

Untersuchung zur Rolle extrazellulärer Vesikel bei der metastatischen Kolonisierung des malignen Melanoms



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER
NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.) DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND
VORKLINISCHE MEDIZIN DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von

Severin Gütter

aus

Wasserburg am Inn

im Jahr 2022

Untersuchung zur Rolle extrazellulärer Vesikel bei der metastatischen Kolonisierung des malignen Melanoms



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER
NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.) DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND
VORKLINISCHE MEDIZIN DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von

Severin Gütter

aus

Wasserburg am Inn

im Jahr 2022

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:

08.06.2022

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. Christoph Klein

Unterschrift:

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VII
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	X
Zusammenfassung.....	XI
1. Einleitung	12
1.1. Prozesse während der metastatischen Kolonisierung	12
1.2. <i>Disseminated Cancer Cells</i> (DCC) aus SLNs von Melanompatienten.....	13
1.3. Veränderungen der Immunmikroumgebung des SLN bei Melanompatienten	14
1.4. Abwehr von Melanomzellen durch CD8-T-Zellen	15
1.5. Immuncheckpoint Therapie	17
1.6. Extrazelluläre Vesikel.....	18
2. Materialien.....	21
2.1. Reagenzien, Chemikalien, Enzyme und Kits	21
2.2. Medien, Puffer und Lösungen	23
2.2.1. Western Blot.....	23
2.2.2. Zellkultur und Immunzellassays	23
2.2.3. Durchflusszytometrie und FACS	24
2.2.4. TEM.....	24
2.2.5. miRNA Sequenzierung.....	24
2.2.6. Massenspektrometrie	24
2.3. Antikörper	25
2.4. Oligonukleotide und Plasmide	27
2.5. Primäre Zellen	27
2.6. Humane Zelllinien.....	27
2.7. Verbrauchsmaterialien.....	27
2.8. Geräte.....	29
2.9. Datenbanken und Software	30
3. Methoden.....	31
3.1. Zellkultur.....	31
3.1.1. Auftauen von kryokonservierten Zellen	31
3.1.2. Zellzahlbestimmung	31
3.1.3. Passagieren adhärenter Zellen	31
3.1.4. Einfrieren von Zellen	31
3.2. Immunzell-Assays	32

3.2.1.	Aufreinigung von CD8-T-Zellen aus humanen PBMCs.....	32
3.2.2.	CFSE Färbung von CD8-T-Zellen.....	32
3.2.3.	CD8-T-Zell-Assay	32
3.2.4.	CD3/CD28-coating	33
3.2.5.	Restimulation von Immunzellen.....	33
3.2.6.	Vorbereitung humaner Lymphknoten für die Durchflusszytometrie.....	33
3.3.	Antikörperfärbung für Durchflusszytometrie und FACS	34
3.3.1.	<i>Viability Dye</i> Färbung.....	34
3.3.2.	Oberflächenfärbung	34
3.3.3.	Intrazellulärfärbung.....	34
3.3.4.	Kompensationskontrollen	35
3.4.	Isolation extrazellulärer Vesikel durch differentielle Ultrazentrifugation (dUZ).....	35
3.4.1.	Herstellung des konditionierten Mediums.....	35
3.4.2.	Differentielle Ultrazentrifugation.....	35
3.5.	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) von EVs	36
3.5.1.	Negativfärbung.....	36
3.5.2.	Gefrierätzung.....	37
3.6.	Zeta View	37
3.6.1.	Einstellen der Verdünnungen.....	37
3.6.2.	CD81 Färbung von MelDCC10a 100K-Pellets	37
3.6.3.	Zeta View Messung	37
3.7.	Größenausschlusschromatographie (SEC)	38
3.7.1.	Kalibrierung der Säule	38
3.7.2.	Isolation von Vesikel- und Protein-Fraktion aus 100K-Pellets.....	38
3.8.	CRIPSR/Cas9	39
3.8.1.	Optimierung der Elektroporation von MelDCC10a	39
3.8.2.	CD155 und CD276 Knock-out in MelDCC10a Zellen.....	39
3.9.	Western Blot.....	41
3.9.1.	Herstellung von Zell-Lysaten	41
3.9.2.	SDS-Gelelektrophorese	42
3.9.3.	Blotten der Proteine auf eine PVDF Membran	42
3.9.4.	Antikörperfärbung.....	42
3.9.5.	Blot „entwickeln“	42
3.9.6.	<i>Stain Free Gel</i>	43
3.10.	Massenspektrometrische Untersuchung der 100K-Pellets.....	43
3.11.	Testen der EV-Aufnahme durch Makrophagen.....	43

3.11.1.	CFSE Färbung von Vesikeln.....	43
3.11.2.	Ernte der Makrophagen	43
3.11.3.	Färbung auf HOTS	44
3.12.	Sequenzierung von miRNAs aus EVs	44
3.12.1.	Proteinase und RNase Verdau	44
3.12.2.	RNA Isolation mit TRIzol LS aus EVs und Zelllinien.....	45
3.12.3.	miRNA Sequenzierung.....	45
3.13.	Statistische Auswertungen	46
4.	Ergebnisse	47
4.1.	Vorarbeiten der Arbeitsgruppe	47
4.2.	Identifizierung von Kolonisierungs-assoziierten Veränderungen in der Immunmikroumgebung.....	48
4.3.	Isolierung und Charakterisierung Extrazellulärer Vesikel von MelDCC10a.....	50
4.3.1.	Detektion von EV-spezifischen Proteinen durch Western Blot.....	50
4.3.2.	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) von Negativfärbung und Gefrierätzung von EV-Präparationen	51
4.3.3.	F-NTA Messung der 100K-Pellets	52
4.4.	CD8-T-Zell inhibitorische Wirkung des 100K-Pellets	53
4.5.	Immunsuppressiver Effekt der EVs von vier MelDCC-Zelllinien.....	55
4.6.	Einfluss der Produktionsbedingungen und des Verhältnis von Vesikeln zu CD8-T-Zellen auf die Wirksamkeit der EV-Präparationen im CD8-T-Zell-Assay.....	56
4.6.1.	EV-Produktion mit und ohne FBS	56
4.6.2.	EV-Produktionsdauer: 24 versus 48 Stunden.....	57
4.6.3.	Verhältnis von Vesikeln zu CD8-T-Zellen	58
4.7.	Auftrennung des 100K-Pellets in Vesikel- und Protein-Fraktion durch SEC.....	59
4.7.1.	Kalibrierung der SEC-Säule	59
4.7.2.	Qualitätskontrolle der SEC-Fractionen.....	59
4.7.3.	Effekt der SEC-Fractionen auf CD8-T-Zellen.....	60
4.8.	Analyse von Checkpoint-Liganden auf MelDCC-EVs	61
4.8.1.	Expression von PD-L1 auf MelDCC-EVs und DCC.....	61
4.8.2.	Expression der Immuncheckpoint-Liganden CD39, CD73, CD155, CD200 und CD276 auf MelDCC-EVs	62
4.8.3.	Analyse der Expression von <i>CD155</i> und <i>CD276</i> in scRNAseq Daten von DCC.....	63
4.8.4.	Assoziation von <i>CD155</i> und <i>CD276</i> mit EVs	63
4.9.	CRISPR/Cas9 vermittelter Knock-out von <i>CD155</i> und <i>CD276</i> in MelDCC10a.....	64
4.9.1.	Optimierung der Elektroporationsbedingungen	64
4.9.2.	Herstellung von <i>CD155</i> und <i>CD276</i> Einzel- und Doppel-Knock-out-Zellen	64

4.9.3.	Qualitätskontrolle der Knock-out-EVs	67
4.10.	CD155 und CD276 Knock-out EVs im CD8-T-Zell-Assay	68
4.11.	Überprüfung der Erkenntnisse aus den <i>in vitro</i> Versuchen in Patientenproben	69
4.11.1.	Expressionsmuster der Rezeptoren von CD155 und CD276 auf CD8-T-Zellen.....	69
4.11.2.	Expression von CD226 und TIGIT auf CD8-T-Zellen während der metastatischen Kolonisierung.....	69
4.12.	Untersuchung Extrazellulärer Vesikel auf miRNAs.....	73
4.12.1.	Aufnahme von EVs durch Makrophagen.....	73
4.12.2.	Etablierung eines Protokolls zur Degradierung extravesikulärer, kontaminierender miRNAs	74
4.12.3.	Sequenzierung von miRNAs aus vier MelDCC-Linien und -EVs	77
5.	Diskussion	80
5.1.	Die Anzahl von DCC im SLN ist mit lokaler CD8-T-Zell <i>exhaustion</i> assoziiert	80
5.2.	Isolation einer homogenen Population kleiner EVs von MelDCC10a	80
5.3.	Die Marker-unabhängige Isolation kleiner EVs durch dUZ ist vorteilhaft.....	81
5.4.	MelDCC-EVs wirken immunsuppressiv auf CD8-T-Zellen.....	82
5.5.	Nachweis von Immuncheckpoint-Liganden auf MelDCC-EVs	84
5.5.1.	Der immunsuppressive Effekt wird nicht durch PD-L1 vermittelt.....	84
5.5.2.	CD276 und CD155 sind am immunsuppressiven Effekt beteiligt.....	85
5.6.	Nachweis von miRNAs in MelDCC-EVs	89
5.6.1.	Makrophagen inkorporieren MelDCC-EVs	89
5.6.2.	Nicht-EV-assoziierte miRNAs können entfernt werden	89
5.6.3.	Spezifische EV-miRNAs können Makrophagen beeinflussen	90
5.7.	Die Expression von CD155 Rezeptoren von CD8-T-Zellen aus SLN von Melanompatienten verändert sich mit steigendem DCCD	91
5.8.	Implikationen für Therapeutische Strategien	93
Literaturverzeichnis.....		96
Danksagung		108

Abkürzungsverzeichnis

APC	<i>Antigen Presenting Cell</i>
cDCC	<i>colonizing DCC</i>
DCC	<i>Disseminated cancer cell</i>
DCCD	<i>DCC density</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dUZ	differentielle Ultrazentrifugation
ECD	extrazelluläre Domänen
EVs	extrazelluläre Vesikel
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FBS	Fötales Rinderserum
gRNA	<i>guide RNA</i>
HOT	Haftobjektträger
ICL	Immunchekpoint-Liganden
IEVs	große EVs
kcps	<i>Kilocounts</i> pro Sekunde
Mb	Megabase
MelDCC	Melanom-DCC-Zelllinienmodell
MHC-I	MHC-Klasse-I-Komplex
MHC-II	MHC-Klasse-II-Komplex
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nt	Nukleotide
MWCO	<i>Molecular weight cut of</i>
NTA	<i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>
PBMCs	Periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
pDCC	<i>pre-colonizing DCC</i>
PDX	<i>Patient-Derived Xenograft</i>
PK	Proteinase K
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoproteine
RPM	<i>reads per million</i>
SEC	Größenausschlusschromatographie
SEC-P	Protein-Fraktion
SEV-V	Vesikel-Fraktion
sEVs	kleine EVs
scRNAseq	Einzelzell-RNA Sequenzierung
SLN	Wächterlymphknoten
STM	<i>singlepass</i> Transmembranproteinen
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TILs	tumorinfiltrierende Lymphozyten
Tregs	regulatorische T-Zellen
UT	unbehandelt
WB	Western Blot

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Immuncheckpoint-Signalwege.....	17
Abbildung 2: Verschiedenen Subtypen von Extrazellulären Vesikeln.....	18
Abbildung 3: Mögliche Komponenten eines Extrazellulären Vesikels.	20
Abbildung 4: Hochregulation des <i>EV-Pathways</i> und der IFN γ -Antwort während der metastatischen Kolonisierung von Lymphknoten.	47
Abbildung 5: Analyse der PD-1 und TIM-3 Expression auf CD8-T-Zellen aus Lymphknoten von Melanompatienten in Abhängigkeit des DCCD.	49
Abbildung 6: Vesikel Marker Western Blot und Gesamtproteinfärbung.....	50
Abbildung 7: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Negativfärbung des 2K-Pellets.	51
Abbildung 8: Elektronenmikroskopische Aufnahmen einer Negativfärbung des 100K-Pellets.....	51
Abbildung 9: Elektronenmikroskopische Aufnahmen einer Gefrierätzung des 100K-Pellets.....	52
Abbildung 10: F-NTA Messung CD81 gefärbter 100K-Pellets.....	52
Abbildung 11: CFSE Proliferations-Assay von EV-behandelten CD8-T-Zellen.	53
Abbildung 12: Einfluss von EVs auf die Anteile von naiven und Antigen-erfahrenen CD8-T-Zellen.	54
Abbildung 13: Intrazelluläre Färbung von CD8-T-Zellen für die Effektor-Moleküle IFN γ und GRZB nach EV-Behandlung.....	55
Abbildung 14: Test der EVs von 4 MelDCC-Zelllinien im CD8-T-Zell-Assay.	55
Abbildung 15: Volcano Plot der massenspektrometrischen Untersuchung von EVs produziert mit und ohne FBS.	56
Abbildung 16: Test von EVs produziert mit und ohne FBS im CD8-T-Zell-Assay.....	57
Abbildung 17: Test von EVs mit 24- und 48-stündiger Produktionsdauer im CD8-T-Zell-Assay.	58
Abbildung 18: Test von EVs produziert von 10^6 und 5×10^6 Zellen im CD8-T-Zell-Assay.	58
Abbildung 19: Zetasizer Echtzeit-Messung der Auftrennung des 100K-Pellets durch SEC.	59
Abbildung 20: Gesamtproteinfärbung und Western Blot der durch SEC gewonnenen Vesikel- und Protein-Fraktion im Vergleich zum 100K-Pellet.....	60
Abbildung 21: Test der durch SEC gewonnenen Vesikel- und Protein-Fraktion im CD8-T-Zell-Assay im Vergleich zum Input (100K).	60
Abbildung 22: PD-L1 Expression auf MelDCC-Zelllinien und 100K-Pellets getestet mit Western Blot und Durchflusszytometrie.	61
Abbildung 23: UMAP Plot der Expression von PD-L1 in DCC von Melanompatienten.	61
Abbildung 24: Immuncheckpoint-Liganden Western Blot mit Lysaten und 100K-Pellets von 4 MelDCC-Zelllinien.	62
Abbildung 25: UMAP Plot der Expression von CD155 und CD276 in DCC von Melanompatienten.	63
Abbildung 26: Western Blot Analyse der SEC-Fractionen und des Inputs (100K) für die Checkpoint-Liganden CD155 und CD276.....	63
Abbildung 27: Messungen der Transfektionseffizienz und des Überlebens in der Probe mit den besten Elektroporationsbedingungen.	64
Abbildung 28: Bindestellen der gRNAs für den Knock-out von CD155 und CD276 im Genom von MelDCC10a.	65

Abbildung 29: Expression von CD155 und CD276 auf MelDCC10a.	65
Abbildung 30: Auswahl-Strategie beim Sort der CD155, CD276 und CD155/CD276 Knock-out-Zelllinien.	66
Abbildung 31: Kontrolle der Expression von CD155 und CD276 auf den Knock-out-Zelllinien nach EV-Produktion.	66
Abbildung 32: Western Blot Analyse der Lysate und 100K-Pellets der Knock-out-Zelllinien für CD155 und CD276.	67
Abbildung 33: Test der Knock-out-EVs im CD8-T-Zell-Assay.	68
Abbildung 34: Expressionsmuster der von CD226, TIGIT, CD96 und IL20R α auf humanen CD8-T-Zellen.	69
Abbildung 35: Expression von CD226 und TIGIT auf CD8-T-Zellen aus einem Lymphknoten mit DCCD 250.000.	70
Abbildung 36: Analyse der Korrelation des MFI von CD226 und TIGIT auf CD8-T-Zellen aus Lymphknoten von Melanompatienten mit unterschiedlichem DCCD.	71
Abbildung 37: Analyse der Korrelation der Expression von TNF auf CD8-T-Zellen aus Lymphknoten von Melanompatienten mit unterschiedlichem DCCD.	72
Abbildung 38: Mikroskop-Aufnahmen und durchflusszytometrische Messung von EV-behandelten humanen Monozyten.	73
Abbildung 39: Analyse der Qualität der miRNA-Sequenzierbibliotheken nach verschiedenen Vorbehandlungen der EVs.	74
Abbildung 40: Biotypisierung der <i>reads</i>	75
Abbildung 41: Verteilung der reads ohne und mit PK + RNase Behandlung der 100K-Pellets.	76
Abbildung 42: <i>Log2fold change</i> der RPM der miRNAs mit mehr als 1.000 RPM nach PK + RNase Behandlung verglichen mit UT.	76
Abbildung 43: Qualitätsanalyse der miRNA-Sequenzierbibliotheken anhand der zugeordneten <i>reads</i>	77
Abbildung 44: Ergebnisse der Analyse der Daten der miRNA Sequenzierung von MelDCC2, 10a und 11.	78

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Reagenzien, Chemikalien, Enzyme und Kits.....	21
Tabelle 2: Verwendete Antikörper	25
Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotide und Plasmide	27
Tabelle 4: Verwendete humane Zelllinien.....	27
Tabelle 5: Verwendete Verbrauchsmaterialien	27
Tabelle 6: Verwendete Geräte	29
Tabelle 7: Verwendete Datenbanken und Softwares	30
Tabelle 8: Übersicht der zu verwendenden Volumina und Zellzahlen.....	32
Tabelle 9: FACS Färbungen	35
Tabelle 10: Herstellung gRNA.....	40
Tabelle 11: Verdünnung des Cas9 Enzyms	40
Tabelle 12: Finale Verdünnung <i>Electroporation Enhancer</i>	40
Tabelle 13: Finaler Elektroporationsansatz	41
Tabelle 14: Überblick der Analyse der miRNA-Sequenzierbibliotheken	75

Zusammenfassung

Mehr als 90 Prozent der Krebspatienten sterben an Metastasen, wobei die zugrundeliegenden Mechanismen der Metastasierung bisher nicht vollständig verstanden sind. Wächterlymphknoten (SLN), welche aufgrund ihrer prognostischen Relevanz im Rahmen der klinischen Diagnostik von Melanompatienten entnommen werden, sind ein leicht zugängliches Gewebe um diese Mechanismen zu studieren, da hier die verschiedenen Stadien der metastatischen Kaskade von einzelnen *disseminated cancer cells* (DCC) bis hin zu Metastasen gefunden werden können und weil im SLN als sekundäres hämatopoetisches Organ auch die Wechselwirkung mit Immunzellen analysiert werden kann. Im Rahmen von Vorarbeiten der Arbeitsgruppe hatte ein scRNAseq-basierter Transkriptomvergleich von SLN-DCC vor und während der Kolonisierung ergeben, dass der extrazelluläre Vesikel (*EV*)-*Pathway* in den DCC im Zuge der metastatischen Kolonisierung hochreguliert wird. Auch wies eine IFN γ -Signatur in den DCC und die erhöhte Frequenz von s.g. *exhausted* PD-1⁺ TIM3⁺ CD8-T-Zellen bei steigendem Tumorzellbefall des SLN auf einen vorangegangenen Kontakt mit CD8-T-Zellen hin. Diese Beobachtungen führten zu der Hypothese, dass DCC über die Hochregulation des *EV-Pathways* die Funktionalität der CD8-T-Zellen beeinträchtigen und den Prozess der metastatischen Kolonisierung vorantreiben. Diese Hypothese wurde adressiert, indem (i) der immunmodulatorische Effekt von EVs auf humane CD8-T-Zellen analysiert und daran beteiligte Immuncheckpoint-Liganden (ICL) identifiziert wurden und (ii) untersucht wurde, ob EVs mit miRNA Molekülen beladen sind, welche Funktion und Phänotyp von *Antigen Presenting Cells* (APCs) und damit auch T-Zellantworten modulieren könnten. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden EVs durch differentielle Ultrazentrifugation aus dem Zellkulturüberstand von vier Melanom-DCC-Zelllinienmodellen (MelDCCs) gewonnen, welche sich aus *Patient-Derived Xenografts* (PDX) ableiteten. Die Charakterisierung der MelDCC-EVs mittels Western Blot (WB), Transmissionselektronenmikroskopie und *Nanoparticle Tracking Analysis* belegte die erfolgreiche Isolierung einer homogenen Population von intakten, kleinen EVs definierter Größe. Eine Zugabe von EVs vor und nach polyklonaler Stimulation von humanen CD8-T-Zellen und anschließender multiparametrischer Durchflusszytometrie zeigte einen inhibitorischen Effekt der EVs, da diese die Proliferation und die Differenzierung von CD8-T-Zellen zu IFN γ - und GRZB-produzierenden Effektor-Zellen supprimierten. Mittels Größenausschlusschromatographie und Produktion der EVs in FBS-freiem Medium konnte ausgeschlossen werden, dass die suppressive Aktivität der EVs auf mitosolierte lösliche Proteine zurückzuführen war. Auch konnten durch WB-Analyse der MelDCCs und der davon abstammenden EVs, wie auch der Analyse der scRNAseq Daten von DCC aus SLN die ICL CD155 und CD276 als mögliche Vermittler dieser Effekte identifiziert werden. Die Relevanz von CD155 und CD276 für den immunsuppressiven Effekt der EVs konnte durch CRISPR/Cas9 Knock-out der Moleküle belegt werden. Hinweise für die Bedeutsamkeit der CD155/TIGIT/CD226-Achse lieferte die multiparametrische durchflusszytometrische Analyse von Lymphknoten aus Melanompatienten, welche zeigte, dass mit ansteigendem Tumorzellbefall des SLN der inhibitorische (TIGIT) über den stimulatorischen (CD226) CD155-Rezeptor auf den CD8-T-Zellen dominierte, was sich auch in der verminderten Fähigkeit der CD8-T-Zellen das Effektor-Zytokin TNF zu exprimieren, widerspiegelte. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Behandlung von Melanompatienten im frühen Stadium mit anti-CD155 oder anti-CD276 Antikörpern in Kombination mit anti-PD-1/PD-L1 Antikörpern möglicherweise erfolgsversprechend wäre, um einer Supprimierung von tumorreaktiven CD8-T-Zellen entgegenzuwirken und so die metastatische Kolonisierung des SLN und damit ein Fortschreiten der Krankheit zu stoppen. Darüber hinaus könnten die DCC über ihre EVs auch die Funktion von APCs, wie Makrophagen, beeinflussen, da MelDCC-Linien übergreifend eine Anreicherung von miRNAs mit potenziellem Einfluss auf die Makrophagen-Funktion, wie z.B. miR-21, miR-146a und miR-320, in den EVs nachgewiesen werden konnte. Zukünftige Untersuchungen werden zeigen, ob die Beeinflussung von APCs durch DCC-EVs einen weiteren Mechanismus darstellt, mit dem DCC ihre Immunmikroumgebung modulieren und ihr Auswachsen zur Metastase vorantreiben können.

1. Einleitung

1.1. Prozesse während der metastatischen Kolonisierung

Trotz der zahlreichen neuen Behandlungsmethoden bei Krebserkrankungen, starben, laut Statistischem Bundesamt, 2019 231.000 Menschen in Deutschland an Krebs. Dabei ist nicht der Primärtumor, sondern, in über 90 % der Fälle, die Metastasierung die Todesursache der Krebserkrankung (Lambert et al. 2017). Die aktuelle Auswahl der adjuvanten Chemo- oder Immuntherapien, die sich gegen Metastasen richten, erfolgt hauptsächlich anhand der (molekularen) Charakteristika des Primärtumors (Klein 2020). Dieser Ansatz wird aufgrund der langjährig vorherrschenden Meinung, dass sich der Primärtumor und die abgewanderten Krebszellen (DCC von engl. *Disseminated Cancer Cells*) genetisch sehr ähneln, gewählt. Jedoch wurde z.B. für das Mamma-, Ösophaguskarzinom und das Melanom gezeigt, dass Tumorzellen bereits zu einem frühen Zeitpunkt vom Primärtumor abwandern und genetische Aberrationen außerhalb des Primärtumors erwerben. Diese Veränderungen sind für die metastatische Kolonisierung, d.h. das Auswachsen einzelner gestreuter disseminierter Zellen, wichtig (Schmidt-Kittler et al. 2003; Schardt et al. 2005; Hüsemann et al. 2008; Stoecklein et al. 2008; Hosseini et al. 2016; Harper et al. 2016; Werner-Klein et al. 2018). Für das maligne Melanom wurde zum Beispiel beobachtet, dass die DCC genetische Aberrationen im Wächterlymphknoten (SLN von engl. *sentinal lymph node*) erwerben können (Werner-Klein et al. 2018). In einem Brustkrebs-Mausmodell wurde nachgewiesen, dass, noch bevor Primärtumore detektierbar waren, eine Sub-Population von frühen DCC, die invasiv war und sich zu den Zielorganen ausbreiten konnte, vorhanden war (Harper et al. 2016). Ebenfalls wurde in einem Brustkrebs-Mausmodell beobachtet, dass 80 % der Metastasen von früh abgewanderten Krebszellen stammten. Die Relevanz dieser Ergebnisse konnte auch anhand der karyotypischen und phänotypischen Analyse humaner DCC und Primärtumore bestätigt werden (Hosseini et al. 2016).

