete Transfer wird unter ständiger Kühlung bei 450 mA für 1,5 h durchgeführt. Nach erfolgreichem Blotten kann die Membran einer immunologischen Behandlung unterzogen werden. Dafür wurde die Membran für 1 h in 0,5% Milch in PBS-T (PBS mit 0,05% Tween 20) geblockt und über Nacht mit dem Primärantikörper unter ständiger horizontaler Rotation inkubiert. Am folgenden Tag wird die Membran 3 x 5 min mit PBS-T gewaschen und anschließend mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur versehen. Mit einem Waschvorgang von 5 x 5 min wird überschüssiger Antikörper entfernt und die Membran mit Pierce ECL Western Blot Substrat (Thermo Scientific) mittels Luminiszenz entwickelt.

### **4.2.3 Zytologische Methoden**

#### 4.2.3.1 Kultivierung von Zellen

Zellen wurden entsprechend dem in Abschnitt 4.1.12 beschriebenen Zellkulturmedium gehalten. Dabei werden die Zellen in einer Atmosphäre von 5% CO<sub>2</sub>, 37°C und in einer wassergesättigten Atmosphäre kultiviert. Um Zellen zu passagieren, werden von ihnen, in einer für sie optimalen Konfluenz, das Medium entfernt, einmal mit PBS gewaschen und mit 0,5% Trypsin-EDTA abgelöst. Entsprechend ihrem Wachstumsverhalten wurde eine angemessene Menge an Zellen für die Permanent-Kultur ausgesät.

Die Quantifizierung der Anzahl lebender Zellen erfolgte mittels Neubauer-Zählkammer. Dabei wurden die Zellen 1:10 mit 0,01% Trypanblaulösung verdünnt und in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Anschließend werden die nicht gefärbten Zellen in vier Großquadraten gezählt. Die Gesamtzellzahl pro ml errechnet sich aus der Multiplikation von der durchschnittlichen Anzahl der Zellen aus den gezählten Großquadraten, dem Verdünnungsfaktor und dem Kammerfaktor. Der Kammerfaktor der Neubauer-Zählkammer entspricht  $10^4$ .

Für die Langzeitlagerung der verschiedenen Zelllinien wurden diese für 5 min bei 400 g pellitiert und in 1 ml Medium mit 10% DMSO versetzt. Danach erfolgte eine Abkühlung in einem Isopropanol-Bad (Mr. Frosty) um  $1^\circ\text{C}$  pro Stunde bei  $-80^\circ\text{C}$ . Anschließend wurden die Zellen für die Langzeitlagerung bei  $-150^\circ\text{C}$  gelagert.

Um Zellen aus der Langzeitlagerung wieder in Kultur zu nehmen, werden die tiefgefrorenen Zellen im Wasserbad aufgetaut und anschließend in einem 15 ml Falcon mit erwärmten Medium resuspendiert. Nachdem die Zellen für 5 min bei 400 g pellitiert worden sind, können die Zellen ausgesäht werden.

### 4.2.3.2 Isolation von PBMCs

PBMC (peripheral blood mononuclear cells) wurden durch das Institut für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Bonn in Form von Buffy Codes zur Verfügung gestellt. Die Aufreinigung dieser Zellen erfolgt über einen Dichtegradienten mit Ficoll. Dabei werden 15 ml Ficoll mit 35 ml Blut vorsichtig überschichtet, wobei das Blut vorher 1:2 mit NaCl verdünnt worden ist. Die anschließende Gradientenzentrifugation erfolgt bei Raumtemperatur, 800 g, 20 min ohne Bremse. Dabei werden die Erythrozyten und Granulozyten pellitiert wobei die verbleibenden Immunzellen des Blutes im sogenannten Lymphozyten-Ring verbleiben. Dieser, als weiße wolkenartige Zwischenschicht erkennbar, wird vorsichtig abgenommen und bei 400 g, 5 min pellitiert. Mögliche verbleibende Erythrozyten werden durch 5ml einer hypotonen Ammoniumchlorid-ähnlichen Lösung der Firma BD (BD Pharm Lyse, 1 x eingesetzt) für 5 min lysiert. Die Reaktion wird durch die Zugabe von 45 ml 0,9% NaCl abgestoppt. Die nun von Erythrozyten befreiten Immunzellen werden pellitiert, erneut mit NaCl gewaschen, und anschließend in Medium aufgenommen und gezählt. Jetzt sind die PBMC rein genug, um sie in weiteren Versuchen zu verwenden.

#### 4.2.3.3 Separation von Zellpopulationen mittels MACS-Technologie

Monozyten und NK-Zellen wurden aus PBMCs mit der MACS-Technologie der Firma Miltenyi isoliert. Die Methode basiert auf der Kopplung von superparamagnetischen Beads an hochspezifische Antikörper, die wiederum zur Erkennung von Zelltyp-spezifischen Antigenen beitragen. Durch die besonders kleine Größe der Beads wird eine unspezifische Zellaktivierung ausgeschlossen. Für die Monozyten-Isolation wurden CD14-Microbeads verwendet, die spezifisch CD14+ Monozyten binden. Man spricht hierbei von einer positiven Selektion. Im Gegensatz dazu stellt die Isolation der NK-Zellen eine negative Selektion dar, da nur Nicht-NK-Zellen mit den Beads des NK-Isolations-Kits markiert werden. Nach der Markierung aller PBMCs mit den entsprechenden superparamagnetischen Antikörpern, wird das Zellgemisch auf eine Säule gegeben, die sich in einem starken Magnetfeld befindet. Alle Zellen, die mit den paramagnetischen Antikörpern markiert sind, werden in der Säule zurückgehalten. Im Fall der NK-Zellen, können diese ungehindert die Säule passieren und direkt aus dem Säulendurchfluss gewonnen werden. Die CD14+ markierten Monozyten werden in der Säule zurückgehalten und können anschließend mit MACS-Puffer (PBS + 10% FCS + 0,5 mM EDTA), nach Entfernen der Säule aus dem magnetischen Feld, eluiert werden. Die so gewonnen Monozyten oder NK-Zellen wurden anschließend pelletiert, in Medium aufgenommen und gezählt.

#### 4.2.3.4 Isolation von Exosomen

Exosomen können von fast allen, vermutlich von allen Zellen, sezerniert werden und sammeln sich demzufolge im Zellkulturmedium der Zellkultur an. Um Exosomen aus dem Überstand von Zellen zu gewinnen, führt man eine serielle Zentrifugation durch. Der erste Schritt ist eine Zentrifugation von 400 g für 5 min bei 4°C um Zellen und Zelldebris zu entfernen. Anschließend werden aus dem zentrifugierten Überstand größere Vesikel in zwei aufeinanderfolgenden Zentrifugationsschritten bei 10.000 g, 4°C für jeweils 15 min eliminiert. Erst die nächste Zentrifugation von 100.000 g, 90 min bei 4°C in einer Ultrazentrifuge dient der Pelletierung von Exosomen aus dem Überstand. Dieser Vorgang wird wiederholt, indem man den Überstand vorsichtig entfernt, die Exosomen mit PBS wäscht und erneut bei 100.000 g, 90 min bei 4°C pelletiert. Die so aufgereinigten Exosomen können in weiteren Experimenten verwendet werden.

### 4.2.3.5 Transfektion und Stimulation von Zellen

#### 4.2.3.5.1 Transfektion von immunstimulatorischen (is) Oligonukleotiden

Die Transfektion von Zellen mit isOligonukleotiden mittels Lipofectamin 2000 (Invitrogen) ist eine Art der Lipofektion, bei der kationischen Lipidvesikel passiv von der Zelle aufgenommen werden und damit direkt in das Zytoplasma der Zelle gelangen. Als Beispiel folgt die Transfektion für das 96-wells Format. Dabei werden 25 µl Optimem mit 0,5 µl Lipofectamin 2000 für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Gleichzeitig wird 200 ng isOligonukleotid in 25 µl verdünnt. Anschließend werden beide Ansätze zusammengegeben und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach können die Lipokomplexe auf die Zellen gegeben werden. Die Transfektion von weiteren well-Formaten sind der Tabelle zu entnehmen.

<b>well-Format</b>	<b>Gesamtvolumen</b>	<b>Optimem</b>	<b>RNA</b>	<b>Lipofectamin® 2000</b>
96-wells	200 µl	2 x 25 µl	200 ng	0,5 µl
24-wells	600 µl	2 x 50 µl	800 ng	2 µl
12-wells	1,2 ml	2 x 100 µl	1,6 µg	4 µl
6-wells	2,5 ml	2 x 250 µl	4 µg	10 µl
10cm	18 ml	2 x 1,5 ml	24 µg	60 µl

Die Anzahl der auszubringenden Zellen für eine Stimulation mit isOligonukleotiden richtet sich nach der Zellart und der Größe des gewählten well-Formates. Für ein 96-wells gilt im allgemeinen 400.000 PBMCs, 200.000 Monozyten, 100.000 NK-Zellen und 20.000-50.000 Zellen diverser Zelllinien.

Für die Durchführung einiger Versuche ist es notwendig, die Transfektionskomplexe zu entfernen, um eine Wirkung dieser in den folgenden Assays auszuschließen. Die Entfernung der Transfektionskomplexe erfolgt nach 3 h Transfektion durch dreimaliges waschen mit PBS und der Aufnahme der Zellen in frisches Medium.

#### 4.2.3.5.2 Stimulation mit rekombinanten Zytokinen

Die Zugabe von rekombinanten humanen Zytokinen erfolgte direkt zu den Tumorzellen. Diese wurden einen Tag vor Zugabe der Zytokine mit 20.000 Tumorzellen pro 96well ausplattiert um eine Adhärenz der Zellen zu gewährleisten. Für TNF $\alpha$  wurden 1 ng/ml und 10 ng/ml sowie für IFN $\gamma$  5 ng/ml und 50 ng/ml verwendet.

#### 4.2.3.5.3 Stimulation mit PBMC Überständen

Um den Einfluss von zellfreien Überständen aus über Nacht stimulierten PBMCs mit isOligonukleotiden zu untersuchen, wurden 20.000 Tumorzellen pro 96well mindestens 6 h vor Zugabe der Überstände ausplattiert. Die Menge an zugegebenem zellfreiem Überstand entsprach einer Endkonzentration im well von 40% des Gesamtvolumens. Die Tumorzellen wurden anschließend für 24 h oder 48 h mit dem PBMC-Überstand inkubiert und in weiteren Versuchen analysiert.

#### 4.2.3.6 CFSE Färbung

Um Zellen mit dem fluoreszenten, membrangängigen Farbstoff CFSE (Carboxyfluoreszein-Succinimidyl Ester) zu markieren, wurde die gewünschte Anzahl an Zellen in serumfreiem Medium aufgenommen, mit 5  $\mu$ M CFSE versehen und für 10 min bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die nun markierten Zellen 3 x mit serumhaltigen Medium gewaschen, um nicht aufgenommenes CFSE durch Bindung an Serumproteine zu entfernen. Für weitere Anwendungen können die CFSE-Zellen nun ausgesät werden.

### **4.2.4 Virologische Methoden**

#### 4.2.4.1 Herstellung lentiviraler shRNA-Vektoren

Die Weiterentwicklung der Untersuchung der Funktion von Genen durch das gezielte Ausschalten bestimmter Genfunktionen Ende der 90er Jahre durch siRNAs wurde durch die Technologie der shRNA weiterentwickelt. Von entscheidendem Vorteil ist dabei die durch die dauerhafte Expression der shRNA vermittelte stabile Suppression des shRNA-Zielgens, was als *knock down* bezeichnet wird. Die in dieser Arbeit verwendeten shRNAs wurden durch lentivirale Vektoren in die Zellen eingebracht.

Die Viruspartikel wurden ein Verpackungssystem von Dull et al. basierend auf 3 Plasmiden (pMD2.G, pRSV.Rev, pMDL.g/pRRE) gewählt<sup>213</sup>. Dies ermöglichte die getrennte Zuführung der viralen Proteine gag/pol und env und spiegelt den Vorteil keiner weiteren Replikationsrunden der Viren wieder. Die Partikel wurden mit VSV-G (pMD2.G) pseudotypisiert.

Für die Virusproduktion wurde das shRNA-kodierende Genomplasmid (pLKO.1 + shRNA) mit den Verpackungsplasmiden pMD2.G, pRSV.Rev und pMDL.g/pRRE mittels Kalzium-Phosphat-Transfektion in HEK293T-Zellen eingebracht. Dafür wurden die Zellen am Vortag in einer Dichte von  $4 \times 10^6$  Zellen/ 10 cm Schale ausgebracht und vor Transfektion ein Mediumwechsel durchgeführt. Für eine erfolgreiche Transfektion wurden 10 µg pLKO.1, 2,5 µg pMD2.G, 3,5 µg pRSV.Rev und 6,5 µg pMDL.g/pRRE gemischt und auf 500 µl mit Wasser aufgefüllt. Anschließend wurden 50 µl 2M CaCl<sub>2</sub> sowie 500 µl 2x HBS zugegeben. Dieser Ansatz wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und für eine gleichmäßige Präzipitierung tropfenweise auf die Zellen gegeben. Am nächsten Tag wurde das Medium (DMEM + 10% FCS, 1% P/S, 25 mM HEPES pH 7,9) gewechselt.

Für die Virusernte wurde der virushaltige Übersand durch Filtration durch einen 0,45 µm Filter von Zellfragmenten getrennt und die im Überstand enthaltenen Viruspartikel nach Aliquotierung bei -80°C gelagert.

### 4.2.4.2 Herstellung transduzierter Zelllinien

Für die Herstellung von knock-down Zelllinien aus den genrierten viralen Vektoren, wurden 50.000 Zellen der Zelllinie A549 in einem 6 wells ausgebracht. Die Zugabe einer geeigneten Virusmenge mit 8 µg/ml Polybrene führt über Nacht zur Transduktion der Zellen. Am nächsten Tag wird das Medium gewechselt und 48- 72h nach Transduktion die Selektion auf positiv transduzierte Zellen mit Puromycin eingeleitet. Die niedrigste nicht-lethale Konzentration für A549 wurde in Vorversuchen auf 1 µg/ml bestimmt. Die unter Selektionsdruck wachsenden Zellen sind erfolgreich transduziert und konnten nach Expandierung in Langzeitlagerung bei -150°C genommen werden.

---

## 4.2.5 Analytische Assays

### 4.2.5.1 ELISA

Der Enzym Linked Immunosorbent Assay (ELISA) beruht auf der Quantifizierung von Proteinen in Lösung mittels eines antikörperbasierten Systems. Dabei wird ein Antikörper auf den Boden einer Testplatte gebunden und die unspezifischen Bindungsstellen blockiert. Anschließend wird die zu untersuchende Lösung, z.B. Zellkulturüberstände oder Serum, zugegeben und kann spezifisch an den ersten Antikörper binden. Proteine, die in der Lösung vorhanden sind, aber nicht spezifisch an den Antikörper binden, werden durch einen folgenden Waschvorgang entfernt. Das an den ersten Antikörper gebundene Protein kann nun durch einen zweiten Antikörper erkannt werden. Mittels einer Farbumschlagsreaktion, welche durch den zweiten Antikörper ermöglicht wird, kann die Menge an gebundenen Protein ermittelt werden.

ELISA-Kits wurden von den Firmen eBiosciences für IFN $\alpha$  und BD für die restlichen Zytokine/Chemokine verwendet. Die Durchführung unterscheidet sich je nach Firma.

Für ELISAs der Firma BD wird der Erstantikörper in einem Puffer entsprechend der Herstellerangaben verdünnt und 50  $\mu$ l pro ELISA-Plattenvertiefung einpipettiert. Die Bindung an die Platte erfolgte über Nacht bei 4°C. Am nächsten morgen wird die ELISA-Platte dreimal mit 150  $\mu$ l Waschpuffer (1 x PBS + 0,05% Tween 20) pro Vertiefung gewaschen und die unspezifischen Bindungen anschließend mit 1 x Assay-Puffer (PBS mit 10% FCS) für eine Stunde blockiert. Bevor die zu untersuchenden Proben aufgetragen werden, wird die ELISA-Platte erneut dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend werden die Proben in einer angemessenen Verdünnung einpipettiert und zusätzlich wird die ELISA-Platte mit einer über acht Stufen angelegten Standardreihe des Faktors 2 versehen. Die Inkubation der zu untersuchenden Proben und der Standardreihe erfolgt für 2 h schüttelnd bei Raumtemperatur. Ungebundene Proben werden durch fünfmaliges Waschen mit Waschpuffer entfernt. Im nächsten Schritt erfolgt die Zugabe des Detektions-Antikörpers (zweiter Antikörper) von 50  $\mu$ l pro Vertiefung. Nach einer weiteren Stunde Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler wird der ELISA sieben mal mit 150  $\mu$ l Waschpuffer gewaschen und mit 50  $\mu$ l TMB-Substrat pro Vertiefung entwickelt. Das Abstoppen der Farbreaktion findet mit 2 N H $_2$ SO $_4$  statt. Die aus der einpipettierten Standardreihe abgeleitete Eichgerade dient in der Auswertung als Kalkulationsgrundlage der gemessenen Proben.

#### 4.2.5.2 HEK Blue

HEK-Blue Zellen der Firma Invivogen sind Reportzellen für das Vorhandensein von bioaktivem Typ I Interferonen (IFN) in z.B. zellfreien Überständen durch die Aktivierung des SEAP Reportergens, welches unter der Kontrolle des JAK/STAT/ISGF3 Signalweges steht. Dafür werden 50.000 HEK-Blue Zellen pro 96well in 180 µl ausplatiert und anschließend 20 µl des zu untersuchenden zellfreien Überstandes zugegeben. Um die Menge an Typ I Interferon im zu untersuchenden Überstand quantifizieren zu können, wird rekombinantes IFN $\alpha$ 2a über 7 Verdünnungsstufen als Standard benutzt. Nach 24 h Inkubation wird der zellfreie Überstand abgenommen und 40 µl zu untersuchender Überstand mit den entsprechenden Leveln an SEAP mit 40 µl p-Nitrophenyl-Phosphat (pNPP) Farbstoff inkubiert. Diese Farbumschlagsreaktion wird anschließend im Mikroplattenreader ausgemessen und anhand der aus der Standardreihe ermittelten Eichgerade, kann die Menge an Typ I IFN berechnet werden.

#### 4.2.5.3 Apoptose

Zur Bestimmung von Apoptose wird Yo-Pro-1 benutzt. Dabei handelt es sich um einen im grünen Bereich fluoreszierenden Farbstoff, der eine sehr hohe Affinität zu Nukleinsäuren besitzt und nur selektiv in apoptotische Zellen eindringen kann. Seine Fluoreszenzeigenschaft ermöglicht die Detektierung der Apoptose im Durchflusszytometer. Die auf Apoptose zu untersuchenden Zellen wurden dafür mit 0,5% Trypsin-EDTA abgelöst und einmal in PBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen für 20 min auf Eis in 0,01 mM Yo-Pro-1 in PBS im Dunkeln gefärbt. Für eine zusätzliche Diskriminierung von nekrotischen Zellen, werden die Zellen kurz vor der durchflusszytometrischen Auswertung mit dem lebend-tot Farbstoff Hoechst33258 (5 µg/ml) inkubiert. Als apoptotisch werden Yo-Pro-1 positive/Hoechst33258 positive sowie Yo-Pro-1 positive/Hoechst33258 negative Zellen gewertet.

#### 4.2.5.4 DiO Lyse Assay

Der Lyse-Assay wird benutzt, um das lytische Potential von Effektorzellen, wie z.B. NK-Zellen oder T-Zellen, gegenüber ihren Zielzellen (z.B. Tumorzellen) zu bestimmen.

Dafür wurden PBMCs oder NK-Zellen wie unter 4.2.3.5.1 beschrieben aktiviert und mit Tumorzellen in unterschiedlichen Effektor/Zielzellen-Verhältnissen für 24 h ko-kultiviert. Um eine Aussage über die Lyse der Zielzellen treffen zu können, wurden diese vor der Ko-Kultur mit dem Farbstoff 3,3'-Diocetadecyloxycarbocyanin Perchlorat (DiO) in einer finalen Konzentration von 0,03  $\mu\text{M}$  gefärbt, welcher im Durchflusszytometer gemessen werden kann. Nach Ende der Ko-Kulturdauer werden die Zielzellen im Durchflusszytometer analysiert. Zur Beschreibung toter Zellen wird der lebend-tot Farbstoff Hoechst33258 in einer finalen Konzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$  zugegeben.

Die Lyse in % berechnet sich nach folgender Formel (3):

**Formel (3):**

$$\frac{(\text{Anzahl DiO}^+ + \text{Hoechst}^+)^{+\text{Effektor}} - (\text{Anzahl DiO}^+ + \text{Hoechst}^+)^{-\text{Effektor}}}{(\text{Anzahl DiO}^+)^{+\text{Effektor}} - (\text{Anzahl DiO}^+)^{-\text{Effektor}}} * 100$$

#### 4.2.5.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrische-Analyse erlaubt die Beurteilung des Vorhandenseins von bestimmten Molekülen auf oder innerhalb einer Zelle, die durch fluoreszierende Antikörper im Durchflusszytometer detektiert werden können. Durch die Kombination von mehreren fluoreszierenden Antikörpern kann der Informationsgehalt über die zu untersuchende Zielzelle erheblich erhöht werden. Im wesentlichen basiert das Durchflusszytometer auf der Emission von optischen Signalen, die von der zu untersuchenden, mit Fluoreszenzantikörper markierten Zelle ausgesandt werden wenn diese die Laserstrahlen im Durchflusszytometer passiert.

##### 4.2.5.5.1 Durchflusszytometrie von Zellen

Für die Markierung von jeglichen Zelltypen mit Fluoreszenzantikörpern auf der Zelloberfläche wurde ein einheitliches Protokoll verwendet. Dabei wurden die Zellen aus den entsprechenden Zellkulturbedingungen gelöst und einmal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Färbung der Zellen mit den entsprechenden Antikörpern in einer 1:200 Verdünnung in PBS + 2% FCS (FACS-Puffer). Die Färbung wurde für 20 min im Dunkeln bei Raumtemperatur durchgeführt. Nicht gebundene Antikörper wurden durch zweimaliges

Waschen der Zellen mit FACS-Puffer entfernt und die Zellen anschließend im Durchflusszytometer analysiert.

#### 4.2.5.6 CD107a Assay

Der CD107a-Assay dient der Bestimmung der Degranulation von NK-Zellen. Dabei wurden PBMCs wie unter 4.2.3.5.1 beschrieben über Nacht stimuliert. Am nächsten morgen erfolgt die Zugabe von Tumorzellen (Effektorzelle (PBMCs) : Zielzelle (Tumorzelle) = 10:1). Gleichzeitig wurde für 1 h 1 µl fluoreszenzgekoppelten CD107a-Antikörper pro 96 well zugegeben. Um die Degranulation der NK-Zellen zu arretieren, wurde anschließend für 3 h Monensin in einer Konzentration von 5 µg/ml zugegeben. Die Diskriminierung der NK-Zellen innerhalb einer PBMC-Population erfolgte mit einer Oberflächenfärbung, wie unter 4.2.4.5.1 beschrieben.

##### 4.2.5.6.1 Intrazelluläre Färbung

Diese Variante der Färbung ermöglicht die Makierung von intrazellulär lokalisierten Zielmolekülen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern in der Zelle. Falls benötigt, werden Zielmoleküle auf der Zelloberfläche wie unter 4.2.4.5.1 beschrieben als erstes markiert. Anschließend wurden die Zellen in 2% PFA in PBS für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln fixiert und folgend zweimal mit PBS gewaschen. Um mit den Antikörpern in das innere der Zelle zu gelangen, wurde anschließend die Zellmembran mit Saponin-Puffer (0,5% Saponin, 5% FCS in 1 x PBS) perforiert und die Färbung mit dem entsprechenden fluoreszenzgekoppelten Antikörper vorgenommen. Nicht gebundener Antikörper wurde durch waschen der Zellen mit FACS-Puffer entfernt und die Zellen konnten anschließend im Durchflusszytometer analysiert werden.

#### **4.2.6 *In vivo* Versuche**

##### 4.2.6.1 Mausstämme

Für *in vivo* Versuche wurden weibliche, 8 Wochen alte C57BL/6 Mäuse verwendet. Sie wurden gemäß nationalen und international geltenden Regeln für Versuchstierhaltung im Haus für Experimentelle Therapie, Universitätsklinikum Bonn gehalten. Die RIG-I *knock out*

Mäuse wurden freundlicherweise von der AG Barchet, Universitätsklinikum Bonn, zur Verfügung gestellt.

#### 4.2.6.2 Tumorinjektionen

Die Transplantation von  $1,5 \cdot 10^5$  Zellen der Melanomlinie HcMel12 erfolgte subkutan in die Flanke der Maus an Tag 0. Das Behandlungsprotokoll wurde mit Erreichen einer Tumorgröße von 2 x 2 mm an Tag 6 gestartet.

#### 4.2.6.3 Therapie mit Exosomen

Die Therapie der induzierten Melanome umfasst die intratumorale Injektion von Kontroll- oder 3pRNA induzierten Exosomen, Kontroll- oder 3pRNA (jeweils 1 µg) in der Formulierung einer Lipidhülle (Komplexierung mit *in vivo*-JetPEI) und einer unbehandelten Gruppe, die nur PBS appliziert bekommen. Die Exosomen wurden aus der entsprechenden Melanomzelllinie (HcMel12) generiert, die auch in der Transplantation verwendet wurden. Die injizierte Menge an Exosomen, die analog 4.2.3.4 gewonnen wurden, entsprach nach Bradford-Bestimmung zwischen 10 µg und 30 µg pro Maus. Das Therapieschema umfasst die Injektionen an Tag (d) 6, d8, d10 und d13. 18 h nach der letzten Injektion wurden die Tiere euthanisiert und die Tumore für Zytokin- und Chemokinbestimmung mittels quantitativer *real-time* PCR entfernt und das aus der Schwanzvene gewonnene Blut auf den NK-Zell-Aktivierungsmarker CD69 mittels Durchflusszytometrie analysiert.

#### 4.2.6.4 Depletion von NK-Zellen *in vivo*

Die Depletion der NK-Zellen in der Maus erfolgte durch intraperitoneale Injektionen des NK1.1 Antikörpers (100 µg pro Maus) der Firma Bio X cell an den Tagen (d) 4, d6, d10 und d13. Die erfolgreiche Depletion der NK-Zellen wurde durch die Entnahme von Blut aus der Schwanzvene an d8 mittels durchflusszytometrischer Bestimmung der Frequenz von CD3 negativen und NK1.1 positiven NK-Zellen überprüft.

### 4.3 Statistik

Alle Abbildungen zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung, sofern es nicht anders beschrieben wird. Statistische Analysen wurden mit einem zwei-seitigen t-Test angefertigt. Im Fall des Vergleiches von mehreren Gruppen wurde der *one way* oder *two way* ANOVA mit einem Post-hoc Test nach Tukey oder Bonferroni durchgeführt. \*, \*\* und \*\*\* stehen für  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  und  $p < 0,001$ .

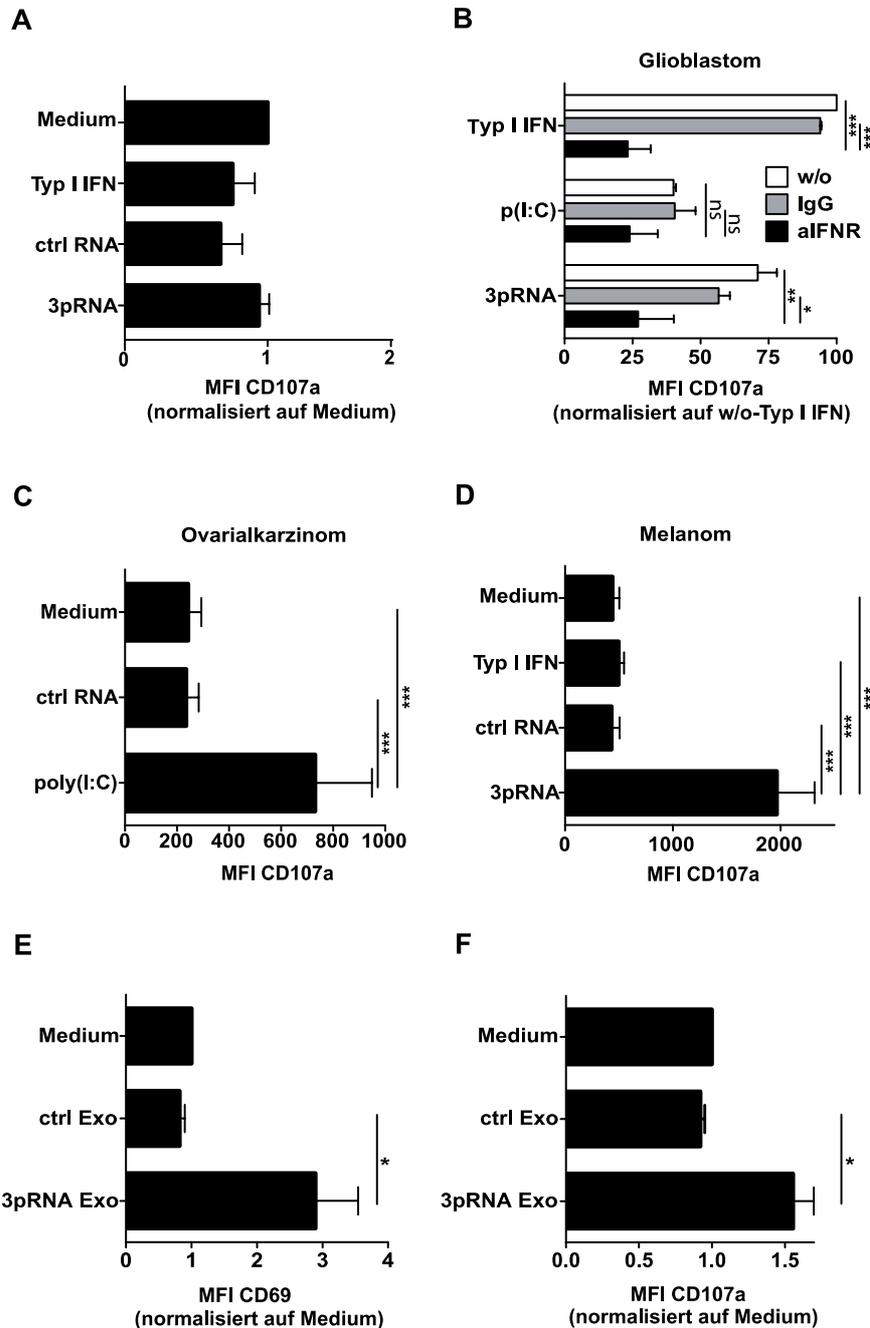
---

## 5 Ergebnisse

### 5.1 RIG-I aktivierte Tumorzellen sezernieren Faktoren zur NK-Zell-Aktivierung: Mikrovesikel und Zytokine

Virusinfizierte Zellen tragen Erkennungsstrukturen, die zu einer direkten Aktivierung von NK-Zellen führen können<sup>199,214,215</sup>. Um zu untersuchen, ob die Aktivierung des *pattern recognition receptors* RIG-I durch seinen Liganden 3pRNA als Imitierung einer Virusinfektion *in vitro* ebenfalls zur Aktivierung von NK-Zellen führt, haben wir die Melanomzellen D04mel mit 3pRNA *in vitro* transfiziert und anschließend mit NK-Zellen in *Peripheral Blood Mononuclear cells* (PBMCs) ko-kultiviert. Es konnte keine Degranulation der NK-Zellen gegenüber 3pRNA aktivierten humanen Melanomzellen beobachtet werden (Abbildung 5-1, A). Hingegen zeigte der Überstand von 3pRNA oder p(I:C) stimulierten Tumorzellen die Kapazität, NK-Zellen zu einer Degranulation gegenüber unbehandelte Tumorzellen anzuregen. Dieser Effekt konnte im Glioblastom (Abbildung 5-1, B), im Ovarialkarzinom (Abbildung 5-1, C) und im Melanom (Abbildung 5-1, D) gezeigt werden. Im Glioblastom (Abbildung 5-1, B) konnte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe PD Glas/ Prof. Scheffler (Uniklinik Bonn) die aktivierende Substanz im Überstand der durch 3pRNA aktivierten Tumorzellen identifiziert werden. Die Blockade des Typ I Interferon Rezeptors inhibierte die Degranulation von NK-Zellen. Es zeigten sich zwischen den Tumormodellen Unterschiede bei der Abhängigkeit der NK-Zell-Degranulation von Typ I IFN. Im Gegensatz zum Glioblastom war Typ I IFN im verwendeten Melanommodell nicht ausreichend, um die Degranulation zu induzieren (Abbildung 5-1, D). Neben Proteinen wie Zytokinen/Chemokinen sezernieren Zellen Mikrovesikel, die sie zur Kommunikation mit anderen Zellen nutzen. Es ist beschrieben, dass *pathogen-associated molecular patterns* im Kontext von einer intrazellulären Infektion mit Mykobakterien<sup>216</sup> über Exosomen weitergegeben werden und dass Viren den exosomal Signalweg zur Ausschleusung aus der Zelle nutzen<sup>217</sup>. Um zu analysieren, ob Exosomen in Abhängigkeit der Aktivierung von RIG-I NK-Zellen aktivieren können, isolierten wir in einem Pilotexperiment in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Pogge von Strandmann Melanomexosomen aus dem Überstand von 3pRNA stimulierten Melanomzellen und inkubierten sie mit NK-Zellen in PBMCs und unbehandelten Melanomzellen. Die Zugabe von RIG-I stimulierten Melanomexosomen, aber nicht von Exosomen, die durch nicht-stimulatorischer RNA (ctrl) induziert wurden, führte zur

verstärkten Expression von CD69 auf NK- Zellen (Abbildung 5-1, E) und zur NK-Zell-Degranulation (Abbildung 5-1, F). Zusammenfassend kann die Aktivierung von Tumorzellen durch 3pRNA eine Aktivierung von NK-Zellen durch Typ I IFN aber auch durch Melanomexosomen vermitteln.