Das Auswachsen von gestreuten Krebszellen zu Metastasen ist an sich ein ineffizienter Prozess. Dies wurde z.B. bei der Injektion von Melanomzellen in die Pfortader von Mäusen deutlich, da nur rund 0,02 % der Zellen Makrometastasen bildeten (Luzzi et al. 1998). Es gibt auch Schätzungen die davon ausgehen, dass weniger als 0,01 % der Tumorzellen, die in den systemischen Kreislauf gelangen, schließlich makroskopische Metastasen bilden (Chambers et al. 2002). Diese Beobachtungen führten zu der Schlussfolgerung, dass die metastatische Kolonisierung oft der dominante geschwindigkeitsbestimmende Schritt für das Fortschreiten der Krankheit ist (Valastyan und Weinberg 2011). Es wird vermutet, dass die Ineffizienz dieses Prozesses darin begründet ist, dass jedes fremde Organ für die Krebszellen eine potenziell tödliche Umgebung darstellt (Massagué und Obenauf 2016). In dieser neuen Mikroumgebung sind gerade ankommende Krebszellen besonders anfällig für die Überwachung durch das Immunsystem (engl. *immune surveillance*) (Eyles et al. 2010). Die Immunabwehr gegen die Krebszellen wird unter anderem von zytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs oder CD8-T-Zellen) und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) ausgeübt. So wurde beispielsweise in Brustkrebs- und Prostatakrebs-Mausmodellen nachgewiesen, dass die Depletion von CD8-T-Zellen und NK-Zellen die Metastasierung begünstigt (Bidwell et al. 2012; Smyth et al. 1999). Dennoch können einige DCC in dieser für sie eigentlich lebensfeindlichen Umgebung überleben, bevor sie wieder erwachen und Metastasen bilden (Aguirre-Ghiso 2007; Lim und Ghajar 2022). Ergebnisse aus experimentellen Modellen unterstützen die Hypothese der s.g. zellulären *dormancy*. Aber auch in Krebspatienten sind lange Phasen der Latenzzeiten zwischen Diagnose und Therapie des Primärtumors und dem Auftreten von Metastasen bekannt, der s.g. *clinical dormancy*: Die Analyse von 62.923 Frauen mit Hormonrezeptor positivem Brustkrebs, die fünf Jahre nach Therapie krebsfrei waren, zeigte, dass 5-20 Jahre nach Therapie bei 10 – 41 % der Patientinnen Metastasen auftraten (Pan et al. 2017). In einer anderen Studie, die das Auftreten von Metastasen in Melanompatienten untersuchte, nachdem sie 10

Jahre als krebsfrei galten, wurde festgestellt, dass 6,8 % und 11,3 % der Patienten nach 15 bzw. 20 Jahren Metastasen aufwiesen (Faries et al. 2013).

Die möglichen Mechanismen, die der zellulären und klinischen *dormancy* zugrunde liegen, sind derzeit Gegenstand intensiver Forschung. Dabei konnten in experimentellen Modellen verschiedene Faktoren identifiziert werden, die dabei eine Rolle spielen könnten. Faktoren, die *dormancy* auslösen oder das Überdauern der Zellen über längere Zeit ermöglichen, wurden in einem Pankreaskrebs Mausmodell identifiziert. Hier löste ER-Stress die Niederregulation von MHC-I aus, was dazu führte, dass die Krebszellen der *immune surveillance* durch CD8-T-Zellen entgehen konnten (Pommier et al. 2018). Faktoren, die das „Erwachen“ der Zellen begünstigen können, wurden in einem Brustkrebs *dormancy* Mausmodell beschrieben. Die systemische Entzündungsreaktion nach einer Operation begünstigte das Auswachsen von Tumoren, die sonst durch die T-Zell spezifische Immunantwort beschränkt war (Krall et al. 2018). Diese Beobachtungen in Mausmodellen unterstützen die Theorie der *dormancy*, jedoch konnte beim Menschen nie direkt beobachtet werden, dass Metastasen aus ruhenden DCC entstehen (Lim und Ghajar 2022). Ein Grund hierfür ist sicherlich, dass sich die Erforschung von gestreuten Krebszellen in der frühen klinischen Phase, d.h. vor dem Auswachsen zu Metastasen, in Patienten schwierig gestaltet, da es zum einen geeignetes Biopsie-Material voraussetzt und zum anderen sensitive Technologien zur Detektion von gestreuten Krebszellen.

1.2. *Disseminated Cancer Cells* (DCC) aus SLNs von Melanompatienten

Eine Möglichkeit DCC in frühen Stadien der Erkrankung zu untersuchen, bietet sich bei schwarzem Hautkrebs (malignes Melanom). Bei Patienten mit einem Primärtumor der eine Dicke von mehr als 1 mm aufweist oder ulzerierend ist, werden routinemäßig die SLNs entfernt und auf Krebsbefall untersucht. Dies bietet die Möglichkeit DCC in verschiedenen Stadien der metastatischen Kolonisierung, angefangen von einzelnen DCC bei ihrer Ankunft im Lymphknoten, bis hin zu Makrometastasen, zu untersuchen (Ulmer et al. 2014). Um DCC zu detektieren, isolieren und molekular zu untersuchen, wird am Lehrstuhl für Experimentelle Medizin und Therapieverfahren der Universität Regensburg eine Hälfte des für die Routine-Histopathologie entnommenen Lymphknotens mechanisch zerkleinert und so eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die Einzelzellsuspension kann verwendet werden um (i) die DCC zu quantifizieren und sie für *single cell omics* zu isolieren und (ii) die Immunzellen im SLN durchflusszytometrisch zu untersuchen. Dies erlaubt es nicht nur die molekularen Veränderungen der DCC während der metastatischen Kolonisierung zu untersuchen, sondern auch möglich, durch den Tumorzellbefall induzierte Veränderungen in der Immunmikroumgebung.

Zur Detektion der Melanomzellen werden zwei Marker verwendet. Zum einen der intrazelluläre Marker Glykoprotein 100 (GP100), der auch in der Diagnostik zum Einsatz kommt, und zum anderen der Zelloberflächenmarker MCSP (von engl. *melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan*) (Weinstein et al. 2014). Durch Färbung mit Antikörpern gegen das melanomzell-spezifische Antigen GP100, können die Melanomzellen detektiert und zur weiteren Untersuchung als Einzelzellen mit dem Mikromanipulator isoliert werden. Diese Methode hat den Vorteil, dass sie eine genaue Quantifizierung des Tumorzellbefalls des Lymphknotens erlaubt. Der DCCD (DCC *density*) gibt hierbei die Anzahl der DCC pro 10^6 Lymphknotenzellen an und es konnte gezeigt werden, dass (i) der DCCD des SLN mit dem Überleben der Patienten korreliert, (ii) schon bei einem sehr geringen DCCD ($0 < \text{DCCD} \leq 3$) das Überleben der Patienten signifikant reduziert ist und (iii) der DCCD des SLN die herkömmliche Histopathologie in Bezug auf die Vorhersage des Behandlungserfolgs übertrifft (Ulmer et al. 2014; Ulmer et al. 2018). Der Vergleich des DCCD anhand der Einzelzellsuspension einer Hälfte des Lymphknotens mit der Morphologie der histopathologisch untersuchten anderen Hälfte des Lymphknotens und die Transplantation von DCC in immundefiziente Mäuse ergab, dass ein DCCD von größer bzw. kleiner als 100 zur Differenzierung von Lymphknoten mit bzw. ohne erste metastatische Kolonien geeignet ist (Werner-Klein et al. 2018). In Lymphknoten mit einem $\text{DCCD} < 100$ sind

hauptsächlich *pre-colonizing* DCCD (pDCC) und in Lymphknoten mit einem DCCD>100 *colonizing* DCC (cDCC) zu finden.

Eine Limitation der GP100-Färbung ist, dass das Antigen intrazellulär lokalisiert ist und die Zellen daher während der Färbung permeabilisiert werden müssen. Somit ist nach der Zellisolation nur eine Analyse der DNA, z.B. auf das Vorhandensein von Driver Mutationen oder *Copy Number Variations* (CNVs), möglich. Im Gegensatz dazu erlaubt es die Färbung mit dem Oberflächenmarker MCSP intakte, lebende Zellen zu isolieren. Die so isolierten Zellen können für Einzelzell-RNA Sequenzierung (scRNAseq) und die Generierung von *Patient-Derived Xenograft*-Modellen (PDX) und daraus abgeleiteten Zelllinien-Modellen verwendet werden. Die RNA einer einzelnen Zelle kann durch *Whole Transcriptome Amplifikation* (WTA) vervielfältigt und durch *Next Generation Sequencing* (NGS) sequenziert werden (Hartmann und Klein 2006; Werner-Klein et al. 2020). Anschließend kann das Transkriptom von DCC aus unterschiedlichen Stadien der metastatischen Kolonisierung untersucht und verglichen werden. Dadurch können Signalwege oder regulatorische Netzwerke aufgedeckt werden, die bei der Kolonisierung des Lymphknotens eine Rolle spielen könnten. Da mit Einzelzellen keine funktionellen Untersuchungen möglich sind, können aus cDCC Zelllinien-Modelle generiert werden, z.B. durch Injektion von cDCC in immundefiziente Mäuse und Generierung von *Patient-Derived Xenografts* (Quintana et al. 2008). Die PDX-Generierung aus pDCC war jedoch bislang nicht möglich (Werner-Klein et al. 2018), so dass für diese Zellgruppe immortalisierte Melanozyten ggf. mit weiteren genetischen Modifikationen das derzeit beste Modell darstellen. In Zusammenarbeit mit dem Fraunhofer-Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin Regensburg konnten aus den PDX der cDCC, Melanom-DCC-Zelllinienmodelle (MelDCC) aus 13 Melanopatienten generiert werden, die nun verwendet werden können, um mögliche Mechanismen, die durch die molekulare Charakterisierung von pDCC/cDCC identifiziert wurden und das Auswachsen der DCC steuern könnten, mechanistisch zu untersuchen.

Mit den beschriebenen Methoden zur Analyse der DCC auf Genom- und Transkriptom-Ebene, sowie der mechanistischen Analyse der MelDCC-Linien können die spezifischen Veränderungen in den DCC während der metastatischen Kolonisierung untersucht werden. Darüber hinaus bieten die im Rahmen der Aufarbeitung mitanfallenden Immunzellen die Möglichkeit auch die Interaktionen zwischen den DCC und der Immunmikroumgebung zu untersuchen.

1.3. Veränderungen der Immunmikroumgebung des SLN bei Melanopatienten

Wie eingehend erwähnt, ist jedes entfernte Organ, so auch der SLN, für die Krebszellen eine potenziell tödliche Umgebung (Massagué und Obenauf 2016). Besonders gerade ankommende Krebszellen sind in dieser neuen Mikroumgebung anfällig für die *immune surveillance* (Eyles et al. 2010). Um zu verstehen wie die DCC im SLN überleben können und die Prozesse der metastatischen Kolonisierung des SLN *in vivo* rekapitulieren zu können, ist es unabdingbar die DCC in Anhängigkeit von ihrer Immunumgebung zu betrachten (Li et al. 2022). Mehrere Studien befassten sich bereits mit dem Vorkommen und der Funktion von Immunzellen bei der Besiedlung von Lymphknoten durch Melanomzellen. So wurde beim Vergleich positiver und negativer SLNs gefunden, dass die Frequenz von regulatorischen T-Zellen (Tregs) erhöht und die von Dendritischen Zellen in positiven SLNs geringer war (Speeckaert et al. 2012; Ma et al. 2012). Auch konnte gezeigt werden, dass das erhöhte Auftreten von FoxP3 (Treg Marker) positiven Zellen in metastasierten Lymphknoten negativ mit dem Überleben korrelierte (Mohos et al. 2013). In einer weiteren Studie wurde beobachtet, dass das rezidiv-freie Überleben und das Gesamtüberleben von Melanopatienten positiv mit dem Aufkommen von CD4 und CD8 positiven tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs) in SLN Metastasen korrelierte (Kakavand et al. 2015). Neuste Erkenntnisse haben gezeigt, dass in positiven SLNs von Melanopatienten im Stadium III im Vergleich zu negativen SLNs von Melanopatienten im Stadium I/II mehr *Effektor Memory* T-Zellen, mehr $\gamma\delta$ T-Zellen und eine erhöhte TCR-Klonalität zu finden waren. Dies deutete auf

eine mögliche Aktivierung einer Antitumor-Immunantwort hin. Es wurde aber auch eine ausgeprägte Immuntoleranz in den positiven SLN festgestellt, welche durch das verminderte Auftreten von NK-Zellen und eine erhöhte Konzentration von CD8⁺ CD57⁺ PD-1⁺ Zellen, die bekanntermaßen eine geringe Fähigkeit zur Abtötung von Melanomzellen aufweisen, gekennzeichnet war. Außerdem wurde ein reduziertes Verhältnis von CD8⁺ CD69⁺ T-Zellen zu Tregs und eine hohe PD-1 Expression auf CD4- und CD8-T-Zellen in positiven verglichen mit negativen SLNs gefunden (Yaddanapudi et al. 2022).

Diese Studien haben die Veränderungen der Immunumgebung in SLN anhand des Vorkommens von Tumorzellen bzw. des Krankheitsstadiums untersucht und verglichen. Die Interpretation dieser Ergebnisse blieb jedoch schwierig, da die individuelle Tumorzelllast der untersuchten Lymphknoten nicht berücksichtigt wurde, d.h. es bleibt unklar, ob die beobachteten Mechanismen bereits früh, bei geringer Tumorzelllast, greifen oder spät und inwiefern systemische Effekte eine Rolle spielen. Um die Mechanismen der metastatischen Kolonisierung der SLNs bei Melanopatienten zu entschlüsseln, müssen funktionelle und molekulare Analysen von Immunzellen und DCCs mit einer genauen quantitativen Bewertung der Tumorzelllast kombiniert werden. Diese Anforderungen erfüllt die Untersuchung und Charakterisierung der Immunzellen des SLN in Kombination mit der molekularen und funktionellen Charakterisierung der DCC, in Abhängigkeit der im vorherigen Kapitel beschriebenen immunzytologischen Quantifizierung der Tumorzelllast (Bestimmung des DCCD).

1.4. Abwehr von Melanomzellen durch CD8-T-Zellen

Das Vorkommen von somatischen Mutationen innerhalb und zwischen verschiedenen Krebsarten ist hoch variabel und reicht von 0,001 Mutation pro Megabase (Mb) bis zu über 400 Mutationen pro Mb. Bestimmte Krebsarten die im Kindesalter auftreten weisen die wenigsten Mutationen auf, während Krebsarten, die mit der chronischen Exposition zu Mutagenen zusammenhängen, wie Lungenkrebs (Tabakrauch, ~10 Mutationen/Mb) und malignes Melanom (ultraviolette Strahlung, >10 Mutationen/Mb), durchschnittlich die höchste Prävalenz aufweisen (Alexandrov et al. 2013). Liegt die Mutation im kodierenden Bereich eines Gens, kann dies zur Produktion eines Proteins mit veränderter Aminosäuresequenz führen. Wenn ein Peptidfragment eines fehlerhaften Proteins, präsentiert auf dem MHC-Klasse-I-Komplex (MHC-I) der Zelle, eine Immunreaktion auslöst, bezeichnet man es als Neoantigen (Jiang et al. 2019). CD8-T-Zellen sind die Komponente des adaptiven Immunsystems, welche potenziell direkt über den T-Zellrezeptor an den, mit dem Neoantigen beladenen, MHC-I Komplex binden und dadurch, nach ihrer Aktivierung, die mutierten Zellen eliminieren können (Raskov et al. 2021). Bereits vor über 20 Jahren wurde beschrieben, dass die Infiltration von Lymphozyten in Primärtumoren von Stadium I und II Melanopatienten mit dem Gesamtüberleben korreliert (Clemente et al. 1996). In einem 4T1 Mausmodell (Brustkrebs) beschleunigte die Depletion von CD8-T-Zellen und NK-Zellen die Metastasierung und verkürzte das Überleben (Bidwell et al. 2012). Die Depletion von CD8-T-Zellen in einem B16-F10 Mausmodell (Melanom) vor der Behandlung mit ADV/IL-12 und anti-4-1BB, hob die positiven Effekte der Behandlung in Bezug auf das Tumolvolumen und die Anzahl der Lungenmetastasen auf (Xu et al. 2004). Bei der Analyse der molekularen Daten des *The Cancer Genome Atlas* von 7178 Patienten mit 21 Krebsarten wurde eine Korrelation der Gesamtmutationslast des Tumors und des geschätzten Vorkommens von CD8-T-Zellen in der Tumormikroumgebung mit der objektiven Ansprechrate auf eine anti-PD-1/PD-L1 Immuntherapie festgestellt (Lee und Ruppin 2019). Diese Studien unterstreichen die Wichtigkeit der CD8-T-Zellen bei der Tumorzellabwehr, besonders bei Krebsarten mit einer hohen Mutationslast.

Eine anti-tumorale Antwort der CD8-T-Zellen kann im Primärtumor, aber auch im Lymphknoten ausgelöst werden, wenn z.B. von den Tumorzellen sekretierte Neoantigene oder DCC in den SLN drainiert werden. Die Interaktion der DCC mit den CD8-T-Zellen im SLN kann dabei entweder direkt in der T-Zone im Parakortex stattfinden oder indirekt über *Antigen Presenting Cells* (APCs) in den Marksträngen vermittelt werden. Eine direkte Interaktion wird über die Bindung des mit Antigen

beladenen MHC-I an den spezifischen T-Zellrezeptor vermittelt. Eine indirekte Interaktion findet statt, wenn das Antigen zuerst von den APCs (z.B. Dendritische Zellen oder Makrophagen) phagozytiert und über den MHC-Klasse-II-Komplex (MHC-II) CD4-T-Zellen präsentiert wird, welche, durch Produktion von IL2, zur Aktivierung der CD8-T-Zellen beitragen. Die initiale Aktivierung der CD8-T-Zellen erfordert neben der Bindung des T-Zellrezeptors an MHC-I-Komplexe, die mit dem spezifischen Antigen beladen sind, zusätzlich noch die Bindung des kostimulatorischen Rezeptors CD28 an CD80 oder CD86, welche von APCs exprimiert werden. Für die Aufrechterhaltung des T-Zell Metabolismus in aktivierten T-Zellen sind weiterhin noch Zytokine wie z.B. IL-2 notwendig (Michalek und Rathmell 2010).

Die Aktivierung der CD8-T-Zellen führt zur Proliferation der Zellen und zu ihrer Differenzierung von naiven in Antigen-erfahrene (engl. *antigen experienced*) CD8-T-Zellen. Die Expression des Chemokinrezeptors CCR7, welcher eine Rekrutierung der T-Zellen in den Lymphknoten vermittelt, in Kombination mit dem Marker CD45RA für naive T-Zellen, erlaubt es naive ($CD45RA^+ CCR7^+$) und *Central Memory* ($CD45RA^- CCR7^+$) von Antigen-erfahrenen Effektor-Zellen ($CD45RA^{+/+} CCR7^-$) zu unterscheiden (Sallusto et al. 1999). Antigen-erfahrene CD8-T-Zellen schütten Interferon- γ (IFN γ) aus, was in den Krebszellen die Expression von MHC-I-Komplexen anregt (Rosa und Fellous 1988). Somit wird mehr Antigen auf den MHC-I-Komplexen präsentiert und die CD8-T-Zellen können mit ihrem T-Zellrezeptor noch effektiver an die Antigene binden. Ihren zytotoxischen Effekt vermitteln die CD8-T-Zellen über IFN γ und durch die sogenannte Degranulation, wobei Granula ausgeschüttet werden, die unter anderem Perforin und Granzym B (GRZB) enthalten. Perforin perforiert die Membran der Zielzelle und GRZB kann durch die entstandenen Poren in die Zelle eindringen, wo es durch die Aktivierung von Caspase-3 die Apoptose der Zielzelle auslöst.

Nachdem die CD8-T-Zellen ihre Aufgabe erfüllt haben, ist es notwendig ihre Aktivität zu bremsen, um eine Überreaktion des Immunsystems und Gewebsschäden zu verhindern. Dies wird von s.g. Immuncheckpoint-Molekülen übernommen, welche von CD8-T-Zellen in Folge einer Aktivierung exprimiert werden und zu denen unter anderem auch *Cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4* (CTLA4) und *Programmed Cell Death Protein 1* (PD-1) zählen. Die Aktivierung der CD8-T-Zellen führt zu einer erhöhten Expression von CTLA-4 auf der Oberfläche der Zellen. CTLA-4 konkurriert mit dem kostimulatorischen Rezeptor CD28 um die Bindung an CD80 und CD86 und vermittelt inhibitorische Signale um die T-Zellantwort zu beenden (McCoy und Le Gros 1999). In Reaktion auf eine andauernde Immunantwort der CD8-T-Zellen, wie z.B. bei Tumorerkrankungen, und der damit einhergehenden dauerhaften Ausschüttung von IFN- γ , regulieren Krebszellen *Programmed Death-Ligand 1* (PD-L1) hoch (Dong et al. 2002). Auf der Oberfläche der CD8-T-Zellen wiederum ist sein Rezeptor PD-1 exprimiert. Die Interaktion von PD-L1 und PD-1 führt zur Vermittlung inhibitorischer Signale an die CD8-T-Zelle (Freeman et al. 2000). Krebszellen nutzen diesen Mechanismus aus, indem sie nicht nur in Reaktion auf IFN- γ , sondern konstitutiv den Immuncheckpoint Liganden PD-L1 exprimieren und dadurch die CD8-T-Zellen über die Interaktion mit PD-1 inhibieren (Iwai et al. 2002). Die moderate Expression von PD-1 auf CD8-T-Zellen ist ein Marker für ihre Aktivierung (Agata et al. 1996). Eine andauernde Aktivität der CD8-T-Zellen, z.B. während einer chronischen Virusinfektion, führt jedoch zu ihrer Erschöpfung (eng. *exhaustion*) und einer erhöhten Expression von PD-1 und TIM-3. Dieser Erschöpfungszustand ist durch den Funktionsverlust der Fähigkeit, eine effektive Immunantwort über die Ausschüttung von Effektor-Molekülen zu vermitteln, gekennzeichnet (Day et al. 2006; Barber et al. 2006). Auf diese Weise können Krebszellen der *immune surveillance* durch CD8-T-Zellen entgehen, weitere Mutationen akkumulieren und durch ihre Proliferation die metastatische Kolonisierung initiieren. Um hier therapeutisch gegenzusteuern, wurden blockierende Antikörper gegen Immuncheckpoint-Rezeptoren und -liganden exploriert.

1.5. Immuncheckpoint Therapie

Der erste monoklonale Antikörper zur Behandlung von schwarzem Hautkrebs, welcher sich gegen CTLA-4 richtet (Ipilimumab), wurde 2011 unter dem Handelsnamen *Yervoy* in den USA und Europa zugelassen. 2015 folgte die Zulassung des PD-1-Immuncheckpoint-Inhibitors Nivolumab, ebenfalls zur Behandlung von Melanom bei Erwachsenen, auch in Kombination mit Ipilimumab. Die CheckMate 067 Studie zur Kombinationstherapie von bisher unbehandeltem, inoperablem oder metastasiertem Melanom im histologisch bestätigten Stadium III oder IV mit Ipilimumab und Nivolumab zeigte eine objektive Ansprechrates bei 58 % und eine vollständige Ansprechrates bei 22 % der Patienten (Larkin et al. 2019). Das progressionsfreie Überleben betrug nach 6,5 Jahren 34 % (Larkin et al. 2019; Wolchok et al. 2021). Die Erfolgsgeschichte der Immuncheckpoint-Inhibitoren wurde 2018 ,mit der Verleihung des Nobelpreises an Tasuku Honjo und James Allison für die Entdeckung von PD-1 und CTLA-4, gewürdigt.

Anfang des Jahres 2022 gab es sieben Immuncheckpoint-Inhibitoren, die zur Behandlung von verschiedenen Krebsarten, wie z.B. Melanom, Darmkrebs, Lungenkrebs, Bronchialkarzinom und Kopf-Hals-Tumoren, zugelassen waren und welche alle CTLA-4 (Ipilimumab), PD-1 (Cemiplimab, Nivolumab, Pembrolizumab) und PD-L1 (Atezolizumab, Avelumab, Durvalumab) als Ziel hatten (Marin-Acevedo et al. 2021). Die Zahlen der vollständigen Ansprechrates in der CheckMate 067 Studie zeigen aber auch, dass 78 % der Patienten nicht vollständig auf die Kombinationstherapie ansprachen und es zur Entwicklung von Resistenzen kam, die bei schätzungsweise 38 % der Patienten auftraten (Schoenfeld und Hellmann 2020). Aus diesen Gründen ist es wichtig sich nicht nur auf die Proteine CTLA-4 und PD-1 bzw. PD-L1 zu beschränken, sondern auch andere Immuncheckpoint-Moleküle als potenzielles Ziel einer Therapie zu betrachten. In Abbildung 1 sind eine Vielzahl von auf T-Zellen exprimierten Immuncheckpoint-Rezeptoren und ihren auf APCs und Tumorzellen exprimierten Liganden dargestellt. Momentan werden klinische Studien mit Molekülen durchgeführt, die zum Beispiel die Proteine LAG-3, TIGIT, TIM-3, B7-H3 (CD276), VISTA, ICOS und BTLA als Ziel haben. (Lee et al. 2021). Im März 2022 wurde der Checkpoint-Inhibitor Relatlimab (gerichtet gegen LAG-3) in Kombination mit Nivolumab zur Behandlung von zuvor unbehandeltem, metastasiertem oder inoperablem Melanom aus der klinischen Studie RELATIVITY-047 als erster Nicht-CTLA-4 oder -PD-1/PD-L1 Checkpoint-Inhibitor zugelassen (Tawbi et al. 2022). Die Entwicklung dieser neuen Therapien ist ein vielversprechender Schritt, um Krebserkrankungen in Zukunft noch besser behandeln zu können.