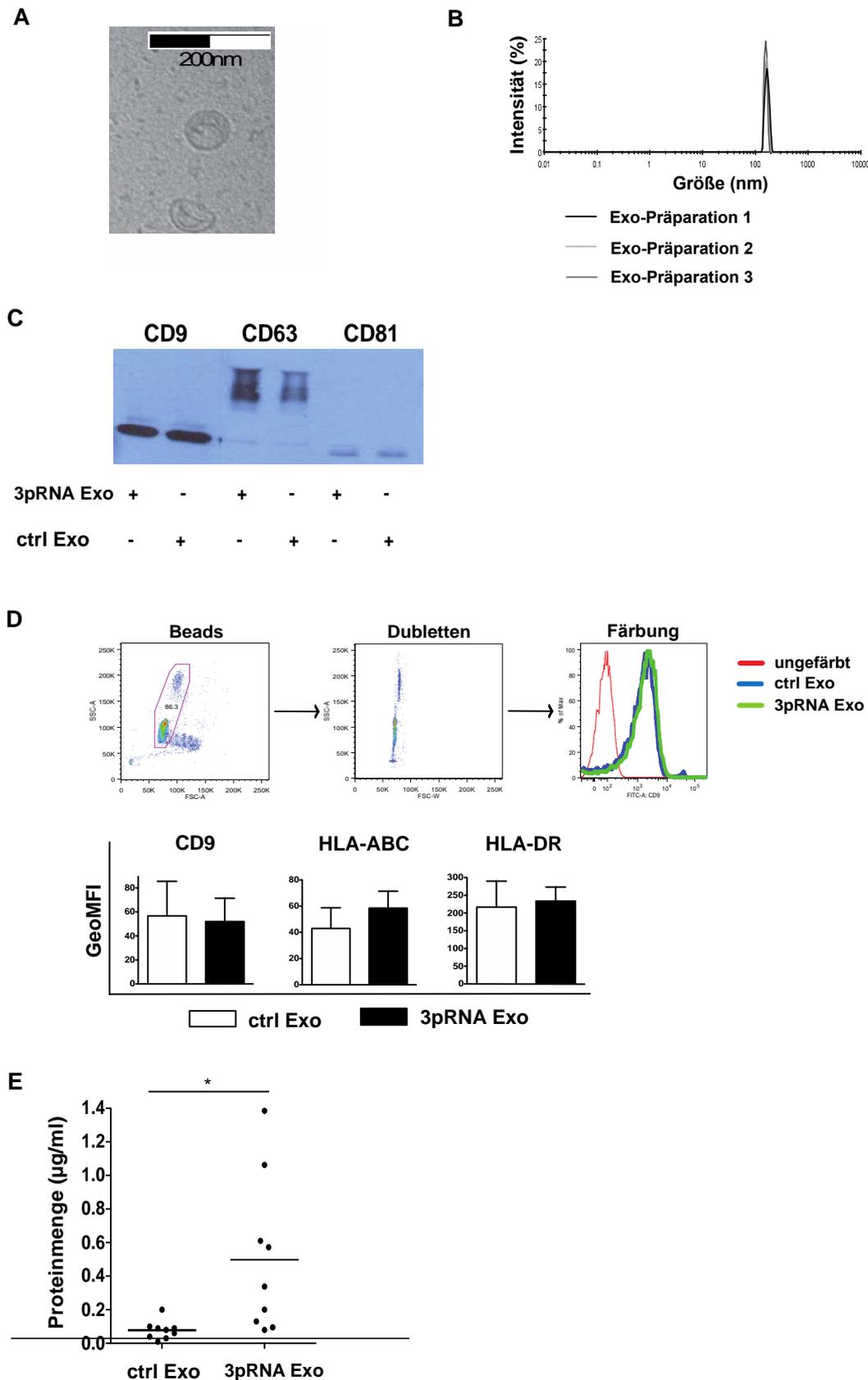
**Abbildung 5-1: Mit 3pRNA aktivierte Tumorzellen sekretieren Faktoren zur NK-Zell-Aktivierung.** (A) Stimulation der Melanomzelllinie D04mel mit nicht-stimulatorischer (ctrl) RNA, 3pRNA (jeweils 1 µg/ml) oder Typ I IFN (300 IU/ml) für 3 h. Entfernung der stimulatorischen Lipofektionskomplexe durch dreimaliges Waschen. Nach über Nacht Stimulation Zugabe von nicht-stimulierten PBMCs. Analyse der Degranulation (CD107a) von NK-Zellen (CD3 negativ, CD56 positiv) nach 4h Ko-Kultur im Durchflusszytometer (n = 4). (B) Primäre Glioblastomzellen wurden mit 3pRNA, p(I:C) (1 µg/ml) oder 300 IU/ml Typ I IFN für 3 h stimuliert und die Stimulationskomplexe durch dreimaliges Waschen entfernt. Anschließende Stimulation der

Glioblastomzellen über Nacht. 60% (v/v) des Tumorüberstandes wird zur Aktivierung von PBMCs (w/o) oder in Gegenwart von einer Isotypenkontrollantikörper (IgG) oder einem anti-IFN-Rezeptor Antikörper (αIFNR) verwendet (jeweils 10 ng/μl). Nach 24 h Inkubation erfolgt die Zugabe von nicht-stimulierten Tumorzellen für 4 h und Analyse der Degranulation von NK-Zellen (CD3 negativ, CD56 positiv) mittels Durchflusszytometrie (n = 4). **(C+D)** Versuchsdurchführung wie in **(B)** mit Ovarialkarzinomzellen **(C)** und Melanomzellen **(D)** ohne Verwendung der Antikörper (n = 3). **(E+F)**  $2 \times 10^5$  Monozyten zusammen mit  $1 \times 10^5$  NK-Zellen wurden mit ctrl RNA oder 3pRNA induzierten Melanomexosomen (ctrl Exo bzw. 3pRNA Exo) ko-kultiviert und auf die Expression von CD69 **(E)** auf der Oberfläche von NK-Zellen durchflusszytometrisch untersucht (n = 4). **(F)** CD107a als Degranulationsmarker von NK-Zellen wurde nach der Zugabe von  $2 \times 10^3$  Melanomzellen (D04mel) durchflusszytometrisch begutachtet (n = 4). Alle Abbildungen zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung. \*, \*\* und \*\*\* stehen für  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  und  $p < 0,001$ .

### **5.1.1 Charakterisierung 3pRNA induzierter Melanomexosomen**

Nach dem interessanten oben beschriebenen Befund, dass Melanomexosomen, die als immunsuppressiv beschrieben sind, nach Aktivierung von RIG-I zur Aktivierung von NK-Zellen führen können, sollten im weiteren Verlauf der Doktorarbeit die RIG-I induzierten Melanomexosomen weiter untersucht werden. Dies geschah in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Pogge von Strandmann, Uniklinik Köln.

Nach Transfektion der Melanomzellen mit dem RIG-I Liganden 3pRNA oder einer inerten nicht-stimulatorischen (ctrl) RNA wurden Vesikel durch serielle Zentrifugationsschritte<sup>170</sup> aus dem Überstand isoliert. Die gewonnenen Partikel zeigten in einer Elektronenmikroskopischen Aufnahme die für Exosomen typische beschriebene Morphologie als *cup-shaped* Vesikel mit einer Größe von 50 – 120 nm (Abbildung 5-2, A). Dies konnte mit Hilfe von Photonen-Korrelations-Spektroskopie bestätigt werden (Abbildung 5-2, B).



**Abbildung 5-2: Charakterisierung von 3pRNA induzierten Melanomexosomen.** (A) Melanomzellen wurden mit 3pRNA oder nicht-stimulatorischer (ctrl) RNA transfiziert und die Exosomen (ctrl Exo bzw. 3pRNA Exo) durch serielle Zentrifugation gewonnen. Bildliche Darstellung der D04mel Exosomen mittels Cryo-Elektronmikroskopie. (B) Bestimmung der Größe der isolierten Mikrovesikeln mittels Photonen-Korrelations

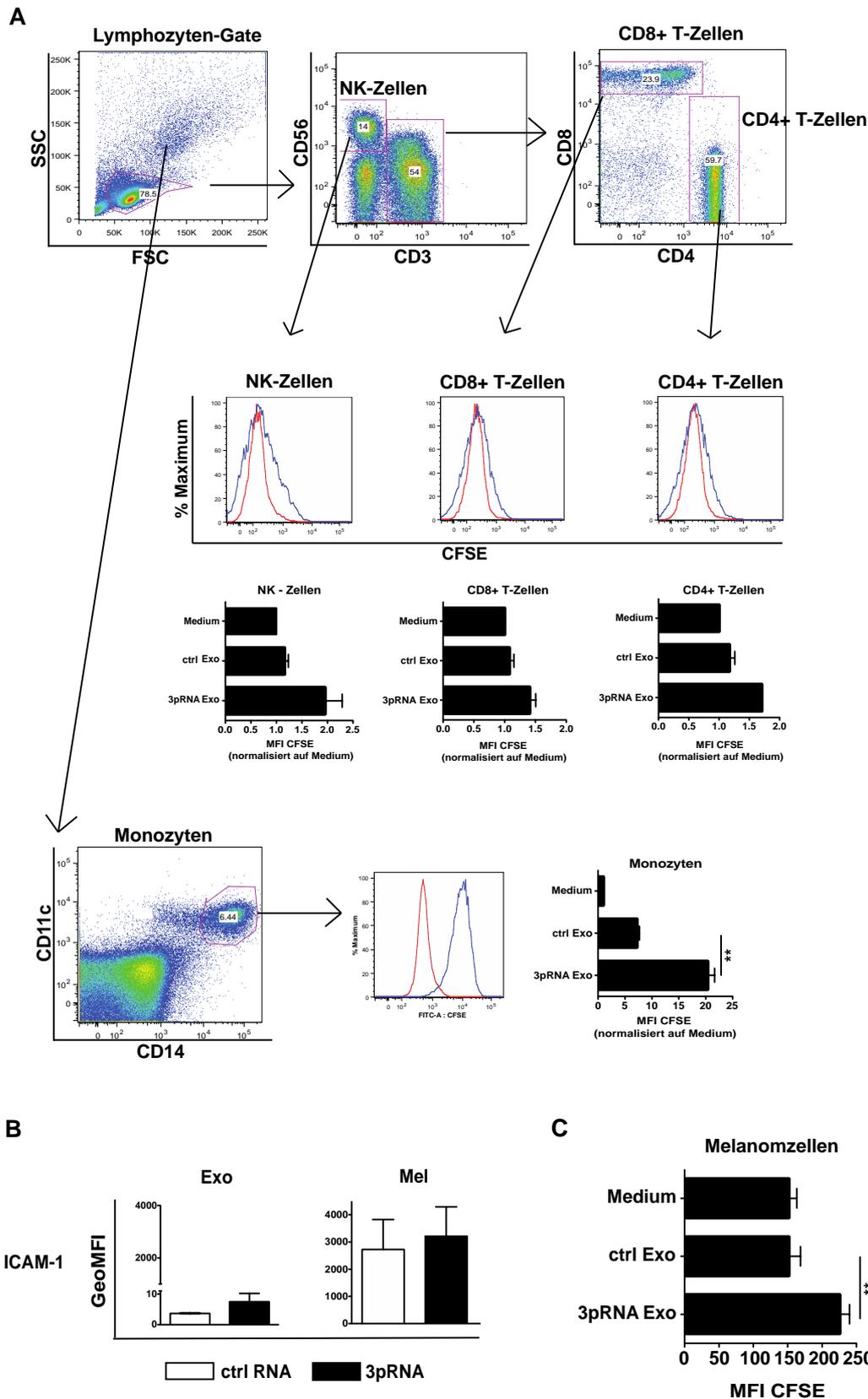
Spektroskopie aus drei unabhängigen Experimenten. (C) Western Blot basierter Nachweis der Proteinexpression von CD9, CD63 und CD81 von ctrl RNA (ctrl Exo) und 3pRNA (3pRNA Exo) induzierten Tumorexosomen. (D) Durchflusszytometrische Analyse von CD9, HLA-ABC und HLA-DR von ctrl RNA oder 3pRNA induzierten Exosomen (n = 4). (E) Bestimmung der Proteinmenge von ctrl RNA und 3pRNA induzierten D04mel Exosomen mittels Bradford-Assay (n = 9). Abbildung zeigt den Mittelwert und die Standardabweichung. \* steht für  $p < 0,05$ . Abbildung (A) entstand in Zusammenarbeit mit Sabine Barnet und Prof. Rolf Schubert vom Institut für pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Albert-Ludwig-Universität Freiburg. Abbildung (C) entstand in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Elke Pogge von Strandmann (Katrin Reiners), Klinik für Innere Medizin I, Labor für Immunologie der Universitätsklinik Köln.

Zum weiteren Nachweis, dass es sich bei den aufgereinigten Vesikeln in der Tat um Exosomen handelt, wurden diese auf die Expression von beschriebenen exosomalen Markern untersucht. Mittels Western Blot Analyse konnte CD9, CD63 und CD81 sowohl auf ctrl RNA als auch 3pRNA induzierten Vesikeln nachgewiesen werden (Abbildung 5-2, C). Neben der Bestimmung von exosomalen Markern per Western Blot ist auch eine durchflusszytometrische Bestimmung möglich. Mit dieser zusätzlichen Methode konnte die Expression von CD9 auf ctrl RNA und 3pRNA Vesikeln bestätigt sowie außerdem die Marker HLA-ABC und HLA-DR nachgewiesen werden (Abbildung 5-2, D). Zusammenfassend kann aufgrund der Größe und des Proteinbesatzes der aufgereinigten Vesikeln geschlossen werden, dass die verwendete Melanomzelllinie mit und ohne Stimulation von RIG-I Exosomen freisetzt und dass die verwendete Methode die Aufreinigung von Exosomen gewährleistet. Die Quantifizierung von Exosomen wird näherungsweise über ihren Proteingehalt vorgenommen<sup>11</sup>. Die Stimulation der Tumorzellen mit 3pRNA aber nicht mit ctrl RNA führte zu einer signifikanten Zunahme des Proteingehaltes der Exosomen (Abbildung 5-2, E). Dies legt eine Zunahme der Exosomenzahl nahe. Mit dieser Quantifizierungsmethode ist jedoch nicht auszuschließen, dass der Proteingehalt in den Exosomen nicht jedoch deren Anzahl zugenommen hat. Eine substantielle Beeinflussung der Exosomen durch 3pRNA nicht jedoch durch ctrl RNA ist damit belegt. Damit konnte erstmalig gezeigt werden, dass neben Stimulationen wie Hitzeschock auch die Aktivierung eines *pattern recognition receptors* die Anzahl bzw. den Proteingehalt von Exosomen steigert.

Da im Folgenden der Einfluss von Melanomexosomen auf Immun- und Tumorzellen untersucht werden sollte, haben wir zunächst analysiert, ob die Melanomexosomen ohne bzw. nach RIG-I Aktivierung von Immun- oder Tumorzellen aufgenommen werden. Dazu markierten wir die Melanomzelllinie D04mel mit CFSE, was zur Bildung von CFSE positiven Exosomen führte. Anschließend stimulierten wir PBMCs oder die Melanomzelllinie D04mel mit den markierten Exosomen und analysierten die Aufnahme der Exosomen durch

---

verschiedene Immunzellen innerhalb der PBMCs bzw. der Melanomzelllinie D04mel anhand der Aufnahme von CFSE in die Immun- oder Tumorzellen. Während NK-Zellen, CD4+ und CD8+ T-Zellen eine schwache Aufnahme von CFSE (Abbildung 5-3, A oben und mitte) zeigten, waren Monozyten stark positiv für den Farbstoff. Daraus lässt sich schließen, dass die Exosomen in PBMC vor allem durch Monozyten aufgenommen werden und zu einem geringeren Anteil von NK- und T-Zellen. Interessanterweise war die Aufnahme in Monozyten von 3pRNA Melanomexosomen doppelt so stark wie von ctrl RNA Exosomen (Abbildung 5-3, A unten). Das deutet auf eine verbesserte Aufnahme von Exosomen nach RIG-I Aktivierung hin. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die verstärkte Expression von ICAM-1 auf der Oberfläche von 3pRNA induzierten Melanomexosomen sein (Abbildung 5-3, B), da ICAM-1 für viele Adhäsionsprozesse verantwortlich ist<sup>218</sup>. Ob diese Korrelation einen kausalen Zusammenhang darstellt, muss weiter untersucht werden. In Abbildung 5-3, C zeigte die Melanomzelllinie D04mel eine Aufnahme von CFSE nach Inkubation der Melanomzellen mit den Melanomexosomen. Daraus folgt, dass Melanomexosomen von der Melanomzelllinie D04mel aufgenommen werden. Damit haben wir beschrieben, dass die durch 3pRNA in Melanomzellen induzierten Vesikel Exosomen sind und diese durch Immun- und Melanomzellen aufgenommen werden können.



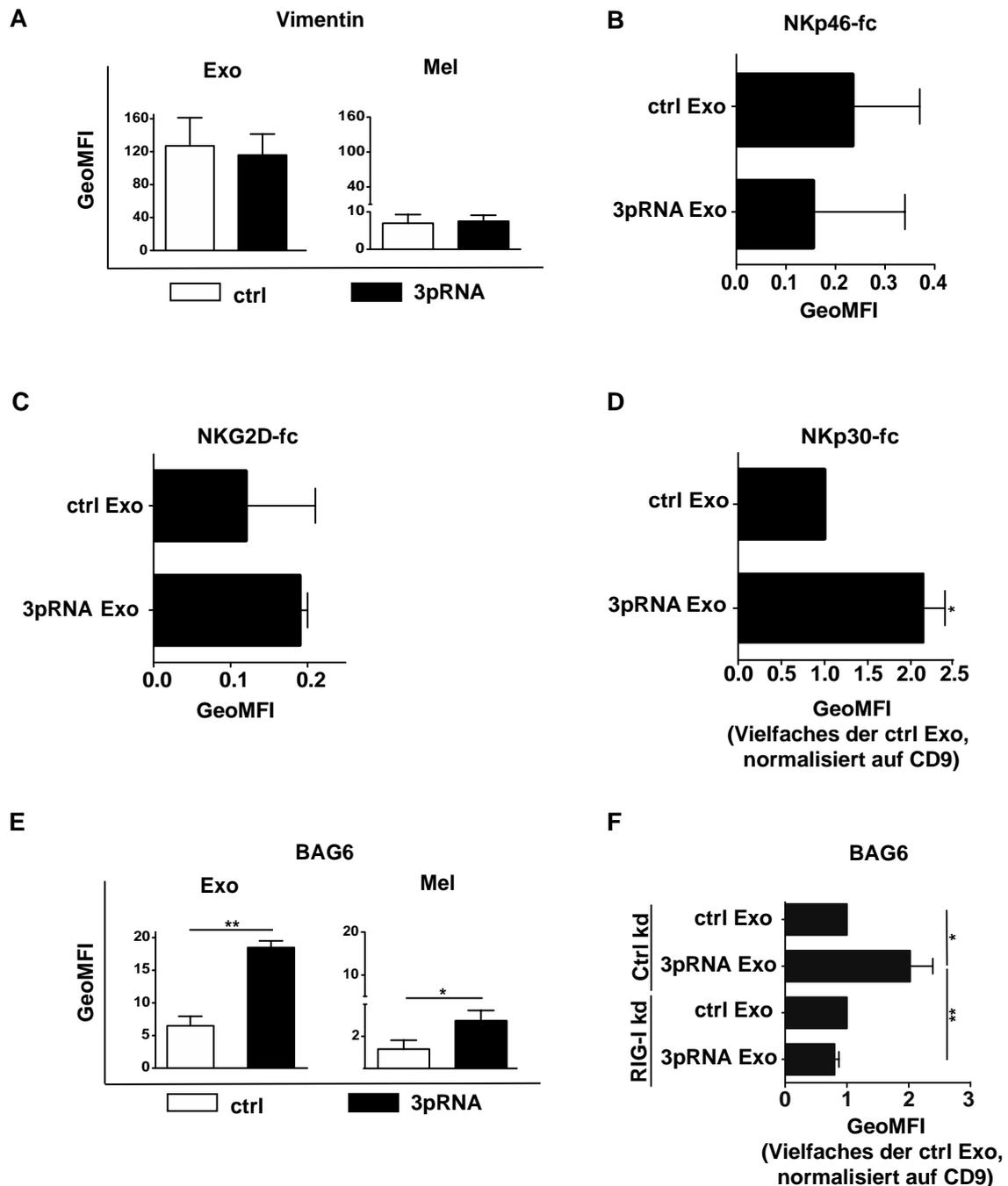
**Abbildung 5-3: Aufnahme von 3pRNA induzierten Melanomexosomen durch Immun- und Melanomzellen.** D04mel wurden für 16 h mit nicht-stimulatorischer (ctrl) RNA oder 3pRNA stimuliert. Anschließend wurden Exosomen (ctrl Exo bzw. 3pRNA Exo) aus dem Überstand mittels serieller Zentrifugation gewonnen. (A) 10  $\mu$ g CFSE Exosomen wurden für 24 h mit PBMCs ko-kultiviert und anschließend im Durchflusszytometer analysiert (n = 4). Dargestellt ist die Strategie zur Verifizierung der einzelnen Immunzellsubtypen innerhalb von PBMCs

aufgrund von Oberflächenmolekülen. In der Mitte ist das Histogramm und die Quantifizierung für die Aufnahme von CFSE-Exosomen durch NK-Zellen, CD4+ und CD8+ T-Zellen und im unteren Teil der Abbildung ist die Aufnahme durch Monozyten dargestellt. **(B)** Durchflusszytometrische Bestimmung von ICAM-1 auf ctrl RNA oder 3pRNA stimulierten Melanomzellen (Mel) oder Exosomen (Exo) (n = 5). **(C)** CFSE markierte Exosomen wurden für 24 h mit  $2 \times 10^4$  Melanomzellen kultiviert und anschließend die CFSE-positiven Melanomzellen im Durchflusszytometer begutachtet (n = 3). Alle Abbildungen zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung. \* und \*\* stehen für  $p < 0,05$  und  $p < 0,01$ .

### **5.1.2 Der NKp30-Ligand BAG6 ist verstärkt auf 3pRNA induzierten Melanomexosomen zu finden und aktiviert NK-Zellen zur Tumorlyse**

Die initiale Entdeckung der NK-aktivierenden Fähigkeiten von 3pRNA Melanomexosomen (vgl. Abbildung 5-1, E und F) verbunden mit der verstärkten Aufnahme von Exosomen durch Immunzellen führte im nächsten Schritt zur Analyse, ob eine Aktivierung von RIG-I in den Melanomzellen die Expression von NK-aktivierenden Liganden auf den Melanomexosomen induziert. Zunächst analysierten wir bekannte NK-Liganden, die NK-Zellen zur Lyse von Tumorzellen aktivieren können. Für die Liganden MICA/B sowie ULBP1/2/3, die durch NKG2D erkannt werden, konnte mit Hilfe der Durchflusszytometrie keine Expression nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Vimentin, ein beschriebener Ligand für NKp46, konnte durchflusszytometrisch auf den Melanomexosomen gemessen werden, zeigt aber keine Veränderung in der Expression nach 3pRNA Behandlung sowohl auf den Tumorzellen als auch auf den Melanomexosomen (Abbildung 5-4, A). Zur Verifizierung dieser Ergebnisse wurden sowohl 3pRNA als auch ctrl RNA Melanomexosomen mit rekombinanten NK-Rezeptor-Fusionsproteinen für NKG2D, NKp46 und NKp30 inkubiert (Abbildung 5-4, B - D). Es zeigte sich keine Bindung von NKp46- und NKG2D-Fusionsprotein an die Melanomexosomen und belegt zusammen mit den Expressionsdaten, dass weder NKG2D- noch NKp46-Liganden für den NK-aktivierenden Phänotyp der 3pRNA Melanomexosomen verantwortlich sind. Im Gegensatz dazu ließ sich jedoch eine verstärkte Bindung des NKp30-Fusionsproteins an die 3pRNA Melanomexosomen belegen (Abbildung 5-4, D). Um den verantwortlichen Liganden zu identifizieren, analysierten wir die beschriebenen Liganden dieses Rezeptors: BAG6<sup>169</sup> und B7-H6<sup>167</sup>. BAG6 war deutlich stärker auf 3pRNA Melanomexosomen als auf ctrl RNA Melanomexosomen exprimiert (Abbildung 5-4, E). Die Tumorzellen zeigten ebenfalls eine Aufregulation von BAG6 auf 3pRNA Stimulation, die aber geringer ausfiel als auf den Melanomexosomen. Im Gegensatz dazu konnte B7-H6 nicht auf 3pRNA induzierten

Melanomexosomen detektiert werden und spielt daher in dem verwendeten Modell keine Rolle (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich konnte beschrieben werden, dass die Aufregulation von BAG6 auf den Exosomen nach 3pRNA Stimulation abhängig von der RIG-I Expression in den Melanomzellen war (Abbildung 5-4, F).

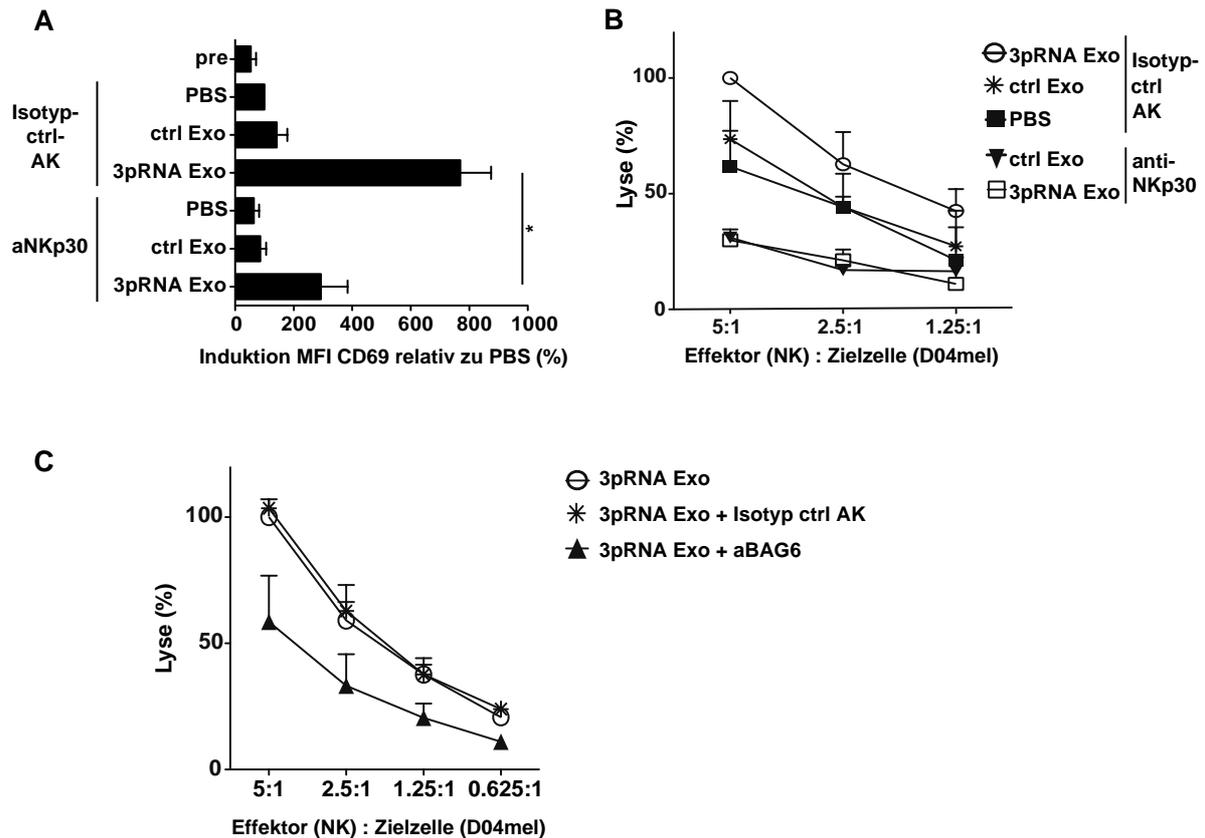


**Abbildung 5-4: Aktivierende NK-Liganden auf 3pRNA Melanomexosomen.** D04mel wurden für 16 h mit nicht-stimulatorischer (ctrl) RNA oder 3pRNA stimuliert. Anschließend wurden Exosomen (ctrl Exo bzw. 3pRNA Exo) aus dem Überstand mittels serieller Zentrifugation gewonnen. (A) Exosomen (Exo) und Melanomzellen D04mel (Mel) wurden auf die Expression von Vimentin mittels Durchflusszytometrie untersucht (n = 5). (B+C+D) Exosomen wurden auf ihre Bindung an fc-Fusionsproteine für NKp46 (B), NKG2D (C) und NKp30 (D) mit

---

Durchflusszytometrie analysiert (n = 3 - 4). (E) Exosomen (Exo) und Melanomzellen D04mel (Mel) wurden auf die Expression von BAG6 mittels Durchflusszytometrie untersucht (n = 5). (F) Die Expression von BAG6 wurde auf den Exosomen mittels Durchflusszytometrie analysiert, die aus Kontroll *knock down* (Ctrl kd) oder RIG-I *knock down* (RIG-I kd) D04mel generiert wurden (n = 4). Alle Abbildungen zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung. \* und \*\* und stehen für  $p < 0,05$  und  $p < 0,01$ . Daten wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Elke Pogge von Strandmann (Katrin Reiners), Klinik für Innere Medizin I, Labor für Immunologie der Universitätsklinik Köln erhoben.

Um zu belegen, dass die verstärkte BAG6 Expression ursächlich an der NK-Zell-Aktivierung der 3pRNA Melanomexosomen beteiligt ist, analysierten wir NK-Zellen nach Zugabe von Melanomexosomen hinsichtlich ihrer Aktivierung und ihrem Lyseverhalten gegenüber von Melanomzellen. 3pRNA Melanomexosomen aber nicht ctrl RNA Exosomen waren in der Lage, den NK-Zell-Aktivierungsmerker CD69 zu induzieren. Durch die Blockierung von NKp30 konnte die Expression von CD69 der NK-Zellen vermindert werden (Abbildung 5-5, A). Zusätzlich konnte auch die Lyse von Melanomzellen durch 3pRNA Exosomen aktivierte NK-Zellen in Abhängigkeit von NKp30 induziert werden (Abbildung 5-5, B). Das belegt, dass 3pRNA Melanomexosomen NK-Zellen zur Lyse von Melanomzellen in Abhängigkeit von NKp30 und damit am ehesten über BAG6 vermittelt, lysieren können. Mit der Blockade von BAG6 auf 3pRNA Exosomen konnte BAG6 als Mediator der NK-vermittelten Melanomzelllyse durch 3pRNA Exosomen identifiziert werden (Abbildung 5-5, C). Zusammenfassend induziert 3pRNA eine verstärkte Expression von BAG6 auf Melanomexosomen, die in Abhängigkeit von NKp30 und damit verbunden BAG6 NK-Zellen aktivieren und zur Lyse von Tumorzellen anregen.



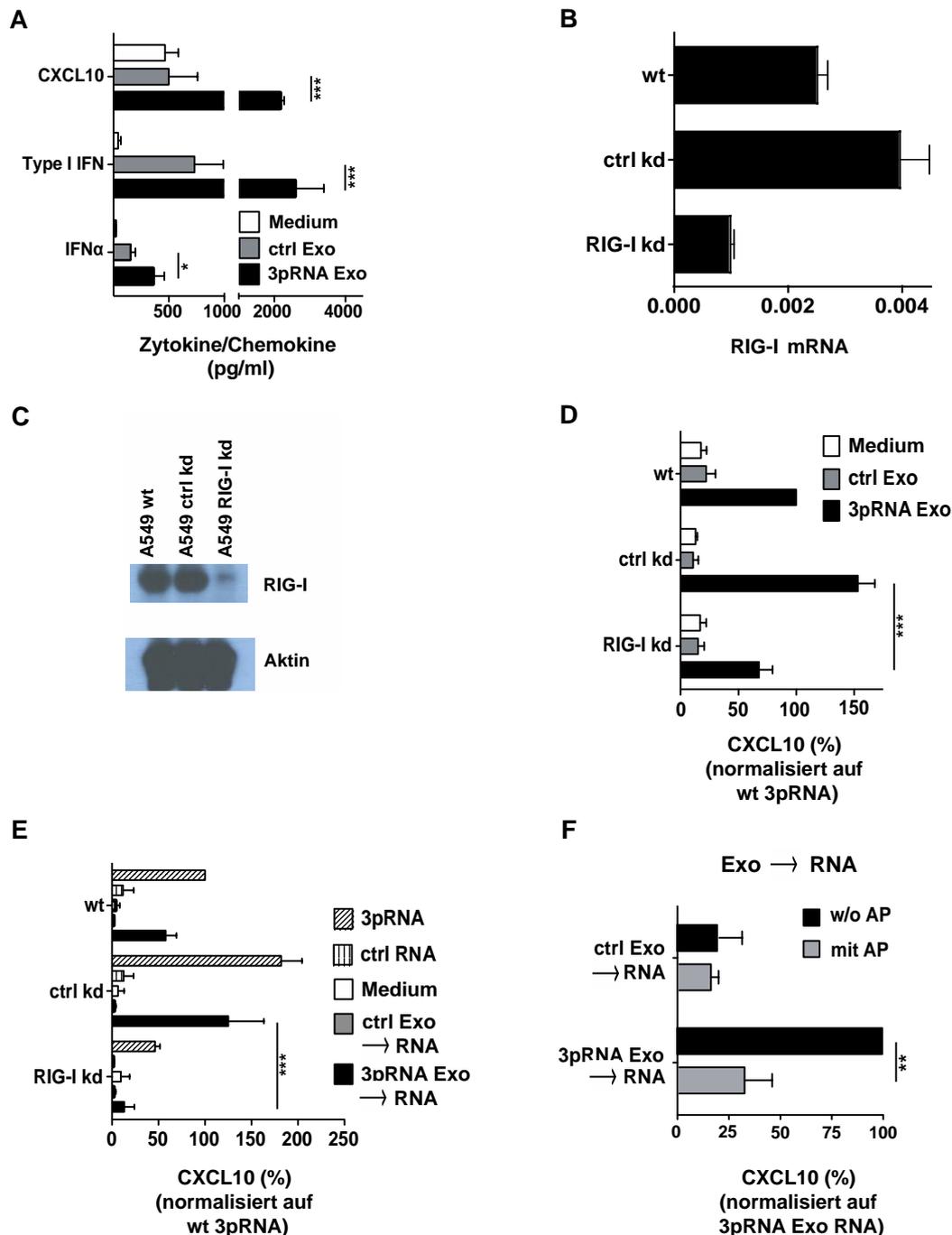
**Abbildung 5-5: NK-Effekte durch 3pRNA induzierte Melanomexosomen sind abhängig von NKp30 und BAG6.** Die Melanomzelllinie D04mel wurden für 16 h mit nicht-stimulatorischer (ctrl) RNA oder 3pRNA stimuliert. Anschließend wurden Exosomen aus dem Überstand mittels serieller Zentrifugation gewonnen. (A) Primäre NK-Zellen wurden mit PBS oder mit Exosomen (3pRNA Exo und ctrl Exo) für 36 h behandelt. Zusätzlich wurden zu 3pRNA Exosomen ein Isotyp-Kontroll-Antikörper (Isotyp-ctrl AK) oder ein blockierender NKp30-Antikörper (aNKp30) zugegeben. Messung von CD69 mittels Durchflusszytometrie auf primären NK-Zellen (n = 4) (B) Versuchsaufbau wie unter (A) beschrieben. Zytotoxizität der NK-Zellen gegenüber den unbehandelten Melanomzellen (D04mel) wurde mittels des Europiums-Freisetzungsversuches in den dargestellten Effektor:Zielzellverhältnissen bestimmt. Die Ergebnisse sind auf 100% der Lyse durch 3pRNA Exo im Effektor:Zielzellverhältnis von 5:1 normalisiert (n = 3). (C) Versuchsaufbau wie unter (B) beschrieben. Zu den 3pRNA Exosomen wurden ein Isotyp-Kontroll-Antikörper (Isotyp ctrl AK) oder ein anti-BAG6 Antikörper (aBAG6) hinzugegeben und die Lyse der Melanomzellen (D04mel) im Europium-Freisetzungsversuche bestimmt. Die Ergebnisse sind auf 100% der Lyse durch 3pRNA Exo im Effektor:Zielzellverhältnis von 5:1 normalisiert (n = 3 für 3pRNA Exo und 3pRNA Exo + aBAG6, n = 2 für 3pRNA Exo + Isotyp-ctrl AK). Alle Abbildungen zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung. \* steht für p < 0,05. Daten wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Elke Pogge von Strandmann (Katrin Reiners), Klinik für Innere Medizin I, Labor für Immunologie der Universitätsklinik Köln erhoben.

### 5.1.3 Melanomexosomen enthalten 3pRNA nach Aktivierung von RIG-I in Melanomzellen

Es ist beschrieben, dass Exosomen diverse RNA-Spezies, insbesondere kurze RNA Moleküle wie miRNAs enthalten können<sup>13</sup>. Für RIG-I konnte eine Aktivierung des Rezeptors durch kurze RNA Moleküle mit einem 3p-Motiv (ab 19 Basenpaaren) belegt werden. Aufgrund der Beobachtung, dass 3pRNA induzierte Melanomexosomen über eine NK-Zell-Aktivierung

---

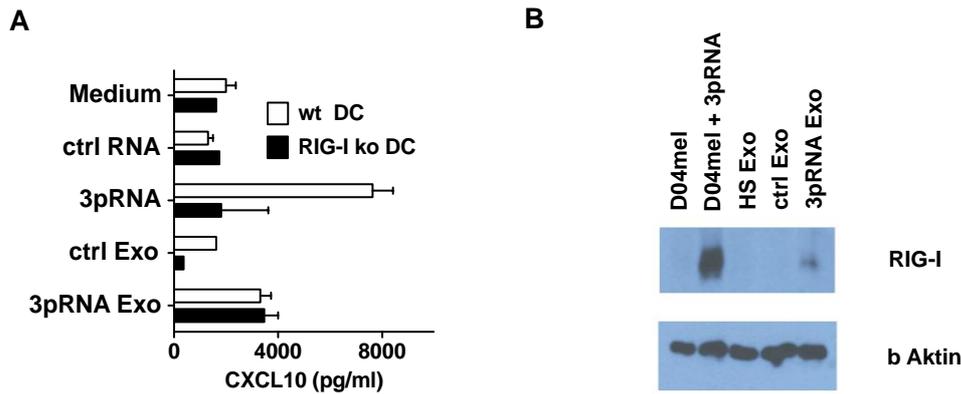
hinaus in PBMCs zur Produktion von CXCL10, Typ I IFN und IFN $\alpha$  führten (Abbildung 5-6, A), stellten wir die Hypothese auf, dass es zur Verpackung des RIG-I Liganden in die Melanomexosomen nach Aktivierung von RIG-I kommt. Um diese Hypothese zu belegen, inkubierten wir die Zelllinie A549 mit Melanomexosomen. Nach Inkubation mit RIG-I induzierten Melanomexosomen aber nicht nach Inkubation mit ctrl RNA induzierten Melanomexosomen zeigte sich eine Produktion von CXCL10. Nach *knock down* von RIG-I in A549, welcher auf mRNA und Protein-Level bestätigt wurde (Abbildung 5-6, B und C), war die CXCL10 Induktion durch 3pRNA Melanomexosomen vermindert (Abbildung 5-6, D). Dies belegt, dass 3pRNA Melanomexosomen den Rezeptor RIG-I in den Zielzellen aktivieren können. Um zu analysieren, ob ein RIG-I Ligand in den Exosomen transportiert wird, isolierten wir die RNA aus den Melanomexosomen. Die aufgereinigte RNA aus 3pRNA Melanomexosomen induzierte ebenfalls CXCL10 in A549 in Abhängigkeit von RIG-I (Abbildung 5-6, E). Dies zeigte, dass RIG-I aktivierende RNA-Motive in den 3pRNA Melanomexosomen vorhanden sind. Um zu klären, ob es sich tatsächlich um 3pRNA Motive handelt, welche die RIG-I Aktivierung induzieren, wurde die exosomale RNA mit alkalischer Phosphatase behandelt, die zu einem Verdau des 3p-Motives führt. Das nicht vorhandene 3p-Motiv würde eine Aktivierung von RIG-I verhindern. In Abbildung 5-6, F zeigte die exosomale RNA von 3pRNA Melanomexosomen eine Induktion von CXCL10 in PBMCs während die mit alkalischer Phosphatase behandelte exosomale RNA zu einem Verlust der CXCL10 Produktion führte. Daraus folgt, dass sich in 3pRNA induzierten Melanomexosomen 3p-tragende RNAs befinden, die in Zielzellen übertragen und dort durch RIG-I erkannt werden können.



**Abbildung 5-6: Melanomesosomen enthalten 3pRNA nach Aktivierung von RIG-I in Melanomzellen.** (A) PBMCs wurden für 24 h mit 10  $\mu$ g nicht-stimulatorischer (ctrl) RNA oder 3pRNA induzierten Tumorexosomen (ctrl Exo oder 3pRNA Exo) aus der Melanomzelllinie D04mel inkubiert und im zellfreien Überstand die Menge an gebildeten CXCL10, Typ I IFN und IFN $\alpha$  bestimmt. (B) RIG-I mRNA Level von A549 Wildtyp (wt), Kontroll *knock down* (ctrl kd) und RIG-I *knock down* Zellen. Dargestellt ist die normalisierte Expression zu  $\beta$ -Aktin. (C) Expression endogener RIG-I Level auf Proteinebene mittels Western Blot in A549 Wildtyp (wt), Kontroll *knock down* (ctrl kd) und RIG-I *knock down* Zellen. (D+E) Stimulation von A549 wt/ ctrl kd/ RIG-I kd mit 3pRNA oder ctrl induzierten Tumorexosomen (D) oder 50 ng/ml RNA von ctrl RNA (ctrl Exo  $\rightarrow$  RNA) oder 3pRNA induzierten Exosomen (3pRNA Exo  $\rightarrow$  RNA) im Vergleich zu mit Lipofektamin $^{\circledR}$  transfizierter ctrl RNA (0,5 ng/ml) oder 3pRNA (0,5 ng/ml) (E) für 24 h. CXCL10 wurde aus zellfreien Überständen mit ELISA quantifiziert (n = 3). (F) PBMCs wurden mit RNA aus ctrl Exo (ctrl Exo  $\rightarrow$  RNA) oder 3pRNA Exo (3pRNA Exo  $\rightarrow$  RNA) (50 ng/ml) mit oder ohne (w/o) alkalischem Phosphataseverdau für 24 h stimuliert. Analyse von CXCL10 aus dem zellfreien Überstand mittels ELISA (n = 4). Alle Abbildungen zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung. \*, \*\* und \*\*\* stehen für p < 0,05, p < 0,01 und p < 0,001.

---

Die Verpackung von 3p-tragenden RNA-Spezies wirft die Frage auf, ob auch zusätzlich der Rezeptor RIG-I in die 3pRNA Melanomexosomen transferiert wird. Vergleicht man Abbildung 5-6 D und E fällt auf, dass der RIG-I *knock down* die durch RNA aus 3pRNA Melanomexosomen vermittelte CXCL10 Produktion um etwa 80% inhibieren konnte während die Stimulation der A549 mit 3pRNA Melanomexosomen die CXCL10 Produktion nur um 60% reduzierte. Das könnte darauf hindeuten, dass mit den Exosomen zusätzlich RIG-I übertragen wird, so dass der *knock down* von RIG-I in den Zielzellen eine geringe funktionelle Auswirkung hat. In einem ersten Versuch führte die Stimulation von murinen Dendritischen Zellen mit 3pRNA Melanomexosomen und die Lipofektion transfizierter 3pRNA zur Bildung von murinem CXCL10 während ctrl RNA und ctrl Melanomexosomen dazu nicht in der Lage waren (Abbildung 5-7, A). Im Gegensatz dazu wird die Produktion von murinem CXCL10 nach 3pRNA Transfektion in murinen RIG-I *knock out* DCs auf Mediumniveau inhibiert während die CXCL10 Induktion durch 3pRNA Melanomexosomen unverändert blieb (Abbildung 5-7, A). Auch dies wäre vereinbar mit dem Transport von RIG-I in den Exosomen. Daraus resultierend betrachteten wir die Expression von RIG-I in der Melanomzelllinie D04mel im Vergleich zu induzierten Melanomexosomen. Nach 3pRNA Stimulation der Melanomzelllinie D04mel konnte RIG-I im Western Blot nachgewiesen werden (Abbildung 5-7, B). In Hitzeschock und ctrl Melanomexosomen war RIG-I nicht detektierbar dafür aber in 3pRNA Melanomexosomen (Abbildung 5-7, B). Damit konnte gezeigt werden, dass der Rezeptor RIG-I in die Exosomen verpackt wird. Zusätzlich deuten die ersten Ergebnisse darauf hin, dass der übertragene Rezeptor RIG-I in den Zielzellen funktionell aktiv sein könnte. Dies muss zukünftig weiter belegt werden.

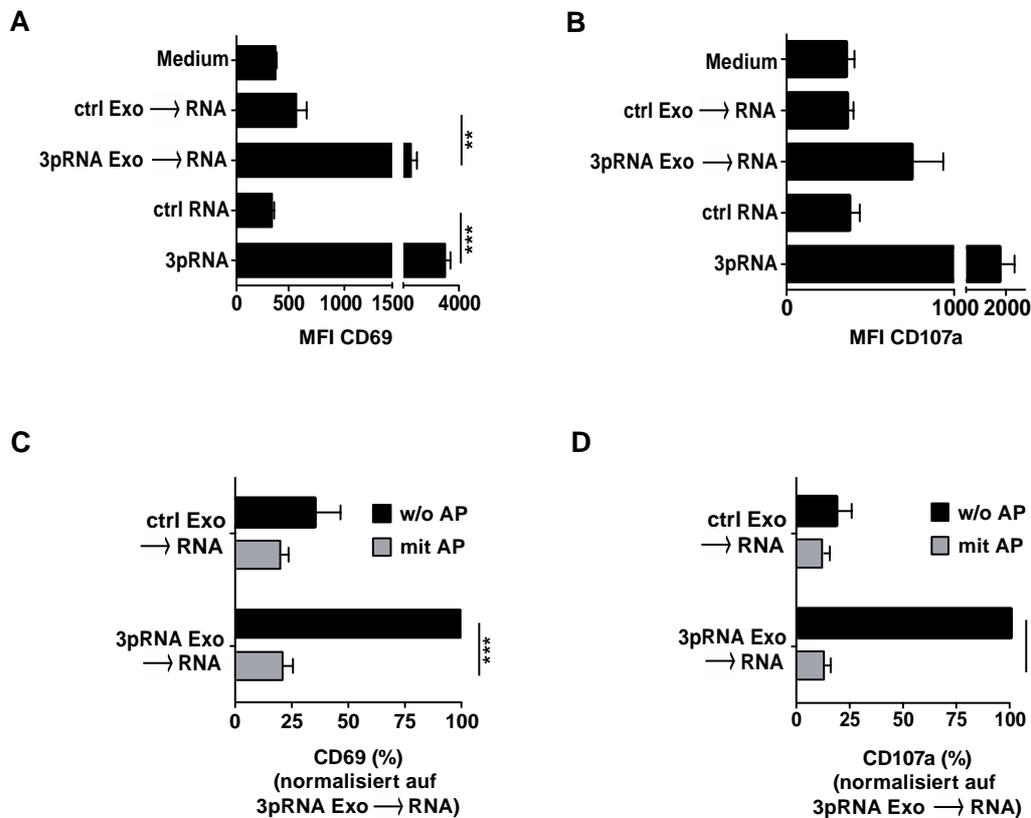


**Abbildung 5-7: 3pRNA Melanomexosomen tragen RIG-I Protein.** (A)  $2 \cdot 10^5$  murine BM-DCs von wt und RIG-I knock out Mäusen wurden für 24h mit nicht-stimulatorischer (ctrl) RNA (50 ng/ml), ctrl Melanomexosomen, 3pRNA (50 ng/ml) und 3pRNA Melanomexosomen für 24 h inkubiert und mittels ELISA der zellfreie Überstand auf CXCL10 analysiert ( $n = 1$ ). (B) Bestimmung von RIG-I Proteinleveln in Melanomexosomen und D04mel aus  $2 \mu\text{g}$  Gesamtprotein. Melanomexosomen wurden durch Hitzeschock (HS), ctrl RNA oder 3pRNA induziert. Im Vergleich dazu die Expression von RIG-I in unbehandelten oder 3pRNA behandelten D04mel. Als Ladekontrolle ist  $\beta$ -Aktin dargestellt.

#### 5.1.4 Die in Melanomexosomen beinhaltete 3pRNA aktiviert NK-Zellen

Nachdem wir zeigen konnten, dass 3pRNA induzierte Melanomexosomen RIG-I mit 3pRNA beinhalten und dass der Überstand von RIG-I stimulierten Melanomzellen NK-Zellen zur Degranulation anregen kann, stellt sich die Frage, ob 3pRNA generell bzw. über die Exosomen zur Aktivierung von NK-Zellen beitragen kann. Anders als für Viren und TLR Rezeptoren ist die Aktivierung von NK-Zellen durch den Rezeptor RIG-I grundsätzlich kaum untersucht. Dazu stimulierten wir PBMCs mit 3pRNA und mit RNA aus 3pRNA Melanomexosomen. Es zeigte sich, dass beide Stimuli NK-Zellen aktivieren können. Sowohl 3pRNA als auch RNA aus 3pRNA Melanomexosomen erhöhten innerhalb von PBMCs die Expression von CD69 auf NK-Zellen (Abbildung 5-8, A) und führten zusätzlich zur Degranulation (Abbildung 5-8, B). Diese Effekte wurden durch ctrl RNA, ctrl Melanomexosomen und RNA aus ctrl RNA Melanomexosomen nicht ausgelöst. Der Beweis, dass tatsächlich eine 3p-tragende Gruppe innerhalb der exosomalen RNA Fraktion für die NK-Zell-Aktivierung verantwortlich ist, belegt der Verdau des 3p-Motivs mittels alkalischer Phosphatase. Der Verlust der 3p-Gruppe, die das bevorzugte Motiv des RIG-I Rezeptors ist, verhinderte die CD69 Induktion (Abbildung 5-8, C) und Degranulation (Abbildung 5-8, D) von NK-Zellen nach Stimulation mit exosomaler RNA aus 3pRNA Melanomexosomen. Daraus kann geschlossen werden, dass der RIG-I Ligand 3pRNA in der Lage ist NK-Zellen zu

aktivieren und dass der Ligand nach Aktivierung von RIG-I in Melanomzellen über Melanomexosomen übertragen werden kann.

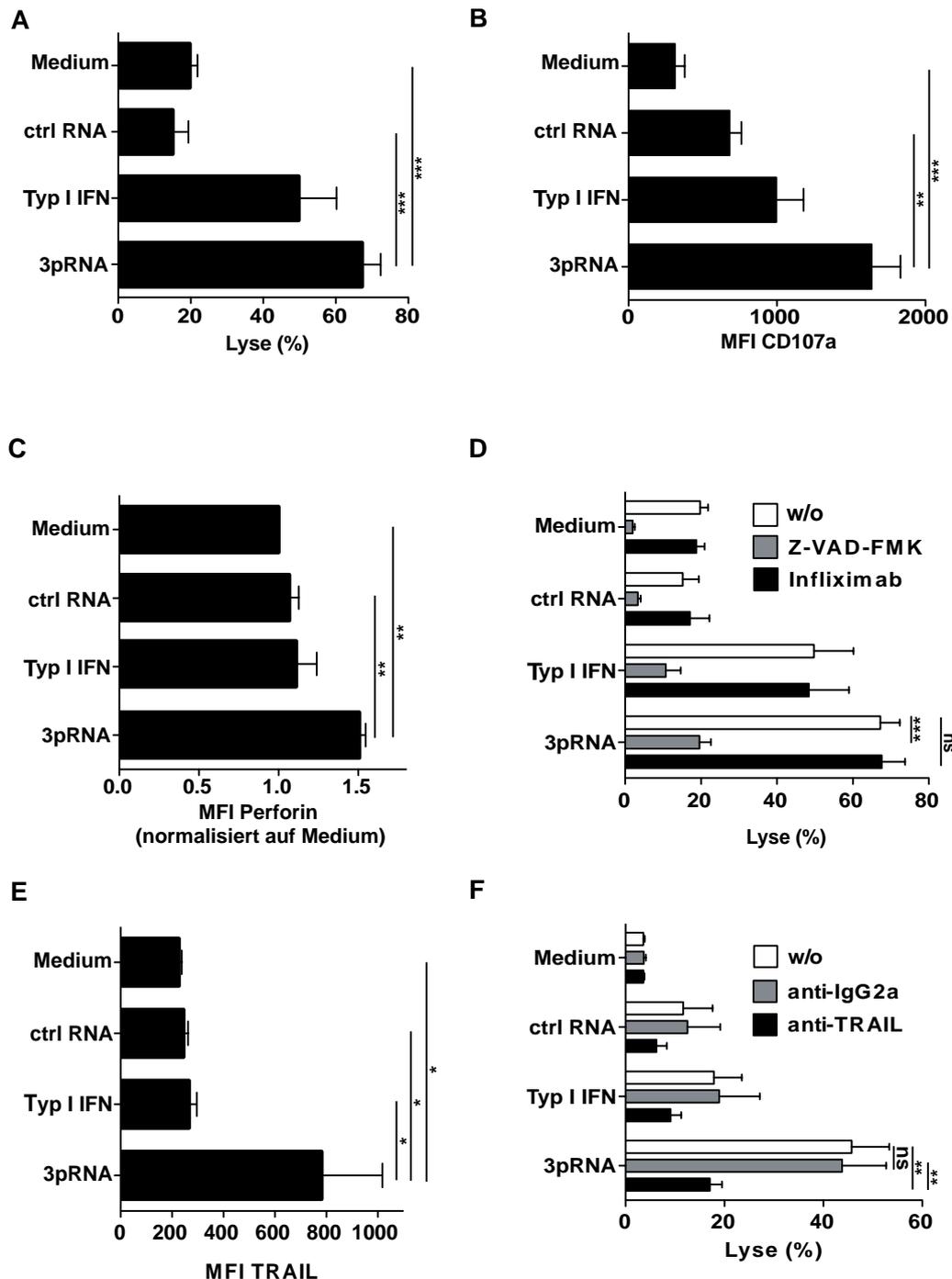


**Abbildung 5-8: Exosomale RNA aus 3pRNA induzierten Melanomexosomen aktiviert NK-Zellen.** (A+B)  $4 \times 10^5$  PBMCs wurden mit 50 ng/ml exosomaler RNA von nicht-stimulatorischer (ctrl) RNA (ctrl Exo → RNA) oder 3pRNA (3pRNA Exo → RNA) induzierten Melanomexosomen oder 0,5 ng/ml 3pRNA oder ctrl RNA mit Lipofectamin2000® für 24h stimuliert. Expression von CD69 (A) und CD107a (B) nach Zugabe von  $2 \times 10^4$  Melanomzellen wurde auf NK-Zellen (CD3 negativ, CD56 positiv) mittels Durchflusszytometrie bestimmt (n = 5). (C+D) Versuchsaufbau wie (A) mit oder ohne (w/o) alkalischen Phosphatase Verdau (AP) der exosomalen RNA. Expression von CD69 (C) und CD107a (D) von NK-Zellen wurde im Durchflusszytometer bestimmt (n = 4). \*, \*\* und \*\*\* stehen für  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  und  $p < 0,001$ .

### 5.1.5 Der Mechanismus der 3pRNA vermittelten NK-Aktivierung

Da die Aktivierung von NK-Zellen durch RIG-I bisher nur in Ansätzen beschrieben war, wollten wir herausfinden, wie der Mechanismus dieser unter 5.1.4 beobachteten Aktivierung ist. Um diese Frage zu beantworten, wurden NK-Zellen innerhalb von PBMCs mit 3pRNA aktiviert und anschließend mittels MACS-Technologie aufgereinigt, um in den folgenden Versuchen das Verhalten von reinen NK-Zellen gegenüber den Melanomzellen untersuchen zu können. NK-Zellen, die aus PBMCs isoliert worden sind, konnten Melanomzellen nach Stimulation mit 3pRNA aber nicht mit ctrl RNA lysieren (Abbildung 5-9, A). Beim Kontakt der NK-Zelle mit ihrer potentiellen Zielzelle gelangen die zytotoxischen

Granula der NK-Zelle an die Plasmamembran und verschmelzen mit dieser. In den zytotoxischen Granula werden konstitutiv zytotoxische Proteine exprimiert, z.B. Granzym und Perforin. Nach Ausbildung der immunologischen Synapse und der Fusion der zytotoxischen Granula mit der Zellmembran wird während des Prozesses der Degranulation Perforin ausgeschüttet und gelangt zur Zielzelle. Dort bewirkt es die Ausbildung von Poren in der Zellmembran<sup>219</sup> und ermöglicht das passive Eindringen von Granzym, welches über eine direkte Caspase 3 Aktivierung zum Zelltod der Zielzelle führt<sup>220</sup>. Für 3pRNA aktivierte NK-Zellen konnten wir diesen Hinweis auf Lyse aufgrund toxischer Degranulation nachweisen: Nach 3pRNA Stimulation zeigten NK-Zellen im Vergleich zu ctrl RNA behandelten Zellen die Expression des Degranulationsmarkers CD107a (Abbildung 5-9, B) und die Expression von Perforin (Abbildung 5-9, C). Zusätzlich war die Induktion des Zelltodes der Zielzelle in diesem Versuchsaufbau mittels Pan-Caspase-Inhibitor (Z-VAD-FMK) inhibierbar (Abbildung 5-9, D). Zusammen deutet dies darauf hin, dass RIG-I über direkte Stimulation NK-Zellen zur Degranulation anregt und damit zur Lyse von Tumorzellen führt. Neben der Freisetzung von Perforin und Granzym ist für NK-Zellen die Induktion des Zelltodes über die Freisetzung von TNF $\alpha$  bekannt, welches durch die Bindung an den TNF-Rezeptor den extrinsischen Apoptosesignalweg einleitet und damit zum Zelltod der Zielzelle führt. Um zu untersuchen, ob TNF $\alpha$  an der Lyse der Zielzellen in diesem Versuchsaufbau beteiligt war, fügten wir den TNF $\alpha$  Inhibitor Infliximab hinzu. Hiermit war keine Inhibition der Melanomzelllyse beobachtbar. Dies spricht dafür, dass TNF $\alpha$  an der direkten Lyse von Tumorzellen durch NK-Zellen nach Stimulation von RIG-I nicht beteiligt ist (Abbildung 5-9, D). Neben den untersuchten Mechanismen, die zur direkten RIG-I abhängigen Lyse durch NK-Zellen führen, kommen weitere direkte NK-Lyse-Mechanismen in Frage. Dazu zählt insbesondere der Rezeptor TRAIL<sup>221,222</sup>. Wir konnten eine verstärkte Expression von TRAIL auf NK-Zellen nach Stimulation von PBMCs mit 3pRNA nachweisen (Abbildung 5-9, E). Die Blockade von TRAIL mittels eines blockierenden Antikörpers (anti-TRAIL) bedingte eine signifikante Reduktion der Tumorzelllyse durch 3pRNA aktivierte NK-Zellen. Die Verwendung eines Kontrollantikörpers verdeutlicht das spezifische Verhalten des anti-TRAIL Antikörpers (Abbildung 5-9, F). Zusammenfassend konnten wir belegen, dass 3pRNA in der Lage ist, NK-Zellen zur direkten Lyse von Melanomzellen über die Induktion von Degranulation, der Freisetzung von Perforin und in Abhängigkeit des TRAIL-Signalweges anzuregen. Wie diese verschiedenen Mechanismen interagieren, muss im Verlauf näher charakterisiert werden.