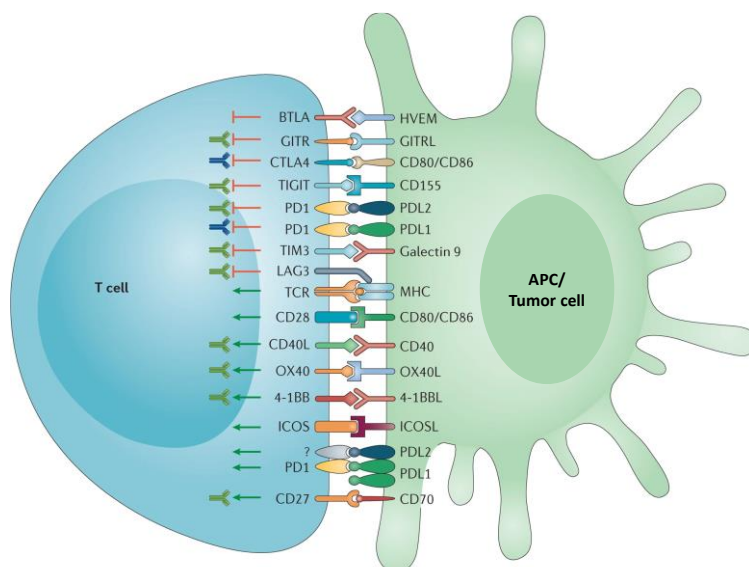


Abbildung 1: Immuncheckpoint-Signalwege. Abbildung modifiziert aus Wykes und Lewin 2018.

Immuncheckpoint-Liganden können jedoch nicht nur auf den Tumorzellen selbst, sondern auch auf Extrazellulären Vesikeln (EVs), die von den Tumorzellen produziert werden, vorkommen. In einer Studie von Chen et al. 2018 wurde beispielsweise gezeigt, dass nicht nur PD-L1 auf den Krebszellen, sondern auch PD-L1 auf Exosomen mit PD-1 auf CD8-T-Zellen interagieren und diese damit inhibieren konnte. Da Exosomen als wichtige Zell-zu-Zell-Kommunikatoren fungieren, könnte PD-L1 auf Exosomen ein unerforschtes therapeutisches Ziel darstellen, dass die Resistenz gegen aktuelle Immuncheckpoint-Inhibitoren überwinden könnte (Poggio et al. 2019).

1.6. Extrazelluläre Vesikel

Verschiedene Zelltypen tauschen *in vivo* EVs über kurze und lange Strecken aus. Sie dienen den Zellen zur Kommunikation zwischen den Zellen, aber auch um Moleküle, wie modifizierte RNAs und Amyloidproteine, aus den Zellen zu entfernen (Koppers-Lalic et al. 2014; Coleman und Hill 2015). Die verschiedenen EV-Subtypen, welche sich anhand ihrer Größe und Biogenese unterscheiden, sind in Abbildung 2 dargestellt. Zur Isolierung der unterschiedlichen EV-Subtypen werden jedoch meistens die Eigenschaften der Größe und Dichte, unabhängig von ihrer Biogenese, genutzt (Théry et al. 2018). Deshalb ist es wichtig zu betrachten, wie die Größe und Biogenese der EVs zusammenhängen und in welche Kategorien sie bisher eingeteilt wurden.

Exosomen sind kleine EVs (sEVs von engl. *small EVs*) mit einem Durchmesser von <150 nm. Sie werden im endosomalen Weg durch Fusion des internen *multivesicular bodies* (MVB) mit der Plasmamembran freigesetzt. EVs können aber auch, ähnlich wie Retroviren, direkt von der Plasmamembran in einer Größe von 200-500 nm knospen und werden als Mikrovesikel oder Ektosomen bezeichnet (Gan und Gould 2011). Weiterhin ist es auch möglich, dass kleinere Vesikel mit einer Größe von ca. 100 nm direkt von der Plasmamembran knospen, welche dann, aufgrund ihrer identischen Größe, zusammen mit Exosomen isoliert werden (Nabhan et al. 2012). Ein weiterer Subtyp, der von Krebszellen produziert werden kann und einen Durchmesser von 1-10 µm aufweist, wird als Onkosom bezeichnet (Di Vizio et al. 2012). Zusätzlich dissoziieren apoptotische Zellen in membran-gebundene *Apoptotic Bodies* von unterschiedlicher Größe, welche nur schwer von anderen Vesikeln zu unterscheiden sind, jedoch möglicherweise mehr genomische DNA enthalten (Maas et al. 2017). Wie schon erwähnt, werden EVs meist anhand ihrer Größe und Dichte isoliert. Aus diesem Grund wurden die Begriffe sEVs und lEVs (von engl. *large EVs*) vorgeschlagen, wenn die Zusammensetzung der EV Präparation bezogen auf ihre Biogenese nicht klar definiert ist (Tkach und Théry 2016).

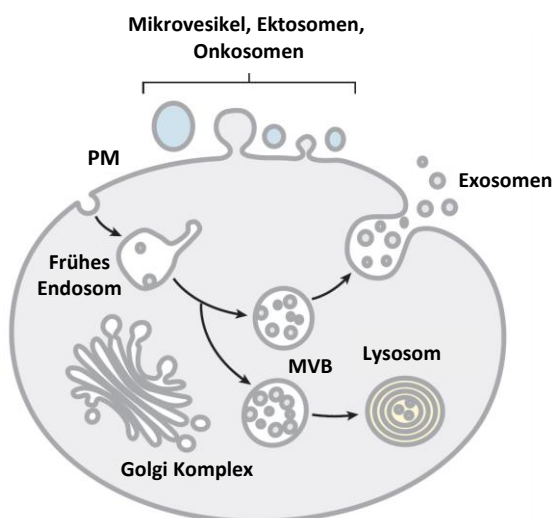


Abbildung 2: Verschiedenen Subtypen von Extrazellulären Vesikeln. PM = Plasmamembran, MVB = *multivesicular body*. Abbildung modifiziert aus Colombo et al. 2014.

EVs können aus konditioniertem Zellkulturmedium, Körperflüssigkeiten oder Geweben isoliert werden. Die am häufigsten verwendete Methode zur primären Aufkonzentration und Separation von EVs ist die differentielle Ultrazentrifugation (dUZ). Bei dieser Methode werden EVs schrittweise, mit steigenden Zentrifugationsgeschwindigkeiten, anhand ihrer Größe und Dichte pelletiert (Théry et al. 2006). Somit können mit einer mittleren Ausbeute und Spezifität alle von den Zellen sekretierten Partikel (EVs, Proteine und Lipide), die bis zur höchsten Zentrifugationsgeschwindigkeit pelletieren, gewonnen werden. Dies hat den Vorteil, dass bei der Untersuchung der EVs in den folgenden Experimenten kein Effekt durch vorherigen Ausschluss eines bestimmten EV-Subtypen übersehen wird. Dadurch ist es jedoch nicht möglich, z.B. den beobachteten Effekt in einem funktionellen Assay einem speziellen EV-Subtypen zuzuschreiben und auch nicht auszuschließen, dass der Effekt von mitisolierten Proteinen vermittelt wurde. Methoden, die eine höhere Spezifität bei geringerer Ausbeute liefern sind, z.B. die Filtration und anschließende Größenausschlusschromatographie (SEC von engl. *size-exclusion chromatography*) und die Dichtegradientenzentrifugation. Hierbei können EVs sehr genau definierter Größe bzw. Dichte isoliert werden. Eine weitere Methode, die eine sehr hohe Spezifität aufweist und die es erlaubt EVs anhand von Oberflächenmarkern zu isolieren, ist die Immunisolation mit Antikörper-gekoppelten magnetischen Beads. Ein Nachteil dieser Methoden kann sein, dass durch die hohe Spezifität der Isolationsmethode, physiologisch wirksame EVs, durch die vorher festgelegten, strikten Kriterien übersehen werden. Das andere Extrem ist die Isolation der EVs durch Präzipitations-Kits oder Polymere wie Polyethylenglykol, wobei die höchste Ausbeute mit der geringsten Spezifität erreicht wird. Dabei wird annähernd das komplette Sekretom aufkonzentriert unabhängig davon, ob es vesikulärer oder nicht vesikulärer Natur ist. Grundsätzlich muss aus den genannten Gründen die Art und Weise, auf welche die EVs isoliert werden, immer an die wissenschaftliche Fragestellung angepasst werden und ist auch davon abhängig, ob man einen speziellen Subtypen oder generell alle, von den Zellen sekretierten EVs untersuchen will. Deshalb wird häufig zuerst die differentielle Ultrazentrifugation angewandt, um einen generellen Effekt aufzudecken und anschließend folgt, um eine höhere Spezifität der EV oder EV-Subtyp Trennung zu erreichen, eine oder mehrere zusätzliche Techniken auf die primäre Aufreinigung, wie zum Beispiel: ein Waschschrift in EV-freiem Puffer, eine Ultrafiltration, ein Dichtegradient oder eine Chromatographie (Théry et al. 2018).

Die EV-Präparation muss, nachdem sie angefertigt wurde, quantifiziert und charakterisiert werden. Die am häufigsten verwendeten Methoden zur Quantifizierung sind die Bestimmung der absoluten Anzahl der isolierten Partikel durch *Nano Particle Tracking Analysis* (NTA) und die Bestimmung des Proteingehalts, z.B. durch einen BCA-Assay. Die NTA-Messung ist dabei die genauere Methode um spezifisch EVs zu quantifizieren, da Proteine in der EV-Präparation nicht ausschließlich EV-assoziiert sind, sondern auch als lösliche Proteine oder Proteinaggregate vorliegen können (Théry et al. 2018). Soll jedoch der von EVs verschiedener Zelllinien produzierte Effekt, z.B. in einem funktionellen Assay, verglichen werden, kann die Quantifizierung auch anhand der EV-produzierenden Zellen erfolgen. Hierbei wird berücksichtigt, dass die Zellen unterschiedlich viele EVs produzieren und dadurch der Effekt auf die Zielzellen unterschiedlich ausfällt. Würde durch NTA die absolute Anzahl der EVs bestimmt und gleich viele EVs jeder Zelllinie eingesetzt, würden diese Unterschiede nicht zum Tragen kommen. Auch bei der Quantifizierung der EV-Präparationen muss also die Methode der jeweiligen Fragestellung angepasst werden. Gemäß den Empfehlungen der *International Society for Extracellular Vesicles* (ISEV) sollte eine Charakterisierung durch Western Blot (EV Marker), Elektronenmikroskopie (Morphologie und Heterogenität der EV-Präparation) und *Nano Particle Tracking Analysis* (Größe der EVs) erfolgen (Théry et al. 2018). Nachdem die Zusammensetzung der EV-Präparation definiert wurde, kann eine Analyse der Bestandteile der EVs, die für die Forschungsfrage relevant sind, erfolgen.

In Abbildung 3 ist der Aufbau eines prototypischen EV dargestellt. Es besteht aus einer Lipid-doppelschicht, Proteinen und Nukleinsäuren. Proteine können im Lumen der EVs, aber auch

membrangebunden vorkommen. Eine Analyse des Proteoms von sEVs und IEVs zeigte, dass es Proteine gibt, die spezifisch für sEVs (z.B. CD81 und TSG101) und IEVs (z.B. GRP94, Mitofilin) sind, aber auch Proteine, die in beiden Subtypen (z.B. HSP70, MHC-I) vorkommen können (Kowal et al. 2016). Nukleinsäuren können in Form von RNA und DNA in Vesikeln vorliegen. Die Präsenz von mRNAs und miRNAs in Vesikeln ist bereits 2007 von Valadi et al. nachgewiesen worden. Fünf Jahre später wurden erstmals *small non-coding RNAs* in Vesikeln von Immunzellen beschrieben (Nolte-'t Hoen et al. 2012). Weitere zwei Jahre später wurde doppelsträngige DNA in EVs gefunden und als neuer Biomarker zur Krebserkennung vorgeschlagen (Kahlert et al. 2014; Thakur et al. 2014). Die Zusammensetzung der Lipide, welche die Membran der Vesikel bilden, unterscheidet sich von der Ausgangszelle und zeigt eine Anreicherung von Shingomyelin, Phosphatidylserin, Cholesterol und im allgemeinen gesättigter Fettsäuren (Laulagnier et al. 2004; Llorente et al. 2013; Trajkovic et al. 2008; Wubbolts et al. 2003).

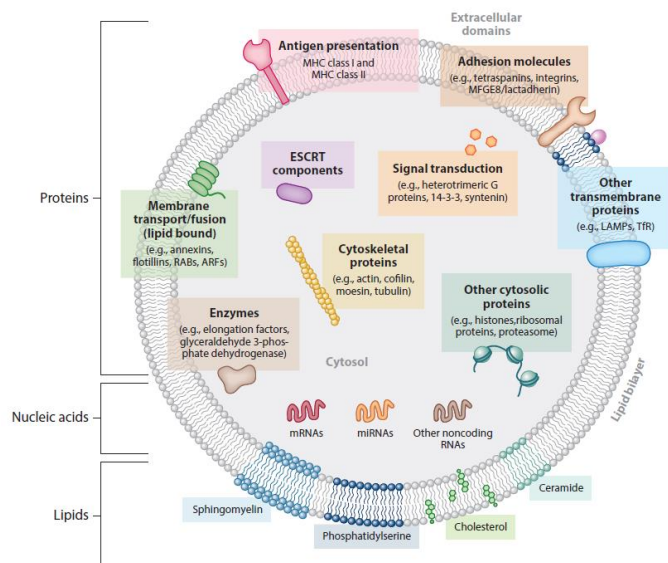


Abbildung 3: Mögliche Komponenten eines Extrazellulären Vesikels. Abbildung aus Colombo et al. 2014.

Die Zusammensetzung der EVs ist also durchaus komplex und spiegelt in Teilen die der Ausgangszelle wider. Somit ist es möglich, dass Krebszellen Signalmoleküle, verpackt in EVs und damit durch die Lipiddoppelschicht geschützt, in ihre nähere Umgebung oder zu entfernten Stellen über das lymphatische System oder den Blutstrom aussenden (Gao et al. 2021). Dass sEVs aus Krebszellen das Fortschreiten des Tumors und die Metastasierung über mehrere Wege fördern können, wurde bereits mehrfach beschrieben. Im murinen System wurde gezeigt, dass miRNA-21 aus EVs von Lungenkrebs-Zelllinien durch Bindung an Toll-like Rezeptor 8 in Makrophagen *in vivo* eine prometastatische Entzündungsreaktion auslöst, die letztlich zu Tumorwachstum und Metastasierung führen könnte (Fabbri et al. 2012). Ebenfalls wurde im murinen System beschrieben, dass EVs, produziert von Zellen des Primärtumors bei Bauchspeicheldrüsen Krebs, *in vivo* die Formierung der *pre-metastatic niche* in der Leber vorbereiteten (Costa-Silva et al. 2015). Auch eine Beteiligung von sEVs an der Tumor-Angiogenese bei Kopf-Hals-Tumoren wurde *in vivo* im murinen und *in vitro* im humanen System beschrieben (Sato et al. 2019).

Ob EVs auch in der frühen Phase der metastatischen Kolonisierung beim Melanom, d.h. beim Auswachsen von disseminierten Melanomzellen fernab vom Primärtumor, eine Rolle spielen, wurde noch nicht untersucht und ist Gegenstand dieser Arbeit.

2. Materialien

2.1. Reagenzien, Chemikalien, Enzyme und Kits

Tabelle 1: Verwendete Reagenzien, Chemikalien, Enzyme und Kits

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
AB Serum, human	Bio-Rad	805135
Accutase-Lösung	Sigma Aldrich	A6964
Alt-R® Cas9 Electroporation Enhancer, 2 nmol	IDT	1075915
Alt-R® S.p. HiFi Cas9 Nuclease V3, 100 µg	IDT	1081060
2% BCL Agarose Bead Standard (50-150µm)	Agarose Bead Technologies	A-1021S-500
BD™ CompBead Anti-Mouse Ig, κ/Negative Control Compensation Particles Set	BD Biosciences	552843
Brilliant Stain Buffer Plus	BD Biosciences	566385
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Sigma Aldrich	C5670-100G
Chloroform	Sigma Aldrich	288306-1L
cOmplete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	Sigma Aldrich	11873580001
DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride)	Thermo Fisher Scientific	D1306
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich	D4540-100ML
DNaseI	Roche	11284932001
DPBS, no calcium, no magnesium	Thermo Fisher Scientific	14190094
eBioscience™ Cell Stimulation Cocktail (plus protein transport inhibitors), 500x	Thermo Fisher Scientific	00-4975-93
eBioscience™ CFSE	Thermo Fisher Scientific	65-0850-84
eBioscience™ Fixable Viability Dye eFluor™ 780	Thermo Fisher Scientific	65-0865-18
eBioscience™ Protein Transport Inhibitor, 500x	Thermo Fisher Scientific	00-4980-93
Ethanol absolute ≥99.8%, Mol. Bio.Grade 250 ml	VWR International GmbH	437433T
EDTA (0,5 M), pH 8,0, RNase-frei	Thermo Fisher Scientific	AM9260G
Fetal calf serum (FBS) sera Plus	PAN Biotech	P30-3702
Fluorescent PS beads YG-488	Particle Metrix	700092
FluoroFix™ Buffer	Biolegend	422101
Glycine	Sigma Aldrich	G8898-1KG
Glykogen, RNA-Grad	Thermo Fisher Scientific	R0551
GM-CSF	Berlex, Seattle, USA	N.A.
HEPES (1 M)	Sigma Aldrich	H0887
H ₂ O, Aqua ad iniectionabilia (ultrareines Wasser)	Braun	2351744
H ₂ O, demineralized (ddH ₂ O.)	aus der Leitung mit demineralisiertem Wasser	N.A.
70 % H ₂ SO ₄	Zentrum für Elektronenmikroskopie	N.A.
IDTE pH 7.5 (1X TE Solution)	IDT	11-01-02-02
Intracellular Staining Permeabilization Wash Buffer (10x)	Biolegend	421002
4x Laemmli Sample Buffer	Bio-Rad	1610747
L-Glutamine (200 mM)	PAN Biotech	P04-80100
2-Mercaptoethanol 55 mM (for cell culture)	Gibco	21985

2-Mercaptoethanol, 100 ml, Glas (Western Blot)	Roth	4227.3
Methanol	Roth	X948.2
Milchpulver, 500 g	Roth	T145.2
MojoSort™ Human CD8 T Cell Isolation Kit	Biolegend	480012
NanoStandards™ – 0,100 µm	Applied Microspheres	75009-03
Natriumchlorid (NaCl)	Merck	1.06404.1000P
Natriumdodecylsulfat-Lösung (SDS)	Sigma Aldrich	05030-1L-F
Neon™ Transfektionssystem 10 µl-Kit	Thermo Fisher Scientific	MPK1025
Penicillin (10.000 U/ml) / Streptomycin (10 mg/ml)	PAN Biotech	P06-07100
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	23225
Phenylmethansulfonylfluorid-Lösung (PMSF)	Sigma Aldrich	93482-50ML-F
Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards	Bio-Rad	161-0363
Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards	Bio-Rad	161-0373
2-Propanol	Roth	6752.3
Proteinase K (Lyophilized)	Promega	V3021
rauchende Salzsäure (HCl, 37 %)	Sigma Aldrich	320331-500ML
Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffer	Thermo Fisher Scientific	46430
Rinderserumalbumin Fraktion V (BSA)	Roche	10735086001
RIPA Buffer	Sigma Aldrich	R0278-50ML1
RNase-Free Water	Aus Quiagen RNeasy Mini Kit	74104
RNase A, DNase und proteasefrei (10 mg/ml)	Thermo Fisher Scientific	EN0531
RPMI 1640	Anprotech	AC-LM-0060
Sodium azide ReagentPlus®, NaN ₃ (for FACS buffer)	Sigma Aldrich	S2002-5G
Spritzenfilter ROTILABO® PVDF, 0,22 µm	Roth	P666.1
SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (ECL Reagenz)	Thermo Fisher Scientific	34087
Tris base Ultrapure	AppliChem	A1086,1000
TRIzol™ LS Reagenz	Thermo Fisher Scientific	10296010
Trypan blue	Sigma Aldrich	T8154-20ml
Trypsin/ EDTA (10x) (0.05% Trypsin/ 0.02% EDTA)	PAN Biotech	P10-024100
Tween20 TWEEN® 20 for molecular biology, viscous liquid	Sigma Aldrich	P9416-50ml
UltraComp eBeads™ Plus Compensation Beads	Thermo Fisher Scientific	01-3333-42
1 % Uranylacetat-Lösung	Zentrum für Elektronenmikroskopie	N.A.
VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium	Vector Laboratories	H-1000-10

2.2. Medien, Puffer und Lösungen

2.2.1. Western Blot

4x Laemmli Puffer mit 10 % 2-Mercaptoethanol

450 µl 4x Laemmli Puffer, 50 µl 2-Mercaptoethanol (Western Blot)

25x Protease Inhibitor Stammlösung

1 cOmplete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablette in 2 ml ddH₂O auflösen

RIPA Puffer mit 1x Protease Inhibitor

96 µl RIPA Buffer, 4 µl 25x Protease Inhibitor Stammlösung

10x SDS Laufpuffer (250 mM Tris base Ultrapure, 1,92 M Glycin, 1 % SDS)

30,3 g Tris base Ultrapure, 144 g Glycin, 50 ml SDS (20 %), ad 1 l ddH₂O

10x TBS (137 mM NaCl, 20 mM Tris base Utrapure)

160,12 g NaCl, 48,46 g Tris base Ultrapure, ad 2 l ddH₂O

1x TBS

200 ml TBS (10x), pH-Wert auf 8,0 mit rauchender Salzsäure einstellen, ad 2 l ddH₂O

1x TBST (1x TBS, 0,05 % Tween 20)

2 l 1x TBS, 1 ml Tween 20

1x TBST + 5 % Magermilchpulver

45 ml TBST, 5 g Magermilchpulver

1x TOWBIN/SDS Transfer Puffer (25 mM Tris base Ultrapure, 192 mM Glycin, 0,02 % SDS, 20 % Methanol)

3,03 g Tris base Ultrapure, 14,4 g Glycin, 1 ml SDS (20 %), 200 ml Methanol (100 %) ad 1 l ddH₂O

2.2.2. Zellkultur und Immunzellassays

Blockierungspuffer

DPBS mit 10 % AB Serum

CFSE 5 mM

500 µg CFSE mit 180 µl DMSO rekonstituieren

DAPI 5 mg/ml

10 mg DAPI mit 2 ml DMSO rekonstituieren

Einfriermedium 1

100 % FBS

Einfriermedium 2 für Zelllinien

80 % Standard-Zellkulturmedium, 20 % DMSO

Einfriermedium 2 für Primärzellen

80 % FBS, 20 % DMSO

EV Produktionsmedium (2 mM L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin)

500 ml RPMI 1640, 5 ml L-Glutamin (200 mM), 5 ml Penicillin/Streptomycin

GM-CSF Medium (10 % FBS, 2 mM L-Glutamin, 280 U/ml GM-CSF)

50 ml RPMI 1640, 5 ml FBS, 0,5 ml L-Glutamin (200 mM), 5 µl GM-CSF

MACS Puffer (2 % BSA, 2 mM EDTA)

10 g BSA, 2 ml EDTA (0,5 M), ad 500 ml DPBS, steril filtrieren

Standard-Zellkulturmedium (10 % FBS, 2 mM Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin)

500 ml RPMI 1640, 50 ml FBS, 5 ml L-Glutamine (200 mM), 5 ml Penicillin/Streptomycin

T-Zell-Medium (10 % FBS, 2 mM Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin, 100 mM HEPES, 0,1 % 2-Mercaptoethanol)

43,45 ml RPMI 1640, 5 ml FBS, 0,5 ml L-Glutamine (200 mM), 0,5 ml Penicillin/Streptomycin, 0,5 ml HEPES (1 M), 50 µl 2-Mercaptoethanol (55 mM)

2.2.3. Durchflusszytometrie und FACS**FACS Puffer (2 % FBS, 2 mM EDTA, 0,01 % NaN₃)**

10 ml FBS, 2 ml EDTA (0,5 M), 0,5 ml NaN₃ (10 %), ad 500 ml DPBS

2.2.4. TEM**HEPES Buffered Saline (137 mM NaCl, 10 mM HEPES)**

8 g NaCl, 0,1 ml HEPES (1 M), ad 10 ml ddH₂O

2.2.5. miRNA Sequenzierung**CaCl₂ 100 mM**

1,1 g CaCl₂, ad 100 ml ddH₂O

DNase 10 mg/ml

100 mg DNase in 10 ml H₂O (ultrareines Wasser)

Proteinase K 5 mg/ml

5 mg Proteinase K in 1 ml H₂O (ultrareines Wasser)

2x Proteinase K Puffer (50 mM Tris HCl pH 8,0, 2,5 mM CaCl₂)

0,5 ml Tris HCl (1 M pH 8,0), 0,25 ml CaCl₂ (100 mM), ad 10 ml ddH₂O, steril filtrieren

2x Proteinase K Arbeitslösung (0,1 mg/ml Proteinase K, 50 mM TrisHCl, 2,5 mM CaCl₂)

4 µl Proteinase K (5 mg/ml), 196 µl 2x Proteinase K Puffer (50 mM Tris HCl pH 8,0, 2,5 mM CaCl₂)

Tris HCl 1 M pH 8,0

12,114 g Tris base, pH-Wert auf 8,0 mit rauchender Salzsäure einstellen, ad 100 ml ddH₂O

2.2.6. Massenspektrometrie**GASP Puffer (6 M Harnstoff, 2 M Thio-Harnstoff, 20 mM Tris pH = 8,8, 20 mM DTT, 4 % SDS)**

Bereitgestellt von Katharina Limm vom Institut für funktionelle Genomik (AG Oefner, Universität Regensburg).