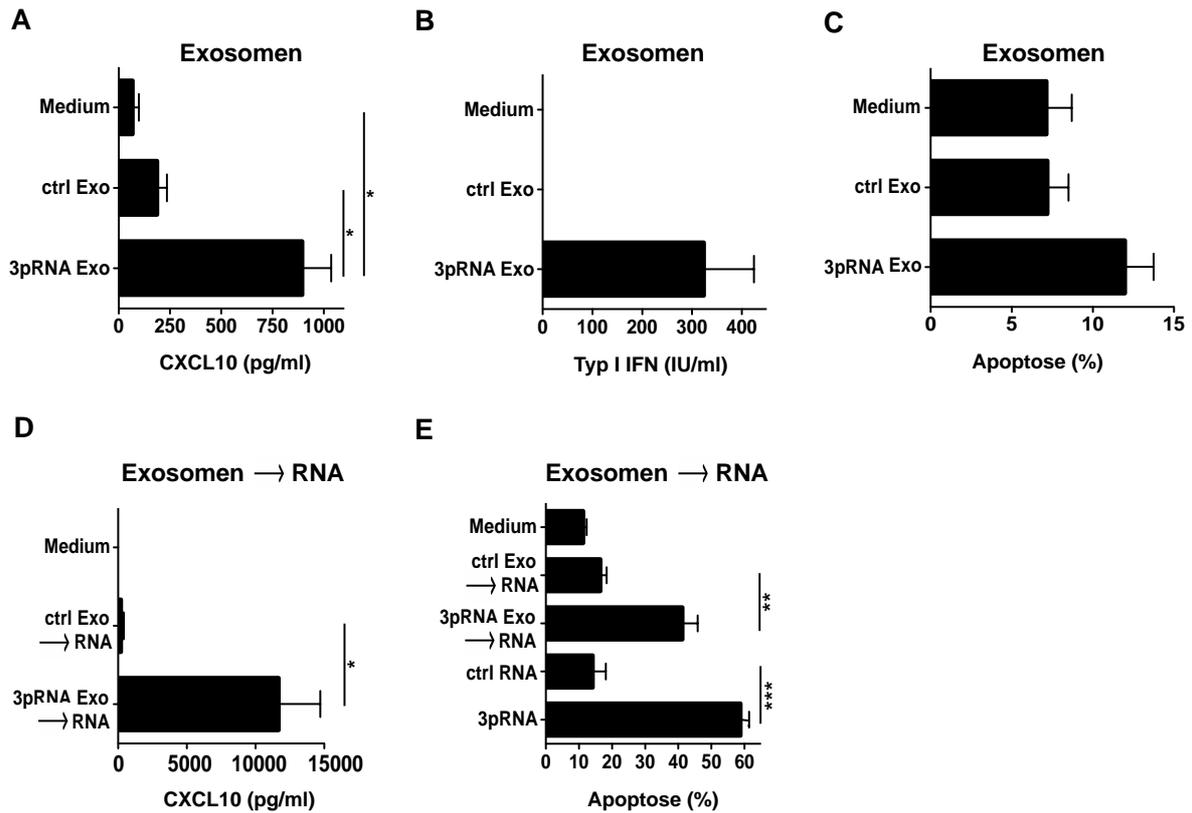


**Abbildung 5-9: Der Mechanismus der 3pRNA vermittelten NK-Aktivierung.** (A) NK-Zellen wurden mittels MACS-Separations-Technologie aus nicht-stimulatorischer RNA (ctrl RNA) bzw. 3pRNA (1  $\mu\text{g/ml}$ ) oder Typ I IFN (300 IU/ml) stimulierten PBMCs isoliert.  $1 \cdot 10^5$  NK-Zellen wurden für 24 h mit DiO gefärbten Melanomzellen D04mel ko-kultiviert und die Zelllyse im Durchflussmeter bestimmt. Als lysierte Tumorzellen gelten DiO+Hoechst33258+ Tumorzellen, berechnet an der Gesamtzahl der DiO+ Tumorzellen und unter Einbeziehung des spontanen Auftretens von DiO+Hoechst33258+ Tumorzellen ohne die Anwesenheit von Effektorzellen ( $n = 4$ ). (B) Stimulation von  $4 \cdot 10^5$  PBMCs mit 300 IU/ml Typ I IFN, ctrl RNA oder 3pRNA (je 1  $\mu\text{g/ml}$ ). Nach 18 h werden  $2 \cdot 10^4$  Melanomzellen D04mel pro 96 well zugegeben und für 4 h ko-kultiviert. Die mittlere Fluoreszenzintensität von CD107a auf CD3- CD56+ NK-Zellen wird anschließend durchflusszytometrisch bestimmt. (C) Versuchsaufbau wie unter (A). Ko-Kultur zwischen NK-Zellen und D04mel für 4 h. Durchflusszytometrische Bestimmung der mittlerern Fluoreszenzintensität von Perforin auf CD3- CD56+ NK-Zellen ( $n = 3$ ). (D) Versuchsaufbau wie unter (A). Zugabe von 20  $\mu\text{M}$  Z-VAD-FMK oder 100  $\mu\text{g/ml}$  Infliximab zur NK-Zell- D04mel Ko-Kultur. Durchflusszytometrische Bestimmung der Tumorzelllyse anhand DiO+ Tumorzellen ( $n = 4$ ). (E) Stimulation von  $4 \cdot 10^5$  PBMCs mit 300 IU/ml Typ I IFN, ctrl RNA bzw. 3pRNA (je 1  $\mu\text{g/ml}$ ). Nach 24 h Inkubation wurde die mittlere Fluoreszenzintensität von TRAIL auf CD3- CD56+ NK-Zellen bestimmt ( $n = 4$ ). (F)

Versuchsaufbau wie unter (A). Präinkubation der NK-Zellen mit anti-TRAIL oder anti-IgG2a (je 1,25 µg/ml) vor Ko-Kultur mit DiO-markierten Tumorzellen. Alle Abbildungen zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung. \*, \*\* und \*\*\* stehen für  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  und  $p < 0,001$ , ns = nicht signifikant.

### **5.1.6 Exosomen aus 3pRNA behandelten Melanomzellen zeigen einen direkten Effekt auf Melanomzellen**

Nachdem eine RIG-I aktivierende 3pRNA Spezies in den Melanomexosomen gezeigt werden konnte und es publiziert ist, dass eine RIG-I Aktivierung in Melanomzellen zur Apoptose und Zytokinfreisetzung führt, sollte untersucht werden, ob ein direkter Effekt von RIG-I induzierten Melanomexosomen auf unbehandelten Melanomzellen nachzuweisen ist. Die bevorzugte Aufnahme der 3pRNA induzierten Melanomexosomen im Vergleich zu den ctrl Melanomexosomen durch die Melanomzellen konnte bereits in Abbildung 5-3, C gezeigt werden. Im Weiteren zeigten die Melanomzellen D04mel nach Behandlung mit 3pRNA Melanomexosomen im Vergleich zu ctrl Melanomexosomen eine erhöhte Ausschüttung von CXCL10 (Abbildung 5-10, A) und Typ I IFN (Abbildung 5-10, B) sowie eine leicht erhöhte Apoptoserate (Abbildung 5-10, C). Wie bereits für andere Melanomzelllinien publiziert<sup>128</sup> und von mir bereits in der Diplomarbeit beschrieben, induziert mit Lipofektion transfizierte 3pRNA auf der Melanomzelllinie D04mel CXCL10 und Apoptose. Das legt nahe, dass die in den Melanomexosomen nachgewiesene 3pRNA diesen Effekt vermittelt. Um dies weiter zu belegen, isolierten wir die exosomale RNA und konnten zeigen, dass die Expression von CXCL10 (Abbildung 5-10, D) sowie die Induktion von Apoptose (Abbildung 5-10, E) in der Zelllinie D04mel durch Transfektion der exosomalen RNA aus 3pRNA Melanomexosomen verursacht werden kann.



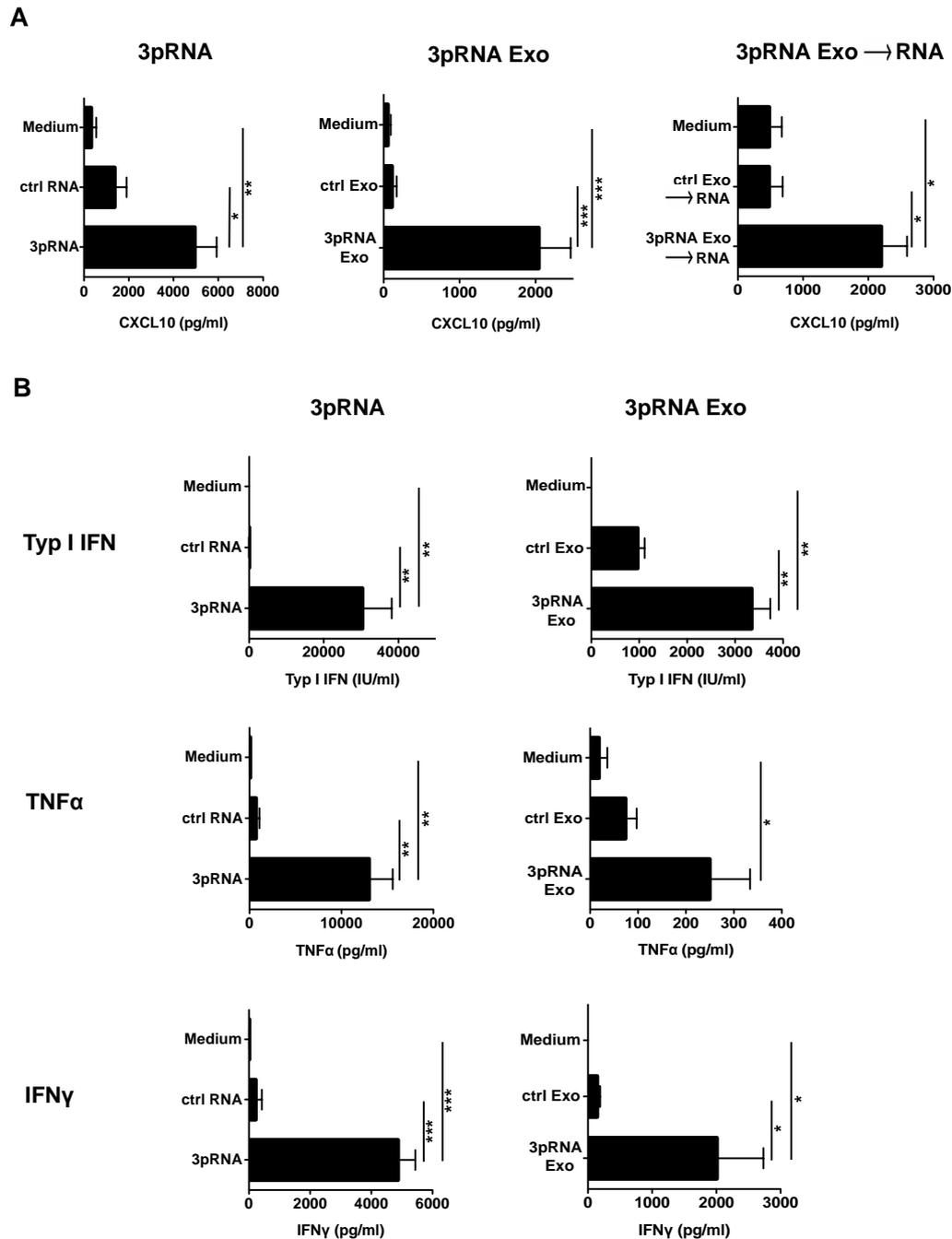
**Abbildung 5-10: Exosomen aus 3pRNA behandelten Melanomzellen zeigen einen direkten Effekt auf Melanomzellen.** Melanomzellen D04mel wurden mit 3pRNA oder nicht-stimulatorischer (ctrl) RNA transfiziert und Exosomen nach 12 h Stimulation durch serielle Zentrifugation isoliert. (A+B)  $2 \cdot 10^4$  D04mel wurden für 24 h mit Exosomen kultiviert und der Überstand auf CXCL10 (A) oder Typ I IFN (B) analysiert (n = 3). (C)  $2 \cdot 10^4$  D04mel wurden für 48 h mit Exosomen kultiviert und Apoptose mittels der Farbstoffe YoPro-1 und Hoechst33258 im Durchflusszytometrie bestimmt (n = 3). (D+E)  $2 \cdot 10^4$  D04mel wurden für 48 h mit 50 ng/ml exosomaler RNA (ctrl Exo → RNA oder 3pRNA Exo → RNA) oder 0,5 ng/ml 3pRNA oder ctrl RNA mit Lipofectamin2000® stimuliert. Messung von CXCL10 im zellfreien Überstand (D) und Bestimmung der Apoptoserate im Durchflusszytometer mit YoPro-1 und Hoechst33258 (E) (n = 3). Alle Abbildungen zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung. \* und \*\* stehen für  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ .

### 5.1.7 3pRNA induzierte Exosomen induzieren pro-inflammatorische und anti-virale Zytokine/ Chemokine in Immunzellen

Die oben beschriebenen Daten belegen, dass 3pRNA nach Stimulation von RIG-I in Melanomzellen in Exosomen transportiert wird und 3pRNA abhängige Immuneffekte auslösen kann. Im folgenden sollte untersucht werden, ob Zytokine bzw. Chemokine, die durch 3pRNA innerhalb von PBMCs gebildet werden auch über 3pRNA in RIG-I induzierten Melanomexosomen induziert werden können. Die Aktivierung von RIG-I durch seinen Liganden 3pRNA bedingt die Bildung von Typ I IFN sowie von IFN induzierbaren Genen (z.B. CXCL10)<sup>106</sup>. Sowohl mit Lipofektion transfizierte 3pRNA als auch 3pRNA Melanomexosomen

---

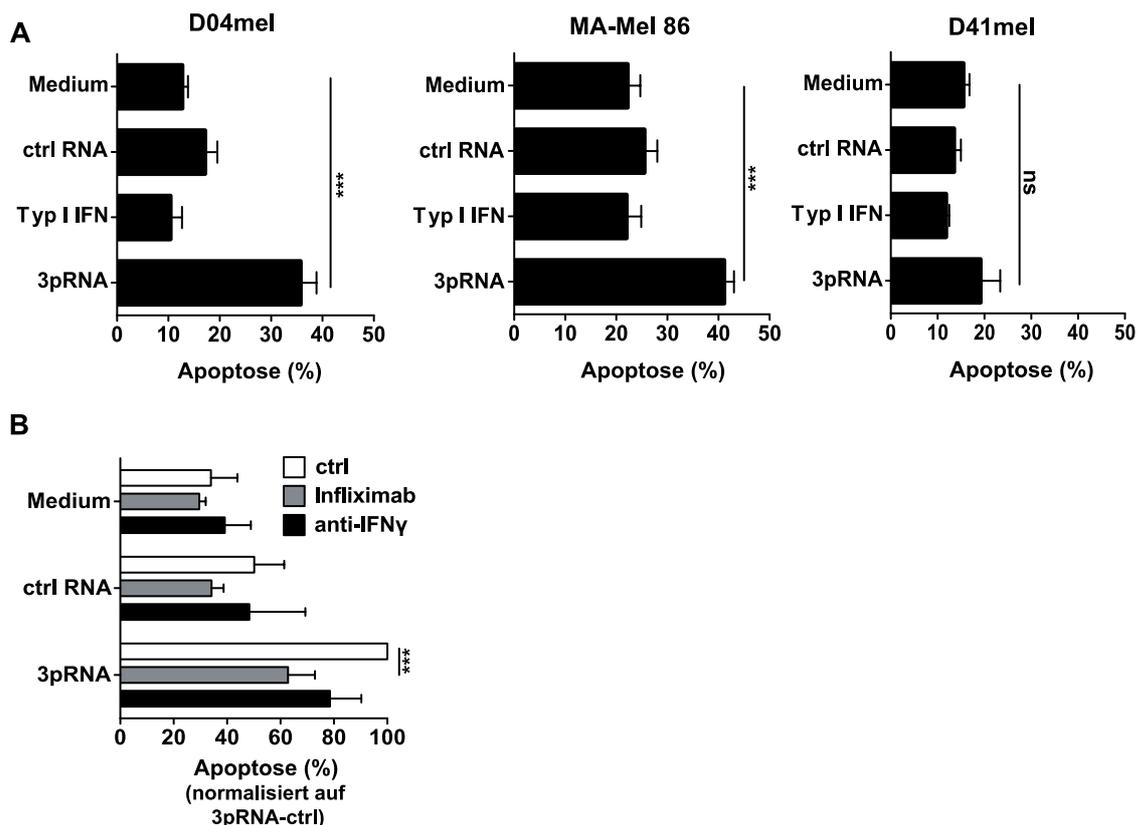
und die daraus isolierte RNA induzierte in PBMCs CXCL10, während dies durch ctrl RNA bzw. ctrl Melanomexosomen nicht der Fall war (Abbildung 5-11, A). In einem weiteren Versuch konnte die Produktion von Typ I IFN durch 3pRNA und 3pRNA Melanomexosomen im Vergleich zu den Kontrollen beobachtet werden (Abbildung 5-11, B). Zusätzlich ist für 3pRNA stimulierte PBMCs eine starke TNF $\alpha$  Produktion durch z.B. Monozyten beschrieben<sup>223</sup>. Auch dies wird durch 3pRNA Melanomexosomen gebildet (Abbildung 5-11, B). Ebenso verhält es sich für die Induktion des Typ II Interferons (Abbildung 5-11, B). Hierfür ist uns bekannt, dass eine RIG-I Aktivierung zur IFN $\gamma$  Induktion in NK-Zellen führt (unpublizierte Daten, Doktorarbeit B. Hommertgen). Zusammenfassend kann damit festgehalten werden, dass Melanomexosomen über die nach RIG-I Aktivierung enthaltene 3pRNA in der Lage sind, vielfältige anti-virale und anti-proliferative Zytokine in Immunzellen zu induzieren.



**Abbildung 5-11: 3pRNA induzierte Melanomexosomen induzieren Th1- Zytokinen und Chemokinen. (A)** PBMCs wurden mit nicht-stimulatorischer (ctrl) RNA, 3pRNA (je 0,5 ng/ml), ctrl RNA induzierten Exosomen (ctrl Exo), 3pRNA induzierten Exosomen (3pRNA Exo), RNA aus ctrl Exo (ctrl Exo → RNA) oder 3pRNA Exo (3pRNA Exo → RNA) (50 ng/ml) für 24 h stimuliert. Analyse von CXCL10 aus dem zellfreien Überstand mittels ELISA (n = 4). **(B)** Verschlaufbau wie (A) beschrieben für ctrl RNA, 3pRNA und Stimulation mit ctrl und 3pRNA Exosomen (Exo). Analyse des zellfreien Überstandes nach 24 h auf Typ I IFN, TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  (n = 3 - 6). Alle Abbildungen zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung. \*, \*\* und \*\*\* stehen für p < 0,05, p < 0,01 und p < 0,001.

### 5.1.8 Die durch 3pRNA in Immunzellen induzierten Zytokine führen zum Zelltod von Melanomzellen

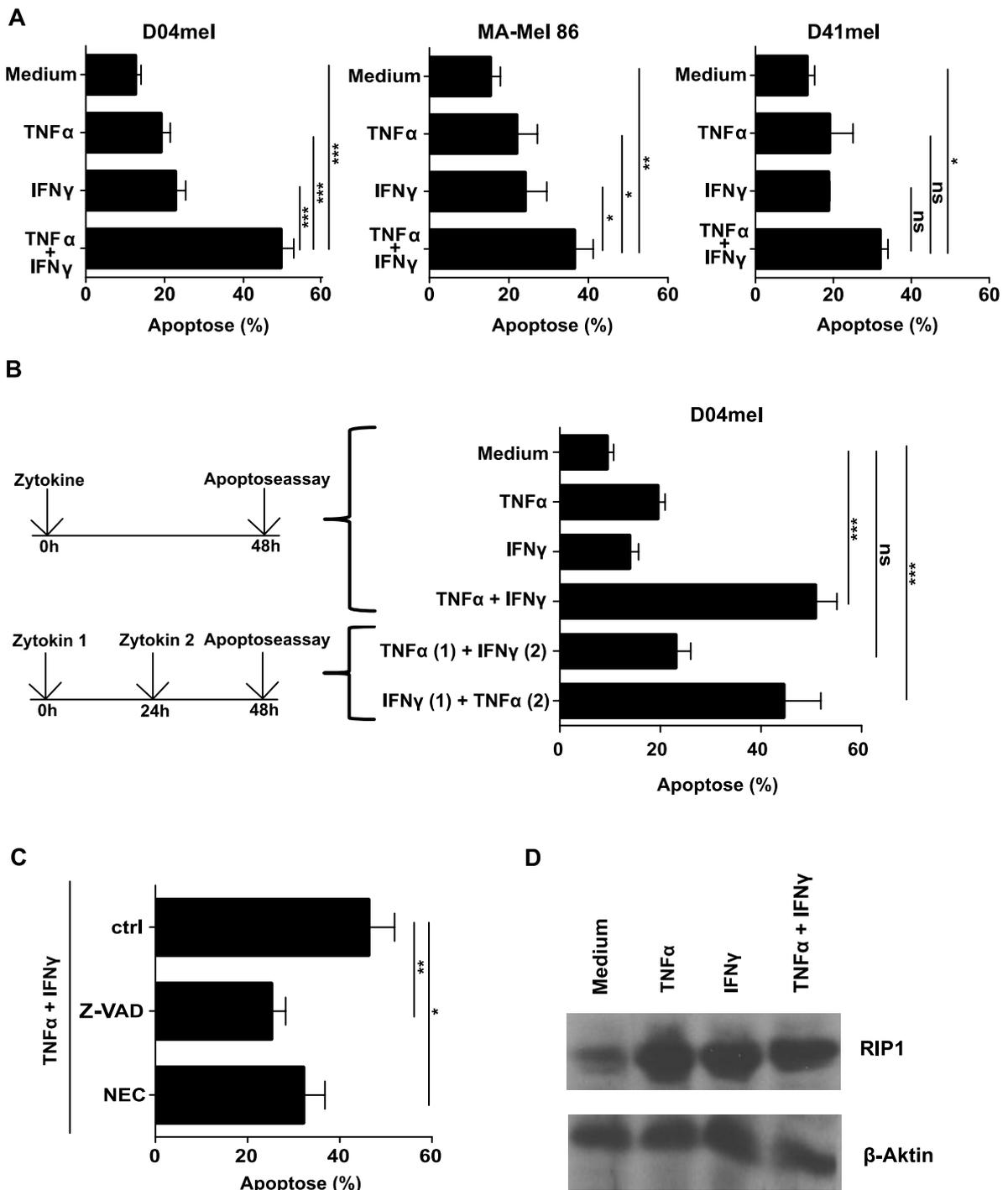
Für die Th1-Zytokine  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IFN}\gamma$  konnte gezeigt werden, dass sie in Zervix-Karzinomzellen synergistisch anti-tumorale Effekte besitzen, indem sie Zelltod durch Apoptose oder Nekrose induzieren<sup>224</sup>. Da beide Zytokine durch 3pRNA bzw. nach Übertragung von 3pRNA in Melanomexosomen in PBMCs induziert werden können, stellte sich die Frage, ob der zellfreie Überstand von PBMCs nach Stimulation mit 3pRNA einen Einfluss auf das Überleben von verschiedenen Melanomzelllinien hat. Zwei von drei getesteten Melanomzelllinien reagierten mit Zelltod auf die Inkubation mit 3pRNA stimulierten PBMC-Überständen (Abbildung 5-12, A). Um nachzuweisen, dass  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IFN}\gamma$  dafür verantwortlich sind, blockierten wir die Zytokine durch spezifische Antikörper. Dies führte für beide Zytokine zur Reduktion des Zelltodes wenn auch ausgeprägter nach Blockade von  $\text{TNF}\alpha$  (Abbildung 5-12, B).



**Abbildung 5-12: 3pRNA induzierte Zytokine induzieren den Zelltod von Melanomzellen.** (A)  $2 \cdot 10^4$  Melanomzellen (D04mel, MA-Mel 86 oder D41mel) wurden für 48 h mit 60% (v/v) zellfreiem Überstand von nicht-stimulatorischer (ctrl) RNA bzw. 3pRNA stimulierten PBMCs inkubiert und anschließend im Durchflusszytometer auf Zelltod mittels Yo-Pro-1 analysiert ( $n = 4-6$ ). (B) Versuchsaufbau wie in (A) mit zusätzlicher Zugabe von 100  $\mu\text{g/ml}$  Infliximab bzw. 1  $\mu\text{g/ml}$  anti- $\text{IFN}\gamma$  zu den PBMCs. Analyse des Zelltodes nach 48 h im Durchflusszytometer ( $n = 3$ ). Alle Abbildungen zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung. \*, \*\* und \*\*\* stehen für  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  und  $p < 0,001$ , ns = nicht signifikant.

---

Um diesen Mechanismus näher zu belegen, wurden die Melanomzelllinien mit rekombinanten TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  inkubiert. Die Kombination induzierte in der Tat den Tod der Zellen in den entsprechenden Zelllinien (Abbildung 5-13, A). Die Zelllinie D04mel reagierte mit einem deutlich gesteigerten Zelltod, während die Zelllinie MA-Mel 86 schwächer aber signifikant und die Zelllinie D41mel sehr schwach reagierte. Alle Melanomlinien zeigen deutlich, dass nur die Kombination der beiden Zytokine zum Zelltod führt, während die einzelnen Zytokine keinen Einfluss auf das Überleben der Tumorzellen haben. Um näher zu belegen wie dieser Synergismus zu Stande kommt, inkubierten wir die Zelllinie D04mel zunächst mit einem Zytokin bevor das zweite für kurze Zeit hinzugegeben wurde. Es zeigte sich, dass eine Induktion des Zelltodes nur zu beobachten ist, wenn die Zellen zunächst mit IFN $\gamma$  inkubiert wurden bevor TNF $\alpha$  hinzugegeben wurde. Ein Priming der Zellen mit TNF $\alpha$  war nicht ausreichend, um nach Zugabe von IFN $\gamma$  den Zelltod auszulösen (Abbildung 5-13, B). Um den Mechanismus näher zu verstehen, blockierten wir die Melanomzellen mit einem Pan-Caspase Inhibitor sowie mit Necrostatin-1. Über diese Inhibitoren ist eine Unterscheidung möglich, ob es zu einer Caspasen-abhängigen Apoptose (Pan-Caspase Inhibitor) oder zur Nekroptose (Necrostatin-1) der Zellen kommt. Da beide Inhibitoren in der Lage waren den Zelltod partial zu inhibieren, kann ein kombinierter Mechanismus aus Apoptose und Nekroptose vermutet werden (Abbildung 5-13, C). Dafür spricht auch, dass sowohl das an der Nekroptose beteiligte RIP1 (Abbildung 5-13, D) als auch die an der Apoptose beteiligte Caspase 3 (Daten nicht gezeigt, Datenerhebung zusammen mit Dr. Robert Besch, München) induziert wurden. Da jedoch schon die einzelnen Zytokine eine Induktion zeigen, fehlt hier die Erklärung, warum dann erst die Kombination den Zelltod auslöst (Abbildung 5-13, D). Damit können wir belegen, dass 3pRNA nicht nur in der Lage ist eine direkte Apoptose in Melanomzellen auszulösen und über NK-Zellen zur Lyse von Tumorzellen zu führen, sondern auch über die Induktion von TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  eine gemischte Apoptose/Nekroptose in bestimmten Melanomzellen induzieren kann. Warum dieser alternative Weg zum Zelltod nicht für alle Zelllinien zutrifft und wie der Signalweg dazu im Detail funktioniert, kann im Weiteren näher untersucht werden.

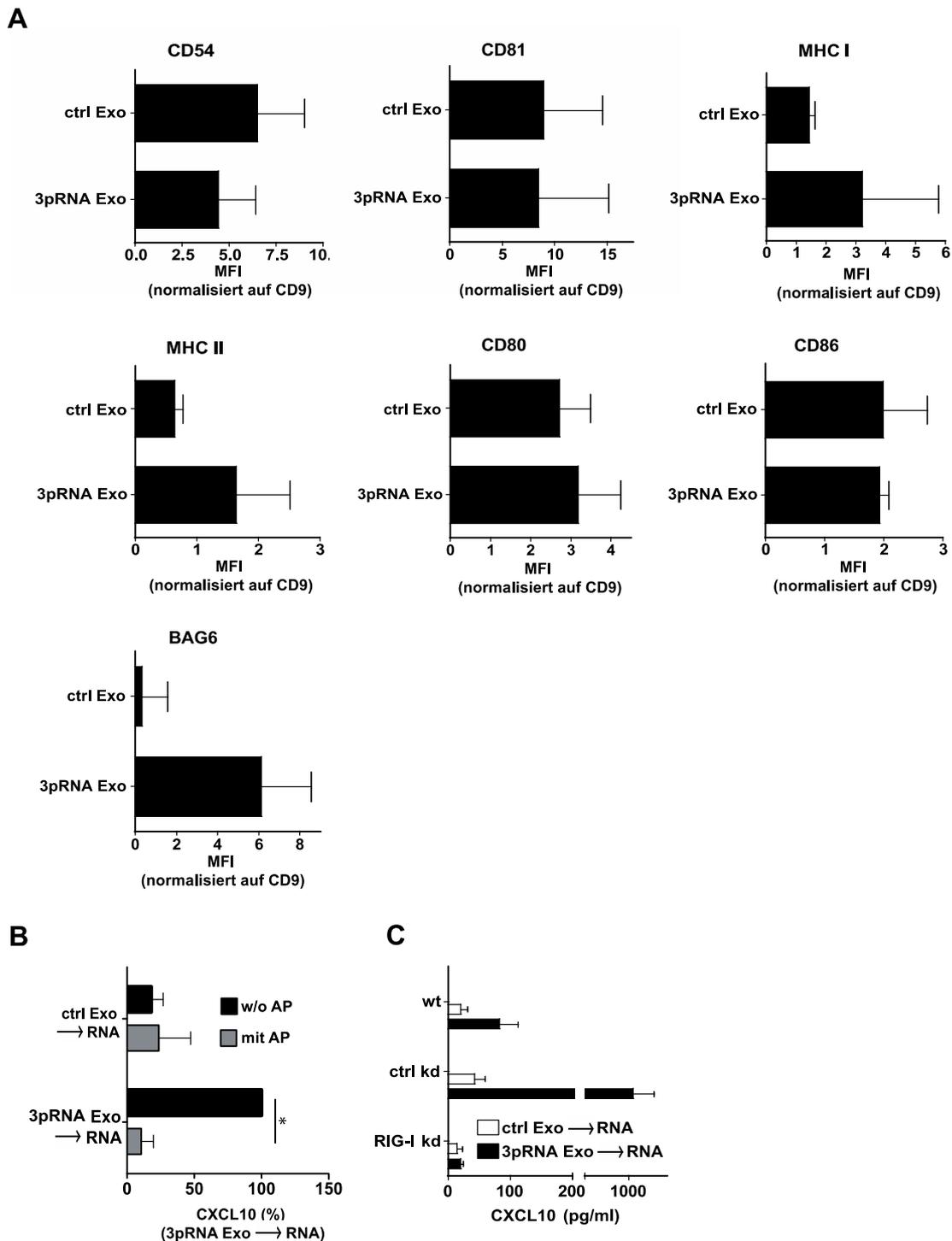


**Abbildung 5-13: IFN $\gamma$  ist essentiell im Th1-vermittelten Zelltod von Melanomzellen.** (A)  $2 \cdot 10^4$  Melanomzellen (D04mel, MA-Mel 86 oder D41mel) wurden für 48 h mit 50  $\mu\text{g/ml}$  rekombinanten IFN $\gamma$  und 10  $\mu\text{g/ml}$  rekombinanten TNF $\alpha$  inkubiert und der Zelltod im Durchflusszytometer bestimmt ( $n = 3 - 7$ ). (B) Versuchsaufbau wie in (A). Die (1.) gibt das Zytokin an, mit welchem die Tumorzellen für 48 h stimuliert worden sind, die (2.) das Zytokin, welches erst nach 24 h dazugegeben wurde (Vergleiche auch Schema des Versuchsablaufs). Gesamtlänge der Zytokinstimulation beträgt 48 h ( $n = 5$ ). (C) Versuchsaufbau wie in (A) mit zusätzlicher Zugabe von 20  $\mu\text{M}$  Z-VAD-FMK (Z-VAD) oder 50  $\mu\text{M}$  Necrostatin-1 (NEC) ( $n = 6$ ). (D) Western Blot von RIP1 nach Stimulation von D04mel mit 50  $\mu\text{g/ml}$  rekombinanten IFN $\gamma$  und/oder 10  $\mu\text{g/ml}$  rekombinanten TNF $\alpha$ . Als Ladekontrolle ist  $\beta$ -Aktin dargestellt. Alle Abbildungen zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung. \*, \*\* und \*\*\* stehen für  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  und  $p < 0,001$ , ns = nicht signifikant.

---

### **5.1.9 3pRNA induziert auch in einer murinen Melanomzelllinie immunaktivierende BAG6 und 3pRNA enthaltende Exosomen**

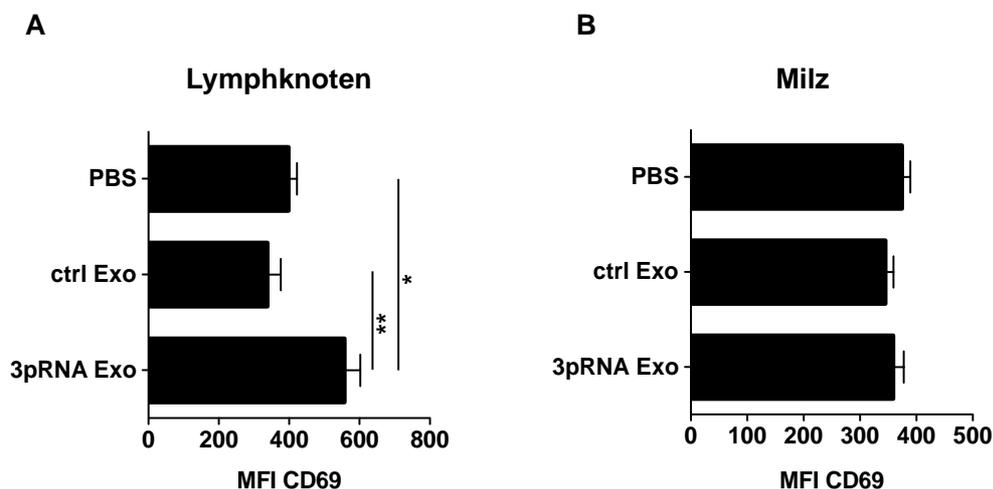
Im Weiteren sollten die Ergebnisse in ein *in vivo* Melanom-Modell der Maus übertragen werden. Um dafür zunächst zu belegen, dass die beobachteten Effekte der 3pRNA Melanomexosomen auch für das murine System gültig sind, wurden murine 3pRNA Melanomexosomen aus einer primären Melanomzelllinie gewonnen. Die murine Zelllinie Hcmel12 wurde von der Arbeitsgruppe um Prof. Tüting, Uniklinikum Bonn, aus dem spontanen HGF/SK x CDK4(R24C) Melanommodell generiert<sup>225</sup>. Die aus der Hcmel12 gewonnenen Melanomexosomen ließen sich durch die Expression von CD54, CD81, MHC I, MHC II, CD80 und CD86 als murine Exosomen identifizieren (Abbildung 5-14, A). Die verstärkte Hochregulation des NK-Liganden BAG6 durch RIG-I Aktivierung war auch im murinen System zu beobachten (Abbildung 5-14, A). Die Isolation der exosomalen RNA spiegelte ebenfalls das Verhalten aus der humanen Situation wieder: Der Verdau des Triphosphatmotives durch alkalische Phosphatase verhinderte die Induktion von CXCL10 in PBMCs (Abbildung 5-14, B). Die Induktion von CXCL10 in A549 war abhängig von der Expression von RIG-I (Abbildung 5-14, C). Beides deutet auch im murinen System auf das Vorhandensein von 3pRNA-Spezies in den Melanomexosomen hin.



**Abbildung 5-14: Charakterisierung muriner 3pRNA-induzierter Melanomexosomen.** (A) Durchflusszytometrische Analyse der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von murinen Melanomexosomen, die durch 3pRNA (3pRNA Exo) bzw. nicht-stimulatorischer (ctrl) RNA (ctrl Exo) induziert wurde (n = 3). (B)  $4 \cdot 10^5$  PBMCs wurden mit 50 ng/ml muriner exosomaler RNA (3pRNA Exo → RNA und ctrl Exo → RNA) mit und ohne (w/o) Verdau mit Alkalischer Phosphatase (AP) mit Lipofectamin2000® stimuliert. Analyse der CXCL10 Induktion nach 24 h Stimulation aus zellfreien Überständen mittels ELISA (n = 4). (C) Stimulation von A549 wt/ctrl kd/ RIG-I kd mit 50 ng/ml RNA von ctrl RNA (ctrl Exo → RNA) oder 3pRNA (3pRNA Exo → RNA) induzierten murinen Exosomen für 24 h. CXCL10 wurde aus zellfreien Überständen mit ELISA quantifiziert (n = 4). Alle Abbildungen zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung. \* steht für  $p < 0,05$ .

### 5.1.10 3pRNA Exosomen zeigen eine NK-Zell abhängige anti-tumorale Wirkung im Maus-Melanom-Modell *in vivo*

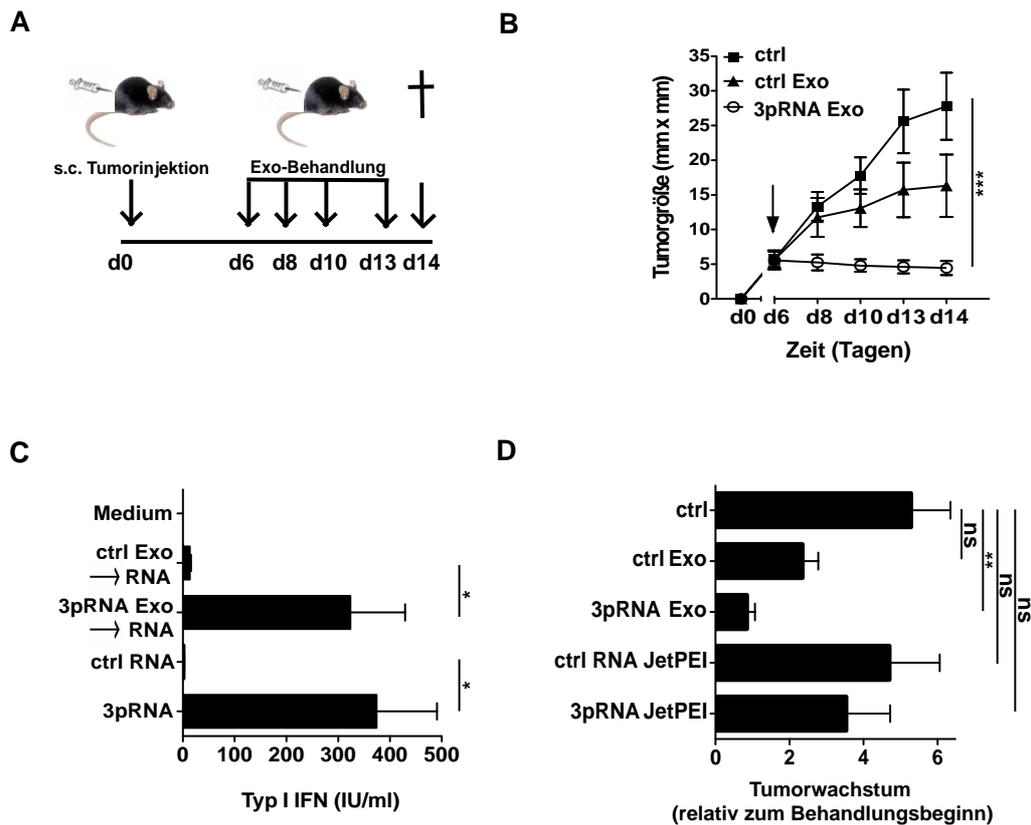
Wie bereits in unserem Institut gezeigt wurde, kann die Injektion von lipidkomplexierter 3pRNA durch intravenöse Injektion zur Regression von Lungenmetastasen des Melanoms *in vivo* führen<sup>151</sup>. Darüber hinaus konnten wir auch für eine intratumorale Injektion von lipidkomplexierter 3pRNA in einem subkutanen Melanom-Modell einen starken therapeutischen Effekt beobachten (unpublizierte Daten, Dr. Jasper van den Boorn). Aufgrund der in dieser Arbeit beschriebenen immunaktivierenden und anti-tumoralen Effekte von 3pRNA tragenden Melanomexosomen *in vitro*, sollte abschließend untersucht werden, ob 3pRNA Melanomexosomen in der Lage sind, NK-Zellen *in vivo* zu aktivieren, Zytokine zu induzieren und einen anti-tumoralen Effekt gegen das Melanom auszulösen und somit als therapeutische Option betrachtet werden zu können oder ob die beschriebenen pro-tumorale Effekte überwiegen. Um dies zu analysieren, haben wir zunächst murine 3pRNA oder ctrl Melanomexosomen in C57/BL6 Mäuse intravenös appliziert. Die Gabe von 3pRNA Melanomexosomen aber nicht von ctrl Melanomexosomen führte zur verstärkten Expression des Aktivierungsmarkers CD69 auf NK-Zellen im Lymphknoten (Abbildung 5-15, A) aber nicht in der Milz (Abbildung 5-15, B). Darüber hinaus kam es systemisch zur makroskopischen Vergrößerung der Lymphknoten (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 5-15: 3pRNA Melanomexosomen aktivieren NK-Zellen *in vivo*.** C57/BL6 Mäusen wurden je Maus 20 µg nicht-stimulatorische (ctrl) RNA induzierte Exosomen (ctrl Exo) oder 3pRNA induzierte Exosomen (3pRNA Exo) intravenös in die Schwanzvene appliziert. (A+B) Analyse der NK-Zell-Aktivierung (CD69) nach 18 h im Lymphknoten (A) oder der Milz (B) mittels Durchflusszytometrie auf NK1.1 positiven, CD3 negativen NK-Zellen. Alle Abbildungen zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung. \* und \*\* stehen für  $p < 0,05$  und  $p < 0,01$ .

---

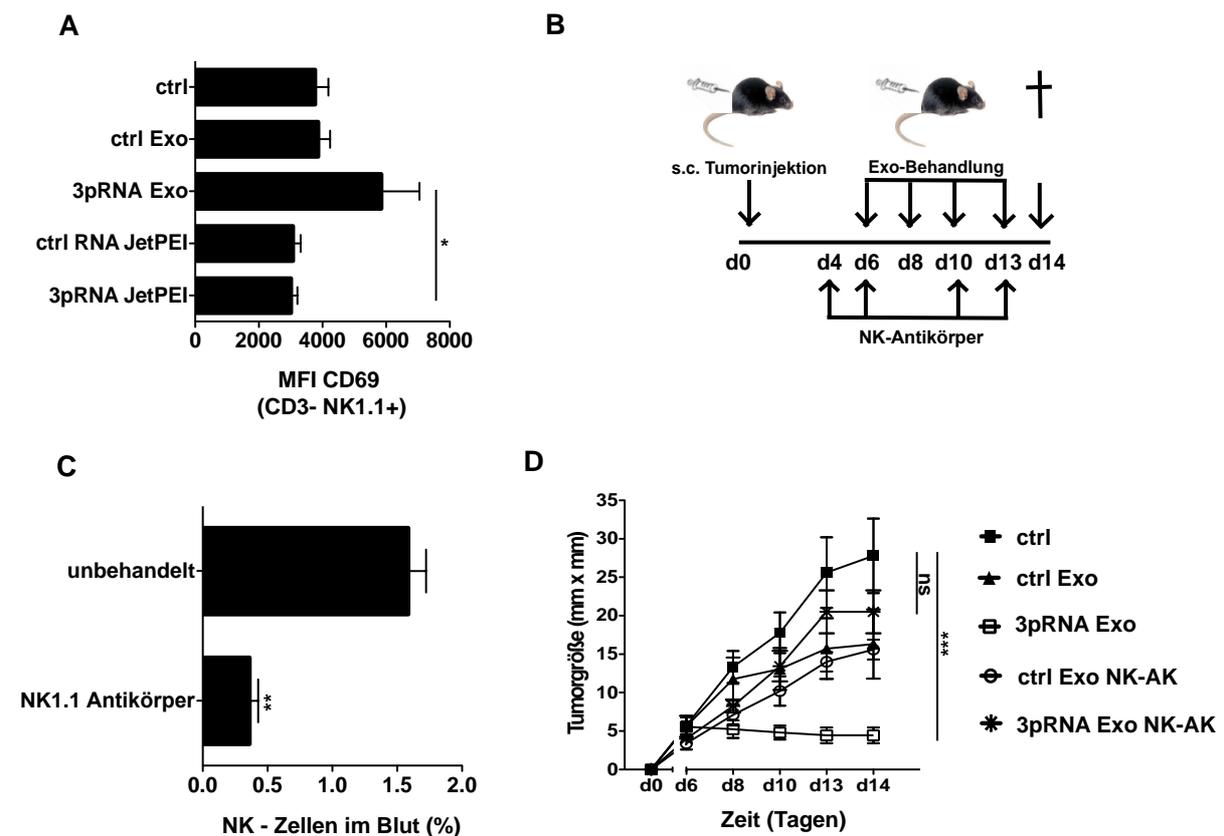
Im nächsten Schritt transplantierten wir die Zelllinie HcMel12 subkutan in die Flanke von C57/BL6 Mäusen. Nachdem der Tumor eine Größe von etwa 2 mm x 2 mm erreicht hat, wurde mit der Untersuchung des Exosomeneffektes begonnen. An Tag 6/8/10/13 wurden ctrl Melanomexosomen (durch ctrl RNA induziert), 3pRNA Melanomexosomen (durch 3pRNA induziert) oder PBS intratumoral in die Maus injiziert (Abbildung 5-16, A). Die Generierung der Exosomen erfolgte dabei aus der murinen Melanomzelllinie HcMel12, die auch für die Bildung des Tumors *in vivo* verwendet und die murinen Melanomexosomen in Kapitel 5.1.9 charakterisiert wurden. Im Versuchsverlauf wurde das Tumorwachstum makroskopisch gemessen. Es konnte über die Behandlungsdauer eine komplette Inhibition des Tumorwachstums durch 3pRNA Melanomexosomen gezeigt werden. Die Behandlung mit ctrl Melanomexosomen reduzierte ebenfalls das Tumorwachstum aber deutlich schwächer als die 3pRNA Melanomexosomen (Abbildung 5-16, B). Nun sollte der Effekt der 3pRNA Melanomexosomen mit dem von vivo-JetPEI® komplexierter 3pRNA (einem erprobten *in vivo* Transfektionsreagenz für 3pRNA<sup>151</sup>) verglichen werden. Dazu ist es die Grundvoraussetzung, dass über beide Applikationswege ähnliche 3pRNA Mengen in den Tumor gegeben werden. Da die exakte Menge an 3pRNA in den Exosomen nicht bekannt ist, war es dazu notwendig, diese anhand eines funktionellen Parameters abzuschätzen. Basierend auf dem Vergleich der Typ I IFN Induktion nach 3pRNA Gabe über Lipofektion versus über Exosomen, konnte eine vergleichbare Dosis abgeschätzt werden (Abbildung 5-16, C). Diese Menge wurde nun in einem subkutanen Melanom-Modell *in vivo* eingesetzt. Hierbei zeigte sich, dass die 3pRNA-JetPEI® Komplexe den 3pRNA Melanomexosomen eindeutig unterlegen waren (Abbildung 5-16, D). Das deutet auf weitere anti-tumorale Mechanismen in den 3pRNA Melanomexosomen hin, die zusammen mit der 3pRNA den therapeutischen Effekt verursachen. Mit BAG6 konnte hierzu in dieser Arbeit schon ein möglicher Kandidat identifiziert werden. Die 3pRNA Melanomexosomen können zukünftig auf weitere Effektormoleküle untersucht werden.



**Abbildung 5-16: 3pRNA beladene Melanomexosomen inhibieren das Wachstum von Melanomen *in vivo*.** (A) Behandlungsschema des *in vivo* Versuchs. C57BL/6 Mäuse wurden mit  $1,5 \cdot 10^5$  primären Melanomzellen (HcMel12) subkutan in die Flanke jeder Maus 6 Tagen vor Exosomeninjektionsbeginn injiziert. Die Applikation von nicht-stimulatorischer (ctrl) RNA (ctrl Exo) oder 3pRNA (3pRNA Exo) induzierten Exosomen (generiert aus den murinen Melanomzellen, die für Tumorinokulation verwendet wurden) an Tag 6/8/10/13 durch intratumorale Injektion. Beendigung des Versuches an Tag 14. (B) Versuchsaufbau wie in (A). Dargestellt ist das mittlere Tumorgröße  $\pm$  Standardabweichung über den Behandlungszeitraum von 9 Mäusen. (C)  $4 \times 10^5$  PBMCs wurden mit 50 ng/ml exosomaler RNA aus ctrl Exosomen (ctrl Exo  $\rightarrow$  RNA) bzw. 3pRNA Exosomen (3pRNA Exo  $\rightarrow$  RNA) oder 0,5 ng/ml 3pRNA oder ctrl RNA mit Lipofectamin2000® stimuliert. Nach 24 h wurde der zellfreie Überstand auf Typ I IFN untersucht (n = 4). (D) Versuchsaufbau wie in (A). Zusätzlich wurden Mäuse mit 1  $\mu$ g ctrl RNA oder 3pRNA behandelt, welche mit *in vivo*-JetPEI® komplexiert und intratumoral appliziert wurde. Beendigung des Versuches an Tag 14. Dargestellt ist das Tumorwachstum  $\pm$  Standardabweichung relativ zum Behandlungsbeginn von 5 Tieren. Alle Abbildungen zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung. \*, \*\* und \*\*\* stehen für  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  und  $p < 0,001$ , ns = nicht signifikant.

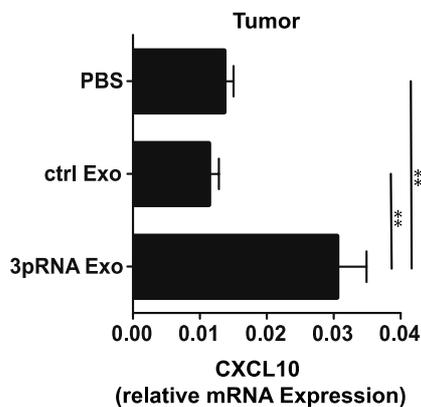
Um zu belegen, dass die NK-Zellen nicht nur in gesunden Mäusen sondern auch im Tumormodell durch die 3pRNA Melanomexosomen aktiviert werden, haben wir die CD69 Expression auf NK-Zellen analysiert (Abbildung 5-17, A). Man erkennt eine aktivierende, wenn auch bei der Mauszahl nicht signifikanten Effekt von 3pRNA Melanomexosomen gegen ctrl Melanomexosomen im Blut von Tumor tragenden Mäusen. Im Vergleich dazu konnte eine vergleichbare Dosis 3pRNA komplexiert mit *in vivo*-JetPEI® diese Aktivierung nicht verzeichnen, was im Einklang mit den Tumorregressionsdaten steht. Um zu belegen, dass die NK-Zell Aktivierung ursächlich mit dem antitumor Effekt zusammenhängt, wurden NK-Zellen in dem Tumormodell durch intraperitoneale Applikation eines spezifischen Antikörpers in

*in vivo* depletiert (Abbildung 5-17, B). Der Antikörper verringerte die Anzahl der NK-Zellen im Blut der Maus um etwa 77% (Abbildung 5-17, C). Betrachtet man anschließend das Verhalten des Tumorwachstums unter NK-Depletions-Bedingungen, ist der Effekt der Tumorregression durch 3pRNA Melanomexosomen aufgehoben. Dabei beeinflusste die NK-Depletion das Wachstumsverhalten des Tumors unter Kontrollbedingungen nur geringfügig (Abbildung 5-17, D). Damit spielen NK-Zellen eine entscheidende Rolle in der Tumorregression durch 3pRNA Melanomexosomen *in vivo*.



**Abbildung 5-17: 3pRNA beladene Melanomexosomen inhibieren das Tumorwachstum *in vivo* abhängig von NK-Zellen.** (A) C57BL/6 Mäuse wurden mit  $1,5 \cdot 10^5$  primären Melanomzellen (HcMel12) subkutan in die Flanke der Maus 6 Tagen vor Exosomeninjektionsbeginn injiziert. Die Applikation von nicht-stimulatorischer (ctrl) RNA (ctrl Exo) oder 3pRNA (3pRNA Exo) induzierten Exosomen (generiert aus den murinen Melanomzellen, die für Tumordinokulation verwendet wurden) an Tag 6/8/10/13 durch intratumorale Injektion. An Tag 14 wurde den Mäusen aus der Schwanzvene Blut abgenommen und die Expression von CD69 auf NK 1.1 positiven CD3 negativen NK-Zellen im Durchflusszytometer bestimmt (n = 5). (B) Behandlungsschema des *in vivo* Versuches. C57BL/6 Mäuse wurden mit  $1,5 \cdot 10^5$  primären Melanomzellen (HcMel12) subkutan in die Flanke der Maus 6 Tagen vor Exosomeninjektionsbeginn injiziert. Die Applikation von ctrl RNA (ctrl Exo) oder 3pRNA (3pRNA Exo) induzierten Exosomen (generiert aus den murinen Melanomzellen, die für Tumordinokulation verwendet wurden) an Tag 6/8/10/13 durch intratumorale Injektion. Depletion von NK-Zellen mit einem NK-Zell-Antikörper (NK-AK) durch intraperitoneale Injektion an d4/6/10/13. Beendigung des Versuches an Tag 14 (n = 5). (C) Depletion von NK-Zellen mittels intraperitonealer Injektion eines NK-Antikörpers. Nachweis der Depletion durch Abnahme von Blut 18 h nach Antikörpergabe aus der Schwanzvene und anschließendem Nachweis von NK-Zellen (NK 1.1 positiv, CD3 negativ) im Durchflusszytometer (n = 5). (D) Versuch wie in (B) dargestellt (n = 5). Dargestellt ist die mittlere Tumorgröße. Alle Abbildungen zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung. \*, \*\* und \*\*\* stehen für  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  und  $p < 0,001$ , ns = nicht signifikant.

Neben dem identifizierten aktivierenden NK-Liganden BAG6 kann auch die Anwesenheit von 3p-tragenden RNA-Spezies in den 3pRNA induzierten Melanomexosomen zum anti-tumoralen Verhalten der 3pRNA Melanomexosomen beitragen. Dafür wurde nach dem Behandlungsverlauf wie unter Abbildung 5-16, A beschrieben, die Tumoren der Mäuse entfernt und mittels quantitativer *real-time* PCR auf die Expression des Zytokins CXCL10 untersucht. Die Tumore, die mit PBS oder ctrl Melanomexosomen behandelt wurden, zeigten keine Expression von CXCL10 während die mit 3pRNA Melanomexosom behandelten Tiere eine signifikante Induktion von CXCL10 zeigten (Abbildung 5-18). Damit können auch die durch 3pRNA Melanomexosomen induzierten Zytokine eine Rolle in dem durch 3pRNA Melanomexosomen vermittelten anti-tumoralen Effekt *in vivo* spielen.



**Abbildung 5-18: 3pRNA Melanomexosomen induzieren CXCL10 im Tumorgewebe.** C57BL/6 Mäuse wurden mit  $1,5 \cdot 10^5$  primären Melanomzellen (HCmel12) subkutan in die Flanke jeder Maus 6 Tage vor Exosomeninjektionsbeginn injiziert. Die Applikation von nicht-stimulatorischer (ctrl) RNA (ctrl Exo) oder 3pRNA (3pRNA Exo) induzierten Exosomen (generiert aus den murinen Melanomzellen, die für Tumorkultivation verwendet wurden) an Tag 6/8/10/13 durch intratumorale Injektion. Beendigung des Versuches an Tag 14. Aufreinigung der RNA mit anschließender cDNA-Synthese des Tumorgewebes. Analyse der CXCL10 mRNA Expression relativ zu beta-Aktin mittels quantitativer *real-time* PCR (n = 5). Die Abbildung zeigt den Mittelwert und die Standardabweichung. \* und \*\* stehen für  $p < 0,05$  und  $p < 0,01$ .

---

## 6 Diskussion

### 6.1 3pRNA induzierte Lyse von Tumorzellen durch NK-Zellen

NK-Zellen sind wichtige Effektorzellen des angeborenen Immunsystems mit der Fähigkeit infizierte bzw. transformierte Zellen zu töten<sup>153</sup>. Grundsätzlich werden zwei Mechanismen unterschieden, wie NK-Zellen Tumorzellen lysieren können: a) durch die direkte Exozytose der zytotoxischen Granula oder b) durch die Expression von Liganden (z.B. TRAIL), die von den Todesrezeptoren der TNF-Superfamilie auf den Tumorzellen erkannt werden. Im Vergleich zu T-Zellen benötigen NK-Zellen keine vorherige Sensibilisierung, können allogent transplantiert werden<sup>226</sup> und viele Krebsarten (z.B. Neuroblastom)<sup>227</sup> sind sensitiv gegenüber der NK-Zell vermittelten Zytotoxizität<sup>228</sup>. Im Mausmodell wurde die Beobachtung gemacht, dass die Abwesenheit von NK-Zellen mit einem gehäuften Auftreten von spontanen Tumoren und Metastasen assoziiert ist<sup>229,230</sup>. Die Infiltrierung von NK-Zellen in den Tumor ist oft mit einer besseren Prognose assoziiert<sup>231</sup>. Daher ist ein vielversprechender Ansatz in der Tumorummunologie über eine NK-Zell-Aktivierung bzw. der NK-Zell-Expansion die Therapie von Tumoren zu verbessern. Die Expansion von NK-Zellen wird v.a. durch Zytokine (z.B. IL-2) vermittelt<sup>232</sup>. Die *ex vivo* Expansion von NK-Zellen mit anschließender Infusion in den Patienten wird in der Therapie von Leukämien angewandt<sup>233</sup>. Eine Limitierung bei der Entwicklung von NK-Zell basierten Tumorthapien ist es, die NK-Zellen im immunsuppressiven Milieu des Tumors erfolgreich gegen die Tumorzellen zu aktivieren. Hier werden Ansätze gesucht, um diese Limitierung zu überwinden. Vor allem TLR-Agonisten sind dabei von Interesse<sup>234</sup>. Für TLR3, TLR7 und TLR9 Agonisten ist bekannt, dass sie NK-Zellen direkt oder auch häufig indirekt über assoziierte Zellen (z.B. Dendritische Zellen) aktivieren können<sup>235-238</sup>. Damit ist die Immitierung einer viralen Infektion eine Möglichkeit, um NK-Zellen innerhalb des immunsuppressiven Milieus zu aktivieren. Wie im Gegensatz zu den TLRs der zu den zytosolischen Helikasen gehörende Rezeptor RIG-I NK-Zellen aktivieren kann, ist bisher nicht untersucht. Jedoch konnte durch Poeck et al. in einem murinen Melanom-Modell *in vivo* gezeigt werden, dass RIG-I seine anti-tumorale Wirkung über NK-Zellen vermittelt.

In dieser Arbeit sollte nun der zytotoxische Mechanismus der 3pRNA vermittelten NK-Zell-Aktivierung gegenüber Melanomzellen untersucht und die Ergebnisse auf das humane System übertragen werden. Es konnte gezeigt werden, dass transfizierte 3pRNA aber nicht

eine innere Kontroll-RNA NK-Zellen innerhalb von PBMCs zur Degranulation von zytotoxischen Vesikeln induziert, die die Lyse der Tumorzellen auslösen. Zum Verständnis, wie 3pRNA aktivierte NK-Zelle gegenüber Melanomzellen ihre zytotoxische Aktivität ausüben, wurden NK-Zellen innerhalb von PBMCs aktiviert um anschließend isoliert mit Melanomzellen ko-kultiviert zu werden. Die zytotoxische Aktivität der 3pRNA aktivierter NK-Zellen kann dabei durch mehrere Mechanismen getragen werden. Die Detektion von Perforin und CD107a nach 3pRNA Aktivierung der PBMCs beschreibt den Prozess der Degranulation. Die dabei freigesetzten lytischen Proteine (z.B. Perforin) führen zur direkten Apoptose über die Caspasen-Kaskade in der Zielzelle, welche durch einen Pan-Caspase-Inhibitor blockiert werden konnte. Daneben gibt es noch weitere Mechanismen, wie NK-Zellen den Tod von Zielzellen bewirken können. Zum einen können sie  $\text{TNF}\alpha$  sekretieren um durch dessen Bindung an den TNF-Rezeptor Apoptose in der Zielzelle auszulösen. Dieser Tötungsmechanismus konnte in diesem hier beschriebenen System für den Rezeptor RIG-I nicht belegt werden. Zum anderen können weitere Zelltod-induzierende Faktoren eine Rolle spielen, wie z.B. TRAIL. TRAIL mRNA wird in vielen Geweben exprimiert – so auch in NK-Zellen. Durch einen bestimmten Stimulus, wie z.B. Doxorubicin,  $\text{IFN}\gamma$  und Proteasominhibitoren, kann eine erhöhte TRAIL-Sensitivität erreicht werden<sup>239-241</sup>. Damit konnte gezeigt werden, dass 3pRNA ein weiterer Stimulus ist, der eine positive TRAIL-Regulation auf NK-Zellen erreichen kann. Die Besonderheit von TRAIL ist, dass er Apoptose hauptsächlich in Tumorzellen aber nicht in gesunden Zellen induziert<sup>242</sup>. Die Ergebnisse sind im Einklang mit den Resultaten für poly(I:C), dass ein PRR-Ligand eine TRAIL Aufregulation in NK-Zellen vermitteln kann<sup>243</sup>. Der Einfluss weiterer PRRs ist bisher nicht untersucht worden. Die Bedeutung weiterer aktivierender NK-Rezeptoren in der 3pRNA vermittelter NK-Aktivierung gegenüber Melanomzellen muss in weiterführenden Projekten betrachtet werden. Erste vorläufige, in dieser Arbeit nicht gezeigte Daten deuten auf eine zusätzliche Beteiligung von NKG2D in der durch 3pRNA vermittelten Lyse von Melanomzellen durch NK-Zellen hin. Damit ist 3pRNA ein weiterer PRR Agonist, der einen direkten Effekt auf NK-Zellen zeigt. Im Gegensatz zu TLR3, TLR7 und TLR9 Liganden, die die Anwesenheit von weiteren assoziierten Zellen, kann 3pRNA durch seine direkte Wirkung auf NK-Zellen zum zytotoxischen Verhalten von NK-Zellen führen<sup>209,237,244</sup>.