2.3. Antikörper

Tabelle 2: Verwendete Antikörper

Bezeichnung	Anwendung	Hersteller	Artikelnummer
Alexa Fluor® 488 anti-human CD45 Antibody (Klon HI30)	FACS	Biolegend	304017
Alexa Fluor® 647 anti-human/mouse Granzyme B Antibody (Klon GB11)	FACS	Biolegend	515406
Alexa Fluor® 647 Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl (ICFC) Antibody (Klon MOPC-21)	FACS	Biolegend	400136
Alexa Fluor® 700 anti-human CD3 Antibody (Klon SK7)	FACS	Biolegend	344822
Anti-Mouse IgG (whole molecule)– Peroxidase antibody produced in goat	Western Blot	Sigma Aldrich	A8924-.5ML
Anti-Rabbit IgG (whole molecule)– Peroxidase antibody produced in goat	Western Blot	Sigma Aldrich	A0545-1ML
Anti-Rat IgG (whole molecule)– Peroxidase antibody produced in goat	Western Blot	Sigma Aldrich	A9037-1ML
APC anti-human CD276 (B7-H3) Antibody (Klon MIH42)	FACS	Biolegend	351006
APC anti-human HLA-A,B,C Antibody (W6/32)	FACS	Biolegend	311409
APC Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl (FC) Antibody (Klon MOPC-21)	FACS	Biolegend	400121
Alexa Fluor® 700 anti-human CD8α Antibody (Klon HIT8α)	FACS	Biolegend	300920
Brilliant Violet 421™ anti-human CD45RA Antibody (Klon HI100)	FACS	Biolegend	304130
Brilliant Violet 421™ anti-human TIGIT (VSTM3) Antibody (Klon A15153G)	FACS	Biolegend	372710
Brilliant Violet 421™ Mouse IgG2a, κ Isotype Ctrl Antibody	FACS	Biolegend	400259
Brilliant Violet 421™ Mouse IgG2b, κ Isotype Ctrl Antibody (Klon MPC-11)	FACS	Biolegend	400341
Brilliant Violet 605™ anti-human CD45RA Antibody (Klon HI100)	FACS	Biolegend	304134
Brilliant Violet 711™ anti-human CD279 (PD-1) Antibody (Klon EH12.2H7)	FACS	Biolegend	329928
Brilliant Violet 711™ Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl Antibody (Klon MOPC-21)	FACS	Biolegend	400167
BUV395 Mouse Anti-Human TNF (Klon Mab11)	FACS	BD Biosciences	563996
BUV395 Mouse IgG1, κ Isotype Control (Klon X40)	FACS	BD Biosciences	563547
BUV615 Mouse Anti-Human TIM-3 (CD366), (Klon 7D3)	FACS	BD Biosciences	752363
BUV615 Mouse IgG1, κ Isotype Control (Klon X40)	FACS	BD Biosciences	612986
BUV805 Mouse Anti-Human CD8 (Klon HIT8α)	FACS	BD Biosciences	742030

CD45RO Monoclonal Antibody (UCHL1), PerCP-eFluor 710, eBioscience™ (Klon UCHL1)	FACS	Thermo Fisher Scientific	46-0457-42
CD81 Antikörper (Klon B-11)	Western Blot	Santa Cruz Biotechnology	sc-166029
GAPDH Antikörper (6C5)	Western Blot	Santa Cruz Biotechnology	sc-32233
Grp94 monoclonal antibody (Klon 9G10)	Western Blot	Enzo Life Sciences	ADI-SPA-850-F
IL-20Rα Antikörper (Klon EE09)	Western Blot	Santa Cruz Biotechnology	sc-80065
PE anti-human CD155 (PVR) Antibody (Klon SKII.4)	FACS	Biolegend	337609
PE anti-human IFN-γ Antibody (Klon 4S.B3)	FACS	Biolegend	502509
PE Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl Antibody (Klon MOPC-21)	FACS	Biolegend	400111
PE/Cyanine7 anti-human CD197 (CCR7) Antibody (Klon G043H7)	FACS	Biolegend	353226
PE/Cyanine7 anti-human CD226 (DNAM-1) Antibody (Klon 11A8)	FACS	Biolegend	338316
PE/Cyanine7 Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl Antibody (Klon MOPC-21)	FACS	Biolegend	400125
PE/Cyanine7 Mouse IgG2a, κ Isotype Ctrl Antibody (MOPC-173)	FACS	Biolegend	400253
PE/Dazzle™ 594 anti-human CD81 (TAPA-1) Antibody (Klon 5A6)	Zeta-View	Biolegend	349519
PE/Dazzle™ 594 anti-human CD96 (TACTILE) Antibody (Klon NK92.39)	FACS	Biolegend	338414
PE/Dazzle™ 594 Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl Antibody (Klon MOPC-21)	FACS	Biolegend	400177
PerCP/Cyanine5.5 anti-human CD3 Antibody (Klon SK7)	FACS	Biolegend	344808
Purified anti-human CD3 Antibody (Klon OKT3)	Stimulation	Biolegend	317302
Purified anti-human CD28 Antibody (Klon CD28.2)	Stimulation	Biolegend	302902
Purified Mouse Anti-Hsp70 (Klon 7/Hsp70)	Western Blot	BD Biosciences	610607
Purified Mouse Anti-TSG101 (Klon 51/TSG101)	Western Blot	BD Biosciences	612697
Recombinant Anti-CD39 antibody (Klon EPR20627)	Western Blot	abcam	ab223842
Recombinant Anti-CD73 antibody (Klon EPR6114)	Western Blot	abcam	ab133582
Recombinant Anti-CD200 / OX2 antibody (Klon EPR22412-229)	Western Blot	abcam	ab254193
Recombinant Anti-CD276 antibody (Klon EPR20115)	Western Blot	abcam	ab219648
Recombinant Anti-PD-L1 antibody (Klon EPR19759)	Western Blot	abcam	ab213524
Recombinant Anti-Poliovirus Receptor/PVR antibody (Klon EPR17302)	Western Blot	abcam	ab205304

2.4. Oligonukleotide und Plasmide

Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotide und Plasmide

Bezeichnung	Sequenz	Hersteller
Alt-R® CRISPR-Cas9 tracrRNA, 5 nmol	N.A.	IDT
Alt-R® CRISPR-Cas9 Negative Control crRNA #1, 2 nmol	N.A.	IDT
Hs.Cas9.CD276.1.AD (crRNA)	5' AGTGCCACCACTGGGTCTTC 3'	IDT
Hs.Cas9.PVR.1.AB (crRNA)	5' CTATTCGGAGTCCAAACGGC 3'	IDT
pmaxGFP™ 0,5 µg/µl	N.A.	Lonza

2.5. Primäre Zellen

Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) wurden vom SCP-Lab des Lehrstuhls aus Leukapheresaten isoliert und nach dem Einfrierprotokoll für primäre Zellen kryokonserviert. Lymphknoten von Melanompatienten und Nicht-Tumorpatienten wurden von der Biobank des Lehrstuhls für Experimentelle Medizin zur Verfügung gestellt.

2.6. Humane Zelllinien

Tabelle 4: Verwendete humane Zelllinien

Bezeichnung	Herkunft
A-431	LEX
HeLa	LEX
MeIDTC2	ITEM-R
MeIDTC8	ITEM-R
MeIDTC10a	ITEM-R
MeIDTC11	ITEM-R
NCI-H1975	LEX

2.7. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
Cell culture flask T25	Greiner Bio-One	690160
Cell culture flask T75	Greiner Bio-One	658175
Cell culture flask T175	Greiner Bio-One	660175
Cellstar® serological pipette 2 ml	Greiner Bio-One	710180
Cellstar® serological pipette 5 ml	Greiner Bio-One	606180
Cellstar® serological pipette 10 ml	Greiner Bio-One	607180
Cellstar® serological pipette 25 ml	Greiner Bio-One	760180
Centrifuge tube 15 ml (15 ml Falcon Tube)	Greiner Bio-One	188271
Centrifuge tube 50 ml (50 ml Falcon Tube)	Greiner Bio-One	227261
Combitips advanced 5 ml	Eppendorf	0030089669
Cryo Tube™ vial	Thermo Fisher Scientific	377267
Deckgläser Stärke 1.5H, 24 x 60 mm	Roth	LH26.1
Diagnostic Microscope Slides (Haftobjektträger; HOT)	Thermo Fisher Scientific	ER-203B-CE24
DNA LoBind Tubes, 1,5 ml	Eppendorf	0030108051
EASYSTRAINER 70 µM, FÜR 50 ML RÖHRCHEN	Greiner Bio-One	542070

Extra thick blot paper (Whatman Paper)	Bio-Rad	170-3969
G2400C-X TEM Gitter	Zentrum für Elektronenmikroskopie	N.A.
G2405C-X TEM Gitter	Zentrum für Elektronenmikroskopie	N.A.
Immobilon-P PVDF Membranes	Millipore	IPVH00010
Injekt®-F Feindosierungsspritzen 1ml	Braun	9166017V
LS Columns	Miltenyi Biotech	130-042-401
Macrosep Advance Centrifugal Devices with Omega Membrane 3K (50 ml Ultrafiltrationstube)	Pall	MAP003C37
0,2ml PCR Tubes	4titude	4ti-0795
10% Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Protein Gels, 15 well, 15 µl	Bio-Rad	4568036
Nalgene™ Oak Ridge Zentrifugenröhrchen aus PPCO für Highspeed-Anwendungen (50 ml Zentrifugenröhrchen)	Thermo Fisher Scientific	3119-0050PK
PARAFILM® M, 100 mm, 38 m	Roth	H666.1
Pasteurpipetten, ohne Wattestopfen	Roth	4522
Plastic XXL Column	Agarose Bead Technologies	CXXL-25
Plastic XXL Columns Frits	Agarose Bead Technologies	FCXXL-25
Polypropylene Centrifuge Tubes (38,5 ml Zentrifugenröhrchen)	Beckman Coulter	326823
5 mL Polystyrene Round-Bottom Tube (FACS tube steril)	Corning	352054
Pre-Separation Filters (30 µm)	Miltenyi Biotech	130-041-407
Protein LoBind Tubes, 1,5 ml	Eppendorf	0030108116
Protein LoBind Tubes, 2 ml	Eppendorf	0030108132
Protein LoBind Tubes, 5 ml	Eppendorf	0030108302
Reaction Tubes, 1,5 ml, PP, graduated, attached cap, natural (1,5 ml Tube)	Greiner Bio-One	616201
Reaction Tubes, 2 ml, PP, graduated, attached cap, natural (2 ml Tube)	Greiner Bio-One	623201
Reagent reservoirs 10 ml	Integra	4331
Röhre 5 ml, 75x12 mm, PP (FACS tube nicht steril)	Sarstedt	55.1578
SEFAR NITREX 03-41/31 (FACS Filter)	SEFAR	3A03-0041-108-00
Vivaspin 500, 5.000 MWCO PES (500 µl Ultrafiltrationstube)	Sartorius	VS0111
VWR Zellkulturplatten 48-Well, steril	VWR	734-2326
VWR Zellkulturplatten 96-Well-F, steril	VWR	734-2327
6 Well Cell Culture Plate	Greiner Bio-One	657160
24 Well Cell Culture Plate	Greiner Bio-One	662160
48 Well Cell Clulture Plate	Greiner Bio-One	677180
96 Well Clear Round Bottom TC-treated Microplate (T-Zell-Assay)	Corning	3799

2.8. Geräte

Tabelle 6: Verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Autoklav DX-45	Systech
Autoklav 3150 EL	Systech
BD FACSAria™ IIu	BD Bioscience
BD FACSCelesta™	BD Bioscience
BD FACSsymphony™ A5 SORP	BD Bioscience
BD LSR II™	BD Bioscience
Centrifuge 5417R	Eppendorf
Centrifuge 5424R	Eppendorf
Centrifuge 5810R	Eppendorf
ChemiDoc MP Imaging System	Bio-Rad
Cryo 1°C Freezing Container	Nalgene
DNA Engine Tetrad2 Peltier Thermal Cycler	Bio-Rad
Elektrophoresekammer 40-1214	Peqlab
FLUOstar Omega	BMG Labtech
Heating Magnetic Stirrer	VELP Scientifica
Incubator Heraeus BB15	Thermo Fisher Scientific
Laminar flow bench Hera Safe KS18	Thermo Fisher Scientific
Manuelle Pipetten (2 µl, 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Gilson
MACS® MultiStand	Miltenyi Biotec
MidiMACS™ Separator	Miltenyi Biotec
MiSeq	Illumina
Neon™ Transfection System	Thermo Fisher Scientific
Neubauer Zählkammer	Marienfeld
Neubauer Improved Zählkammer	Brand
NextSeq 550	Illumina
Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell	Bio-Rad
Microscope IB inverted	Optech
Microscope Axiovert 40 CFL	Zeiss
OLYMPUS IX81 Mikroskop	Olympus
Orbital Shaker PSU-10i	bioSan
pH-meter PB-11	Sartorius
PIPETMAN L Multichannel P8x200L, 20-200 µL	Gilson
PowerPac™ HC High-Current Power Supply	Bio-Rad
Power Supply MP-250N	Kisker Biotech
Rollenmischer; Modell SU 1400	Sunlab
Sorvall Evolution RC Superspeed centrifuge	Thermo Fisher Scientific
SP8 Confocal Microscope	Leica
SW 32 Ti Swinging-Bucket Rotor	Beckman Coulter
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Trans-Blot Turbo Transfer System	Bio-Rad
Optima L-90K Ultracentrifuge	Beckman Coulter
Vortex	VELP Scientifica
Waage PLS 510-3	Kern
ZEN0023 Durchflußmesszelle aus Quartz	Malvern Panalytical
Zetasizer Nano ZS	Malvern Panalytical
Zeta View PMX-120	Particle Metrix

2.9. Datenbanken und Software

Tabelle 7: Verwendete Datenbanken und Softwares

Bezeichnung	Hersteller
BD FACSDiva™ Software	BD Bioscience
cellSens Dimension 1.9	Olympus
CRISPR Design Tool	https://www.synthego.com/products/bioinformatics/crispr-design-tool
Fiji	ImageJ
FlowJo V10	BD Bioscience
Human Protein Atlas	www.proteinatlas.org
Image Lab Version 6.0.1 build 34	Bio-Rad
MARS Version 3.32 R5	BMG Labtech
Office Professional Plus 2019 Version 1808	Microsoft
Predesigned Alt-R® CRISPR-Cas9 guide RNA tool	https://eu.idtdna.com/site/order/designtool/index/CRISPR_PREDESIGN
Prism 9	GraphPad
PubMed	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed
Verify Guide Design Tool von Synthego	https://design.synthego.com/#/validate

3. Methoden

3.1. Zellkultur

Zentrifugationsschritte werden, wenn nicht anders angegeben, immer bei Raumtemperatur durchgeführt. In der Zellkultur verwendetes Medium ist immer auf 37 °C vorgewärmt. Die Inkubation der humanen Zellen erfolgt ausschließlich bei 37 °C und 5,5 % CO₂.

3.1.1. Auftauen von kryokonservierten Zellen

Das aufzutauende Kryoröhrchen wird im 37 °C Wasserbad für ca. 2 min, bis nur noch ein kleiner Eisklumpen zu sehen ist, inkubiert und mit 80 % Ethanol abgewischt. Die Zellsuspension wird in ein 50 ml Falcon Tube überführt (werden Primärzellen aufgetaut, werden 100 µl DNase I (10 mg/ml) im 50 ml Falcon Tube vorgelegt), das Kryoröhrchen mit 1 ml Zellkulturmedium nachgewaschen und langsam 10 ml Zellkulturmedium in das 50 ml Falcon Tube zugetropft. Nach Zentrifugation für 10 min bei 300g wird der DMSO-haltige Überstand abgenommen und das Zellpellet in 1 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Im Anschluss können die Zellen entweder zuerst gezählt und dann ausgesät oder direkt ausgesät werden.

3.1.2. Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl werden 10 µl einer Zellsuspension abgenommen, in ein *Well* einer 96 *Well*-Platte überführt und mit *Trypan Blue* 1:10 verdünnt (Verdünnungsfaktor je nach erwarteter Zellzahl anpassen). Das Deckglas der Neubauer Zählkammer wird durch Hauchen angefeuchtet und auf die Kammer aufgelegt. Anschließend werden 10 µl der 1:10 Verdünnung in die Zählkammer pipettiert. Unter dem Mikroskop werden 4 große Eckquadrate ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Die Zellzahl pro Milliliter kann durch Multiplikation des Mittelwerts der ausgezählten Eckquadrate mit dem Volumen eines Eckquadrats (0,1 mm²) x 10⁴ x Verdünnungsfaktor berechnet werden.

3.1.3. Passagieren adhärenter Zellen

Um adhärente Zellen zu passagieren wird das Zellkulturmedium mit einer Pasteurpipette abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und für ca. 2 min (je nach Adhärenz der Zellen) mit Trypsin/EDTA (10x) bei 37° C inkubiert. Am Mikroskop wird kontrolliert, ob sich die Zellen von der Flasche abgelöst haben. Haben sie sich nicht oder nur unvollständig abgelöst, werden sie erneut bei 37 °C inkubiert bis sie sich ablösen. Anschließend wird das Trypsin/EDTA mit dem 4-fachen Volumen Standard-Zellkulturmedium neutralisiert. Die Zellsuspension kann dann direkt auf neue Zellkulturflaschen ausgesät werden. Soll die Zellzahl bestimmt werden, wird die Zellsuspension in ein 50 ml Falcon Tube überführt und bei 300g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird mit einer Pasteurpipette vollständig abgenommen und das Zellpellet in 1 ml Zellkulturmedium (je 5x10⁶ – 10⁷ Zellen) resuspendiert. Die Zellzahl wird mit einer Neubauer Zählkammer bestimmt und die gewünschte Zellzahl ausgesät.

3.1.4. Einfrieren von Zellen

Die Zellen werden mit PBS gewaschen, trypsinisiert, bei 300g für 10 min abzentrifugiert und in 1 ml FBS resuspendiert. Die Zellzahl wird mit der Neubauer Zählkammer bestimmt und die gewünschte Konzentration eingestellt. In Kryoröhrchen werden, je nachdem ob eine Zelllinie oder Primärzellen eingefroren werden, 500 µl Einfriermedium 2 für Zelllinien oder 500 µl Einfriermedium für Primärzellen vorgelegt. Anschließend werden 500 µl Zellsuspension zugegeben, die Kryoröhrchen in einen, auf 4 °C vorgekühlten, *Cryo 1 °C Freezing Container* gestellt und über Nacht bei -80 °C eingefroren. Am nächsten Tag können die Zellen zur langfristigen Kryokonservierung in den N₂ Tank überführt werden.

Tabelle 8: Übersicht der zu verwendenden Volumina und Zellzahlen

Zellkulturflasche	Volumen Medium	Volumen Trypsin/EDTA	Volumen PBS	Zellzahl pro Flasche für MelDCC Linien bei 80 % Konfluenz
T25	5 ml	1 ml	2,5 ml	ca. $0,5 \times 10^6$ Zellen
T75	15 ml	2 ml	7,5 ml	ca. 2×10^6 Zellen
T175	25 ml	2,5 ml	10 ml	ca. 5×10^6 Zellen

3.2. Immunzell-Assays

3.2.1. Aufreinigung von CD8-T-Zellen aus humanen PBMCs

Humane PBMCs werden aufgetaut, in T-Zell-Medium aufgenommen, gezählt und mit 2×10^6 Zellen pro *Well* in einer 96 *Well*-Platte (T-Zell-Assay) ausgesät. Die Zellen werden über Nacht inkubiert und am nächsten Morgen von der 96 *Well*-Platte in ein 50 ml Falcon Tube gepoolt. Jedes *Well* wird mit 200 μ l PBS nachgewaschen und ebenfalls in das 50 ml Falcon Tube gepoolt. Das Falcon Tube wird mit PBS auf 50 ml aufgefüllt, für 10 min bei 300g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 1 ml MACS Puffer pro 10^6 aufgetauter PBMCs aufgenommen. Die Zellsuspension wird durch einen 70 μ m *Easystrainer* gefiltert und die genaue Zellzahl bestimmt. Nach erneuter Zentrifugation bei 300g für 5 min wird der Überstand abgenommen und die Zellzahl mit MACS Puffer auf 10^8 Zellen/ml eingestellt.

Die gewünschte Zellzahl wird in ein 15 ml Falcon Tube überführt und mit 10 μ l *Biotin-Antibody Cocktail* (*MojoSort™ Human CD8 T Cell Isolation Kit*) pro 10^7 Zellen für 15 min auf Eis inkubiert. Alle 5 min wird die Zellsuspension vorsichtig mit einer 1000 μ l Pipette resuspendiert. Anschließend werden die *Streptavidin Nanobeads* (*MojoSort™ Human CD8 T Cell Isolation Kit*) durch Vortexen gründlich gemischt (5 Berührungen bei maximaler Geschwindigkeit) und 10 μ l pro 10^7 Zellen zugegeben. Die Zellsuspension wird für weitere 15 min auf Eis inkubiert, alle 5 min mit einer 1000 μ l Pipette vorsichtig resuspendiert und bei 300g für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und die Zellen in 1 ml MACS Puffer resuspendiert bis keine Klumpen mehr zu sehen sind.

Die Zellsuspension wird durch einen 30 μ l *Pre-Separation Filter* auf eine *LS Column* geladen, die in einem *MidiMACS Separator* eingesetzt ist und zuvor mit 3 ml MACS Puffer equilibriert wurde. Die CD8-T-Zellen, welche nicht an *Streptavidin Nanobeads* gebunden sind, können als Durchfluss in einem 15 ml Falcon Tube aufgefangen werden. Die *LS Column* wird 3-mal mit 3 ml MACS Puffer gewaschen und der Durchfluss ebenfalls in dem 15 ml Falcon Tube aufgefangen. Der Durchfluss wird in ein 50 ml Falcon Tube überführt und bei 300g für 10 min zentrifugiert. Das erhaltene Pellet enthält die aufgereinigten CD8-T-Zellen. Die Zellen können dann im gewünschten Puffer oder Medium aufgenommen und gezählt werden.

3.2.2. CFSE Färbung von CD8-T-Zellen

Aufgereinigte CD8-T-Zellen werden in einem 50 ml Falcon Tube in 2 ml PBS mit 2 % FBS aufgenommen (max. 2×10^7 Zellen/ml). In einem zweiten Falcon Tube werden 1,6 μ l CFSE 5 mM in 2 ml PBS verdünnt, so dass sich eine CFSE Endkonzentration von 4 μ M ergibt. Die CFSE Verdünnung wird dann zur Zellsuspension gegeben (Endkonzentration: 2 μ M CFSE und 1 % FBS), kurz gevortext und lichtgeschützt für 10 min im 37 °C Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubation wird das 5-fache Volumen Standard-Zellkulturmedium zugegeben und die Zellen bei 300 g für 10 min pelletiert. Der Überstand wird abgenommen und die CFSE gefärbten CD8-T-Zellen in 1 ml T-Zell-Medium aufgenommen. Anschließend können die Zellen gezählt und ausplattiert werden.

3.2.3. CD8-T-Zell-Assay

Die Konzentration von ungefärbten oder CFSE gefärbten CD8-T-Zellen wird mit T-Zell-Medium auf 10^6 Zellen/ml eingestellt. Von dieser Zellsuspension werden 100 μ l je *Well* (entspricht 100.000 Zellen) auf eine 96 *Well*-Platte (T-Zell-Assay) ausgesät. Für die Behandlung der Zellen mit EVs vor Stimulation

werden ca. 4 h später die EVs zugegeben und die Zellen anschließend für 16 h inkubiert. Für ein Verhältnis von 1:10 oder 1:50 werden EVs zugegeben, die von 10^6 oder 5×10^6 MelDCC-Zellen produziert wurden. Um die Zellen zu stimulieren, werden sie am nächsten Tag mit einer Mehrkanalpipette auf eine CD3/CD28 gecoatete 96 *Well*-Platte (T-Zell-Assay) überführt. Jedes *Well* wird mit 100 μ l T-Zell-Medium nachgewaschen und das Waschvolumen wird ebenfalls auf die gecoatete 96 *Well*-Platte (siehe Abschnitt CD3/CD28 *coating*) überführt, so dass das Endvolumen pro *Well* 200 μ l beträgt. Die Zellen werden dann auf der gecoateten 96 *Well*-Platte inkubiert. Für die Behandlung der Zellen mit EVs nach Stimulation werden ca. 24 h später die EVs zugegeben und die Zellen anschließend weiter inkubiert. Am vierten Tag nach Stimulation werden die Zellen für die Analyse am Durchflusszytometer gefärbt. Sollen intrazelluläre Effektor Proteine wie z.B. IFN γ oder Granzym B gefärbt werden, müssen die Zellen für 4 h restimuliert und mit Proteintransport Inhibitor behandelt werden (siehe Abschnitt Restimulation von Immunzellen).

3.2.4. CD3/CD28-coating

Für die Stimulation von CD8-T-Zellen werden lösliche CD3 und CD28 Antikörpern verwendet. Die Antikörper werden in PBS auf eine Konzentration von 2 μ g/ml je Antikörper verdünnt. Daraufhin werden 200 μ l der Antikörperlösung pro *Well* einer 96 *Well*-Platte (T-Zell-Assay) pipettiert. Die Platte wird mit Parafilm verschlossen und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wird die Lösung mit einer Pasteurpipette abgesaugt und jedes *Well* mit 200 μ l PBS, welches auch mit einer Pasteurpipette abgesaugt wird, gewaschen. Jetzt können CD8-T-Zellen zur Stimulation auf die Platte transferiert werden.

3.2.5. Restimulation von Immunzellen

Werden intrazelluläre Effektor Moleküle wie z.B. IFN γ oder Granzym B für eine FACS Analyse gefärbt, müssen die Immunzellen zuerst restimuliert und der Proteintransport inhibiert werden. Hierfür wird der *eBioscience™ Cell Stimulation Cocktail* (inklusive Protein Transport Inhibitoren) verwendet. Da dieser 500x konzentriert vorliegt, muss eine Vorverdünnung angefertigt werden. Es wird ein *Mastermix* mit 0,4 μ l *Cell Stimulation Cocktail* und 3,6 μ l T-Zell-Medium pro Probe pipettiert. Von diesem *Mastermix* werden dann 4 μ l auf ein 200 μ l Medium enthaltendes *Well* einer 96 *Well*-Platte gegeben, der Inhalt des *Wells* wird resuspendiert und die Platte für 4 h inkubiert. Sollen unstimulierte Kontrollen mitgeführt werden, werden diese analog mit *eBioscience™ Protein Transport Inhibitor*, der ebenfalls 500x konzentriert ist, behandelt. Nach den 4 h Inkubationszeit können die Zellen gefärbt werden.

3.2.6. Vorbereitung humaner Lymphknoten für die Durchflusszytometrie

Kryokonservierte Lymphknoten von Melanompatienten und Nicht-Tumorpatienten werden aufgetaut, abzentrifugiert und die Pellets in Standard-Zellkulturmedium aufgenommen. Bevor sie gezählt werden, werden die Zellen durch FACS Filter in 2 ml LoBind Tubes gefiltert, um Gewebereste und Verklumpungen zu entfernen. Nachdem die Zellzahl bestimmt wurde, werden pro Lymphknoten zwei *Wells* einer 96 *Well*-Platte (T-Zell-Assay) mit je 10^6 Zellen ausgesät. Zusätzlich wird auf einer weiteren Platte pro Lymphknoten, sofern vorhanden, mind. ein *Well* mit 10^6 Zellen für die Isotypfärbung ausgesät. Die Zellen werden über Nacht inkubiert und am nächsten Morgen für die Intrazellulärfärbung für 4 h restimuliert. Die Isotypkontrollen werden nach der Restimulation gepoolt und für jede Isotypfärbung je ein *Well* mit 10^6 Zellen der Mischung ausgesät. Jetzt kann die FACS Färbung durchgeführt werden.

3.3. Antikörperfärbung für Durchflusszytometrie und FACS

Die Antikörperfärbung von Zellen für Durchflusszytometrie kann in 5 ml Tubes (FACS Tubes) oder in 96 *Well*-Rundbodenplatten durchgeführt werden. Nach einem Zentrifugationsschritt werden FACS Tubes in einer fließenden Bewegung abgekippt und auf einem Zellstofftuch abgestrichen. Platten werden in einer schwungvollen Bewegung abgekippt, aber nicht abgestrichen. Handelt es sich um potenziell infektiöses Material wird die Färbung unter der Sterilwerkbank durchgeführt und die Überstände werden in eine Flüssigabfall-Flasche (FACS Tubes) oder in einen 5 l Messbecher (96 *Well*-Platten) abgekippt, dort gesammelt und anschließend autoklaviert. Sollen die Zellen sortiert (FACS) werden, wird die Färbung immer in sterilen FACS Tubes unter der Sterilwerkbank durchgeführt. Außerdem muss steriles PBS und steriler FACS Puffer für die Waschschrte verwendet werden. Die unterschiedlichen Volumina und Zentrifugationsgeschwindigkeiten bei der Färbung in FACS Tubes und 96 *Well*-Platten sind in Tabelle 9 aufgeführt. Werden BUV konjugierte Antikörper verwendet wird der Antikörper *Mastermix* in einem Endvolumen von 100 µl angefertigt der 10 µl *Brilliant Stain Buffer Plus* enthält. Dieser Puffer verhindert die unerwünschte Interaktionen unterschiedlicher Fluorochrome miteinander. Es wird jeweils ein Viertel der vom Hersteller angegeben Menge an Antikörper/Million Zellen verwendet. Liefert dies keine befriedigenden Ergebnisse, muss der Antikörper austitriert werden.

3.3.1. *Viability Dye* Färbung

Die Zellen werden 2-mal mit PBS gewaschen, um Reste des Mediums zu entfernen und anschließend für 20 min mit 200 µl *Viability dye* gefärbt, der zuvor 1:2000 in PBS verdünnt wurde. Im nächsten Schritt werden die Zellen abzentrifugiert, der *Viability dye* abgekippt und es wird mit FACS Puffer gewaschen.

3.3.2. Oberflächenfärbung

Um die FC Rezeptoren, die unspezifisch mit den Antikörpern interagieren könnten, zu blockieren, wird für 10 min humanes AB Serum hinzugefügt. Nach der 10 min Inkubation wird der *Mastermix* mit in FACS Puffer verdünnten Antikörpern, die gegen Oberflächenantigene gerichtet sind, auf die Zellen gegeben und für 30 min im Dunkeln inkubiert. Sollen die Zellen sortiert werden, werden sie nach diesem Schritt 2-mal mit FACS Puffer gewaschen, in FACS Puffer aufgenommen und bis zum Sortieren auf Eis gelagert. Werden die Zellen am Durchflusszytometer analysiert, werden sie, nach der Färbung der Oberflächenantigene, für 20 min im Dunkeln mit 200 µl Fluoro Fix Puffer fixiert (wird in einer 96 *Well*-Platte gefärbt, muss vor der Fixierung der *Mastermix* durch Zentrifugieren und Abkippen entfernt werden). Anschließend werden die Zellen zentrifugiert und der Fluoro Fix Puffer abgekippt. Es wird mit FACS Puffer gewaschen und die Zellen in 150 µl FACS Puffer resuspendiert. Die Zellen können jetzt direkt am Durchflusszytometer analysiert werden oder über Nacht lichtgeschützt bei 4 °C gelagert und am nächsten Tag analysiert werden.

3.3.3. Intrazellulärfärbung

Sollen zusätzlich zu den Oberflächenantigenen intrazellulär lokalisierte Antigene gefärbt werden, müssen die Zellen permeabilisiert werden. Hierzu wird nach der Fixierung nicht mit FACS Puffer, sondern 2-mal mit *Intracellular Staining Permeabilization Wash Buffer (Perm Wash)*, der zuvor 1:10 in ddH₂O verdünnt wurde, gewaschen. Es wird für 10 min mit AB Serum blockiert, bevor der *Mastermix* mit in *Perm Wash* verdünnten Antikörpern, die gegen intrazellulär lokalisierte Antigene gerichtet sind, auf die Zellen gegeben und für 30 min im Dunkeln inkubiert wird. Die Zellen werden dann abzentrifugiert und erneut 2-mal mit *Perm Wash* gewaschen (wird in einer 96 *Well*-Platte gefärbt, muss vor dem Waschen mit *Perm Wash* der *Mastermix* durch Zentrifugieren und Abkippen entfernt werden). Es wird mit FACS Puffer gewaschen und die Zellen in 150 µl FACS Puffer resuspendiert. Die Zellen können jetzt direkt am Durchflusszytometer analysiert oder über Nacht lichtgeschützt bei 4 °C gelagert und am nächsten Tag analysiert werden.

3.3.4. Kompensationskontrollen

Für die Einstellung der PMTs am Durchflusszytometer werden Kompensationskontrollen benötigt. Es müssen Einzelfärbungen mit jedem Antikörper bzw. Farbstoff des Färbepanels angefertigt werden. Hierzu werden die *UltraComp eBeads™ Plus Compensation Beads* verwendet. Jeder Tropfen dieser *Beads* enthält eine positive Population, die jeden Maus-, Ratten-, Hamster-, Kaninchen- und rekombinanten humanen Antikörper bindet und eine negative Population, die nicht mit dem Antikörper reagiert. Ein Tropfen *Beads* in 300 µl FACS ist ausreichend für 6 Einzelfärbungen à 50 µl. Für die Einzelfärbung wird jeweils die gleiche Menge Antikörper verwendet, die auch im eigentlichen Färbepanel für eine Probe eingesetzt wird. Die Kompensationskontrolle für den *Viability dye* kann mit einem beliebigen Antikörper, der mit einem Fluorochrom konjugiert ist, welches das gleiche Emissionsspektrum wie der *Viability dye* aufweist, gefärbt werden. Werden die Zellen mit CFSE-gefärbt, müssen als Kompensationskontrolle CFSE-gefärbte Zellen verwendet werden, da nur so die Intensität des CFSE Signals berücksichtigt werden kann.

Tabelle 9: FACS Färbungen

	Färbung in Tubes	Färbung in 96 Well-Platte	Färbung in 96 Well-Platte mit BUV Farbstoffen
Zentrifugation	300 g, 5 min	300 g, 5 min	1000 g, 2 min
Brilliant Stain Buffer Plus	-	-	10 µl
Volumen PBS (Waschen)	2 ml	200 µl	200 µl
Volumen FACS Puffer (Waschen)	2 ml	200 µl	200 µl
Volumen AB Serum	5 µl	2,5 µl	2,5 µl
Volumen Mastermix Antikörper	10 µl	10 µl	100 µl
Volumen Intracellular Staining Permeabilization Wash Buffer	2 ml	200 µl	200 µl

3.4. Isolation extrazellulärer Vesikel durch differentielle Ultrazentrifugation (dUZ)

3.4.1. Herstellung des konditionierten Mediums

MelDCC Zelllinien werden auf acht T175 Zellkulturflaschen à 2×10^6 Zellen pro Flasche ausgesät und für 3 Tage in Standard-Zellkulturmedium (25 ml je Flasche) inkubiert. Nach 3 Tagen wird das Medium abgesaugt und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Anschließend werden 30 ml EV Produktionsmedium zugegeben und die Zellen für 48 h inkubiert. Nach 48 h kann das konditionierte Medium zur Isolierung extrazellulärer Vesikel verwendet werden.

3.4.2. Differentielle Ultrazentrifugation

Alle folgenden Zentrifugationsschritte werden in Kühlzentrifugen bei 4 °C durchgeführt. Das konditionierte Medium wird abgenommen, in 50 ml Falcon Tubes überführt und für 10 min bei 300g zentrifugiert. Während der Zentrifugation werden die Zellen aus 4 Flaschen geerntet, in ein 50 ml Falcon Tube gepoolt und ebenfalls bei 300g für 10 min zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand vollständig abgenommen, das Zellpellet in 4 ml Standard-Zellkulturmedium aufgenommen und die

Zellzahl mit einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Durch Hochrechnung der Zellzahl von 4 auf 8 Flaschen wird die Anzahl der EV-produzierenden Zellen bestimmt.

Ab diesem Schritt muss beim Abnehmen des Überstands immer darauf geachtet werden mindestens 0,5 cm oberhalb der Pellets zu stoppen, um sicherzugehen, dass nichts von den Pellets mit überführt wird. Die Überstände aus der Zentrifugation des konditionierten Mediums werden abgenommen, in frische 50 ml Falcon Tubes überführt und für 20 min bei 2.000g zentrifugiert. Nach der 2.000g Zentrifugation werden die Überstände abgenommen und in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Pellets aus der 2.000g Zentrifugation (2K-Pellets) werden in den 50 ml Falcon Tubes auf Eis gelagert. Alle 50 ml Zentrifugenröhrchen werden auf 0,01 g genau austariert und für 40 min bei 10.000g zentrifugiert. Während der Zentrifugation, werden die 2K-Pellets in ein 50 ml Falcon Tube gepoolt, jedes Tube wird mit 1 ml PBS nachgewaschen und zu den gepoolten 2K-Pellets gegeben. Um die 2K-Pellets zu waschen, wird das Falcon Tube mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und für 20 min bei 2.000g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird der Überstand vollständig abgenommen, das 2K-Pellet in 1 μ l PBS je 10^6 EV-produzierenden Zellen gelöst, in 1,5 ml Protein LoBind Tubes aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

Nach der 10.000g Zentrifugation werden die Überstände abgenommen, in 38,5 ml Zentrifugenröhrchen überführt und in die Ultrazentrifugen-Becher eingesetzt. Die Pellets aus der 10.000g Zentrifugation (10K-Pellets) werden in den 50 ml Zentrifugenröhrchen auf Eis gelagert. Alle Ultrazentrifugen-Becher werden auf 0,01 g genau austariert und für 90 min bei 100.000g zentrifugiert. Während der Zentrifugation werden die 10K-Pellets in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gepoolt, jedes Zentrifugenröhrchen wird mit 1 ml PBS nachgewaschen und zu den gepoolten 10K-Pellets gegeben. Um die 10K-Pellets zu waschen, wird das Zentrifugenröhrchen auf 50 ml mit PBS aufgefüllt und für 40 min bei 10.000g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird der Überstand vollständig abgenommen, das 10K-Pellet in 1 μ l PBS je 10^6 EV-produzierenden Zellen gelöst, in 1,5 ml Protein LoBind Tubes aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

Die Überstände aus der zweiten 100.000g Zentrifugation werden abgenommen und verworfen. Alle Pellets (100K-Pellets) werden in ein 38,5 ml Zentrifugenröhrchen gepoolt, jedes 38,5 ml Zentrifugenröhrchen wird mit 1 ml PBS nachgewaschen und zu den gepoolten 100K-Pellets gegeben. Um die 100K-Pellets zu waschen, wird das 38,5 ml Zentrifugenröhrchen mit PBS auf 35 ml aufgefüllt und für 90 min bei 100.000g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird der Überstand vollständig abgenommen, das 100K-Pellet in 1 μ l PBS je 10^6 EV-produzierenden Zellen gelöst, in 1,5 ml Protein LoBind Tubes aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

3.5. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) von EVs

Für die Betrachtung der Vesikel unter dem TEM müssen die EV-Pellets nach dem letzten Zentrifugationsschritt in 1 μ l *HEPES Buffered Saline* pro 10^6 EV-produzierender Zellen aufgenommen werden. Die Vorbereitung der Proben und die Mikroskopie erfolgt durch Reinhard Rachel am Zentrum für Elektronenmikroskopie der Universität Regensburg.

3.5.1. Negativfärbung

Die Vesikel werden 1:10 in *HEPES Buffered Saline* verdünnt und 4 μ l auf ein hydrophilisiertes G2400C-X TEM Gitter pipettiert. Das Gitter wird mit einer Pinzette auf ein Zellstofftuch getupft, um die Flüssigkeit durch das Gitter zu saugen und die Vesikel an das Gitter zu binden. Das Gitter wird mit einem Tropfen ddH₂O gewaschen und erneut auf das Zellstofftuch getupft, bevor die Färbung mit 1 % Urnaylacetat-Lösung für ca. 30 sec erfolgt. Nachdem das Gitter abgetupft wurde, wird ein weiteres Mal mit einem Tropfen ddH₂O gewaschen, das Gitter auf das Zellstofftuch getupft und an der Luft getrocknet. Die Probe kann jetzt mikroskopiert werden.

3.5.2. Gefrierätzung

Es werden 4 µl der Vesikel, welche in *HEPES Buffered Saline* vorliegen, unverdünnt auf den sogenannten Goldträger pipettiert. Daraufhin wird der Goldträger in flüssigen Stickstoff eingebracht und die Probe damit physikalisch fixiert. Der Goldträger inklusive Probe wird in die Gefrierätzeinheit mit Ultrahochvakuum eingeschleust, fixiert und die Probe mit einem -180 °C kalten Messer gebrochen. Dabei brechen die Vesikel in der Probe an ihrer schwächsten Stelle zwischen innerer und äußerer Membranseite. Um ein Relief zu erzeugen, wird die Probe unter eine Kältefalle geschoben, die eine Temperatur von -196 °C hat. Jetzt geht die gefrorene Flüssigkeit der Probe nach und nach durch Sublimation in die Gasphase über. Nach ca. 4 min in der Kältefalle wird die Probe mit Platin und Kohlenstoff bedampft, um einen Abdruck der durch die Gefrierätzung entstandenen Oberfläche zu erhalten. Die Probe wird ausgeschleust und der Abdruck in ein Schälchen mit 70 % H₂SO₄ gelegt. Im letzten Schritt wird der Abdruck mit einem G2405C-X TEM Gitter aufgefangen und an der Luft getrocknet.

3.6. Zeta View

3.6.1. Einstellen der Verdünnungen

Ist die Ausgangskonzentration des 100K-Pellets unbekannt, muss durch eine Verdünnungsreihe die optimale Verdünnung ermittelt werden. Die Konzentration der Probe ist optimal, wenn zwischen 200 und 300 Partikel pro Messposition aufgezeichnet werden. Wird ein neuer Antikörper verwendet muss auch dieser durch eine Verdünnungsreihe austitriert werden. Hierbei ist darauf zu achten, dass die Verdünnung mindestens so hoch ist, dass kein Hintergrundsignal mehr aufgezeichnet wird. Der Färbeansatz muss dann so zusammengestellt werden, dass am Ende sowohl die optimale Endverdünnung des 100K-Pellets als auch des Antikörpers eingestellt werden kann. Ist das Antigen gegen, welches gefärbt wird, nur auf einem Teil der Vesikel vorhanden, kann es sein, dass für die Fluoreszenzmessung eine geringere Verdünnung angefertigt werden muss als für die Messung im *Scatter*-Modus. All diese Dinge müssen individuell getestet und auf die jeweilige Probe bzw. den jeweiligen Antikörper angepasst werden.

3.6.2. CD81 Färbung von MelDCC10a 100K-Pellets

Die 100K-Pellets werden auf Eis aufgetaut und kurz abzentrifugiert. In einem *1,5 ml Protein LoBind Tube* werden 8 µl PBS vorgelegt, 1 µl 100K-Pellet und 1 µl anti-human CD81 Antikörper zugegeben. Der Ansatz wird durch Resuspendieren durchmischt und für 30 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wird 1 µl des Färbeansatzes in 10 ml PBS verdünnt, so dass die Verdünnung des Antikörpers und des 100K-Pellets 1:100.000 beträgt.

3.6.3. Zeta View Messung

Zum Setup des Geräts wird den Anweisungen in der Software gefolgt. Anschließend wird die Probe mit einer 1 ml Feindosierungsspritze, möglichst ohne Luftblasen zu erzeugen, aufgezogen und 500 µl in den Injektionsport des Zeta View Geräts injiziert. Im *Measurement* Fenster der Zeta View Software wird *run video acquisition*, der Speicherort und die gewünschte SOP ausgewählt. Außerdem wird bei FBS Export ein Hacken gesetzt, damit die Daten später in FlowJo analysiert werden können. Die Messung kann jetzt gestartet werden.

Die Konzentration und Größe aller Partikel in der Probe werden im *Scatter*-Modus bestimmt. Bei Vesikeln wird bei einer *sensitivity* von 80, *trace length* von 15 und *frame rate* von 30 gemessen. Diese Einstellungen sind als SOP: Scatter_EV_SMG in der Software hinterlegt.

Die Konzentration und Größe der CD81 gefärbten Vesikel werden durch Einschieben eines 500 LP Fluoreszenzfilters bestimmt. Im Fluoreszenzkanal wird bei einer *sensitivity* von 95-97, *trace length* von mind. 7 besser 10 (je nach Stabilität des *dyes*) und *frame rate* von 30 gemessen. Weiterhin wird die

low bleach Funktion aktiviert, um das Ausbleichen des Farbstoffes zu minimieren. Für den PE/Dazzle 594 konjugierten CD81 Antikörper sind die Einstellungen in der SOP: SMG_LP500_PE-Dazzle in der Software hinterlegt.

3.7. Größenausschlusschromatographie (SEC)

Die SEC wird durchgeführt, um über Ultrazentrifugation angereicherte extrazelluläre Vesikel von möglicherweise mit aufgereinigten Proteinen zu trennen.

3.7.1. Kalibrierung der Säule

Nach dem ersten Ultrazentrifugationsschritt (100.000g für 90 min, siehe Isolation extrazellulärer Vesikel durch differentielle Ultrazentrifugation) werden die 100K-Pellets aus den 6 Zentrifugenröhrchen gepoolt, die Zentrifugenröhrchen mit PBS nachgewaschen und ebenfalls zu den 100K-Pellets gepoolt. Das Endvolumen von 3 ml wird in ein 5 ml *Protein LoBind* Tube überführt und auf Eis an das Institut für Pharmazeutische Technologie transportiert. Zur Auftrennung des 100K-Pellets in Vesikel- und Protein-Fraktion wird eine SEC-Säule des Instituts für Pharmazeutische Technologie verwendet. Die Säule besteht aus einer *Plastic XXL Column* gefüllt mit 2 % *BCL Agarose Bead Standard* (50 - 150 μm) und einer zusätzlichen *Plastic XXL Column* Fritte. Die 100K-Pellets werden auf die SEC-Säule geladen, welche über einen Schlauch an eine Durchflusszelle aus Quarz angeschlossen ist, die in den *Zetasizer Nano ZS* eingefügt wird. Dies ermöglicht die Messung der *count rate* (in *kilocounts* pro Sekunde) und die Berechnung der intensitätsgewichteten Größe der Partikel im Durchfluss in Echtzeit. Sobald die 3 ml in die Säule gelaufen sind, wird die Messung gestartet und die Säule mit PBS beladen. Der Durchfluss wird bis zu einer *count rate* < 100 kcps in einem 50 ml Falcon Tube aufgefangen und als Fraktion 1 bezeichnet. In einem neuen 50 ml Falcon Tube wird die Fraktion 2 aufgefangen, bis die *count rate* wieder unter 300 kcps sinkt. Fraktion 3 wird in einem neuen 50 ml Falcon Tube aufgefangen, bis die Probe komplett durch die Säule gelaufen ist (zu sehen an der Phenolrot Bande aus dem EV Produktionsmedium). Die 50 ml Falcon Tubes werden abgewogen, um das exakte Volumen der Fraktionen zu bestimmen.

Wird der Durchfluss erst aufgefangen, wenn die Probe vollständig in die Säule eingezogen ist, befindet sich das Ende von Fraktion 2 immer an der gleichen Stelle, unabhängig davon wie viel auf die Säule geladen wird. Somit kann bei der zukünftigen Verwendung der Säule die Summe des Volumens von Fraktion 1 und 2 (21,5 ml) als Vesikel-Fraktion und das Volumen von Fraktion 3 (35 ml) als Protein-Fraktion aufgefangen werden. Die Säule ist damit für die Auftrennung der 100K-Pellets nach der ersten Ultrazentrifugation kalibriert.

3.7.2. Isolation von Vesikel- und Protein-Fraktion aus 100K-Pellets

Die gepoolten 100K-Pellets aus der ersten Ultrazentrifugation werden auf die kalibrierte SEC-Säule geladen. Nachdem die Flüssigkeit vollständig eingezogen ist, werden 21,5 ml (Vesikel-Fraktion) in einem 38,5 ml Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Weitere 35 ml (Protein-Fraktion) des Durchlaufs werden in einem anderen 38,5 ml Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Das Zentrifugenröhrchen mit der Vesikel-Fraktion wird mit PBS aufgefüllt und für 90 min bei 100.000g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird der Überstand vollständig abgenommen, das Pellet der Vesikel-Fraktion in PBS aufgenommen, in 1,5 ml *Protein LoBind* Tubes aliquotiert und bei -80 °C eingefroren. Die Protein-Fraktion wird in zwei Schritten auf ein 50 ml Ultrafiltrationstube geladen und jeweils für 30 min bei 3.200g und 4 °C zentrifugiert, bis das Endvolumen etwa 2 ml beträgt. Die 2 ml werden sukzessive auf ein 500 μl Ultrafiltrationstube geladen und jeweils für 20 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die Membran des 50 ml Ultrafiltrationstubes wird durch Resuspendieren mit 400 μl PBS nachgewaschen und ebenfalls auf das 500 μl Ultrafiltrationstube geladen. Die Ultrafiltration wird so lange wiederholt, bis sich das Volumen auf etwa 30 μl reduziert hat. Die 30 μl werden in ein 1,5 ml *Protein LoBind* Tube überführt, die Membran des 500 μl Ultrafiltrationstubes mit 40 μl PBS

nachgewaschen und ebenfalls in das *LoBind Tube* überführt. Idealerweise wird das Volumen mit PBS auf das gleiche Volumen, in dem die Vesikel-Fraktion aufgenommen wurde, eingestellt, in 1,5 ml Protein LoBind Tubes aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

3.8. CRISPR/Cas9

3.8.1. Optimierung der Elektroporation von MelDCC10a

Zur Bestimmung der besten (hohe Transfektionsrate und Viabilität der Zielzellen) Elektroporationsparameter für die MelDCC10a Linie wird das Optimierungsprotokoll des *Neon™ Transfection Systems* durchgeführt.

Nachdem die Zellen geerntet, in PBS aufgenommen und gezählt wurden, werden 3×10^6 Zellen in ein 1,5 ml Tube überführt und für 5 min bei 300g abzentrifugiert. Der Überstand wird möglichst vollständig abgenommen, das Zellpellet in 270 µl *Resuspension Buffer R* (*Neon™ Transfection System 10 µl-Kit*) aufgenommen und es werden 30 µl pmaxGFP™ Plasmid (0,5 µg/µl) zugegeben. Anschließend werden mit dem *Neon™ Transfection System* 24 x 10 µl (enthalten je 10^5 Zellen und 0,5 µg Plasmid) entsprechend des Optimierungsprotokolls elektroporiert. Hierzu wird eine Spitze aus dem *Neon™ Transfection System 10 µl-Kit* in die Neon Pipette eingesetzt und der Elektroporationsansatz vorsichtig aufgesaugt. Dabei ist darauf zu achten, dass keine Luftblasen aufgesaugt werden, da dies zu einem Kurzschluss führen kann. Die Neon Pipette inklusive Spitze wird in die *Pipette Station* eingesetzt und das Vorhandensein von *Electrolytic Buffer* im Neon Tube sichergestellt. Nach Durchführung der Elektroporation wird die Probe in ein *Well* einer 24 *Well*-Platte, in dem sich 0,5 ml auf 37 °C vorgewärmtes Standard-Zellkulturmedium ohne Pen/Strep befinden, pipettiert. Nachdem alle 24 Elektroporationen durchgeführt wurden, werden die Zellen durch leichtes Schwenken der Platte gleichmäßig verteilt und für 24 h bei 37 °C inkubiert.