RIG-I aktiviert NK-Zellen nicht nur direkt oder über Immunzellen, sondern auch über die Aktivierung von Tumorzellen: Der Überstand von RIG-I stimulierten Glioblastomzellen

---

aktiviert über Typ I IFN NK-Zellen zur Lyse von Tumorzellen. Interessanterweise konnte bei diesen Versuchen die Beobachtung gemacht werden, dass RIG-I aktivierte Tumorzellen keine bessere Erkennungsstruktur für NK-Zellen darstellten. Warum dies so ist, bleibt unklar. Hier kann vermutet werden, dass aufgrund der beschriebenen Apoptoseinduktion der 3pRNA stimulierten Tumorzellen keine Aktivierung von NK-Zellen zur zusätzlichen Tumoreliminierung notwendig sind. Alternativ könnten die durch RIG-I Aktivierung sterbenden Tumorzellen bevorzugt von T-Zellen lysiert werden, z.B. durch die Aufregulation von MHC-Molekülen (Diplomarbeit J. Daßler). Zusammenfassend beschreibt 3pRNA mehrere Wege, die zu einer NK-Zell-Aktivierung beitragen können: 1.) 3pRNA induziert TRAIL auf NK-Zellen resultierend in der Apoptose von Melanomzellen 2.) 3pRNA induziert die Ausschüttung von zytotoxischen NK-Zell Granula gegen die Tumorzellen und 3.) 3pRNA kann in Tumorzellen zur Sekretion von NK-aktivierenden Zytokinen (Typ I IFN) beitragen. Damit grenzt sich 3pRNA eindeutig gegenüber anderen TLR-Liganden ab. TLR-Liganden können die für 3pRNA beschriebenen Effekte nur indirekt nachstellen, wobei ihre limitierte Expression nicht zu der zusätzlichen Zytokinkomponente durch Tumorzellen beitragen kann. Zusammenfassend ist 3pRNA ein optimaler NK-Zell-Stimulus, der zusätzlich Apoptose und weitere immunaktivierende Zytokine/Chemokine in Tumorzellen induziert.

Im Weiteren muss die Frage nach der *in vivo* Relevanz der TRAIL-Expression sowie der Abhängigkeit der NK-Zell-Aktivierung durch Typ I IFN untersucht werden. Darüber hinaus sollte betrachtet werden, ob 3pRNA in NK-Zellen ein Gedächtnis induzieren kann und ob die durch 3pRNA aktivierten NK-Zellen zu einer Modifizierung der T-Zell Antwort beitragen können.

Mit dieser Arbeit konnte erstmals beschrieben werden, wie der Mechanismus der 3pRNA vermittelten NK-Zell-Lyse von Melanomzellen auf molekularer Ebene funktioniert. Dabei spielt zum einen die Degranulation mit der Ausschüttung von lytischen Proteinen eine Rolle, die durch 3pRNA induzierte Zytokine bzw. durch eine direkte 3pRNA vermittelte NK-Zell-Aktivierung ausgelöst wird, zum anderen die durch eine verstärkte Expression von TRAIL vermittelte Apoptose der Tumorzellen. Damit vereint 3pRNA in einem Molekül die Aktivierung der hauptsächlichlichen NK-Mechanismen, die für die Lyse von transformierten Zellen durch NK-Zellen beschrieben sind.

## **6.2 Die durch 3pRNA induzierten Th1-Zytokine TNF $\alpha$ und IFN $\gamma$ haben zytotoxisches Potential**

Wie publiziert und in dieser Arbeit beschrieben induziert die Stimulation von RIG-I durch seinen Liganden 3pRNA in humanen Immunzellen ein breites Spektrum an anti-viralen und pro-inflammatorischen Zytokinen, wie z.B. Typ I IFN, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6. In dieser Arbeit konnte beobachtet werden, dass lösliche Faktoren von 3pRNA aktivierten PBMCs zum Zelltod von verschiedenen Melanomzelllinien beitragen. Mit Hilfe von blockierenden Antikörpern konnte der Zelltod der Melanomzelllinien auf die Zytokine TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  eingegrenzt und der Effekt mit der Gabe von rekombinanten Zytokinen nachgestellt werden. Die biologischen Effekte von TNF $\alpha$  sind vielfältig und reichen von der Auslösung des septischen Schocks über die Initiierung der lokalen inflammatorischen Immunantwort bis hin zur Fieberreaktion<sup>245</sup>. Auch anti-tumorale Effekte sind *in vitro* und *in vivo* für TNF $\alpha$  gezeigt worden<sup>246</sup>. TNF $\alpha$  hat sich in der Tumorthherapie als einzelner Wirkstoff nicht etablieren können. Zusätzlich erschwerend ist die Beobachtung, dass mit der Progression des Melanoms dessen Ansprechen auf TNF $\alpha$  sinkt<sup>247</sup>. Für einige Tumorzelllinien ist bekannt, dass ein antitumoraler Effekt von TNF $\alpha$  durch IFN $\gamma$  gesteigert werden kann<sup>248</sup>. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass IFN $\gamma$  wahrscheinlich die Induktion eines Faktors vermittelt, der die Sensitivität der Melanomzellen gegenüber TNF $\alpha$  erhöhen kann. Die Aufregulation von verschiedenen Genen wie ICAM-1, CXCL10 und MHC I ist für den Synergismus von TNF $\alpha$ /IFN $\gamma$  in vielen biologischen Prozessen beschrieben. Allerdings sind die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen bisher nicht verstanden<sup>249-251</sup>. Es ist beschrieben, dass IFN $\gamma$  die Expression des TNF $\alpha$ -Rezeptors regulieren kann<sup>252</sup>. Dennoch konnte in experimentellen Arbeiten kein Zusammenhang zwischen der Expression des TNF $\alpha$ -Rezeptors und der Sensitivität der Zielzellen auf TNF $\alpha$  beobachtet werden<sup>253,254</sup>. Der Mechanismus für den TNF $\alpha$ /IFN $\gamma$  Zelltod konnte in dieser Arbeit näher charakterisiert werden. Es konnte eine Beteiligung von Caspase 3 nachgewiesen werden. Darüber hinaus war der Zelltod durch den Inhibitor der Nekroptose Necrostatin-1 hemmbar und die Induktion von RIP1 konnte gezeigt werden. Das spricht für einen gemischten Prozess aus Apoptose und Nekroptose. Dies identifiziert 3pRNA als neuen Auslöser für Nekroptose und gibt einen Einblick in einen neuen Mechanismus, wie der Zelltod trotz anti-apoptotischer Prozesse initiiert werden kann. Das zeigt, dass der anti-virale PRR RIG-I nicht nur direkt Apoptose in Tumorzellen auslösen kann, sondern auch indirekt über eine anti-tumorale Zytokinkombination. Der Synergismus aus

---

TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  im Hinblick auf das Sterbeverhalten von Melanomzellen zeigt einen neuen Weg auf, wie die Applikation von 3pRNA *in vivo* neben einem direkten Effekt auf dem Tumor durch die Induktion der Th-1 Zytokinen TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  zum Zelltod des Tumors, auch in entfernten Tumorlokalisationen, mit beitragen kann. Diese Daten belegen mit RIG-I einen Rezeptor, der die Kombination aus TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  im Körper induzieren kann und beschreibt damit einen physiologischen Stimulus für diese beschriebene zytostatische Zytokinkombination. Dieses Verständnis der umfassenden Effekte von 3pRNA kann entscheidenden Einfluss auf die translationale Anwendung von 3pRNA *in vivo* haben. In Zukunft sollte dieser Zusammenhang weiter untersucht werden. Erste Daten deuten darauf hin, dass dieser Effekt nicht durch TLR7 und TLR9 Liganden erreicht werden kann, da diese Rezeptoren in plasmazytoiden dendritischen Zellen exprimiert sind und im humanen System anders als in machen anderen Spezies nicht zu TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  führen (unpublizierte Daten, Doktorarbeiten B. Hommertgen, C. Hillen). Das stellt wie schon oben für die NK-Zell-Aktivierung beschrieben auch bei den Zytokin-vermittelten anti-tumoralen Effekten die besondere Bedeutung von RIG-I gegenüber den TLRs heraus. Die Nekroptose, ein weiterer Signalweg der durch die Zytokinkombination den Daten hier zur Folge initiiert wird, muss gründlicher analysiert werden. Da schon durch die einzelnen Zytokine RIP1 induziert wird, bleibt nach dieser Arbeit offen, warum erst deren Kombination zur Nekroptose führt. Dies kann durch Analysen der weiteren Bestandteile des Nekroptosoms versucht werden. Darüber hinaus wäre es interessant zu untersuchen, warum nicht alle untersuchten Melanomzelllinien sensitiv für die Induktion des Zelltodes durch TNF $\alpha$ / IFN $\gamma$  sind.

Erst kürzlich wurde für den Synergismus von TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  die Induktion von Seneszenz im Tumormodell in Abhängigkeit von Zellzyklusproteinen (p16INK4a) beschrieben<sup>255</sup>. Ob der Einhalt der Zellproliferation auch in dem hier untersuchten Modell zu beobachten ist, wurde nicht untersucht. Da im Melanom verstärkt Mutationen im Zellzyklusprotein p16INK4a auftreten, ist es fraglich, ob der dort beschriebene Prozess für das Melanom zutreffend ist<sup>256</sup>. In der erwähnten Arbeit ist keine Induktion des Zelltodes durch diese Zytokinkombination zu beobachten. Daraus könnte man schließen, dass die Wirkung in verschiedenen Tumorarten und Zelllinien unterschiedlich sein kann. Es wäre interessant zu untersuchen, ob der hier beschriebene Synergismus aus TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  in weiteren Zellsystemen beobachtet werden kann.

---

TNF $\alpha$  ist ein pro-inflammatorisches Zytokin, welches häufig in Zusammenhang mit IL-1 $\beta$  und CXCL8 im Kontext der Auswirkung von inflammatorischen Prozessen in der Progression von Tumoren erwähnt wird. Die Kombination von TNF $\alpha$  mit IFN $\gamma$  führt in dem hier beschriebenen Kontext zur Induktion von Apoptose und Nekroptose, mit einer gegenläufigen Auswirkung. Das belegt, dass die Wirkung von Zytokinen vom jeweiligen Milieu und der jeweiligen Zytokinkombination abhängt und nicht davon getrennt betrachtet werden kann. Trotz der Induktion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF $\alpha$  führt die Aktivierung von RIG-I zu einem anti-tumoralen Gesamteffekt.

### **6.3 Die Aktivierung von RIG-I durch seinen Liganden 3pRNA führt in Melanomzellen zur Bildung von Exosomen**

Die Sekretion von Exosomen ist für viele Zelltypen, wie z.B. Immunzellen, Epithelzellen, Neurone und Tumorzellen beschrieben<sup>15-17,257,258</sup>. Man kann postulieren, dass alle Körperzellen die Fähigkeit zur Exosomensekretion besitzen. Diverse Faktoren sind für eine verstärkte Exosomenproduktion beschrieben. Dazu gehört neben der Induktion einer p53-vermittelten Exosomenbiogenese nach Schädigung der DNA auch erhöhte intrazelluläre Kalzium-Level im Rahmen von Exozytoseprozessen sowie Hypoxie<sup>259-261</sup>. In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass das angeborene Immunsystem über Aktivierung des *pattern recognition receptor* - RIG-I - zur verstärkten Freisetzung von Exosomen führen kann. Die Charakterisierung der freigesetzten Vesikel als Exosomen beruhte auf der Expression von exosomal Markern wie CD9, CD81, CD63, MHC I und II sowie ihrer ermittelten Größe nach Elektronenmikroskopie und Photonen-Korrelations-Spektroskopie. Dies entspricht der in der Literatur beschriebenen Eigenschaften von Exosomen<sup>36,262</sup>. Im folgenden konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass 3pRNA Melanomexosomen hauptsächlich von Monozyten und nur zu einem geringen Anteil von NK-Zellen und T-Zellen aufgenommen wurden. Interessanterweise war die Aufnahme von 3pRNA Melanomexosomen deutlich stärker als die Aufnahme der ctrl Melanomexosomen. Dies spricht für eine effektive Verbreitung der Exosomen sobald sie das Warnmolekül 3pRNA tragen. Warum es zur verstärkten Aufnahme kommt ist unklar. Möglich wäre, dass die ebenfalls beobachtete erhöhte Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 auf 3pRNA Melanomexosomen dafür verantwortlich ist. Dies muss im Verlauf noch analysiert werden.

---

Neben Immunzellen waren auch Melanomzellen in der Lage, die 3pRNA Melanomexosomen besser aufzunehmen als die ctrl Melanomexosomen. Damit ändert die Aktivierung von RIG-I durch seinen Liganden 3pRNA in Melanomzellen nicht nur die Quantität der Exosomen sondern auch deren Aufnahme in mögliche Zielzellen.

#### **6.4 3pRNA Melanomexosomen aktivieren NK-Zellen zur Lyse von Tumorzellen durch die Expression des NKp30 Liganden BAG6**

In dieser Arbeit konnte belegt werden, dass die durch 3pRNA induzierten Melanomexosomen NK-Zellen über NKp30 zur Lyse von Tumorzellen aktivieren können. Der NKp30 Ligand ist vermutlich BAG6, da BAG6 als NKp30 Ligand beschrieben ist<sup>169</sup> und stark auf 3pRNA Melanomexosomen exprimiert war aber nur eine geringe Expression auf den Melanomzellen oder den ctrl Melanomexosomen zeigte. Letztendlich konnte belegt werden, dass BAG6 in Abhängigkeit von RIG-I auf den durch 3pRNA induzierten Melanomexosomen exprimiert wird und das BAG6 ein essentieller Bestandteil zur Aktivierung der NK-Zell-vermittelten Tumorzelllyse ist. Der außerdem beschriebene NKp30 Ligand B7-H6 konnte als Ursache ausgeschlossen werden<sup>167</sup>. Unsere Ergebnisse bestätigen den beschriebenen Transfer des intrazellulären NKp30 Liganden BAG6 durch Exosomen<sup>170</sup>. Eine Beteiligung weiterer bekannter aktivierender NK-Zell-Liganden wie die NKG2D Liganden (MICA, MICB, ULBP1-3) konnte ausgeschlossen werden<sup>167</sup>. Dass weitere aktivierende NK-Zell Liganden wie z.B. Hitzeschockproteine beteiligt sind, ist möglich<sup>263,264</sup> und muss näher untersucht werden. Die Aktivierung der Familie der *natural cytotoxicity receptors*, wie NKp30, ist ein möglicher vielversprechender Ansatz in anti-viralen und anti-tumoralen Therapien. Mit dem hier generierten Wissen, wie der aktivierende Ligand BAG6 innerhalb des immunsuppressiven Tumormikromilieus induziert werden kann, eröffnet sich eine vielversprechende Möglichkeit diese Therapiestrategie gezielt weiter entwickeln zu können<sup>265-268</sup>. Neben der Lyse von Tumorzellen können NK-Zellen über NCRs durch Interaktion mit DCs die Kommunikation mit dem adaptiven Immunsystem aufnehmen und dessen Aktivierung begünstigen<sup>204</sup>. Ob über die hier beschriebene NK-Zell Aktivierung durch RIG-I auch das adaptive Immunsystem aktiviert wird, muss in fortführenden Arbeiten untersucht werden.

## **6.5 RIG-I und sein Ligand 3pRNA werden in 3pRNA Melanomexosomen verpackt und induzieren anti-virale und anti-tumorale Effekte**

Neben der erhöhten Expression von BAG6 konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass ein Ligand für den *pattern recognition receptor* RIG-I nach dessen Stimulation in Exosomen von Melanomzellen verpackt wird. Diese Verpackung wurde in der Verwendung von RIG-I *knock down* Zellen verifiziert. Wie für 3pRNA beschrieben, sezernierten PBMCs auf Stimulation mit 3pRNA Melanomexosomen das Th1-Chemokin CXCL10 sowie anti-virale und pro-inflammatorische Zytokine (Typ I IFN, TNF $\alpha$ )<sup>80,106</sup>. Auch in Melanomzellen konnte die Produktion von CXCL10, Typ I IFN und die Induktion von Apoptose wie bereits beschrieben beobachtet werden<sup>124,128</sup>. Mit isolierter RNA aus den Melanomexosomen konnten die mit 3pRNA Melanomexosomen beschriebenen Effekte reproduziert werden. Zusätzlich zeigte die exosomale RNA nach Stimulation mit 3pRNA eine Aktivierung von NK-Zellen mit zytotoxischen Potentialen gegenüber Melanomzellen. Als zusätzlicher Nachweis, dass in der RNA aus Melanomexosomen nach Stimulation von RIG-I ein 3p-Motiv enthalten ist, wurde die RNA mit alkalischer Phosphatase verdaut, die in der Lage ist, das 3p-Motiv abzubauen. Dadurch verlor die RNA ihre Fähigkeit zur Induktion von CXCL10, Typ I IFN und zur Aktivierung von NK-Zellen. Damit ist bewiesen, dass die Imitierung einer Virusinfektion durch Transfektion des RIG-I Liganden 3pRNA in Melanomzellen zur Produktion von Melanomexosomen führt, die RNAs mit 3p-Motiven beinhalten. Nun muss im Weiteren geklärt werden, welche 3pRNA in den Melanomexosomen enthalten ist. Zu vermuten ist, dass der transfizierte Ligand selber übertragen wird. Es könnte jedoch auch eine endogen induzierte 3pRNA sein bzw. der transfizierte Ligand könnte erst nach Modifikation der Länge oder der Struktur in Exosomen verpackt werden. Neben der Verpackung von 3p-tragenden RNA-Spezies konnte auch die Verpackung des Rezeptors RIG-I selber in Exosomen nachgewiesen werden. Zusätzlich konnten Hinweise erarbeitet werden, dass RIG-I daraufhin in anderen Zellen funktionell aktiv übertragen wird: 3pRNA Melanomexosomen, die RIG-I enthalten, stimulieren noch teilweise RIG-I *knock down* Zellen zur CXCL10 Produktion während die Transfektion von isolierter exosomaler 3pRNA fast komplett ohne Wirkung blieb. Ein vergleichbares Ergebnis zeigte sich in murinen RIG-I *knock out* Zellen. Ob das übertragene RIG-I Protein in der Tat funktionell aktiv ist, muss nun weiter untersucht werden.

---

Es ist in der Literatur beschrieben, dass virale RNAs bei einer HCV Infektion von infizierten Zellen auf plasmazytoide dendritische Zellen übertragen werden können<sup>269</sup>. Außerdem ist der exosomale Transport von TLR2 und TLR4 Liganden nach Infektion mit Mykobakterien bekannt<sup>216,270</sup>. Unser Wissens nach wurde mit der Übertragung von RIG-I und seinem Liganden in dieser Arbeit erstmalig die Übertragung eines anti-viralen PRR des angeborenen Immunsystems zusammen mit seinem aktivierenden Liganden über Exosomen beschrieben. Die Beteiligung des exosomalen Signalweges im Rahmen von Virusinfektionen ist bereits beschrieben. Neben Retroviren nutzen auch andere Viren diesen Weg zur Formierung und Ausbreitung von infektiösen Partikeln<sup>271-274</sup><sup>275</sup>. Aber nicht nur Viren haben gelernt, Exosomen für sich auszunutzen. Die Verpackung und der Transfer eines anti-viralen Enzyms via Exosomen kann vor der Replikation von HIV schützen<sup>276</sup>. Zusätzlich können Exosomen des Atemwegsepithels zur Neutralisation von Influenza beitragen und Immunzellen durch die Übertragung von RNA aktiviert werden<sup>277</sup>. Damit kann der exosomale Weg sowohl im Sinne des Immunsystems und der Virusabwehr als auch im Sinne des Virus und seiner Verbreitung verstanden werden. Ob der hier beschriebene Prozess der Übertragung von RIG-I mit seinem Liganden nicht nur nach Transfektion des Liganden in die Zelle, sondern auch im Verlauf einer Virusinfektion stattfindet und welche virale 3pRNA dabei übertragen wird, muss im Weiteren in viralen Modellen untersucht werden. Wenn dieser Effekt auch im Rahmen einer Virusinfektion stattfindet, sollte es sich um einen protektiven Effekt des Immunsystems handeln, da es wie in dieser Arbeit charakterisiert zur Induktion von anti-viralen Mechanismen (Induktion von Zytokinen und NK-Zell Aktivierung) kommt. Zu klären wäre jedoch, ob Viren in der Lage sind diesen Mechanismus zu unterdrücken, z.B. durch eine bereits beschriebene Inhibierung von RIG-I<sup>278</sup> und wie die oben beschriebene Übertragung ganzer Viren über Exosomen dazu im Verhältnis steht. Die Relevanz der Übertragung von RIG-I mit seinem Liganden im Rahmen von Virusinfektionen sollte der Mittelpunkt weiterer Forschungsprojekte sein.

---

## **6.6 3pRNA induzierte Exosomen inhibieren das Tumorwachstum in Abhängigkeit von NK-Zellen in einem subkutanen Melanommodell *in vivo***

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die intravenöse Applikation von murinen 3pRNA Melanomexosomen aber nicht von ctrl Melanomexosomen zu einer Aktivierung von NK-Zellen in den Lymphknoten der Maus führt. Makroskopisch waren alle Lymphknoten vergrößert und eine Beteiligung der Milz konnte durch eine fehlende Aktivierung von NK-Zellen ausgeschlossen werden. Wodurch die intravenöse Applikation der murinen 3pRNA Melanomexosomen zu einer präferentiellen Wanderung der Melanomexosomen in den Lymphknoten vermittelt wird, muss im Weiteren untersucht werden. Dabei sollte von besonderem Interesse die Expression von Tetraspaninen auf den Melanomexosomen sein. Die Gruppe um Zöller et al. postuliert, dass die exosomale Tetraspaninkomposition die Aufnahme in verschiedene Zelltypen bestimmt<sup>279,280</sup>. Die daraus resultierenden Ergebnisse könnten wegweisend für eine zellspezifische therapeutische Anwendung von Tumorexosomen sein.

Die intratumorale Injektion von 3pRNA Melanomexosomen inhibierte das Tumorwachstum eines subkutanen murinen Melanoms. Dieser Effekt war abhängig von der Anwesenheit von NK-Zellen, wie durch Depletion belegt werden konnte und zeigt, dass die *in vitro* analysierten NK-Zell-Aktivierung *in vivo* in der Tumorthherapie von Bedeutung ist. Im Weiteren konnte eine Aktivierung von NK-Zellen nach intratumoraler Injektion von 3pRNA Melanomexosomen aber nicht von ctrl Melanomexosomen in der tumortragenden Maus gezeigt werden. Ob hierbei die Aktivierung der NK-Zellen durch 3p-Motiv tragende RNA-Spezies in den Melanomexosomen zustande kommt oder durch die Expression von NK-aktivierenden Liganden (z.B. BAG6) muss in weiteren Versuchen genauer untersucht werden. Obwohl die Maus nur ein Pseudogen für das humanen NKp30 besitzt, konnte in Studien eine immunologische Relevanz für BAG6 im murinen System gezeigt werden<sup>281,282</sup>. Ob dabei BAG6 in der Maus von einem bisher nicht identifizierten aktivierenden NK-Rezeptor erkannt wird oder ob es weitere bisher nicht charakterisierte immunaktivierende Moleküle auf den 3pRNA Melanomexosomen gibt, sind zentrale Fragen für zukünftige Projekte. Im weiteren muss untersucht werden, welche Relevanz die durch die 3pRNA Melanomexosomen induzierten Chemokine in der anti-tumoralen Antwort spielen.

---

Die Inhibierung des Tumorwachstums des subkutanen murinen Melanommodells durch eine Kurzzeittherapie mit 3pRNA Melanomexosomen war sehr überraschend. Wie bereits in der Kapitel 2.1.3.2 beschrieben, sind Exosomen aus Tumorzellen hauptsächlich mit immunsuppressiven, pro-angiogenetischen und pro-metastatischen Eigenschaften assoziiert<sup>48,49,283-285</sup>. Im Gegensatz zu DEX zeichnen sich TEX allerdings durch den Vorteil der Expression von Tumorantigenen aus. Um diesen Vorteil der TEX gegenüber anderen Exosomen ausnutzen zu können, ist es erforderlich, die pro-tumoralen Eigenschaften in anti-tumorale Charakteristika umzuwandeln. Dieses bisher angestrebte aber nicht erreichte Ziel ist in dieser Arbeit mit der Generierung von Melanomexosomen durch die Aktivierung von RIG-I gelungen. Als Mechanismus konnte die Expression von BAG6 als aktivierender NK-Zell Ligand und die Verpackung von RIG-I mit 3pRNA in Melanomexosomen belegt werden. In fortführenden Forschungsprojekten muss analysiert werden, ob weitere Faktoren zur Umwandlung von pro- in anti-tumorale TEX beitragen. Dabei sollte das Interesse auf der möglichen Veränderung der Verpackung von miRNAs liegen, da Publikationen die pro-tumoralen Eigenschaften mit miRNAs assoziieren<sup>43</sup>. In dieser Arbeit wurde nicht untersucht, ob 3pRNA Melanomexosomen durch grundsätzlich enthaltene Tumorantigene in der Lage sind, zur Aktivierung von T-Zellen zu führen<sup>50</sup>. Auch wenn der anti-tumorale Effekt *in vivo* nach Depletion von NK-Zellen nicht mehr nachweisbar war, schließt dies nicht aus, dass T-Zellen eine Rolle, insbesondere in langfristigen Tumormodellen, spielen können. Sicherlich wird es interessant sein zu sehen, ob die 3pRNA Melanomexosomen vermittelte NK-Zell-Aktivierung von einer T-Zell Aktivierung gefolgt wird. Zusätzlich sollte in Betracht gezogen werden, dass durch die Identifizierung der exprimierten Tumorantigene die 3pRNA TEX als Vakzinierungsstrategie genutzt werden könnten. Im Vergleich zu DEX würde man den Gedanken der Vakzinierung von Tumorantigenen mit 3pRNA TEX um die Fähigkeit der Aktivierung von NK-Zelle und der Induktion von Th1-Zytokinen (Typ I IFN) erweitern, um ein optimales Umfeld mit der Möglichkeit zur T-Zell-Aktivierung im immunsuppressiven Tumormikromilieu zu schaffen.

Mit dieser Arbeit konnte belegt werden, dass die Aktivierung von RIG-I ausreichend ist, um Tumorexosomen mit potentiellen pro-tumoralen Eigenschaften in anti-tumorale Vehikel zu verwandeln.

## 6.7 Exosomen als natürliches delivery tool

Nukleinsäuren werden in der therapeutischen Anwendung bei chronischen Krankheiten, Tumorerkrankungen und als Adjuvant erprobt. Allerdings bringt die Anwendung nackter Nukleinsäuren einige Probleme mit sich, da es zu einer schnellen Clearance<sup>286</sup>, zu einer Limitierung der Serumhalbwertszeit durch Nukleasen (5 – 60 min für RNA, 10 min für DNA)<sup>287,288</sup> und zu keiner Organ-spezifischen Verteilung kommt. Daher bedarf es der Verpackung der Nukleinsäuren, um einen sicheren Transport im Organismus zu gewährleisten. Neben viralen Vektoren (z.B. Adenovirale Vektoren)<sup>289</sup> werden dafür u.a. kationische Liposomen und Zell-penetrierende Peptide<sup>290,291</sup> verwendet. 3pRNA kann *in vivo* mit einer kommerziell erhältlichen Liposomenformulierung (in vivo-JetPEI®) appliziert werden<sup>151</sup>. Interessanterweise war der Effekt der Tumorregression und der NK-Zell-Aktivierung durch 3pRNA Melanomexosomen stärker als wenn eine äquivalente Dosis pure 3pRNA mit dem kommerziellen Transfektionsmittel eingesetzt wurde. Äquivalent bedeutet hier, dass beide Applikationsformen *in vitro* eine vergleichbare Menge anti-virale Zytokine induzieren, d.h. in etwa das gleiche Potential an 3pRNA vermittelten Effekt besitzen. Dieses Ergebnis lässt sich damit erklären, dass die Aktivierung von RIG-I zu vielfältigen Veränderungen in den Exosomen führt, die zur anti-Tumorantwort führen und damit über den Transfer von RIG-I und Ligand hinausgehen. Wir konnten mit der Induktion von BAG6 auf der Oberfläche von Exosomen einen weiteren wichtigen Faktor belegen. Nicht auszuschließen ist das Vorhandensein von weiteren bisher nicht identifizierten immunaktivierenden Molekülen. Da Exosomen im Körper natürlicherweise für den Transport von RNAs und Proteinen zu benachbarten Zellen verantwortlich sind, stellen Exosomen eine neue Gruppe von Vehikeln dar, die geeignet sind exogene Therapeutika *in vivo* zu applizieren. Ihr Vorteil gegenüber bereits vorhandenen Vehikeln ist ihre Fähigkeit zum Transport von funktionellen RNAs, ihre natürliche Stabilität im Blut, ihre Biokompatibilität und ihre immunologische Toleranz. Auch haben sie die Eigenschaft, physiologische Schranken, wie z.B. die Blut-Hirn Schranke<sup>54</sup>, überwinden zu können und grenzen sich damit klar von anderen synthetischen Vehikeln ab. Diese Eigenschaften der 3pRNA Melanomexosomen können eine weitere Erklärung für den stärkeren Tumorregressionseffekt im Vergleich zu einem kommerziellen Transfektionsreagenz sein. Für die klinische Anwendung von Exosomen müssen jedoch noch einige Probleme gelöst werden. Dazu zählen ein kosten-optimiertes standardisiertes Herstellungsverfahren im

---

großen Maßstab, das eine gleichbleibende Wirkung garantiert sowie weitere intensive Forschung zur besseren Charakterisierung von Exosomen. Die zentrale Frage ist dabei, ob die Injektion der als pro-tumoral beschriebenen Tumorexosomen ethisch vertretbar ist, wenn diese durch anti-tumoral wirkenden Substanzen modifiziert wurden. In einem fortführenden Projekt muss analysiert werden, wie die Produktion von 3pRNA Melanomexosomen gesteigert werden kann. Wenn man versteht, wie 3pRNA in Melanomexosomen verpackt wird, lassen sich Rückschlüsse auf Stellschrauben zur Modifikation der Verpackung ziehen. Im Weiteren muss im Mausmodell untersucht werden, ob 3pRNA Melanomexosomen noch pro-tumorale Eigenschaften in sich tragen.