Nach 24 h wird das Medium abgenommen, in FACS Tubes überführt und es werden jeweils 600 µl PBS in jedes *Well* pipettiert. Zum Überstand in den FACS Tubes werden ebenfalls 600 µl PBS gegeben und die FACS Tubes im Kühlschrank gelagert. Von jedem *Well* der 24 *Well*-Platte wird am OLYMPUS IX81 Mikroskop ein repräsentatives Durchlichtbild und ein Bild im FITC Kanal aufgenommen. Das PBS aus den *Wells* wird ebenfalls in die FACS Tubes überführt und die Zellen werden mit 300 µl Trypsin/ EDTA abgelöst. Um das Trypsin/EDTA abzulöschen werden 300 µl Standard-Zellkulturmedium zugegeben und die Zellsuspension in das jeweilige FACS Tube überführt. Anschließend wird eine *Viability Dye* Färbung durchgeführt, die Zellen werden fixiert (siehe Antikörperfärbung für Durchflusszytometrie und FACS) und das GFP und *Viability Dye* Signal wird am Durchflusszytometer gemessen. Anhand der Transfektionseffizienz (GFP Signal) und dem Prozentsatz lebender Zellen (*Viability Dye*) kann das optimale Elektroporationsprogramm für MelDCC10a identifiziert werden.

3.8.2. CD155 und CD276 Knock-out in MelDCC10a Zellen

Mit Hilfe des Alt-R CRISPR-Cas9 Systems und des *Neon™ Transfection Systems* sollen die Gene CD155 und CD276 in der Zelllinie MelDCC10a ausgeknockt werden. Die verwendeten crRNAs sind in Tabelle 3 aufgeführt. Da die Volumina der einzelnen Komponenten im 1x Ansatz zu gering sind, muss entsprechend ein *Mastermix* angefertigt werden, der es erlaubt die Komponenten zuverlässig zu pipettieren. Wenn nicht anders angegeben wird ausschließlich in 0,2 ml PCR Tubes gearbeitet.

a) Vorbereitung der *guide RNA* (gRNA)

Zuerst müssen die RNA Oligos in IDTE pH 7.5 auf eine finale Konzentration von 200 µM rekonstituiert werden (2 nmol in 10 µl IDTE; 5 nmol in 10 µl IDTE). Anschließend werden, wie in Tabelle 10 aufgeführt, tracrRNA und crRNA in gleichen Verhältnissen gemischt, wobei für jede crRNA ein separater Ansatz pipettiert werden muss.

Tabelle 10: Herstellung gRNA

Reagenzien	1x Ansatz	Finale Konzentration
tracrRNA (200 µM)	0,11 µl	44 µM
crRNA (200 µM)	0,11 µl	44 µM
IDTE pH 7.5	0,28 µl	-
Gesamt	0,5 µl	-

Der Ansatz aus Tabelle 10 wird für 5 min bei 95 °C in einem Heizblock inkubiert und anschließend außerhalb des Heizblocks auf Raumtemperatur abgekühlt.

b) Vorbereitung des Cas9 Enzyms

Das Cas9 Enzym muss wie in Tabelle 11 aufgeführt auf eine finale Konzentration von 36 µM verdünnt werden.

Tabelle 11: Verdünnung des Cas9 Enzyms

Reagenzien	1x Ansatz	Finale Konzentration
Alt-R® S.p. HiFi Cas9 Nuclease V3, 100 µg	0,2 µl	36 µM
IDTE pH 7.5	0,3 µl	-
Gesamt	0,5 µl	-

c) Formierung des RNP Komplexes

Im nächsten Schritt werden 0,5 µl gRNA (Tab. 10) mit 0,5 µl Cas9 Enzym (Tab. 11) kombiniert und für 10 bis 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die Formierung des RNP-Komplexes zu gewährleisten.

d) Vorbereitung der Elektroporation

Der *Electroporation Enhancer* muss in IDTE pH 7.5 auf eine Konzentration von 100 µM rekonstituiert werden (2 nmol in 20 µl IDTE). Für den Elektroporationsansatz muss der *Electroporation Enhancer* weiter verdünnt werden, um eine finale Konzentration von 10,8 µM zu erreichen (Tab. 12).

Tabelle 12: Finale Verdünnung *Electroporation Enhancer*

Reagenzien	1x Ansatz	Finale Konzentration
<i>Electroporation Enhancer</i> (100 µM)	0,216 µl	10,8 µM
IDTE pH 7.5	1,784 µl	-
Gesamt	2 µl	-

Die gewünschte Anzahl an Zellen, die insgesamt elektroporiert werden soll, wird in ein 1,5 ml Tube überführt, pelletiert und mit PBS gewaschen. Anschließend wird der Überstand möglichst vollständig abgenommen und die Zellen werden pro 10⁵ Zellen in 9,75 µl *Resuspension Buffer R* resuspendiert. Jetzt können, wie in Tabelle 13 aufgeführt, alle Komponenten vereint werden.

Tabelle 13: Finaler Elektroporationsansatz

Reagenzien	1x Ansatz	Finale Konzentration
Zellsuspension in <i>Resuspension Buffer R</i>	9	-
RNP Komplex	1	1,8 µM gRNA/ 1,5 µM Cas9
<i>Electroporation Enhancer</i> (10,8 µM)	2	1,8 µM
Gesamt	12 µl	-

e) Durchführung der Elektroporation

Es wird eine Spitze aus dem *Neon™ Transfection System 10 µl-Kit* in die Neon Pipette eingesetzt und der Elektroporationsansatz vorsichtig aufgesaugt. Dabei ist darauf zu achten, dass keine Luftblasen aufgesaugt werden, da dies zu einem Kurzschluss führen kann. Die Neon Pipette inklusive Spitze wird in die *Pipette Station* eingesetzt und das Vorhandensein von *Electrolytic Buffer* im Neon Tube sichergestellt. Mit der Einstellung 1600 V Puls-Spannung, 10 ms Puls-Weite, 3 Pulse kann jetzt elektroporiert werden. Die elektroporierten Zellen werden in ein *Well* einer 24 *Well*-Platte, in dem sich 0,5 ml auf 37 °C vorgewärmtes Standard-Zellkulturmedium ohne Pen/Strep befinden, überführt und langsam resuspendiert. Werden mehrfach Zellen mit dem gleichen RNP Komplex elektroporiert, kann die Spitze mehrfach verwendet werden.

f) Sortieren der Knock-out-Zellen

Die Zellen werden für 24 h in der 24 *Well*-Platte bei 37 °C inkubiert, am nächsten Tag abgelöst und die *Wells*, welche mit den gleichen Bedingungen elektroporiert wurden, in ein passendes *Well* oder eine passende Zellkulturflasche gepoolt. Anschließend werden die Zellen für weitere 72 h in Standard-Zellkulturmedium kultiviert, bevor sie für die durchflusszytometrische Sortierung vorbereitet werden. Es wird eine FACS Färbung mit dem Antikörper, der gegen das Produkt des ausgeknockten Gens gerichtet ist, durchgeführt. Die negativen Zellen werden herausortiert und ihrer Anzahl entsprechend in einer passenden Zellkulturplatte oder Zellkulturflasche kultiviert. Nachdem die Zellen bis zu einer ausreichenden Anzahl expandiert wurden, können Kryostocks angefertigt werden. Um den Anteil der Zellen zu bestimmen, in denen das Gen erfolgreich ausgeknockt wurde, wird vor dem Wegfrieren ein Aliquot abgenommen und erneut eine FACS Färbung mit dem Antikörper, der gegen das Produkt des ausgeknockten Gens gerichtet ist, durchgeführt.

3.9. Western Blot

3.9.1. Herstellung von Zell-Lysaten

Die geernteten Zellen werden in ein 1,5 ml *Protein LoBind Tube* überführt und 2-mal mit 1 ml PBS gewaschen. Das PBS wird vollständig abgenommen, das Pellet pro 5×10^6 Zellen in 50 µl RIPA Puffer mit Protease Inhibitor resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wird bei 4 °C und maximaler Geschwindigkeit für 10 min zentrifugiert, um Membranbestandteile vom Zell Lysat abzutrennen. Der Überstand enthält das Zell Lysat und kann jetzt in 1,5 ml Protein LoBind Tubes aliquotiert und bei -80 °C eingefroren werden.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgt mittels BCA Assay mit dem Pierce™ BCA Protein Assay Kit gemäß der Herstellerangaben. Der Assay wird als *Microplate procedure* auf 96 *Well*-Platten durchgeführt, wobei 10 µl des Zell Lysats und der Standards eingesetzt werden. Die Messung der Absorbanz wird am FLUOstar Omega Microplatten Reader bei einer Wellenlänge von 562 nm vorgenommen. Anschließend wird in Excel eine Standardkurve erstellt und die Proteinkonzentration der Zell Lysate, durch Einsetzen ihrer Absorbanz in die Geradengleichung, berechnet.

3.9.2. SDS-Gelelektrophorese

Von Lysaten aus Zelllinien werden im ersten Versuch immer 10 µg pro Tasche des Gels geladen. Die Proteinmenge kann je nach Expression des Zielproteins und der Qualität des Antikörpers angepasst werden. Zuerst werden zu 10 µg des Zell Lysats (oder EVs produziert von $2,5 \times 10^6$ Zellen) 2,5 µl 4x Laemmli Puffer mit 10 % 2-Mercaptoethanol gegeben und mit PBS auf 10 µl Endvolumen aufgefüllt. Ist die Konzentration des Lysats zu gering muss die Menge an Laemmli Puffer dem Endvolumen entsprechend angepasst werden. Das Gemisch wird für 5 min bei 95 °C inkubiert, um die Proteine zu denaturieren, anschließend kurz auf Eis abgekühlt und bei maximaler Geschwindigkeit kurz abzentrifugiert.

Die *Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Precast Gels* werden in die Vorrichtung eingesetzt (wird nur ein Gel verwendet muss ein Dummy eingesetzt werden), mit 1x SDS Laufpuffer aufgefüllt und in die Gelkammer gestellt. Die Gelkammer wird bis zur entsprechenden Markierung ebenfalls mit 1x SDS Laufpuffer aufgefüllt und die Taschen der Gele werden mit einer 200er Pipette ausgespült. Jetzt können die Proben in die Taschen geladen werden, wobei in die erste Tasche immer 10 µl des Größenstandards (Mischung aus 5 µl *Unstained Protein Standard* und 5 µl *All Blue Prestained Protein Standard*) aufgetragen werden. Sind die Taschen beladen, wird das *Lid* aufgesetzt und eine Spannung von 100 V angelegt. Ist die Lauffront unter dem schwarzen Strich angekommen oder die gewünschte Bande des Größenstandards aus dem Gel gelaufen, kann das Gel gestoppt werden.

3.9.3. Blotten der Proteine auf eine PVDF Membran

Das Gel wird aufgebrochen, in ein Schälchen mit 1x TOWBIN/SDS Transfer Puffer überführt und für 10 min equilibriert. Während das Gel equilibriert, wird eine PVDF Membran (6 x 8,5 cm) für ca. 1 min in Methanol aktiviert und anschließend in ein Schälchen mit 1x TOWBIN/SDS Transfer Puffer gegeben. Außerdem werden zwei 7 x 9 cm große *Whatman Paper* in 1x TOWBIN/SDS Transfer Puffer angefeuchtet. Ist die Equilibrierung des Gels abgeschlossen, wird ein *Whatman Paper* auf die *Blotting* Kassette gelegt, darauf die Membran, dann das Gel und zum Schluss wieder ein *Whatman paper*. Nach jeder Schicht werden mit einem Roller Luftblasen entfernt. Die *Blotting* Kassette wird geschlossen, in das *Trans-Blot Turbo Transfer System* eingesetzt und für 30 min eine konstante Spannung von 25 V angelegt.

3.9.4. Antikörperfärbung

Nachdem das Blotten abgeschlossen ist, wird die Membran für eine Stunde in 1x TBST + 5 % Magermilchpulver blockiert, um freie Bindestellen abzusättigen. Der primäre Antikörper wird nach den Angaben des Herstellers in 1x TBST + 5 % Magermilchpulver verdünnt. Ist das Blockieren abgeschlossen, wird die Membran in ein 50 ml Falcon Tube überführt und mit 5 ml der primären Antikörperlösung über Nacht im 4 °C Kühlraum auf dem Roller inkubiert. Am nächsten Morgen wird die Membran 3-mal für 10 min auf dem Roller mit 1x TBST gewaschen, um ungebundenen primären Antikörper zu entfernen. Der sekundäre HRP gekoppelte Antikörper wird 1:10.000 in 1x TBST + 5 % Magermilchpulver verdünnt. Anschließend wird die Membran für 2 h mit 10 ml der sekundären Antikörperlösung unter Rollen bei RT inkubiert. Die Membran wird nach den 2 h Inkubation erneut 3-mal für 10 min auf dem Roller mit 1x TBST gewaschen und ist dann bereit „entwickelt“ zu werden.

3.9.5. Blot „entwickeln“

Das ECL Reagenz wird 1:1 aus den Komponenten des Kits (*SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate*) gemischt. Die Membran wird auf den Schirm des *ChemiDoc MP Imaging Systems* gelegt, durch Rollen von Flüssigkeit befreit und mit 1 ml EL Reagenz, das durch Rollen gleichmäßig verteilt wird, inkubiert. Während der Inkubationszeit kann ein kalorimetrisches Bild gemacht werden, um die Banden des Größenstandards zu visualisieren. Das ECL Reagenz wird durch Rollen entfernt und die Chemilumineszenz der HRP wird aufgezeichnet. Die Einstellungen am Gerät

müssen je nach Stärke des Signals und der Qualität des Antikörpers angepasst werden. Aufnahmen werden entweder im Manuellen- oder im *Optimal Auto Exposure* Modus in der höchsten Auflösung gemacht. Die Bilder werden im tiff Format und im Image Lab kompatiblen Format vom *Imager* auf ein portables Speichermedium transferiert. Die Analyse und Bildbearbeitung erfolgen zuerst in der *Image Lab Software* und anschließend in *Power Point*.

3.9.6. *Stain Free Gel*

Wird ein *Stain Free Gel* von Bio-Rad verwendet kann das Gel vor dem Blotten am *Imager* für 45 sek. aktiviert werden und anschließend im *Optimal Auto Exposure* Modus aufgenommen werden. Dadurch wird das gesamte Protein auf dem Gel sichtbar gemacht. Weiterhin kann das Gel nach dem Blotten erneut aufgenommen werden, um die Effizienz des Blottens zu evaluieren. Wurde das Gel vor dem Blotten aktiviert, können die erfolgreich transferierten Proteine auf der Membran aufgenommen werden. Diese Aufnahme kann später zur Normalisierung von Antikörperbanden auf das Gesamt-Protein in einer Spur verwendet werden.

3.10. Massenspektrometrische Untersuchung der 100K-Pellets

Die 100K-Pellets wurden nach der zweiten Ultrazentrifugation bei 100.000g in 100 µl GASP Puffer aufgenommen und bei -80 °C weggefroren. Anschließend wurden die Proben an Katharina Limm vom Institut für funktionelle Genomik (AG Oefner, Universität Regensburg) übergeben und dort für die massenspektrometrische Messung aufbereitet, bevor die Messung der Proben in zwei unterschiedlichen Modi erfolgte. Einmal in einer Daten-abhängigen Messung (DDA) für die Generierung der Peptid-Bibliothek und einmal in einer Label-freien Daten-unabhängigen Quantifizierung (SWATH/DIA). Hierzu wurde die Eksigent nanoLC400 (Sciex) gekoppelt mit einem Hybrid-Quadrupol-TOF Massenspektrometer TTOF5600+ (Sciex) verwendet. Die Prozessierung der DDA-Läufe wurde mit der ProteinPilot™ Software (Version 5.0; Sciex) durchgeführt. Die erhaltene Peptid-Bibliothek wurde dann für die Analyse der SWATH/DIA-Läufe herangezogen. Die hierzu verwendete Software PeakView™+MikroApp 2.2 (Sciex) ermöglichte so die Quantifizierung der Proteine. Die Proteindaten wurden dann auf „Gesamtintensität“ aller Proteine einer Probe normiert, bevor Mittelwert, Standardabweichung, *fold change* (FC) und der nach Benjamini-Hochberg korrigierte p-Wert berechnet wurden (Signifikanzlevel 0,05). Die weitere Auswertung erfolgte mit der Software Perseus.

3.11. Testen der EV-Aufnahme durch Makrophagen

Die Monozyten wurden von der AG Rehli (UKR) durch Elutriation aus humanen PBMCs gewonnen und zu 150.000 Zellen in 250 µl GM-CSF Medium auf 48 *Well*-Platten ausgesät. Am Tag 3 werden die jetzt in Makrophagen differenzierten Zellen mit CFSE-gefärbten EVs inkubiert.

3.11.1. CFSE Färbung von Vesikeln

Es werden Vesikel von ca. 25×10^6 Zellen in 50 µl PBS aufgenommen. CFSE (5 mM) wird 1:100 in PBS verdünnt und 2 µl dieser Verdünnung werden auf die Vesikel in 50 µl PBS und als Kontrolle auf 50 µl reines PBS gegeben (Endkonzentration CFSE beträgt dann 2 µM). Die Vesikel und das PBS werden für 10 min im Dunkeln bei 37 °C gefärbt. Anschließend wird das CFSE mit 6 µl EV-freiem FBS (Überstand von FBS das für 16 Stunden bei 100.000g zentrifugiert wurde) inaktiviert und jeweils die Hälfte der gefärbten Vesikel bzw. der PBS Kontrolle auf ein *Well* der 48 *Well*-Platte mit den Makrophagen pipettiert. Die Zellen werden für 4 Stunden bei 37 °C mit den Vesikeln bzw. der Kontrolle inkubiert.

3.11.2. Ernte der Makrophagen

Nach 4 Stunden Inkubationszeit der Makrophagen mit den CFSE-markierten Vesikeln, wird der Überstand abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Das PBS wird abgesaugt, es werden 200 µl Accutase Lösung zugegeben und die Zellen für 10 min bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 500 µl

Standard-Zellkulturmedium wird die Reaktion der Accutase abgestoppt und die Zellen werden durch Resuspendieren gelöst und in FACS Tubes überführt. Die *Wells* werden mit 500 µl PBS nachgewaschen und zu den Zellen in den FACS Tubes gepoolt. Anschließend werden die FACS Tubes bei 300g für 10 min zentrifugiert und der Überstand abgekippt. Vom Restvolumen, welches jetzt ca. 50 µl beträgt, werden 15 µl in ein *1,5 ml Protein LoBind Tube* in dem 285 µl PBS vorgelegt wurden, überführt und für die Färbung auf Haftobjektträger (HOTS) beiseitegestellt. Das restliche Volumen wird für die Durchflusszytometrie verwendet. Hierfür werden die Zellen lediglich mit dem *Viability Dye* gefärbt und anschließend am Durchflusszytometer gemessen (siehe Abschnitt Antikörperfärbung für Durchflusszytometrie und FACS).

3.11.3. Färbung auf HOTS

Die 300 µl Zellsuspension, die für die Färbung auf HOTS beiseitegestellt wurde, wird auf einen *Spot* eines HOT aufgetragen. Nach 2 Stunden Inkubationszeit im Dunkeln wird die Flüssigkeit von den HOTS seitlich abgekippt und die HOTS über Nacht getrocknet. Am nächsten Morgen können die HOTS entweder direkt gefärbt oder bei -20 °C bis zum Tag der Färbung eingefroren werden.

Nachdem die HOTS für 5 min bei Raumtemperatur aufgetaut sind, werden pro *Spot* 300 µl Blockierungspuffer zugegeben, um die FC Rezeptoren zu blockieren. Die Flüssigkeit wird seitlich abgekippt und die Zellen werden für 60 min mit 3,75 µl Antikörper in 150 µl Blockierungspuffer gefärbt. Anschließend wird dreimal mit jeweils frischem PBS in einer Küvette gewaschen. Danach werden 150 µl von einer 1:10.000 Verdünnung des DAPI Stocks (5 mg/ml) in PBS auf einen *Spot* aufgetragen und für 10 min inkubiert. Es folgen wieder 3 Waschschriffe mit jeweils frischem PBS in einer Küvette. Nach dem dritten Waschschriff wird mit 150 µl Fluoro Fix Puffer für 5 min fixiert und das HOT noch einmal mit PBS gewaschen.

Letzter Schriff ist das *Mounten* mit *Vectashield*. Dafür werden pro *Spot* zwei bis drei Tropfen *Mounting Medium* aufgetragen und vorsichtig ein Deckglas (24 x 60 mm) auf den *Spot* gelegt. Der HOT wird anschließend für mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln getrocknet. Nachdem das *Mounting Medium* getrocknet ist, kann die Probe direkt mikroskopiert oder einige Tage bei 4 °C im Dunkeln gelagert werden. Das *Imaging* erfolgt am *SP8 Confocal Microscope* in Kooperation mit Mathias Raß vom Lehrstuhl für Entwicklungsbiologie. Die Aufnahmen wurden anschließend mit ImageJ bearbeitet.

3.12. Sequenzierung von miRNAs aus EVs

3.12.1. Proteinase und RNase Verdau

Bei der Isolation des 100K-Pellets durch differentielle Ultrazentrifugation werden Ribonukleoproteine (RNPs) und miRNAs mitisoliert, die sich nicht innerhalb der EVs befinden, sondern entweder EV-assoziiert sind oder als Aggregate pelletieren. Diese potenziellen Kontaminanten sollen durch einen Proteinase K und anschließenden RNase A Verdau degradiert werden.

Das 100K-Pellet wird nach dem letzten Zentrifugationsschritt in 100 µl PBS aufgenommen und in ein *1,5 ml Protein LoBind Tube* überführt. Es werden 100 µl 2x Proteinase K Arbeitslösung zugegeben und das Gemisch im Heizblock für 10 min bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wird die Proteinase K durch Zugabe von 10 µl PMSF (100 mM) für 10 min bei Raumtemperatur inaktiviert. Es folgt ein Hitzeinaktivierungsschritt für 10 min bei 65 °C. Nachdem das Tube auf Raumtemperatur abgekühlt ist, werden durch Zugabe von 10,5 µl RNase A für 20 min bei 37 °C miRNAs verdaut, die sich außerhalb der EVs befinden. Im Anschluss werden unter einem Digestorium 3 Volumen (hier 660 µl) Trizol LS zugegeben, vorsichtig resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor mit der RNA Isolation begonnen wird.

3.12.2. RNA Isolation mit TRIzol LS aus EVs und Zelllinien

Da TRIzol LS Phenol enthält, müssen alle Pipettierschritte in einem Digestorium durchgeführt werden. Es wird 1/5 Volumen (hier 176 µl) Chloroform zugegeben und das Gemisch für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit gevortext. Ab jetzt wird auf Eis gearbeitet und alle Zentrifugationsschritte erfolgen bei 4 °C. Um eine Phasentrennung zu erreichen, wird für 10 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Es bilden sich drei Phasen (von oben nach unten: wässrige Phase, Interphase und organische Phase), von denen die wässrige Phase abgenommen und in ein *1,5 ml DNA LoBind Tube* überführt wird. Hierbei ist darauf zu achten nichts von der Interphase zu überführen. Es folgt eine erneute Zugabe von Chloroform, um mögliche Verunreinigungen durch Phenol zu entfernen. Hierzu wird 1/5 Volumen Chloroform zugegeben, für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit gevortext und für 10 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wird abgenommen und in ein neues *1,5 ml DNA LoBind Tube* überführt. Um die RNA zu fällen, wird 2-Propanol zugegeben, so dass ein Endvolumen von 45 % 2-Propanol erreicht wird. Weiterhin wird 1 µl Glykogen zugegeben, welches eine effektivere RNA Fällung ermöglicht und zusätzlich die Sichtbarkeit des Pellets erhöht. Das Tube wird invertiert und die RNA über Nacht bei -20 °C gefällt. Am nächsten Morgen wird die RNA durch Zentrifugation für 30 min bei maximaler Geschwindigkeit pelletiert. Anschließend wird das 2-Propanol abgenommen und das Pellet durch Zugabe von 500 µl eiskaltem 80 % Ethanol (bei -20 °C lagern) gewaschen. Nach Zentrifugation für 30 min bei maximaler Geschwindigkeit wird das Ethanol möglichst vollständig mit einer 1000er Pipette abgenommen. Die restliche Flüssigkeit wird durch kurzes Anzentrifugieren gesammelt und mit einer 20er Pipette entfernt. Das Tube wird für ca. 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, um das restliche Ethanol verdampfen zu lassen. Das Pellet wird in 10 µl *RNase-Free Water* durch Resuspendieren gelöst, kurz anzentrifugiert und für 5 min bei 70 °C im Heizblock inkubiert, um die RNA vollständig im Wasser zu lösen. Das Tube wird erneut kurz anzentrifugiert und bei -80 °C weggefroren.

3.12.3. miRNA Sequenzierung

Die *library preparation*, Sequenzierung und Prozessierung der Daten wird von der AG Meister durchgeführt.

Sequenzierungen im Rahmen der Etablierung des Proteinase und RNase Verdaus

Die *library preparation* wird nach dem *Small RNA cloning (TrueSeq-System)* Protokoll der AG Meister durchgeführt. Anschließend werden die erhaltenen *libraries* im *80 bp single-end* Modus auf dem Illumina MiSeq System sequenziert. Die Prozessierung der Daten wird in folgender Reihenfolge durchgeführt:

- 1) *Adapter trimming (cutadapt: adapter = TGGAATTCTCGGGTGCCAAGG, error-rate = 10%, overlap = 8, discard untrimmed reads)*
- 2) *Collapsing/summing up equal sequences (miRDeep2 mapper: Discard inserts < 18nt)*
- 3) *Annotation to miRNAs (miRDeep2 Quantifier: database = miRBase V22, human miRNAs only, window size 2nt upstream to 5nt downstream w/ 1 mismatch)*
- 4) *Reformatting and merging of result tables (Galaxy tools)*
- 5) *Calculate length distribution (cutadapt + FastQC text output)*

Weiterhin wurde von der AG Meister eine Biotypisierung durchgeführt, wodurch *reads*, die nicht auf miRNAs mappen, anderen RNA Spezies zugeordnet werden können. Die weitere Analyse der Daten erfolgt mit Hilfe der Excel Tabelle in der die *read counts* der einzelnen miRNAs aufgeführt sind.

Sequenzierung von MelDCC2, MelDCC8, MelDCC10a und MelDCC11

Die *library preparation* wird nach dem optimierten *Small RNA cloning* (TrueSeq/AQseq-System; according to V.N. Kim-Group) Protokoll der AG Meister durchgeführt. Anschließend werden die erhaltenen *libraries* im 70 bp single-end Modus auf dem Illumina NextSeq 550 System sequenziert. Die Prozessierung der Daten wird in folgender Reihenfolge durchgeführt:

- 1) *Adapter trimming* (cutadapt: adapter = TGGAATTCTCGGGTGCCAAGG, error-rate = 10%, overlap = 8, discard resulting fragments < 9 nt as well as untrimmed reads)
- 2) *Trimming of 4 Bases from each end of the sequence* (= 4xN introduced with the Ligation adapters; Galaxy trim tool)
- 3) *Collapsing/summing up equal sequences* (miRDeep2 mapper: Discard inserts < 18nt)
- 4) *Annotation to miRNAs* (miRDeep2 Quantifier: database = miRBase V22.1, human miRNAs only, window size 2nt upstream to 5nt downstream w/ 1 mismatch)
- 5) *Reformatting and merging of result tables* (custom R script)
- 6) *Calculate length distribution* (cutadapt + FastQC text output)

Die weitere Analyse der Daten erfolgt mit Hilfe der Excel Tabelle in der die *read counts* der einzelnen miRNAs aufgeführt sind.

3.13. Statistische Auswertungen

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der Software Graph Pad Prism. Die Signifikanzen wurden folgendermaßen angegeben: ns= $p > 0,05$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$.

4. Ergebnisse

4.1. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe

Das Ziel dieser Arbeit ist es, den Prozess der Bildung von metastatischen Kolonien bei Melanompatienten besser zu verstehen und Mechanismen aufzudecken, um neue Therapieansätze zu eröffnen. Eine Möglichkeit diese Mechanismen zu untersuchen, stellen Wächter- und regionale Lymphknoten dar, die im Rahmen der klinischen Diagnostik und therapeutischen Maßnahmen bei Melanompatienten entnommen werden. Hier können mittels Immunzytologie DCC während des gesamten Prozesses der metastatischen Kolonisierung, angefangen von einzelnen gestreuten Melanomzellen bis hin zu Makrometastasen detektiert, isoliert und untersucht werden (Ulmer et al. 2014). Dazu werden die dem Patienten entnommenen Lymphknoten halbiert: eine Hälfte wird mittels Routine-Histopathologie untersucht (Abb. 4 A), die andere Hälfte wird mechanisch disaggregiert, um eine Zellsuspension zu erhalten, aus welcher nach Anfärbung für Melanom-spezifische Marker, wie GP100, gestreute DCC detektiert und isoliert werden können. Die Anzahl der gestreuten Krebszellen pro Million Umgebungszellen (*Disseminated cancer cell density*, DCCD) kann bestimmt werden und stellt ein Maß für den Tumorbefall dar. Abbildung 4 A zeigt exemplarische histopathologische Schnitte von Wächterlymphknoten von Melanompatienten, die für die Melanom-Marker Melan-A und S100 angefärbt wurden und welche DCC vor (*pre-colonizing DCC*, pDCC) und bei der Bildung einer metastatischen Kolonie (*colonizing DCC*, cDCC) zeigen. Bisherige Arbeiten der Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass der mittels Immunzytologie ermittelte DCCD zur Unterscheidung von pDCC und cDCC herangezogen werden kann, mit einem DCCD-Grenzwert von 100 (pDCC = DCCD<100, cDCC = DCCD≥100) (Werner-Klein et al. 2018).

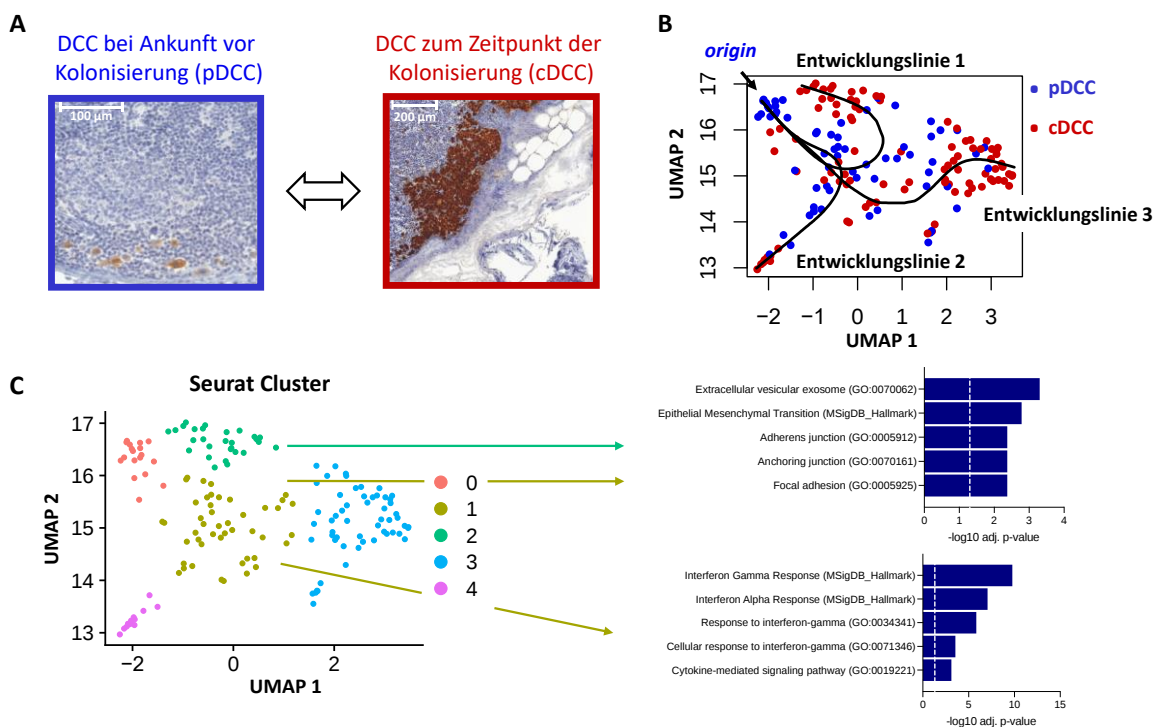


Abbildung 4: Hochregulation des EV-Pathways und der IFN γ -Antwort während der metastatischen Kolonisierung von Lymphknoten. A DCC in Wächterlymphknoten von Melanompatienten vor und während der Kolonisierung des Lymphknotens gefärbt mit den Markern MLANA und S100 welche spezifisch für Melanomzellen sind. B UMAP Darstellung der scRNAseq Daten aus DCC mit simulierten Entwicklungslinien. Das Plotting-Symbol für jede Zelle ist entsprechend des DCCD (DCCD<100 blau, DCCD>100 rot) eingefärbt. C UMAP Darstellung der Einteilung der DCC in Cluster anhand ihrer Genexpression mit der Seurat Methode. Die Gene Ontology Analysen von Clustern 1 (beige) und Cluster 2 (grün) nach scWGA Analyse sind rechts dargestellt. pDCC = *pre-colonizing DCC*, cDCC = *colonizing DCC*. n = 161. Jeder Punkt entspricht einer Zellen. Abbildung A von Melanie Werner-Klein. Abbildungen B und C erstellt von Dr. Huiqin Koerke-Qu.

Um transkriptionelle Änderungen zu identifizieren, die mit dem Übergang von pDCC in cDCC assoziiert sind, wurden pDCC und cDCC aus Wächterlymphknoten von Melanompatienten isoliert und eine Einzelzell-RNA Sequenzierung (scRNAseq) durchgeführt (Daten von Melanie Werner-Klein, Courtney König und Huiqin Koerkel-Qu). Dabei wurde gefunden, dass sich die pDCC während des Auswachsens zu metastatischen Kolonien in drei Linien aufteilen, die sich in ihrer Genexpression (Abb. 4 B) unterscheiden. Eine Seurat Cluster-Analyse über differenziell exprimierte Gene zeigte fünf Gruppen auf (Abb. 4 C). Eine weitergehende Analyse mittels *single cell weighted gene co-expression network analysis* (scWGCNA, Daten Huiqin Koerkel Qu) und *Gene Ontology* Analyse zeigte, dass zum einen in Cluster 1 und 2 der *Extracellular Vesicular Exosome Pathway* (EV-Pathway) stark hochreguliert war und zum anderen in Cluster 1 der Signalweg „*response to interferon gamma*“ (IFN γ -Antwort).

4.2. Identifizierung von Kolonisierungs-assoziierten Veränderungen in der Immunmikroumgebung

Die bekannte Rolle extrazellulärer Vesikel (EVs) als Vermittler der Zell-zu-Zell-Kommunikation und die Anreicherung eines mit einer IFN γ -Antwort assoziiertem Genexpressionsmusters in DCC des Cluster 1 deuteten auf eine Interaktion mit T-Zellen während der beginnenden metastatischen Besiedlung hin, da IFN γ maßgeblich von T-Zellen, während einer Immunantwort sezerniert wird. Da die durchflusszytometrische Analyse von Wächter- und regionalen Lymphknoten von Melanompatienten im Vergleich zu Lymphknoten von Nicht-Tumorpatienten keine mit dem DCCD-assoziierten Veränderungen in der Frequenz der CD4-T-Zellen zeigte (unpublizierte Daten, Melanie Werner-Klein), wurden die Lymphknoten eingehend durchflusszytometrisch auf DCCD-assoziierte Veränderungen hinsichtlich der Frequenz und des Phänotyps von CD8-T-Zellen untersucht. Die Analyse der Aktivierungsmarker PD-1 und TIM-3 erlaubt hierbei einen Rückschluss auf die Funktion der CD8-T-Zellen, da eine Ko-Expression dieser Marker mit einem Funktionsverlust (*exhaustion*) assoziiert ist (Fourcade et al. 2010).

Die ab diesem Absatz gezeigten Daten wurden im Rahmen dieser Arbeit generiert und analysiert. In Abbildung 5 A ist die Frequenz der PD1⁺ TIM3⁺ CD8-T-Zellen in Lymphknoten von Melanompatienten und Patienten ohne Tumorerkrankung als Kontrolle dargestellt. Es zeigte sich, dass, im Vergleich zu den Kontrollpatienten, die Lymphknoten von Melanompatienten mit steigendem DCCD eine steigende Frequenz an PD-1⁺ TIM-3⁺ CD8-T-Zellen aufwiesen. Es ist bekannt, dass der Verlust der Zytokin-Expression ein Kennzeichen von erschöpften (engl. *exhausted*) T-Zellen ist (Fourcade et al. 2010). Wie in Abbildung 5 B zu sehen ist, wiesen die PD1⁺ Tim3⁺ Zellen einen reduzierten geometrischen Mittelwert der Fluoreszenz Intensität (MFI) von IFN γ im Vergleich zu PD1^{+/−} Tim3[−] Zellen auf, was zeigt, dass die Frequenz an *exhausted* CD8-T-Zellen mit steigendem DCCD tatsächlich erhöht war. Um zu untersuchen, ob es sich hierbei um einen lokalen oder systemischen Effekt der zugrundeliegenden Tumorerkrankung handelt, wurden nur jene Melanompatienten betrachtet, von welchen mehrere, aus derselben Region stammende Lymphknoten erhalten werden konnten und welche unterschiedliche DCCD Werte aufwiesen (Abb. 5 B, C). Hier wurde deutlich, dass die erhöhte Frequenz PD1⁺ TIM3⁺ CD8-T-Zellen in Wächter- und regionalen Lymphknoten von Melanompatienten nicht systemisch bedingt, sondern eine Folge der lokalen Tumorlast des jeweiligen Lymphknotens war. Die Daten zeigten aber auch, dass eine hohe Tumorlast nicht zwingenderweise mit einer erhöhten Frequenz an PD1⁺ TIM3⁺ Zellen einherging (Abb. 5 A, C), da es auch Patienten mit Lymphknoten gab, welche einen hohen DCCD aufwiesen, jedoch keine stark erhöhte Frequenz an erschöpften CD8-T-Zellen.

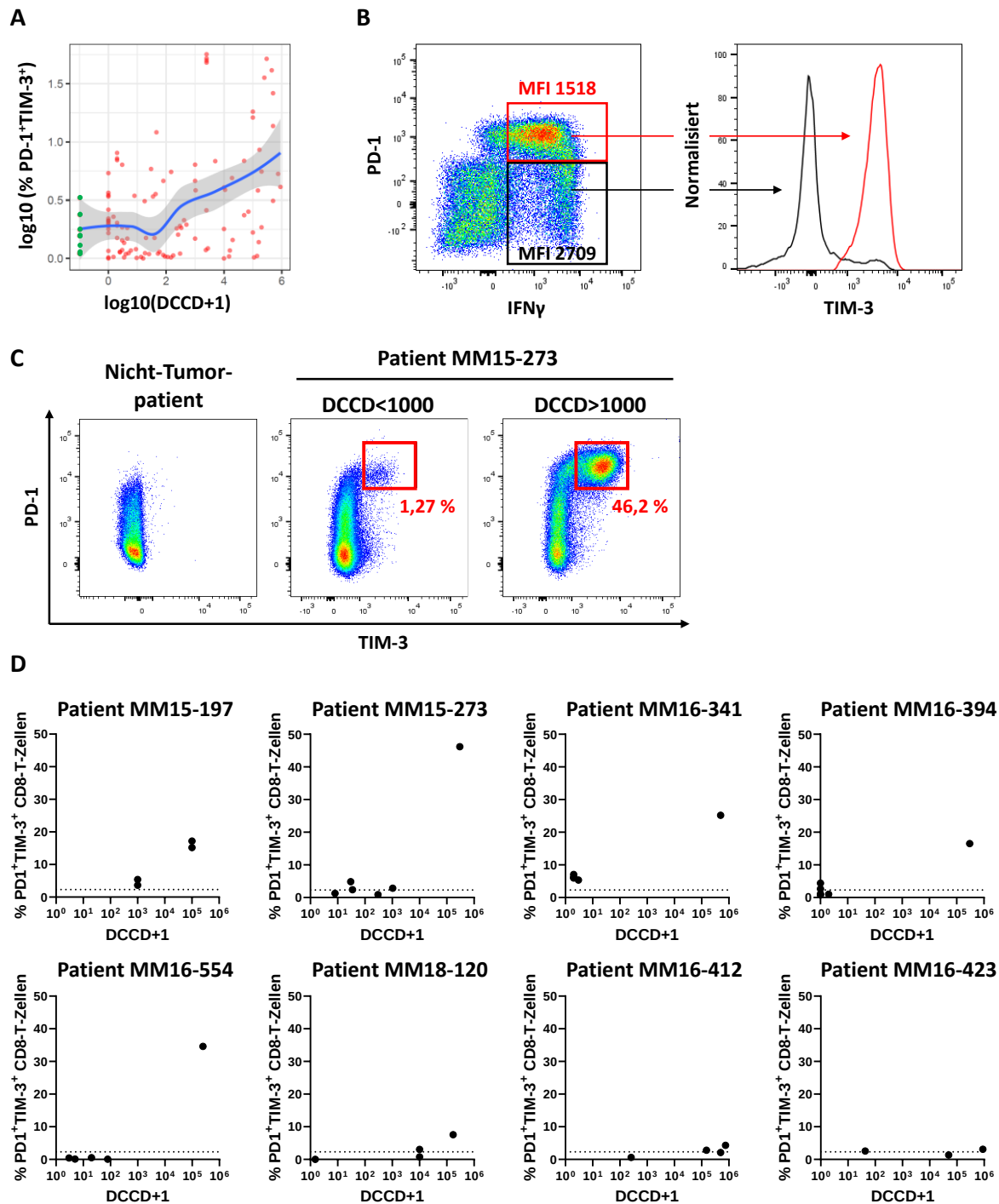


Abbildung 5: Analyse der PD-1 und TIM-3 Expression auf CD8-T-Zellen aus Lymphknoten von Melanompatienten in Abhängigkeit des DCCD. **A** Der log10 des prozentualen Anteils PD-1 und TIM-3 positiver CD8-T-Zellen ist gegen den log10 des DCCD+1 aufgetragen. Die blaue Linie wurde mit der *default smoothing function* berechnet und der graue Bereich stellt den Standardfehler dar. Die grünen Punkte zeigen Lymphknoten von Nicht-Tumorpatienten. Die Lymphknoten mit dem Wert 10⁰ sind DCC frei. n = 115 Lymphknoten, davon 8 Lymphknoten von Nicht-Tumorpatienten. **B** PD-1 und IFN γ Expression von CD8-T-Zellen aus einem Lymphknoten eines Melanompatienten mit DCCD = 250.000 (links). Der Geometrische Mittelwert der Fluoreszenz Intensität (MFI) von IFN γ der PD-1⁺ IFN γ ⁺ (rote Auswahl) und PD-1⁺ IFN γ ⁺ (schwarze Auswahl) Zellen ist aufgeführt. Das Histogramm zeigt die Intensität des TIM-3 Signals der Zellen aus der roten und schwarzen Auswahl (rechts). **C** PD-1 und TIM-3 Expression in einem Lymphknoten eines Nicht-Tumorpatienten und in zwei Lymphknoten aus demselben regionalen Bett mit DCCD kleiner und größer 1000 des Patienten MM15-273. **D** Frequenz PD-1 und TIM-3 ko-exprimierender CD8-T-Zellen in Lymphknoten von 8 Melanompatienten, von welchen mehrere Lymphknoten entnommen wurden und welche unterschiedliche DCCD Werte aufwiesen. Abbildung A erstellt von Dr. Huiqin Koerkel-Qu.

Die Erkenntnisse, dass eine (1) Hochregulierung des *EV-Pathways*, (2) die Signatur einer IFN γ -Antwort in DCC und (3) erhöhte Frequenz erschöpfter CD8-T-Zellen während der metastatischen Kolonisierung auftritt führen zu der prüfbaren Hypothese, ob DCC durch die Abgabe von EVs die umliegenden CD8-T-Zellen inhibieren und damit die metastatische Kolonisierung vorantreiben.

Um diese Hypothese zu überprüfen, sollte ein zelluläres Modell verwendet werden, welches auf Zelllinien basiert, die von DCC abstammen. Von diesen s.g. MelDCC-Linien sollten EVs isoliert, charakterisiert und ihr Effekt auf die Funktionalität von CD8-T-Zellen getestet werden. Hierfür wurde die Zelllinie MelDCC10a ausgewählt, da sie sich durch ein Genexpressions-Profil auszeichnet, welches stellvertretend für die DCC der Entwicklungslinie 1 ist (unpublizierte Daten, Melanie Werner-Klein). Um eine vorbestehende Beeinträchtigung der CD8-T-Zellen durch systemische Auswirkungen der Krebserkrankung auszuschließen, wurden CD8-T-Zellen von gesunden Spendern verwendet.

4.3. Isolierung und Charakterisierung Extrazellulärer Vesikel von MelDCC10a

4.3.1. Detektion von EV-spezifischen Proteinen durch Western Blot

MelDCC10a wurde *in vitro* kultiviert und aus dem konditionierten Medium wurden durch differentielle Ultrazentrifugation (dUZ) mit sukzessiven Zentrifugationen von 2.000g (2K), 10.000g (10K) und 100.000g (100K) Pellets isoliert, die EVs enthalten (Abb. 6 A). Die mit dUZ isolierten Pellets wurden im Western Blot durch Färbung mit spezifischen Markern charakterisiert (Abb. 6 B). Alle Pellets zeigten den universellen EV-Marker HSP70 und es zeigte sich eine Anreicherung von kleinen Vesikeln durch die dUZ, was sich an dem reduzierten Signal für GRP94 (Marker für große Vesikel), dem stärkeren Signal für TSG101 und CD81 (Marker für kleine Vesikel) bei gleichbleibendem GAPDH-Signal ablesen ließ. Als zusätzliche Kontrolle wurde nach der Auftrennung der Proben im SDS-Gel ein Bild des *stain free gels* angefertigt (Abb. 6 C). Hier ist zu sehen, dass in allen Spuren eine vergleichbare Proteinmenge geladen wurde. Da das 2K-Pellet den Marker für große Vesikel stark exprimiert und das 100K-Pellet Marker für kleine Vesikel und Exosomen, wurden diese beiden Pellets weiter untersucht. Das 10K-Pellet stellt eine Mischung aus kleinen und großen Vesikeln dar und wurde deshalb nicht weiter analysiert (Kowal et al. 2016).

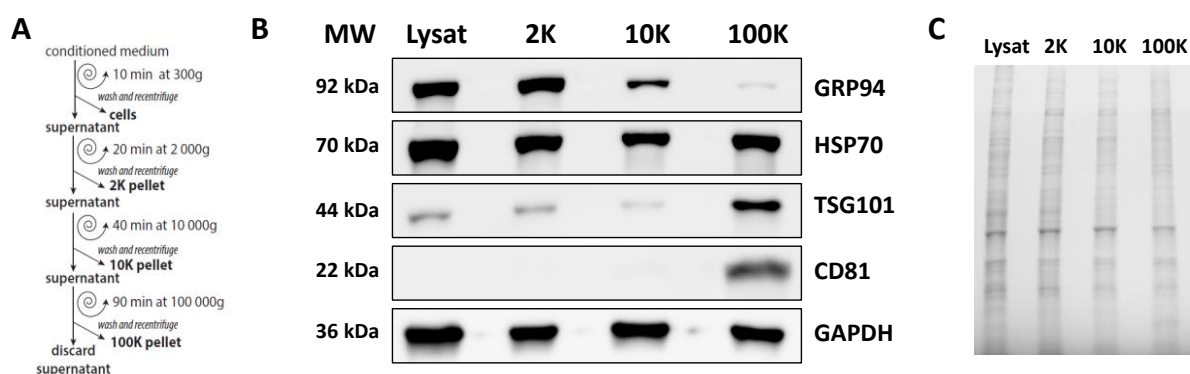


Abbildung 6: Vesikel Marker Western Blot und Gesamtproteinfärbung. **A** Flow Chart der differentiellen Ultrazentrifugation zur Isolation von 2K-, 10K- und 100K-Pellets aus Kowal et al. 2016. **B** Western Blot Analyse von 2K-, 10K- und 100K-Pellets und Zell-Lysat von MelDCC10a. Geladen wurden 15 µg Zell-Lysat und 2K-, 10K- und 100K-Pellets isoliert von 2,5x10⁶ EV-produzierenden Zellen. Die Antikörper wurden in folgenden Verdünnungen eingesetzt: GRP94 (1:1.000), HSP70 (1:1.000), TSG101 (1:1.000), CD81 (1:5.000) und GAPDH (1:1.000). **C** Stain free Image des SDS-Gels nach Auftrennung des geladenen Lysats und der 2K-, 10K- und 100K-Pellets. MW = Molecular Weight, kDa = Kilodalton.

4.3.2. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) von Negativfärbung und Gefrierätzung von EV-Präparationen

Die 2K- und 100K-Pellets wurden anschließend in Kooperation mit Prof. Dr. Reinhard Rachel vom Zentrum für Elektronenmikroskopie der Universität Regensburg am Transmissionselektronenmikroskop (TEM) auf ihre Morphologie hin untersucht. Hierzu wurde zuerst eine Negativfärbung mit Uranylacetat angefertigt, wobei nicht die Probe selbst, sondern der Hintergrund gefärbt wird. Dadurch entsteht ein Kontrast, welcher die Detektion der EVs mit dem TEM möglich macht. In der Negativfärbung des 2K-Pellets waren hauptsächlich Bestandteile des Zytoskeletts toter Zellen zu erkennen. Die dünnen, fadenartigen Strukturen in Abbildung 7 A (schwarze Pfeile) könnten Aktinfilamente darstellen. In Abbildung 7 B ist eine Struktur zu erkennen (schwarzer Pfeil), die ein Vesikel sein könnte. Die beiden gezeigten Bilder sind repräsentativ für alle Aufnahmen der 2K-Pellets und legen nahe, dass es sich beim 2K-Pellet fast ausschließlich um Bestandteile toter Zellen handelt, die bei 2.000g pelletieren.