Blickt man mit den Ergebnissen dieser Arbeit auf die durch kommerzielle Liposomenformulierungen transfizierte 3pRNA, so stellt sich die Frage nach der Bildung von 3pRNA Melanomexosomen nach subkutaner Injektion der komplexierten 3pRNA. Es wird von Interesse sein, ob die intratumorale Injektion von 3pRNA in das Melanom zur Bildung von 3p-Motiv tragenden Exosomen *in vivo* führt. Sollte sich die Rolle der 3pRNA Melanomexosomen in der Weitergabe von anti-tumoralen Signalen bestätigen, wäre 3pRNA die erste beschriebene kurze immunstimulatorische RNA, die im Vergleich zu anderen kurzen RNAs (z.B. siRNAs) ein eigenes natürliches zytoplasmatisches *delivery-tool in vivo* induzieren und sich damit selber weiter transportieren kann. Hierbei wird von besonderem Interesse sein, ob die möglicherweise *in vivo* induzierten 3pRNA Melanomexosomen zum therapeutischen Effekt der 3pRNA beitragen.

Zusammenfassend zeichnen sich die Eigenschaften von Exosomen als ideales natürliches *delivery tool* aus. Allerdings bedarf es noch intensiver Forschung, um Exosomen in ihrer Komplexität zu verstehen und zielgerichtet einsetzen zu können.

---

## 7 Literaturverzeichnis

1. Trams, E. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim Biophys Acta*
2. Pan, B. T. & Johnstone, R. M. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell* **33**, 967–978 (1983).
3. Harding, C. Receptor-mediated Endocytosis of Transferrin and Recycling of the Transferrin Receptor in Rat Reticulocytes.
4. Raposo, G. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J. Exp. Med.* **183**, 1161 (1996).
5. Thery, C., Ostrowski, M. & Segura, E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* **9**, 581–593 (2009).
6. Simpson, R. J., Jensen, S. S. & Lim, J. W. E. Proteomic profiling of exosomes: Current perspectives. *Proteomics* **8**, 4083–4099 (2008).
7. 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**, 3791–3799 (1999).
8. Gasser, O. *et al.* Characterisation and properties of ectosomes released by human polymorphonuclear neutrophils. *Experimental Cell Research* **285**, 243–257 (2003).
9. 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**, 2849–2858 (2005).
10. Hawari, F. I. Release of full-length 55-kDa TNF receptor 1 in exosome-like vesicles: A mechanism for generation of soluble cytokine receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 1297–1302 (2004).
11. Thery, C. *et al.* Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J. Immunol.* **166**, 7309–7318 (2001).
12. Runz, S. *et al.* Malignant ascites-derived exosomes of ovarian carcinoma patients contain CD24 and EpCAM. *Gynecol. Oncol.* **107**, 563–571 (2007).
13. Valadi, H. *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* **9**, 654–659 (2007).
14. Lötval, J. & Valadi, H. Cell to cell signalling via exosomes through esRNA. *Cell Adh Migr* **1**, 156–158 (2007).
15. Escola, J. M. Selective Enrichment of Tetraspan Proteins on the Internal Vesicles of Multivesicular Endosomes and on Exosomes Secreted by Human B-lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 20121–20127 (1998).
16. Lamparski, H. G. *et al.* Production and characterization of clinical grade exosomes derived from dendritic cells. *J. Immunol. Methods* **270**, 211–226 (2002).
17. Iero, M. *et al.* Tumour-released exosomes and their implications in cancer immunity. *Cell Death Differ* **15**, 80–88 (2007).
18. Mireya Gonzalez-Begn *et al.* Proteomic Analysis of Human Parotid Gland Exosomes by Multidimensional Protein Identification Technology (MudPIT).

- 
- Journal of proteome research* **8**, 1304 (2009).
19. Kapsogeorgou, E. K., Abu-Helu, R. F., Moutsopoulos, H. M. & Manoussakis, M. N. Salivary gland epithelial cell exosomes: A source of autoantigenic ribonucleoproteins. *Arthritis Rheum* **52**, 1517–1521 (2005).
  20. Wahlgren, J. *et al.* Plasma exosomes can deliver exogenous short interfering RNA to monocytes and lymphocytes. *Nucleic Acids Research* **40**, e130 (2012).
  21. Pisitkun, T. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 13368–13373 (2004).
  22. Keller, S. *et al.* CD24 is a marker of exosomes secreted into urine and amniotic fluid. *Kidney Int* **72**, 1095–1102 (2007).
  23. Admyre, C. *et al.* Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. *J. Immunol.* **179**, 1969–1978 (2007).
  24. Razi, M. & Futter, C. E. Distinct roles for Tsg101 and Hrs in multivesicular body formation and inward vesiculation. *Mol. Biol. Cell* **17**, 3469–3483 (2006).
  25. 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**, 10963–10972 (2003).
  26. de Gassart, A. Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. *Blood* **102**, 4336–4344 (2003).
  27. Gibbings, D. J., Ciaudo, C., Erhardt, M. & Voinnet, O. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat Cell Biol* **11**, 1143–1149 (2009).
  28. Lee, Y. S. *et al.* Silencing by small RNAs is linked to endosomal trafficking. *Nat Cell Biol* **11**, 1150–1156 (2009).
  29. Tamai, K. *et al.* Exosome secretion of dendritic cells is regulated by Hrs, an ESCRT-0 protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **399**, 384–390 (2010).
  30. Trajkovic, K. *et al.* Ceramide Triggers Budding of Exosome Vesicles into Multivesicular Endosomes. *Science* **319**, 1244–1247 (2008).
  31. Baietti, M. F. *et al.* Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat Cell Biol* (2012). doi:10.1038/ncb2502
  32. Ostrowski, M. *et al.* Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol* **12**, 19–30 (2009).
  33. Hsu, C. *et al.* Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C. *J. Cell Biol.* **189**, 223–232 (2010).
  34. Savina, A., Furlán, M., Vidal, M. & Colombo, M. I. Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 20083–20090 (2003).
  35. Parolini, I. *et al.* Microenvironmental pH Is a Key Factor for Exosome Traffic in Tumor Cells. *J. Biol. Chem.* **284**, 34211–34222 (2009).
  36. Keller, S., Sanderson, M. P., Stoeck, A. & Altevogt, P. Exosomes: From biogenesis and secretion to biological function. *Immunology Letters* **107**, 102–108 (2006).
  37. Clayton, A. *et al.* Adhesion and signaling by B cell-derived exosomes: the role of integrins. *FASEB J.* **18**, 977–979 (2004).
  38. 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).
  39. Matsumoto, K. Exosomes Secreted From Monocyte-Derived Dendritic Cells Support in Vitro Naive CD4+ T Cell Survival Through NF-kappa B Activation. *Cellular Immunology* (2004).

40. Blanchard, N. *et al.* TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/zeta complex. *J. Immunol.* **168**, 3235–3241 (2002).
41. Alonso, R. Diacylglycerol Kinase Regulates the Secretion of Lethal Exosomes Bearing Fas Ligand during Activation-induced Cell Death of T Lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 28439–28450 (2005).
42. Liu, C. *et al.* Murine mammary carcinoma exosomes promote tumor growth by suppression of NK cell function. *J. Immunol.* **176**, 1375–1385 (2006).
43. Skog, J. *et al.* Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* **10**, 1470–1476 (2008).
44. Abusamra, A. J. *et al.* Tumor exosomes expressing Fas ligand mediate CD8+ T-cell apoptosis. *Blood Cells Mol. Dis.* **35**, 169–173 (2005).
45. Liu, Y. *et al.* Contribution of MyD88 to the tumor exosome-mediated induction of myeloid derived suppressor cells. *Am. J. Pathol.* **176**, 2490–2499 (2010).
46. Clayton, A. *et al.* Human tumor-derived exosomes down-modulate NKG2D expression. *J. Immunol.* **180**, 7249–7258 (2008).
47. Hong, B. *et al.* Colorectal cancer cell-derived microvesicles are enriched in cell cycle-related mRNAs that promote proliferation of endothelial cells. *BMC Genomics* **10**, 556 (2009).
48. Hood, J. L., San, R. S. & Wickline, S. A. Exosomes Released by Melanoma Cells Prepare Sentinel Lymph Nodes for Tumor Metastasis. *Cancer Research* **71**, 3792–3801 (2011).
49. Peinado, H. *et al.* Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat. Med.* (2012). doi:10.1038/nm.2753
50. 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).
51. Dai, S. *et al.* Phase I Clinical Trial of Autologous Ascites-derived Exosomes Combined With GM-CSF for Colorectal Cancer. *Mol Ther* **16**, 782–790 (2008).
52. Chen, T., Guo, J., Yang, M., Zhu, X. & Cao, X. Chemokine-Containing Exosomes Are Released from Heat-Stressed Tumor Cells via Lipid Raft-Dependent Pathway and Act as Efficient Tumor Vaccine. *The Journal of Immunology* **186**, 2219–2228 (2011).
53. Zhuang, X. *et al.* Treatment of Brain Inflammatory Diseases by Delivering Exosome Encapsulated Anti-inflammatory Drugs From the Nasal Region to the Brain. *Mol Ther* **19**, 1769–1779 (2011).
54. Alvarez-Erviti, L. *et al.* Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol* **29**, 341–345 (2011).
55. Xiu, F. *et al.* Surface anchorage of superantigen SEA promotes induction of specific antitumor immune response by tumor-derived exosomes. *J Mol Med* **85**, 511–521 (2007).
56. Viaud, S. *et al.* Dendritic Cell-Derived Exosomes Promote Natural Killer Cell Activation and Proliferation: A Role for NKG2D Ligands and IL-15R $\alpha$ . *PLoS ONE* **4**, e4942 (2009).
57. Bernard Escudier *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).

- 
58. Michael A Morse *et al.* A phase I study of dexosome immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Transl Med* **3**, 9 (2005).
  59. Lamparski, H. G. *et al.* Production and characterization of clinical grade exosomes derived from dendritic cells. *J. Immunol. Methods* **270**, 211–226 (2002).
  60. Marleau, A. M., Chen, C.-S., Joyce, J. A. & Tullis, R. H. Exosome removal as a therapeutic adjuvant in cancer. *J Transl Med* **10**, 134 (2012).
  61. Ristorcelli, E., Beraud, E., Mathieu, S., Lombardo, D. & Verine, A. Essential role of Notch signaling in apoptosis of human pancreatic tumoral cells mediated by exosomal nanoparticles. *Int. J. Cancer* **125**, 1016–1026 (2009).
  62. Xie, Y. *et al.* Membrane-bound HSP70-engineered myeloma cell-derived exosomes stimulate more efficient CD8<sup>+</sup> CTL- and NK-mediated antitumour immunity than exosomes released from heat-shocked tumour cells expressing cytoplasmic HSP70. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **14**, 2655–2666 (2010).
  63. Zeelenberg, I. S. *et al.* Targeting Tumor Antigens to Secreted Membrane Vesicles In vivo Induces Efficient Antitumor Immune Responses. *Cancer Research* **68**, 1228–1235 (2008).
  64. Bu, N., Li, Q.-L., Feng, Q. & Sun, B.-Z. Immune protection effect of exosomes against attack of L1210 tumor cells. <http://dx.doi.org/10.1080/10428190500376191>
  65. Chen, W. *et al.* Efficient induction of antitumor T cell immunity by exosomes derived from heat-shocked lymphoma cells. *Eur. J. Immunol.* **36**, 1598–1607 (2006).
  66. 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 Letters* **275**, 256–265 (2009).
  67. Cho, J.-A. *et al.* Exosomes: A new delivery system for tumor antigens in cancer immunotherapy. *Int. J. Cancer* **114**, 613–622 (2005).
  68. Janeway, C. A. Approaching the Asymptote? Evolution and Revolution in Immunology. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **54**, 1–13 (1989).
  69. Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. & Janeway, C. A. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**, 394–397 (1997).
  70. Volz, T., Kaesler, S. & Biedermann, T. Innate immune sensing 2.0 - from linear activation pathways to fine tuned and regulated innate immune networks. *Experimental Dermatology* **21**, 61–69 (2012).
  71. Arstila, T. P. A Direct Estimate of the Human T Cell Receptor Diversity. *Science* **286**, 958–961 (1999).
  72. Mackay, I. R., Rosen, F. S., Delves, P. J. & Roitt, I. M. The Immune System. *N. Engl. J. Med.* **343**, 108–117 (2000).
  73. Blasius, A. L. & Beutler, B. Intracellular Toll-like Receptors. *Immunity* **32**, 305–315 (2010).
  74. Kumar, H., Kawai, T. & Akira, S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **388**, 621–625 (2009).
  75. Kawai, T. & Akira, S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *International Immunology* **21**, 317–337 (2009).

76. Peiser, L., Mukhopadhyay, S. & Gordon, S. Scavenger receptors in innate immunity. *Current Opinion in Immunology* **14**, 123–128 (2002).
77. McGreal, E. P., Miller, J. L. & Gordon, S. Ligand recognition by antigen-presenting cell C-type lectin receptors. *Current Opinion in Immunology* **17**, 18–24 (2005).
78. Apostolopoulos, V. & Mckenzie, I. Role of the Mannose Receptor in the Immune Response. *CMM* **1**, 469–474 (2001).
79. Takeuchi, O. & Akira, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* **140**, 805–820 (2010).
80. Hornung, V. *et al.* 5'-Triphosphate RNA Is the Ligand for RIG-I. *Science* **314**, 994–997 (2006).
81. Yueh-Ming Loo *et al.* Distinct RIG-I and MDA5 Signaling by RNA Viruses in Innate Immunity. *Journal of Virology* **82**, 335–345 (2008).
82. Kato, H. *et al.* Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nat Cell Biol* **441**, 101–105 (2006).
83. Yoneyama, M. *et al.* Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J. Immunol.* **175**, 2851–2858 (2005).
84. Pichlmair, A. *et al.* RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* **314**, 997–1001 (2006).
85. Kanneganti, T.-D. Central roles of NLRs and inflammasomes in viral infection. *Nat Rev Immunol* **10**, 688–698 (2010).
86. Chen, G., Shaw, M. H., Kim, Y.-G. & Nuñez, G. NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease. *Annu Rev Pathol* **4**, 365–398 (2009).
87. Stetson, D. B. & Medzhitov, R. Recognition of Cytosolic DNA Activates an IRF3-Dependent Innate Immune Response. *Immunity* **24**, 93–103 (2006).
88. Takaoka, A. *et al.* DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* **448**, 501–505 (2007).
89. Chiu, Y.-H., MacMillan, J. B. & Chen, Z. J. RNA Polymerase III Detects Cytosolic DNA and Induces Type I Interferons through the RIG-I Pathway. *Cell* **138**, 576–591 (2009).
90. Ablasser, A. *et al.* RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III transcribed RNA intermediate. *Nature Immunology* **10**, 1065–1072 (2009).
91. Unterholzner, L. *et al.* IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nature Immunology* **11**, 997–1004 (2010).
92. Beutler, B. *et al.* Genetic analysis of resistance to viral infection. *Nat Rev Immunol* **7**, 753–766 (2007).
93. Saito, T. *et al.* Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 582–587 (2007).
94. Wang, Y. *et al.* Structural and functional insights into 5'-ppp RNA pattern recognition by the innate immune receptor RIG-I. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 781–787 (2010).
95. Cui, S. *et al.* The C-Terminal Regulatory Domain Is the RNA 5'-Triphosphate Sensor of RIG-I. *Molecular Cell* **29**, 169–179 (2008).
96. Takahasi, K. *et al.* Nonself RNA-Sensing Mechanism of RIG-I Helicase and Activation of Antiviral Immune Responses. *Molecular Cell* **29**, 428–440 (2008).

- 
97. Lu, C. *et al.* The Structural Basis of 5' Triphosphate Double-Stranded RNA Recognition by RIG-I C-Terminal Domain. *Structure* **18**, 1032–1043 (2010).
98. BAMMING, D. & Horvath, C. M. Regulation of Signal Transduction by Enzymatically Inactive Antiviral RNA Helicase Proteins MDA5, RIG-I, and LGP2. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 9700–9712 (2009).
99. Yoneyama, M. *et al.* The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nature Immunology* **5**, 730–737 (2004).
100. Rothenfusser, S. *et al.* The RNA Helicase Lgp2 Inhibits TLR-Independent Sensing of Viral Replication by Retinoic Acid-Inducible Gene-1.
101. Satoh, T. *et al.* From the Cover: LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 1512–1517 (2010).
102. Chauhan, V. S. *et al.* Vesicular stomatitis virus infects resident cells of the central nervous system and induces replication-dependent inflammatory responses. *Virology* **400**, 187–196 (2010).
103. Furr, S. R., Moerdyk-Schauwecker, M., Grdzlishvili, V. Z. & Marriott, I. RIG-I mediates nonsegmented negative-sense RNA virus-induced inflammatory immune responses of primary human astrocytes. *Glia* (2010). doi:10.1002/glia.21034
104. Sirén, J. *et al.* Retinoic acid inducible gene-1 and mda-5 are involved in influenza A virus-induced expression of antiviral cytokines. *Microbes Infect.* **8**, 2013–2020 (2006).
105. Le Goffic, R. *et al.* Cutting Edge: Influenza A Virus Activates TLR3-Dependent Inflammatory and RIG-I-Dependent Antiviral Responses in Human Lung Epithelial Cells.
106. Schlee, M. *et al.* Recognition of 5' Triphosphate by RIG-I Helicase Requires Short Blunt Double-Stranded RNA as Contained in Panhandle of Negative-Strand Virus. *Immunity* **31**, 25–34 (2009).
107. Schmidt, A. *et al.* 5'-triphosphate RNA requires base-paired structures to activate antiviral signaling via RIG-I. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 12067–12072 (2009).
108. Baum, A., Sachidanandam, R. & Garcia-Sastre, A. Preference of RIG-I for short viral RNA molecules in infected cells revealed by next-generation sequencing.
109. Peisley, A. *et al.* Cooperative assembly and dynamic disassembly of MDA5 filaments for viral dsRNA recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 21010–21015 (2011).
110. Peisley, A. *et al.* Kinetic mechanism for viral dsRNA length discrimination by MDA5 filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, E3340–9 (2012).
111. Wu, B. *et al.* Structural Basis for dsRNA Recognition, Filament Formation, and Antiviral Signal Activation by MDA5. *Cell* **152**, 276–289 (2013).
112. Pichlmair, A. *et al.* Activation of MDA5 requires higher-order RNA structures generated during virus infection. *Journal of Virology* **83**, 10761–10769 (2009).
113. Kawai, T. *et al.* IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nature Immunology* **6**, 981–988 (2005).
114. Seth, R. B., Sun, L., Ea, C.-K. & Chen, Z. J. Identification and Characterization of MAVS, a Mitochondrial Antiviral Signaling Protein that Activates NF- $\kappa$ B and IRF3.

- Cell* **122**, 669–682 (2005).
115. Xu, L.-G. *et al.* VISA Is an Adapter Protein Required for Virus-Triggered IFN- $\beta$  Signaling. *Molecular Cell* **19**, 727–740 (2005).
116. Meylan, E. *et al.* Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* **437**, 1167–1172 (2005).
117. Takahashi, K. *et al.* Roles of caspase-8 and caspase-10 in innate immune responses to double-stranded RNA. *J. Immunol.* **176**, 4520–4524 (2006).
118. Michallet, M.-C. *et al.* TRADD Protein Is an Essential Component of the RIG-like Helicase Antiviral Pathway. *Immunity* **28**, 651–661 (2008).
119. Taniguchi, T. & Takaoka, A. The interferon- $\alpha/\beta$  system in antiviral responses: a multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors. *Current Opinion in Immunology* **14**, 111–116 (2002).
120. Samuel, C. E. Antiviral Actions of Interferons. *Clinical Microbiology Reviews* **14**, 778–809 (2001).
121. Honda, K., Takaoka, A. & Taniguchi, T. Type I Interferon Gene Induction by the Interferon Regulatory Factor Family of Transcription Factors. *Immunity* **25**, 349–360 (2006).
122. Stetson, D. B. & Medzhitov, R. Type I interferons in host defense. *Immunity* **25**, 373–381 (2006).
123. Kumar, H., Kawai, T. & Akira, S. Pathogen Recognition by the Innate Immune System. <http://dx.doi.org/10.3109/08830185.2010.529976>
124. Kubler, K. *et al.* Targeted Activation of RNA Helicase Retinoic Acid-Inducible Gene-1 Induces Proimmunogenic Apoptosis of Human Ovarian Cancer Cells. *Cancer Research* **70**, 5293–5304 (2010).
125. Yoneyama, M. & Fujita, T. RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors. *Immunol. Rev.* **227**, 54–65 (2009).
126. Wilkins, C. & Gale, M., Jr. Recognition of viruses by cytoplasmic sensors. *Current Opinion in Immunology* **22**, 41–47 (2010).
127. Hersey, P. & Zhang, X. D. Overcoming resistance of cancer cells to apoptosis. *J. Cell. Physiol.* **196**, 9–18 (2003).
128. Besch, R. *et al.* Proapoptotic signaling induced by RIG-I and MDA-5 results in type I interferon-independent apoptosis in human melanoma cells. *J. Clin. Invest.* (2009). doi:10.1172/JCI37155DS1
129. Glas, M. *et al.* Targeting the Cytosolic Innate Immune Receptors RIG-I and MDA5 Effectively Counteracts Cancer Cell Heterogeneity in Glioblastoma. *STEM CELLS* (2013). doi:10.1002/stem.1350
130. NI, W., Harmon BV, GC, G. & JF, K. Patterns of cell death. *Methods Achiev Exp Pathol* **13**, 18–54 (1988).
131. Holler, N. *et al.* Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule - Nature Immunology. *Nature Immunology* **1**, 489–495 (2000).
132. Galluzzi, L. *et al.* Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* **19**, 107–120 (2011).
133. Degterev, A. *et al.* Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat Chem Biol* **4**, 313–321 (2008).
134. Chan, F. K. M. A Role for Tumor Necrosis Factor Receptor-2 and Receptor-interacting Protein in Programmed Necrosis and Antiviral Responses. *Journal of*

- Biological Chemistry* **278**, 51613–51621 (2003).
135. Laster, S. M., Wood, J. G. & Gooding, L. R. Tumor necrosis factor can induce both apoptotic and necrotic forms of cell lysis. *Journal of Immunology* **141**, 2629–2634
136. Chu, J. J. H. The mechanism of cell death during West Nile virus infection is dependent on initial infectious dose. *Journal of General Virology* **84**, 3305–3314 (2003).
137. Cho, Y. *et al.* Phosphorylation-Driven Assembly of the RIP1-RIP3 Complex Regulates Programmed Necrosis and Virus-Induced Inflammation. *Cell* **137**, 1112–1123 (2009).
138. Meylan, E. *et al.* RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3–induced NF- $\kappa$ B activation. *Nature Immunology* **5**, 503–507 (2004).
139. Lee, E.-W., Seo, J., Jeong, M., Lee, S. & Song, J. The roles of FADD in extrinsic apoptosis and necroptosis. *BMB Rep* **45**, 496–508 (2012).
140. Rajput, A. *et al.* RIG-I RNA helicase activation of IRF3 transcription factor is negatively regulated by caspase-8-mediated cleavage of the RIP1 protein. *Immunity* **34**, 340–351 (2011).
141. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer. 1–14 (1999).
142. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
143. Gajewski, T. F. Cancer immunotherapy. *Molecular Oncology* **6**, 242–250 (2012).
144. Schwartzenuber, D. J. Guidelines for the safe administration of high-dose interleukin-2. *J. Immunother.* **24**, 287–293 (2001).
145. Rubin, K. M., Vona, K., Madden, K., McGettigan, S. & Braun, I. M. Side effects in melanoma patients receiving adjuvant interferon alfa-2b therapy: a nurse’s perspective. *Support Care Cancer* **20**, 1601–1611 (2012).
146. Liu, G. & Zhao, Y. Toll-like receptors and immune regulation: their direct and indirect modulation on regulatory CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells. *Immunology* **122**, 149–156 (2007).
147. Tabiasco, J. *et al.* Human effector CD8<sup>+</sup> T lymphocytes express TLR3 as a functional coreceptor. *J. Immunol.* **177**, 8708–8713 (2006).
148. Klinman, D. M. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat Rev Immunol* **4**, 249–259 (2004).
149. Klinman, D. M., Klaschik, S., Sato, T. & Tross, D. CpG oligonucleotides as adjuvants for vaccines targeting infectious diseases. *Advanced Drug Delivery Reviews* **61**, 248–255 (2009).
150. *Handbook of Experimental Pharmacology.* **183**, 51–70 (Springer Berlin Heidelberg, 2008).
151. Poeck, H. *et al.* 5′-triphosphate-siRNA: turning gene silencing and Rig-I activation against melanoma. *Nat. Med.* **14**, 1256–1263 (2008).
152. Kübler, K. *et al.* Immunogenic cell death of human ovarian cancer cells induced by cytosolic poly(I:C) leads to myeloid cell maturation and activates NK cells. *Eur. J. Immunol.* **41**, 3028–3039 (2011).
153. Vivier, E. *et al.* Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells. *Science* **331**, 44–49 (2011).
154. Lanier, L. L. NK CELL RECOGNITION. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 225–274 (2005).
155. Trapani, J. A. & Smyth, M. J. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* **2**, 735–747 (2002).
156. Lee, S.-H., Miyagi, T. & Biron, C. A. Keeping NK cells in highly regulated antiviral

- warfare. *Trends in Immunology* **28**, 252–259 (2007).
157. Shi, F.-D. *et al.* Natural killer cells determine the outcome of B cell-mediated autoimmunity - Nature Immunology. *Nature Immunology* **1**, 245–251 (2000).
158. Munz, C. Dendritic cell maturation by innate lymphocytes: coordinated stimulation of innate and adaptive immunity. *Journal of Experimental Medicine* **202**, 203–207 (2005).
159. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. **298**, 157–174 (Springer-Verlag, 2006).
160. Vivier, E., Nunès, J. A. & Vély, F. Natural killer cell signaling pathways. *Science* **306**, 1517–1519 (2004).
161. Billadeau, D. D. & Leibson, P. J. ITAMs versus ITIMs: striking a balance during cell regulation. *J. Clin. Invest.* **109**, 161–168 (2002).
162. Zompi, S. & Colucci, F. Anatomy of a murder—signal transduction pathways leading to activation of natural killer cells. *Immunology Letters* **97**, 31–39 (2005).
163. Biassoni, R. *et al.* Human natural killer cell receptors and co-receptors. *Immunol. Rev.* **181**, 203–214 (2001).
164. Chisholm, S. E. & Reyburn, H. T. Recognition of vaccinia virus-infected cells by human natural killer cells depends on natural cytotoxicity receptors. *Journal of Virology* **80**, 2225–2233 (2006).
165. Hershkovitz, O. *et al.* NKp44 receptor mediates interaction of the envelope glycoproteins from the West Nile and dengue viruses with NK cells. *The Journal of Immunology* **183**, 2610–2621 (2009).
166. Esin, S. *et al.* Direct binding of human NK cell natural cytotoxicity receptor NKp44 to the surfaces of mycobacteria and other bacteria. *Infect. Immun.* **76**, 1719–1727 (2008).
167. Brandt, C. S. *et al.* The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans. *Journal of Experimental Medicine* **206**, 1495–1503 (2009).
168. Kaifu, T., Escalière, B., Gastinel, L. N., Vivier, E. & Baratin, M. B7-H6/NKp30 interaction: a mechanism of alerting NK cells against tumors. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 3531–3539 (2011).
169. Pogge von Strandmann, E. *et al.* Human Leukocyte Antigen-B-Associated Transcript 3 Is Released from Tumor Cells and Engages the NKp30 Receptor on Natural Killer Cells. *Immunity* **27**, 965–974 (2007).
170. Simhadri, V. R. *et al.* Dendritic Cells Release HLA-B-Associated Transcript-3 Positive Exosomes to Regulate Natural Killer Function. *PLoS ONE* **3**, e3377 (2008).
171. Bottino, C., Castriconi, R., Moretta, L. & Moretta, A. Cellular ligands of activating NK receptors. *Trends in Immunology* **26**, 221–226 (2005).
172. BOTTINO, C. *et al.* Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as Cell Surface Ligands for the Human DNAM-1 (CD226) Activating Molecule. *Journal of Experimental Medicine* **198**, 557–567 (2003).
173. Ljunggren, H.-G. & Kärre, K. In search of the ‘missing self’: MHC molecules and NK cell recognition. *Trends in Immunology* **11**, 237–244 (1990).
174. Braud, V. M. *et al.* HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C : Article : Nature. *Nature* **391**, 795–799 (1998).
175. Borrego, F., Ulbrecht, M., Weiss, E. H., Coligan, J. E. & Brooks, A. G. Recognition of Human Histocompatibility Leukocyte Antigen (HLA)-E Complexed with HLA

- Class I Signal Sequence-derived Peptides by CD94/NKG2 Confers Protection from Natural Killer Cell-mediated Lysis. *Journal of Experimental Medicine* **187**, 813–818 (1998).
176. Ito, M. *et al.* Killer cell lectin-like receptor G1 binds three members of the classical cadherin family to inhibit NK cell cytotoxicity. *J. Exp. Med.* **203**, 289–295 (2006).
177. Gründemann, C. *et al.* Cutting edge: identification of E-cadherin as a ligand for the murine killer cell lectin-like receptor G1. *J. Immunol.* **176**, 1311–1315 (2006).
178. Lebbink, R. J. Collagens are functional, high affinity ligands for the inhibitory immune receptor LAIR-1. *Journal of Experimental Medicine* **203**, 1419–1425 (2006).
179. Cantoni, C. *et al.* Molecular and functional characterization of IRp60, a member of the immunoglobulin superfamily that functions as an inhibitory receptor in human NK cells. *Eur. J. Immunol.* **29**, 3148–3159 (1999).
180. Nicoll, G. Identification and Characterization of a Novel Siglec, Siglec-7, Expressed by Human Natural Killer Cells and Monocytes. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 34089–34095 (1999).
181. Zhang, J. Q. Siglec-9, a Novel Sialic Acid Binding Member of the Immunoglobulin Superfamily Expressed Broadly on Human Blood Leukocytes. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 22121–22126 (2000).
182. Gross, C. C., Brzostowski, J. A., Liu, D. & Long, E. O. Tethering of intercellular adhesion molecule on target cells is required for LFA-1-dependent NK cell adhesion and granule polarization. *The Journal of Immunology* **185**, 2918–2926 (2010).
183. Vyas, Y. M. *et al.* Spatial organization of signal transduction molecules in the NK cell immune synapses during MHC class I-regulated noncytolytic and cytolytic interactions. *J. Immunol.* **167**, 4358–4367 (2001).
184. Bossi, G. & Griffith, G. CTL secretory lysosomes: biogenesis and secretion of a harmful organelle. *Seminars in Immunology* **17**, 87–94 (2005).
185. Orange, J. S. Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse. *Nat Rev Immunol* **8**, 713–725 (2008).
186. Topham, N. J. & Hewitt, E. W. Natural killer cell cytotoxicity: how do they pull the trigger? *Immunology* **128**, 7–15 (2009).
187. Alter, G., Malenfant, J. M. & Altfeld, M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J. Immunol. Methods* **294**, 15–22 (2004).
188. Schulze-Osthoff, K. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem* 1–21 (2012).
189. Takeda, K. *et al.* Involvement of Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand in NK Cell-Mediated and IFN- $\gamma$ -Dependent Suppression of Subcutaneous Tumor Growth. *Cellular Immunology* **214**, 194–200 (2001).
190. Lynch, D. H. *et al.* Tumoricidal activity of tumor necrosis factor alpha related apoptosis inducing ligand in vivo. *Nat. Med.* **5**, 157–163 (1999).
191. Tsao, H., Atkins, M. B. & Sober, A. J. Management of Cutaneous Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **351**, 998–1012 (2004).
192. Erdmann, M. K. Immunity unleashed in melanoma. *The Lancet Oncology* **11**, 108–109 (2010).
193. Berry, L. J., Moeller, M. & Darcy, P. K. Adoptive immunotherapy for cancer: the

- next generation of gene-engineered immune cells. *Tissue Antigens* **74**, 277–289 (2009).
194. Algarra, I., Cabrera, T. & Garrido, F. The HLA crossroad in tumor immunology. *HIM* **61**, 65–73 (2000).
195. Jennifer M Reiman *et al.* Tumor Immunoediting and Immunosculting Pathways to Cancer Progression. *Seminars in Cancer Biology* **17**, 275–287 (2007).
196. Mirna Balsamo *et al.* Melanoma immunoediting by NK cells. *Oncoimmunology* **1**, 1607 (2012).
197. Burke, S., Lakshmikanth, T., Colucci, F. & Carbone, E. New views on natural killer cell-based immunotherapy for melanoma treatment. *Trends in Immunology* **31**, 339–345 (2010).
198. Hart, O. M., Athie-Morales, V., O'Connor, G. M. & Gardiner, C. M. TLR7/8-mediated activation of human NK cells results in accessory cell-dependent IFN- $\gamma$  production. *J. Immunol.* **175**, 1636–1642 (2005).
199. Alter, G. *et al.* Single-stranded RNA derived from HIV-1 serves as a potent activator of NK cells. *J. Immunol.* **178**, 7658–7666 (2007).
200. Hornung, V. *et al.* Quantitative Expression of Toll-Like Receptor 1–10 mRNA in Cellular Subsets of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells and Sensitivity to CpG Oligodeoxynucleotides. *jimmunol.org*
201. Qiu, F., Maniar, A., Diaz, M. Q., Chapoval, A. I. & Medvedev, A. E. Activation of cytokine-producing and antitumor activities of natural killer cells and macrophages by engagement of Toll-like and NOD-like receptors. *Innate Immun* **17**, 375–387 (2011).
202. Lauzon, N. M., Mian, F., MacKenzie, R. & Ashkar, A. A. The direct effects of Toll-like receptor ligands on human NK cell cytokine production and cytotoxicity. *Cellular Immunology* **241**, 102–112 (2006).
203. Ballas, Z. K. Modulation of NK cell activity by CpG oligodeoxynucleotides. *Immunol Res* **39**, 15–21
204. Wehner, R., Dietze, K., Bachmann, M. & Schmitz, M. The Bidirectional Crosstalk between Human Dendritic Cells and Natural Killer Cells. *Journal of Innate Immunity* **3**, 258–263 (2011).
205. Dumitru, C. D. *et al.* NK1.1+ cells mediate the antitumor effects of a dual Toll-like receptor 7/8 agonist in the disseminated B16-F10 melanoma model. *Cancer Immunology, Immunotherapy* **58**, 575–587 (2008).
206. Tu, Z., Hamalainen-Laanaya, H. K., Crispe, I. N. & Orloff, M. S. Synergy between TLR3 and IL-18 promotes IFN- $\gamma$  dependent TRAIL expression in human liver NK cells. *Cellular Immunology* **271**, 286–291 (2011).
207. Perrot, I. *et al.* TLR3 and Rig-Like Receptor on Myeloid Dendritic Cells and Rig-Like Receptor on Human NK Cells Are Both Mandatory for Production of IFN- in Response to Double-Stranded RNA. *The Journal of Immunology* **185**, 2080–2088 (2010).
208. Miyake, T. *et al.* Poly I:C-Induced Activation of NK Cells by CD8 + Dendritic Cells via the IPS-1 and TRIF-Dependent Pathways. *The Journal of Immunology* **183**, 2522–2528 (2009).
209. McCartney, S. *et al.* Distinct and complementary functions of MDA5 and TLR3 in poly(I:C)-mediated activation of mouse NK cells. *Journal of Experimental Medicine* **206**, 2967–2976 (2009).
210. Eldh, M., Lötvall, J., Malmhäll, C. & Ekström, K. Importance of RNA isolation

- methods for analysis of exosomal RNA: Evaluation of different methods. *Molecular Immunology* **50**, 278–286 (2012).
211. Simon, P. Q-Gene: processing quantitative real-time RT-PCR data. *Bioinformatics* **19**, 1439–1440 (2003).
212. Muller, P. Y., Janovjak, H., Miserez, A. R. & Dobbie, Z. Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *BioTechniques* **32**, 1372–4, 1376, 1378–9 (2002).
213. Dull, T. *et al.* A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *Journal of Virology* **72**, 8463–8471 (1998).
214. Draghi, M. *et al.* NKp46 and NKG2D recognition of infected dendritic cells is necessary for NK cell activation in the human response to influenza infection. *J. Immunol.* **178**, 2688–2698 (2007).
215. Jarahian, M. *et al.* Activation of Natural Killer Cells by Newcastle Disease Virus Hemagglutinin-Neuraminidase. *Journal of Virology* **83**, 8108–8121 (2009).
216. Bhatnagar, S., Shinagawa, K., Castellino, F. J. & Schorey, J. S. Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo. *Blood* **110**, 3234–3244 (2007).
217. Rebecca D Wiley, S. G. Immature dendritic cell-derived exosomes can mediate HIV-1 trans infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 738 (2006).
218. Lee, H. M. *et al.* A membranous form of ICAM-1 on exosomes efficiently blocks leukocyte adhesion to activated endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **397**, 251–256 (2010).
219. Lopez, J. A., Brennan, A. J., Whisstock, J. C., Voskoboinik, I. & Trapani, J. A. Protecting a serial killer: pathways for perforin trafficking and self-defence ensure sequential target cell death. *Trends in Immunology* **33**, 406–412 (2012).
220. Ewen, C. L., Kane, K. P. & Bleackley, R. C. A quarter century of granzymes. *Cell Death Differ* **19**, 28–35 (2011).
221. Kashii, Y., Giorda, R., Herberman, R. B., Whiteside, T. L. & Vujanovic, N. L. Constitutive expression and role of the TNF family ligands in apoptotic killing of tumor cells by human NK cells. *J. Immunol.* **163**, 5358–5366 (1999).
222. Falschlehner, C., Schaefer, U. & Walczak, H. Following TRAIL's path in the immune system. *Immunology* **127**, 145–154 (2009).
223. Hoeve, M. A., Nash, A. A., Jackson, D., Randall, R. E. & Dransfield, I. Influenza Virus A Infection of Human Monocyte and Macrophage Subpopulations Reveals Increased Susceptibility Associated with Cell Differentiation. *PLoS ONE* **7**, e29443 (2012).
224. Suk, K. Interferon gamma (IFN $\gamma$ ) and Tumor Necrosis Factor alpha Synergism in ME-180 Cervical Cancer Cell Apoptosis and Necrosis. IFN $\gamma$  inhibits cytoprotective NF-kappa B through STAT1/IRF-1 pathways. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 13153–13159 (2001).
225. Tormo, D. *et al.* Rapid growth of invasive metastatic melanoma in carcinogen-treated hepatocyte growth factor/scatter factor-transgenic mice carrying an oncogenic CDK4 mutation. *Am. J. Pathol.* **169**, 665–672 (2006).
226. Leung, W. *et al.* Phenotype and function of human natural killer cells purified by using a clinical-scale immunomagnetic method. *Cancer Immunology, Immunotherapy* **54**, 389–394 (2004).
227. Raffaghello, L. *et al.* Mechanisms of immune evasion of human neuroblastoma. *Cancer Letters* **228**, 155–161 (2005).

- 
228. Farag, S. S. & Caligiuri, M. A. Human natural killer cell development and biology. *Blood Reviews* **20**, 123–137 (2006).
229. Kim, S., Iizuka, K., Aguila, H. L., Weissman, I. L. & Yokoyama, W. M. In vivo natural killer cell activities revealed by natural killer cell-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 2731–2736 (2000).
230. Takeda, K. Critical Role for Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand in Immune Surveillance Against Tumor Development. *Journal of Experimental Medicine* **195**, 161–169 (2002).
231. Vivier, E., Ugolini, S., Blaise, D., Chabannon, C. & Brossay, L. Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nat Rev Immunol* **12**, 239–252 (2012).
232. London, L., Perussia, B. & Trinchieri, G. Induction of proliferation in vitro of resting human natural killer cells: IL 2 induces into cell cycle most peripheral blood NK cells, but only a minor subset of low density T cells. *J. Immunol.* **137**, 3845–3854 (1986).
233. Ruggeri, L. Effectiveness of Donor Natural Killer Cell Alloreactivity in Mismatched Hematopoietic Transplants. *Science* **295**, 2097–2100 (2002).
234. Kanzler, H., Barrat, F. J., Hessel, E. M. & Coffman, R. L. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nat. Med.* **13**, 552–559 (2007).
235. Lasek, W., Mackiewicz, A. & Czajka, A. Antitumor effects of the combination therapy with TNF alpha gene±modified tumor cells and interleukin 12 in a melanoma model in mice. 1–10 (2011).
236. Krieg, A. M. Development of TLR9 agonists for cancer therapy. *J. Clin. Invest.* **117**, 1184 (2007).
237. Sivori, S. CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: Induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 10116–10121 (2004).
238. Chengwen Liu *et al.* Plasmacytoid dendritic cells induce NK cell-dependent, tumor antigen-specific T cell cross-priming and tumor regression in mice. *The Journal of Clinical Investigation* **118**, 1165 (2008).
239. Wennerberg, E. *et al.* Doxorubicin sensitizes human tumor cells to NK cell- and T-cell-mediated killing by augmented TRAIL receptor signaling. *Int. J. Cancer* **133**, 1643–1652 (2013).
240. Sarhan, D. *et al.* Activated monocytes augment TRAIL-mediated cytotoxicity by human NK cells through release of IFN- $\gamma$ . *Eur. J. Immunol.* **43**, 249–257 (2013).
241. Hallett, W. H. D. *et al.* Sensitization of tumor cells to NK cell-mediated killing by proteasome inhibition. *J. Immunol.* **180**, 163–170 (2008).
242. Johnsen, A. C. *et al.* Regulation of APO-2 ligand/trail expression in NK cells-involvement in NK cell-mediated cytotoxicity. *Cytokine* **11**, 664–672 (1999).
243. Sato, K. *et al.* Antiviral response by natural killer cells through TRAIL gene induction by IFN-alpha/beta. *Eur. J. Immunol.* **31**, 3138–3146 (2001).
244. Bourquin, C. *et al.* Immunostimulatory RNA Oligonucleotides Induce an Effective Antitumoral NK Cell Response through the TLR7. *The Journal of Immunology* **183**, 6078–6086 (2009).
245. Fiers, W. Tumor necrosis factor Characterization at the molecular, cellular and in vivo level. *FEBS Letters* **285**, 199–212 (1991).

- 
246. Beyaert, R. & Fiers, W. Molecular mechanisms of tumor necrosis factor-induced cytotoxicity. *FEBS Letters* **340**, 9–16 (1994).
247. Ivanov, V. N. Down-regulation of Tumor Necrosis Factor alpha Expression by Activating Transcription Factor 2 Increases UVC-induced Apoptosis of Late-stage Melanoma Cells. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 14079–14089 (1999).
248. Sugarman, B. *et al.* Recombinant Human Tumor Necrosis Factor-alpha: Effects on Proliferation of Normal and Transformed Cells in Vitro. *Science* **22**, 943–945
249. Ohmori, Y. & Hamilton, T. A. The Interferon-Stimulated Response Element and a kappaB Site Mediate Synergistic Induction of Murine IP-10 Gene Transcription by IFN gamma and TNF-alpha. *J. Immunol.* **154**, 5235–5244 (1995).
250. Johnson, D. R. & Pober, J. S. HLA class I heavy-chain gene promoter elements mediating synergy between tumor necrosis factor and interferons. *Molecular and Cellular Biology* **14**, 1322–1332 (1994).
251. Collins, T. *et al.* Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J.* **9**, 899–909 (1995).
252. Ruggiero, V., Tavernier, J., Fiers, W. & Baglioni, C. Induction of the synthesis of tumor necrosis factor by Interferon-gamma. *Journal of Immunology* **136**, (1986).
253. Tsujimoto, M., Feinman, R. & Vilcek, J. Differential effects of type I IFN and IFN gamma on the binding of tumor necrosis factor to receptors in two human cell lines. *Journal of Immunology* **137**, 2272–2276 (1986).
254. Aggarwal, B. B. & Eessalu, T. E. Induction of receptors for tumor necrosis factor-alpha by interferons is not a major mechanism for their synergistic cytotoxic response. *Journal of Biological Chemistry* **262**, 10000–10007 (1987).
255. Braumüller, H. *et al.* T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature* (2013). doi:10.1038/nature11824
256. Mehnert, J. M. & Kluger, H. M. Driver Mutations in Melanoma: Lessons Learned From Bench-to-Bedside Studies. *Curr Oncol Rep* **14**, 449–457 (2012).
257. Chivet, M. *et al.* Exosomes as a novel way of interneuronal communication. *Biochem. Soc. Trans.* **41**, 241–244 (2013).
258. van Niel, G. *et al.* Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. *Gastroenterology* **121**, 337–349 (2001).
259. Lehmann, B. D. *et al.* Senescence-Associated Exosome Release from Human Prostate Cancer Cells. *Cancer Research* **68**, 7864–7871 (2008).
260. King, H. W., Michael, M. Z. & Gleadle, J. M. Hypoxic enhancement of exosome release by breast cancer cells. *BMC Cancer* **12**, 421 (2012).
261. Fader, C. M., Savina, A., Sánchez, D. & Colombo, M. I. Exosome secretion and red cell maturation: Exploring molecular components involved in the docking and fusion of multivesicular bodies in K562 cells. *Blood Cells Mol. Dis.* **35**, 153–157 (2005).
262. Koga, K. *et al.* Purification, characterization and biological significance of tumor-derived exosomes. *Anticancer Res.* **25**, 3703–3707 (2005).
263. Elsner, L. *et al.* The Heat Shock Protein HSP70 Promotes Mouse NK Cell Activity against Tumors That Express Inducible NKG2D Ligands. *jimmunol.org*
264. Lv, L. H. *et al.* Anticancer Drugs Cause Release of Exosomes with Heat Shock Proteins from Human Hepatocellular Carcinoma Cells That Elicit Effective Natural Killer Cell Antitumor Responses in Vitro. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 15874–15885 (2012).

- 
265. Arnon, T. I., Markel, G. & Mandelboim, O. Tumor and viral recognition by natural killer cells receptors. *Seminars in Cancer Biology* **16**, 348–358 (2006).
266. Delahaye, N. F. *et al.* Alternatively spliced NKp30 isoforms affect the prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Nat. Med.* **17**, 700–707 (2011).
267. Golden-Mason, L., Cox, A. L., Randall, J. A., Cheng, L. & Rosen, H. R. Increased natural killer cell cytotoxicity and NKp30 expression protects against hepatitis C virus infection in high-risk individuals and inhibits replication in vitro. *Hepatology* **52**, 1581–1589 (2010).
268. Koch, J., Steinle, A., Watzl, C. & Mandelboim, O. Activating natural cytotoxicity receptors of natural killer cells in cancer and infection. *Trends in Immunology* (2013). doi:10.1016/j.it.2013.01.003
269. Dreux, M. *et al.* Short-Range Exosomal Transfer of Viral RNA from Infected Cells to Plasmacytoid Dendritic Cells Triggers Innate Immunity. *Cell Host & Microbe* **12**, 558–570 (2012).
270. Pramod K Giri, J. S. S. Exosomes Derived from M. Bovis BCG Infected Macrophages Activate Antigen-Specific CD4+ and CD8+ T Cells In Vitro and In Vivo. *PLoS ONE* **3**, (2008).
271. Harrison, M. S., Sakaguchi, T. & Schmitt, A. P. Paramyxovirus assembly and budding: Building particles that transmit infections. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **42**, 1416–1429 (2010).
272. Rossman, J. S. & Lamb, R. A. Influenza virus assembly and budding. *Virology* **411**, 229–236 (2011).
273. Jones, D. M. & McLauchlan, J. Hepatitis C Virus: Assembly and Release of Virus Particles. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 22733–22739 (2010).
274. Gould, S. J. The Trojan exosome hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 10592–10597 (2003).
275. Ramakrishnaiah, V. *et al.* Exosome-mediated transmission of hepatitis C virus between human hepatoma Huh7.5 cells.
276. Khatua, A. K., Taylor, H. E., Hildreth, J. E. K. & Popik, W. Exosomes packaging APOBEC3G confer human immunodeficiency virus resistance to recipient cells. *Journal of Virology* **83**, 512–521 (2009).
277. Kesimer, M. *et al.* Characterization of exosome-like vesicles released from human tracheobronchial ciliated epithelium: a possible role in innate defense. *FASEB J.* **23**, 1858–1868 (2009).
278. Rajsbaum, R. *et al.* Species-Specific Inhibition of RIG-I Ubiquitination and IFN Induction by the Influenza A Virus NS1 Protein. *PLoS Pathog* **8**, e1003059 (2012).
279. Richardson, M. M., Jennings, L. K. & Zhang, X. A. Tetraspanins and tumor progression. *Clin. Exp. Metastasis* **28**, 261–270 (2011).
280. Rana, S. & Zöller, M. Exosome target cell selection and the importance of exosomal tetraspanins: a hypothesis. *Biochem. Soc. Trans.* **39**, 559–562 (2011).
281. Hollyoake, M. NKp30 (NCR3) is a Pseudogene in 12 Inbred and Wild Mouse Strains, but an Expressed Gene in *Mus caroli*. *Molecular Biology and Evolution* **22**, 1661–1672 (2005).
282. Grover, A. & Izzo, A. A. BAT3 Regulates Mycobacterium tuberculosis Protein ESAT-6-Mediated Apoptosis of Macrophages. *PLoS ONE* **7**, e40836 (2012).
283. Xiang, X. *et al.* Induction of myeloid-derived suppressor cells by tumor exosomes. *Int. J. Cancer* **124**, 2621–2633 (2008).
284. Peinado, H., Lavotshkin, S. & Lyden, D. The secreted factors responsible for pre-

- 
- metastatic niche formation: Old sayings and new thoughts. *Seminars in Cancer Biology* **21**, 139–146 (2011).
285. Huber, V. *et al.* Human colorectal cancer cells induce T-cell death through release of proapoptotic microvesicles: role in immune escape. *Gastroenterology* **128**, 1796–1804 (2005).
286. Takakura, Y., Nishikawa, M., Yamashita, F. & Hashida, M. Development of gene drug delivery systems based on pharmacokinetic studies. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **13**, 71–76 (2001).
287. Soutschek, J. *et al.* Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nat Cell Biol* **432**, 173–178 (2004).
288. Kawabata, K., Takakura, Y. & Hashida, M. The fate of plasmid DNA after intravenous injection in mice: involvement of scavenger receptors in its hepatic uptake. *Pharm Res* **12**, 825–830 (1995).
289. Hartman, Z. C., Appledorn, D. M. & Amalfitano, A. Adenovirus vector induced innate immune responses: Impact upon efficacy and toxicity in gene therapy and vaccine applications. *Virus Research* **132**, 1–14 (2008).
290. Deng, Y. *et al.* Repeated injection of PEGylated solid lipid nanoparticles induces accelerated blood clearance in mice and beagles. *IJN* 2891 (2012). doi:10.2147/IJN.S30943
291. Sakurai, H., Kawabata, K., Sakurai, F., Nakagawa, S. & Mizuguchi, H. Innate immune response induced by gene delivery vectors. *International Journal of Pharmaceutics* **354**, 9–15 (2008).

## 8 Abbildungs-/Tabellenverzeichnis

### 8.1 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 2-1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER PROTEINZUSAMMENSETZUNG EINES EXOSOMES. ....	6
ABBILDUNG 2-2: BIOGENESE VON EXOSOMEN.....	8
ABBILDUNG 2-3: DIE FAMILIE DER RIG-I LIKE REZEPTOREN. ....	17
ABBILDUNG 2-4: ÜBERSICHT DES RIG-I SIGNALWEGES. ....	19
ABBILDUNG 2-5: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER INTERAKTION EINER NK-ZELLE MIT EINER ZIELZELLE. ....	22
ABBILDUNG 2-6: DIE REGULATION DER NK-ZELLAKTIVIERUNG DURCH AKTIVIERENDE UND INHIBIERENDE SIGNALS. ....	25
ABBILDUNG 5-1: MIT 3PRNA AKTIVIERTE TUMORZELLEN SEKRETIEREN FAKTOREN ZUR NK-ZELL-AKTIVIERUNG. ....	56
ABBILDUNG 5-2: CHARAKTERISIERUNG VON 3PRNA INDUZIERTEN MELANOMEXOSOMEN.....	58
ABBILDUNG 5-3: AUFNAHME VON 3PRNA INDUZIERTEN MELANOMEXOSOMEN DURCH IMMUN- UND MELANOMZELLEN.....	61
ABBILDUNG 5-4: AKTIVIERENDE NK-LIGANDEN AUF 3PRNA MELANOMEXOSOMEN. ....	63
ABBILDUNG 5-5: NK-EFFEKTE DURCH 3PRNA INDUZIERTE MELANOMEXOSOMEN SIND ABHÄNGIG VON NKP30 UND BAG6. ....	65
ABBILDUNG 5-6: MELANOMEXOSOMEN ENTHALTEN 3PRNA NACH AKTIVIERUNG VON RIG-I IN MELANOMZELLEN.....	67
ABBILDUNG 5-7: 3PRNA MELANOMEXOSOMEN TRAGEN RIG-I PROTEIN.. ....	69
ABBILDUNG 5-8: EXOSOMALE RNA AUS 3PRNA INDUZIERTEN MELANOMEXOSOMEN AKTIVIERT NK-ZELLEN. ....	70
ABBILDUNG 5-9: DER MECHANISMUS DER 3PRNA VERMITTELTE NK-AKTIVIERUNG.. ....	72
ABBILDUNG 5-10: EXOSOMEN AUS 3PRNA BEHANDELTE MELANOMZELLEN ZEIGEN EINEN DIREKTEN EFFEKT AUF MELANOMZELLEN.....	74
ABBILDUNG 5-11: 3PRNA INDUZIERTE MELANOMEXOSOMEN INDUZIEREN TH1- ZYTOKINEN UND CHEMOKINEN. ....	76
ABBILDUNG 5-12: 3PRNA INDUZIERT ZYTOKINE INDUZIEREN DEN ZELLTOD VON MELANOMZELLEN.....	77
ABBILDUNG 5-13: IFN $\gamma$ IST ESSENTIELL IM TH1-VERMITTELTE ZELLTOD VON MELANOMZELLEN. ....	79
ABBILDUNG 5-14: CHARAKTERISIERUNG MURINER 3PRNA-INDUZIERTE MELANOMEXOSOMEN.....	81
ABBILDUNG 5-15: 3PRNA MELANOMEXOSOMEN AKTIVIEREN NK-ZELLEN <i>IN VIVO</i> .....	82

---

ABBILDUNG 5-16: 3PRNA BELADENE MELANOMEXOSOMEN INHIBIEREN DAS WACHSTUM VON MELANOMEN <i>IN VIVO</i> . .....	84
ABBILDUNG 5-17: 3PRNA BELADENE MELANOMEXOSOMEN INHIBIEREN DAS TUMORWACHSTUM <i>IN VIVO</i> ABHÄNGIG VON NK-ZELLEN.....	85
ABBILDUNG 5-18: 3PRNA MELANOMEXOSOMEN INDUZIEREN CXCL10 IM TUMORGEWEBE. ....	86

## 8.2 Tabellenverzeichnis

TABELLE 2-1: VERGLEICHENDE DARSTELLUNG VON MEMBRANVESIKELN. ....	5
TABELLE 2-2: DIE ANWENDUNG VON EXOSOMEN IN KLINISCHEN PHASE I STUDIEN ZUR BEHANDLUNG VON TUMOREN.....	12
TABELLE 2-3: TEX VERWENDENDE <i>IN VITRO</i> UND <i>IN VIVO</i> STUDIEN. ....	13
TABELLE 4-1: STANDARD PCR-MIX UND LAUFPROTOKOLL FÜR DIE QPCR.....	40
TABELLE 4-2: PRIMER UND SONDEN DER DURCHFÜHRTEN QPCRS.....	41

## 9 Abkürzungsverzeichnis

3pRNA	Triphosphat-Ribonukleinsäure
AGO	<i>argonaute</i>
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APC	<i>antigen presenting cell</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BAG6	<i>HLA-B associated transcript 3</i>
BE	Blockierungsexperiment
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CARD	<i>caspase recruitment domain</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFSE	<i>Carboxyfluorescein succinimidyl ester</i>
CMV	Zytomegalie-Virus
ctrl-	Kontroll-
CXCL10	C-X-C Motiv Chemokin 10
DC	Dendritische Zelle
DiO	3,3'-Diocadecyloxacarbocyanin-Perchlorat
DISC	<i>death-inducing signaling complex</i>
DMEM	<i>dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Epstein-Barr-Virus
ELISA	<i>enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EMCV	Encephalomyocarditis Virus
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESCRT	<i>endosomal sorting complex required for transport</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FADD	<i>Fas-associating death domain-containing protein</i>
Fas	<i>TNF receptor superfamily, member 6</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
HCV	Hepatitis-C-Virus

HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
Hrs	<i>hepatocyte growth factor regulated tyrosine kinase</i>
HSP	<i>heat-shock protein</i>
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IPS-1	oder auch MAVS = <i>mitochondrial antiviral signaling protein</i>
IRF	<i>interferon regulatory transcription factor</i>
ISG	<i>Interferon Stimulated Gene</i>
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
kd	<i>knock down</i>
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LFA-1	<i>integrin, beta 2</i>
LGP2	<i>laboratory of genetics and physiology-2</i>
MACS	<i>magnetic associated cell sorting</i>
MDA5	<i>melanoma differentiation-associated protein 5</i>
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute
miRNA	Mikro Ribonukleinsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MTOC	<i>microtubule organizing center</i>
MVB	<i>multi vesicular body</i>
NCR	<i>natural cytotoxicity receptor</i>
NCR	<i>natural cytotoxicity receptor</i>
NEC	Necrostatin-1
NF $\kappa$ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NK	Natürliche Killerzellen
NKG2D	<i>killer cell lectin-like receptor subfamily K, member 1</i>
NLR	<i>nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors</i>
NOD	<i>nucleotide-binding oligomerization domain</i>
OAS	2'-5' Oligoadenylat Synthetase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
pDC	plasmazytoide dendritische Zellen
PFA	Paraformaldehyd
PKR	Protein-Kinase R
pNPP	p-Nitrophenyl-Phosphat
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
qPCR	<i>quantitative real-time polymerase-chain reaction</i>
RD	<i>repressor domain</i>
RIG-I	<i>retinoic acid inducible gene I</i>
RIP	<i>receptor-interacting protein</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RLR	<i>retinoic acid inducible gene like receptors</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institut Medium</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor</i>
TBK	<i>TANK-binding kinase</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
TRADD	<i>TNFR1-associated death domain protein</i>
TRAF	<i>TNF receptor associated factor</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>
WB	Western Blot
wt	wildtyp
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter

---

## 10 Danksagung

Schon Johann Wolfgang von Goethe wusste: „Leider lässt sich eine wahrhafte Dankbarkeit mit Worten nicht ausdrücken“. Trotzdem möchte ich versuchen, allen Menschen, die mich auf dem Promotionsweg begleitet haben, einen Dank auszusprechen.

Allen voran danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Gunther Hartmann. In seinem Labor zu arbeiten ist eine Ehre. Ich bin dankbar dafür, dass ich thematisch neue Wege in seinem Labor beschreiten durfte - auch wenn er anfangs selber nicht daran glaubte. Ich erinnere mich an seine Worte, die in etwa so klangen: „Beeindruckende Daten. Jetzt muss ich wohl an Exosomen glauben“. Er hat mir damit neben der wissenschaftlichen Entwicklung auch in vielfältiger Weise den Freiraum zur Entwicklung meiner Persönlichkeit gelassen.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Prof. Michael Hoch, der die Begutachtung meiner Arbeit übernommen hat. Kennen gelernt habe ich ihn zu meinem Auswahlgespräch des Studiengangs Molekulare Biomedizin –während der Doktorarbeit sind wir im Rahmen des SFB832 immer wieder aufeinander getroffen und jetzt das Gutachten meiner Doktorarbeit. Vielen Dank, dass Sie mich jetzt auch noch beim letzten Schritt begleiten.

Anfangs der Doktorarbeit ist man noch nicht so selbstständig wie am Ende – und in der Zeit dazwischen wäre man ohne seinen Post-Doc aufgeschmissen. Hier gilt der Dank Dr. med. Christoph Coch, der mich während der ganzen Doktorarbeitsjahre eng begleitet hat. Fixe Ideen wurden entworfen, verworfen, neue geschmiedet und letztendlich ist dieses Werk dabei rausgekommen. Danke für das Erlangen des wissenschaftlichen Freischwimmers (Sorry Chrissy, dass ich dieses Wort aus deiner Danksagung benutzen musste, aber es trifft es genau).

Jetzt bleiben noch meine Kollegen, die mich in allen Gefühlslagen reichend von glücklich, strahlend, wütend und traurig gesehen haben. Sie waren immer ein Teil der Versuche, ohne sie hätte man den Galgenhumor verloren, um experimentelle Fehlschläge wegzustecken. Namentlich möchte ich hier Christine Schuberth, Bastian Putschli, Jasper van den Boorn, Christian Lück und Heike Prange nennen. Aber der Dank geht natürlich auch an alle anderen der AG Coch, AG Schlee, AG van den Boorn und AG Barchet, die jetzt hier keinen Platz gefunden haben.

Ein Dank geht auch an Prof. Elke Pogge von Strandmann und Dr. Katrin Reiners von der Uniklinik Köln. Die Zusammenarbeit mit euch ist/war einfach super. Ich hoffe, die Exosomen werden uns gemeinsam noch länger begleiten.

Jetzt bleiben noch meine Lieben, die mir in allen Situationen beigestanden haben, egal ob sie verstanden haben, warum die Arbeit mich glücklich oder traurig gestimmt hat. Liebe Mama, lieber Papa: auch wenn man es viel zu selten sagt: ihr seid die besten und tollsten Eltern die man haben kann. Ihr habt mir uneingeschränkten Rückhalt, Unterstützung und Liebe gegeben, die wertvollsten Dinge, die man einem Menschen gegenüber zeigen kann. Lieber Dennis: deine Kraft, dein Verständnis und deine Anwesenheit haben mich immer wieder aufs Neue ermutigt weiterhin an mich zu glauben. Dafür danke ich euch von ganzen Herzen.

## **11 Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Juliane Daßler, an Eides statt, dass ich diese Dissertation selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Ich erkläre, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in einer anderen Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

---

Bonn, Februar 2014