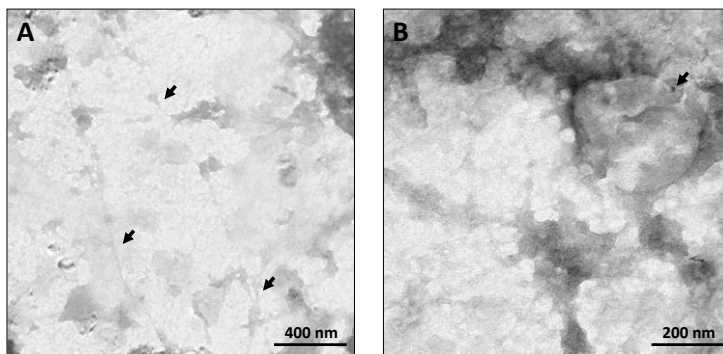


Abbildung 7: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Negativfärbung des 2K-Pellets. A Negativfärbung des 2K-Pellets in 12.000-facher Vergrößerung. Der schwarze Pfeil zeigt auf fadenartigen Strukturen (potenzielle Aktinfilamente). B 20.000-fache Vergrößerung. Der schwarze Pfeil zeigt ein potenzielles Vesikel.

Die TEM-Aufnahme der Negativfärbung des 100K-Pellets in 12.000-facher Vergrößerung zeigt Vesikel in einer Größe von 50 – 300 nm, wobei die kleineren Vesikel deutlich überwiegen (Abb. 8 A). Betrachtet man einen Ausschnitt in einer Vergrößerung von 20.000-fach, sieht man eindeutig die runden Vesikel mit einem Durchmesser von weniger als 200 nm (Abb. 8 B). Die donut-artige Form ist typisch für negativ gefärbte Vesikel und auch die Größe der Vesikel entspricht den aus der Literatur bekannten Werten für 100K-Pellets isoliert durch dUZ.

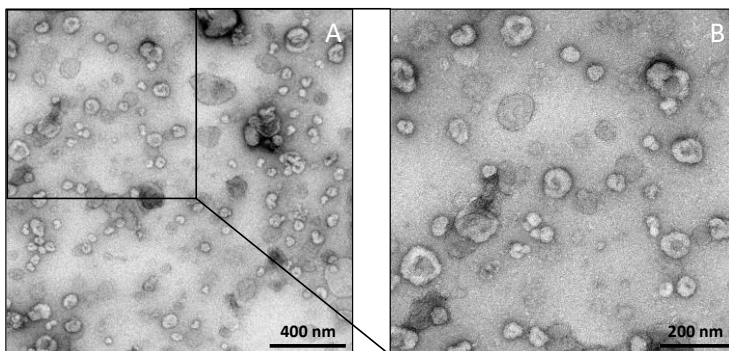


Abbildung 8: Elektronenmikroskopische Aufnahmen einer Negativfärbung des 100K-Pellets. A Negativfärbung des 100K-Pellets in 12.000-facher Vergrößerung. B Ausschnitt von (A) in 20.000-facher Vergrößerung.

Um ein besseres Bild der nativen Form und Struktur der Vesikel zu bekommen, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen einer Gefrierätzung durchgeführt. In der Übersichtsaufnahme sind verschieden große Vesikel zu sehen, die alle eine Runde bis ovale Form aufweisen (Abb. 9 A). Die Aufnahme in der 20.000-fachen Vergrößerung erlaubt einen Blick in die Membran der Vesikel (Abb. 9

B). In der Mitte links von Abbildung 9 B (weißer Pfeil) ist die äußere der beiden Lipidschichten der Membran zu sehen. Die kleinen Strukturen auf der Membran sind Proteine, die in einer Art von Lipid-Rafts angeordnet sein könnten. Es sind Vesikel mit und ohne Proteine in der Membran zu sehen, was auf eine unterschiedliche Ausstattung der einzelnen Vesikel mit Membranproteinen hindeutet.

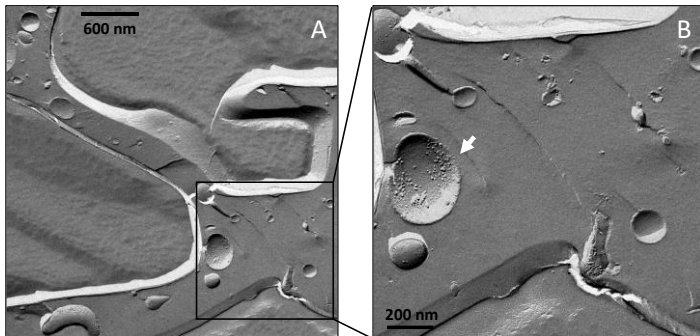


Abbildung 9: Elektronenmikroskopische Aufnahmen einer Gefrierätzung des 100K-Pellets. A Gefrierätzung des 100K-Pellets in 8.000-facher Vergrößerung. B Ausschnitt von (A) in 20.000-facher Vergrößerung. Der weiße Pfeil zeigt ein Vesikel mit Membranproteinen.

Da die elektronenmikroskopische Untersuchung und Western Blot Charakterisierung des 2K-Pellets zeigten, dass es sich hierbei um keine reine Vesikel-Präparation handelt, sondern vielmehr um ein unklares Gemisch aus Zellbestandteilen und Vesikeln, wurde im Folgenden nur mit dem 100K-Pellet weitergearbeitet.

4.3.3. F-NTA Messung der 100K-Pellets

Zur weiteren Charakterisierung des 100K-Pellets wurde eine *Fluorescent Nanoparticle Tracking Analysis* (F-NTA), zum einen im *Scatter*-Modus und zum anderen nach Färbung mit CD81, einem Marker spezifisch für kleine Vesikel, durchgeführt (Kowal et al. 2016). Die Messung im *Scatter*-Modus zeigt die Größenverteilung aller im 100K-Pellet vorhandener Partikel, die Licht streuen (Abb. 10 A). Wird der LP500 Filter verwendet, kann die Größenverteilung der fluoreszenten CD81⁺ Vesikel gemessen werden (Abb. 10 B). Wie in den Histogrammen zu sehen, war die Größenverteilung sowohl für alle Partikel als auch für die CD81⁺ Partikel innerhalb ihrer Replikate nahezu identisch (Abb. 10 A und B). Der Median der Partikelgröße, der für den Marker für kleine Vesikel (CD81) gefärbten Partikel, war erwartungsgemäß mit 118 nm geringer als der Median der im *Scatter*-Modus gemessenen Partikel von 150 nm (Abb. 10 C). Die Anzahl aller Partikel im 100K-Pellet betrug $4,81 \times 10^9$ pro 10^6 EV-produzierender Zellen, wohingegen die Anzahl der CD81 gefärbten Vesikel im 100K-Pellet nur $1,31 \times 10^9$ pro 10^6 EV-produzierender Zellen betrug, was etwa 27 % der Anzahl der im *Scatter*-Modus detektieren Partikel ausmachte (Abb. 10 D).

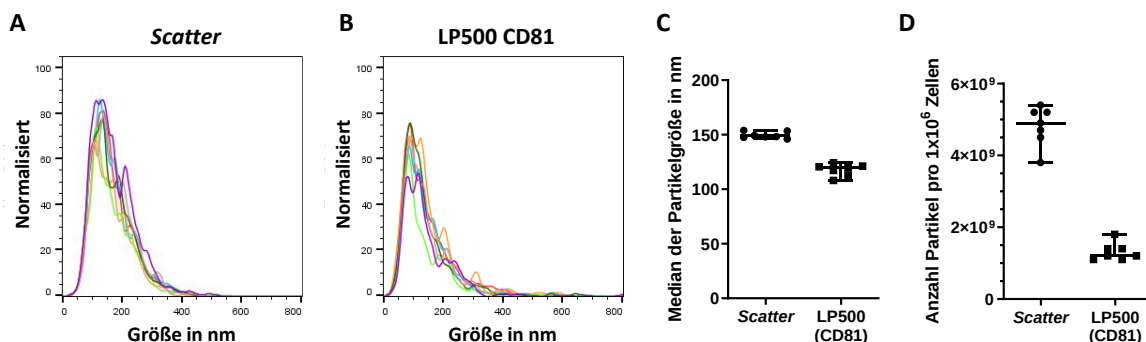


Abbildung 10: F-NTA Messung CD81 gefärbter 100K-Pellets. A und B Histogramm der Größenbestimmung der Partikel im 100K-Pellet im (A) *Scatter*-Modus und (B) Fluoreszenzmodus mit vorgeschobenem LP500 Filter. C Median mit Bereich der Partikelgröße der Proben aus (A) und (B). D Anzahl der Partikel in den Proben aus (A) und (B), normalisiert auf 10^6 EV-produzierende Zellen. n=7.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Charakterisierung der Pellets aus der dUZ zeigt, dass das 2K-Pellet hauptsächlich aus toten Zellen besteht und Vesikel nur in geringer Anzahl vorhanden sind. Es kann somit für funktionelle Assays nicht verwendet werden, da nicht beurteilbar wäre, ob der möglicherweise beobachtete Effekt auf die im Präparat enthaltenden EVs zurückzuführen ist. Das 100K-Pellet jedoch konnte durch die Expression des Exosomen-Markers TSG101, sowie des Markers für kleine EVs CD81 im Western Blot genau definiert werden. Auch die Untersuchung mittels TEM ergab, dass mit dem 100K-Pellet eine EV-Population definierter Morphologie isoliert wird. Die Analyse von 7 Replikaten des 100K-Pellets durch F-NTA hat eine hohe Uniformität der Replikate in Bezug auf Größenverteilung und Anzahl isolierter Partikel gezeigt.

4.4. CD8-T-Zell inhibitorische Wirkung des 100K-Pellets

In diesem Versuch sollte überprüft werden, ob die 100K Pellets von MelDCC10a eine Auswirkung auf CD8-T-Zellen haben. Hierzu wurden CFSE gefärbte CD8-T-Zellen mit Antikörpern, die gegen den T-Zellrezeptor und den kostimulatorischen-Rezeptor CD28 gerichtet sind, stimuliert. Die Folge der Stimulation ist eine Aktivierung der CD8-T-Zellen, was sich in ihrer Proliferation und Differenzierung äußert (Obst 2015). Die Proliferation der CD8-T-Zellen konnte durch Messung der Verdünnung des CFSE Signals am Durchflusszytometer verfolgt werden. Die Differenzierung der CD8-T-Zellen wurde anhand von zwei Aspekten untersucht. Zum einen anhand der Expression der Differenzierungsmarker CD45RA und CCR7 und zum anderen anhand der Expression der Effektor-Moleküle IFN γ und GRZB. Um zu testen, ob die EVs mit der Aktivierung der CD8-T-Zellen oder den Proliferations- und Differenzierungsprogrammen interferieren, wurden die CD8-T-Zellen entweder 16 Stunden vor oder 24 Stunden nach Stimulation mit 100K Pellets behandelt. Vier Tage nach Stimulation wurden die Zellen restimuliert, um intrazelluläre Zytokine messen zu können, und für die Analyse am Durchflusszytometer gefärbt.

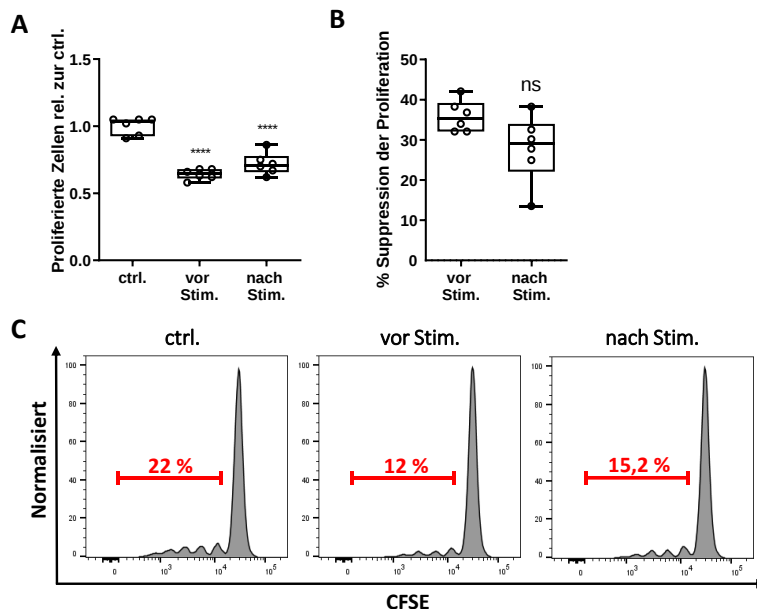


Abbildung 11: CFSE Proliferations-Assay von EV-behandelten CD8-T-Zellen. **A** Änderung des Anteils proliferierter CD8-T-Zellen relativ zur PBS-behandelten Kontrolle (ctrl.), nach Behandlung mit 100K-Pellets von MelDCC10a vor Stimulation (vor Stim.) und nach Stimulation (nach Stim.). Box-Plots mit Whiskers von min. bis max., one way ANOVA mit Dunnetts post hoc Mehrfachvergleich, n = 6. **B** Suppressions Index von 100K vor Stim. und nach Stim., dargestellt als Prozent der Suppression der Proliferation. Suppressions Index = $100 - ((\% \text{ proliferierte Zellen eines Replikats vor Stim. bzw. nach Stim.} / \text{Mittelwert der \% proliferierter Zellen der PBS Kontrolle}) \times 100)$, Zweiseitiger t-Test, n = 6. **C** Histogramme der CFSE Verdünnung je eines Replikats aus (A).

In Abbildung 11 A und C ist die Proliferation der CD8-T-Zellen, behandelt mit EVs vor und nach Stimulation, relativ zur unbehandelten Kontrolle dargestellt. Sowohl vor als auch nach Stimulation mit EVs-behandelte CD8-T-Zellen wiesen eine verglichen mit der Kontrolle, signifikant reduzierte Proliferation auf, wobei der Effekt vor Stimulation deutlicher ausgeprägter war. Es war jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der prozentualen Suppression der Proliferation vor und nach Stimulation festzustellen (Abb. 11 B).

Da die Proliferation der CD8-T-Zellen nach EV-Behandlung eingeschränkt war, wurde untersucht, ob sich auch die Anteile von s.g. Antigen-erfahrenen (engl. *antigen experienced*) T-Zellen und naiven T-Zellen verändert haben. In Übereinstimmung mit der festgestellten reduzierten Proliferation als Folge der Exposition gegenüber EVs, war der Anteil an naiven T-Zellen (CD45RA⁺ CCR7⁺) nach EV-Behandlung größer und der Anteil an Antigen-erfahrenen T-Zellen (CD45RA⁺ CCR7⁻) sank verglichen mit der Kontrolle (Abb. 12). Auch hier war der Effekt stärker ausgeprägt, wenn die EVs bereits vor Stimulation zu den CD8-T-Zellen gegeben worden waren. Die Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung naive CD8-T-Zellen kann entweder durch eine verminderte Aktivierung der naiven CD8-T-Zellen oder eine verminderte Proliferation der Antigen-erfahrenen CD8-T-Zellen nach EV-Behandlung erklärt werden.

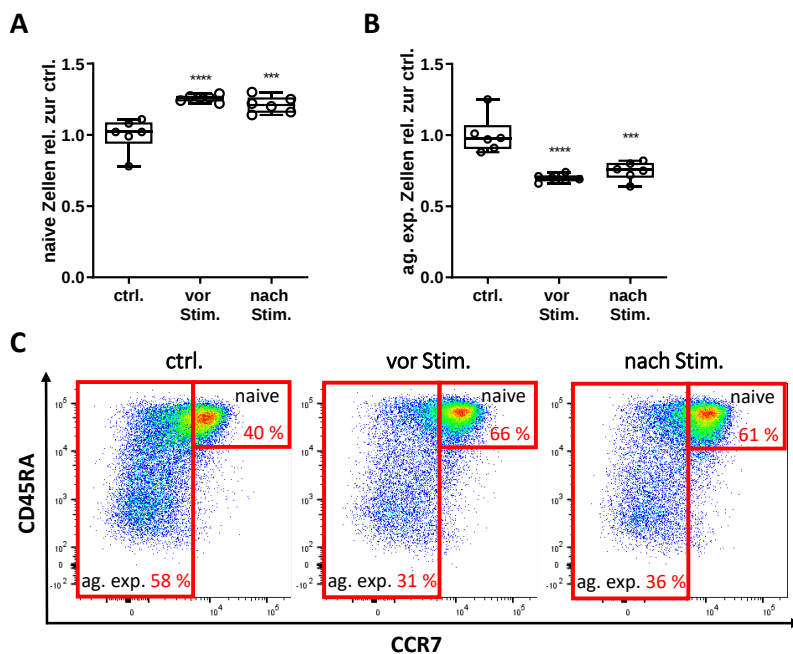


Abbildung 12: Einfluss von EVs auf die Anteile von naiven und Antigen-erfahrenen CD8-T-Zellen. A und B Änderung des Anteils der Naiven (A) und Antigen-erfahrenen (ag. exp.) (B) CD8-T-Zellen relativ zur PBS-behandelten Kontrolle (ctrl.), nach Behandlung mit 100K-Pellets von MelDCC10a vor Stimulation (vor Stim.) und nach Stimulation (nach Stim.). Box-Plots mit Whiskers von min. bis max., one way ANOVA mit Dunnett's post hoc Mehrfachvergleich, n = 6. C Einteilung der T-Zellsubtypen anhand der Expression von CD45RA und CCR7 dargestellt anhand je eines Replikats aus (A).

Mit einer intrazellulären Zytokin Färbung wurden die Effektor-Moleküle IFN γ und GRZB untersucht, welche essenziell sind für die Funktionalität der CD8-T-Zellen, bezogen auf ihre Fähigkeit Tumorzellen zu töten. Abbildung 13 A und B zeigen, dass der Anteil an CD8-T-Zellen, die IFN γ ⁺ sind nach EV-Behandlung sank. Der Unterschied zwischen EV-Behandlung vor Stimulation und nach Stimulation war dabei sehr gering, wobei auch hier der Effekt vor Stimulation stärker war. Auch der Anteil der GRZB⁺ CD8-T-Zellen war nach EV-Behandlung verglichen mit der Kontrolle signifikant reduziert, wobei die Behandlung vor Stimulation auch hier zu einer stärkeren Reduktion der GRZB⁺ CD8-T-Zellen führte (Abb. 13 C und D).

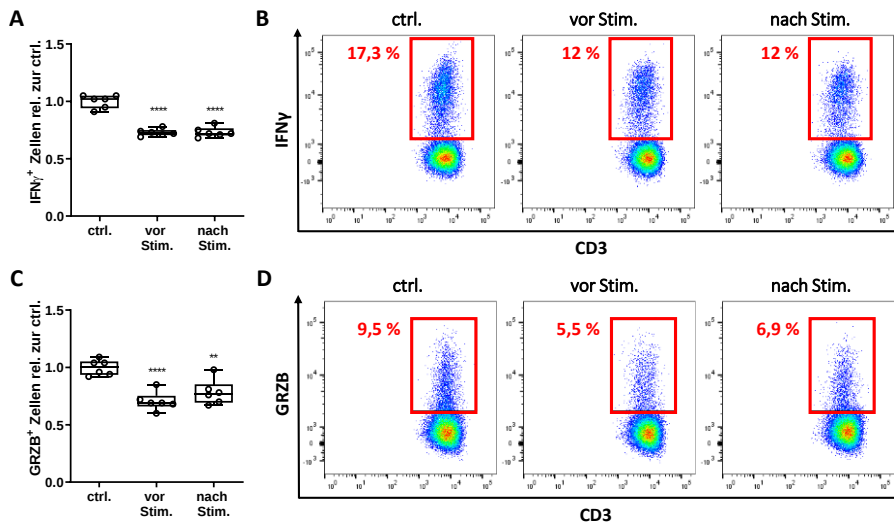


Abbildung 13: Intrazelluläre Färbung von CD8-T-Zellen für die Effektor-Moleküle IFN γ und GRZB nach EV-Behandlung. A und C Änderung des Anteils IFN γ ⁺ (A) und GRZB⁺ (C) CD8-T-Zellen relativ zur PBS-behandelten Kontrolle (ctrl.), nach Behandlung mit 100K-Pellets von MelDCC10a vor Stimulation (vor Stim.) und nach Stimulation (nach Stim.). Box-Plots mit Whiskers von min. bis max., one way ANOVA mit Dunnetts post hoc Mehrfachvergleich, n = 6. B und D IFN γ ⁺ (B) und GRZB⁺ (D) CD8-T-Zellen dargestellt anhand je eines Replikats aus (A) und (C).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Behandlung der CD8-T-Zellen mit EVs, sowohl vor als auch nach Stimulation, einen suppressiven Effekt auf ihre Proliferation und Differenzierung in Antigen-erfahrene Zellen und die Anzahl der IFN γ ⁺ und GRZB⁺ Zellen hat. Dies zeigt, dass die EVs nicht mit der initialen Aktivierung der CD8-T-Zellen, sondern vielmehr mit ihren Proliferations- und Differenzierungsprogrammen interferieren. Wenn die initiale Aktivierung der CD8-T-Zellen durch die EVs eingeschränkt wäre, sollte die EV-Behandlung nach Stimulation einen weitaus geringeren Effekt haben als die EV-Behandlung vor Stimulation.

4.5. Immunsuppressiver Effekt der EVs von vier MelDCC-Zelllinien

Im nächsten Experiment wurde überprüft, ob sich der suppressive Effekt von MelDCC10a EVs auf CD8-T-Zellen auf diese Zelllinie beschränkt oder auch von EVs anderer MelDCC-Zelllinien vermittelt wird. Die EVs von MelDCC2, MelDCC8 und MelDCC11 wurden zusammen mit EVs von MelDCC10a in einem Versuch getestet. Eine verminderte Proliferation der CD8-T-Zellen war nur mit EVs von MelDCC10a zu beobachten (Abb. 14 A). Die Anzahl der IFN γ ⁺ CD8-T-Zellen relativ zur Kontrolle war nach Behandlung mit EVs von MelDCC2, MelDCC8 und MelDCC10a reduziert, nicht jedoch mit EVs von MelDCC11 (Abb. 14 B). EVs von allen vier getesteten Zelllinien führten zu einer Reduktion der GRZB⁺ CD8-T-Zellen relativ zur Kontrolle, wobei der Effekt von MelDCC11 EVs am geringsten ausgeprägt war.

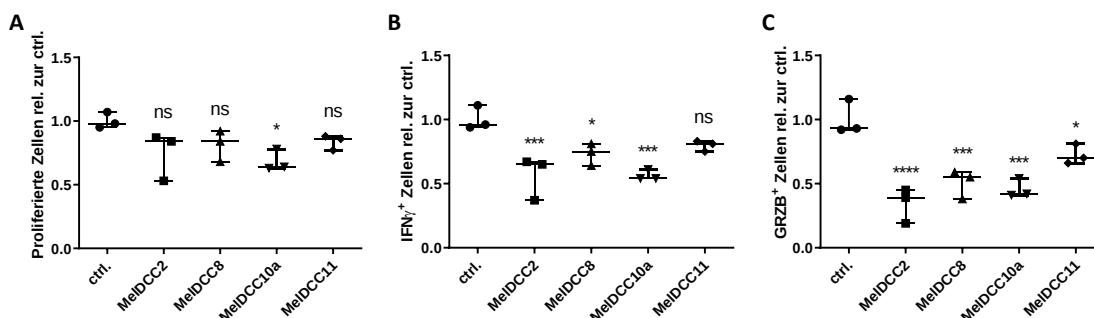


Abbildung 14: Test der EVs von 4 MelDCC-Zelllinien im CD8-T-Zell-Assay. A, B und C Änderung des Anteils proliferierter (A) IFN γ ⁺ (B) und GRZB⁺ (C) CD8-T-Zellen relativ zur PBS-behandelten Kontrolle (ctrl.) nach Behandlung mit EVs von vier verschiedenen MelDCC-Zelllinien. Median mit Bereich, one way ANOVA mit Dunnetts post hoc Mehrfachvergleich, n = 3.

Der immunsuppressive Effekt beschränkt sich also nicht auf EVs der Zelllinie MeIDCC10a, ist aber in Bezug auf zwei der drei getesteten Parameter bei MeIDCC10a am stärksten ausgeprägt.

4.6. Einfluss der Produktionsbedingungen und des Verhältnis von Vesikeln zu CD8-T-Zellen auf die Wirksamkeit der EV-Präparationen im CD8-T-Zell-Assay

4.6.1. EV-Produktion mit und ohne FBS

Da FBS bovine extrazelluläre Vesikel enthält, ist es notwendig das FBS für 18 Stunden in der Ultrazentrifuge von EVs zu befreien, bevor es als Zusatz im Zellkulturmedium benutzt werden kann (Shelke et al. 2014). Die Ultrazentrifugation entfernt aber nicht die bovinen Proteine im FBS, welche sich an die MeIDCC-EVs haften können, und dann passiv mitisoliert werden (Freitas et al. 2019). Weiterhin kann auch RNA nicht vollständig aus dem FBS entfernt werden (Wei et al. 2016). Aus diesen Gründen wurden die Zellen während der EV Produktion in Medium ohne FBS kultiviert.

Um zu testen, ob das fehlende FBS im Medium einen Einfluss auf die Beschaffenheit der EVs hat, wurde mit einer massenspektrometrischen Untersuchung (in Kooperation mit Dr. Katharina Limm vom Institut für funktionelle Genomik der Universität Regensburg) getestet, inwiefern sich EVs, produziert für 48 Stunden in Medium mit EV-depletiertem FBS und ohne FBS, hinsichtlich ihres Proteoms voneinander unterscheiden. Wurden die bovinen Proteine in die Analyse miteinbezogen, gab es viele Proteine, welche in 100K-Pellets, die ohne FBS im Medium produziert worden waren, signifikant geringer und einige die signifikant stärker vertreten waren (Abb. 15). Wurden vor dem Vergleich die bovinen Proteine ausgeschlossen, reduzierte sich die Anzahl der signifikant geringer bzw. stärker vorhandenen Proteine deutlich (Abb. 15). Der Unterschied stammt also hauptsächlich von den passiv mitisolierten bovinen Proteinen aus dem FBS im Medium.

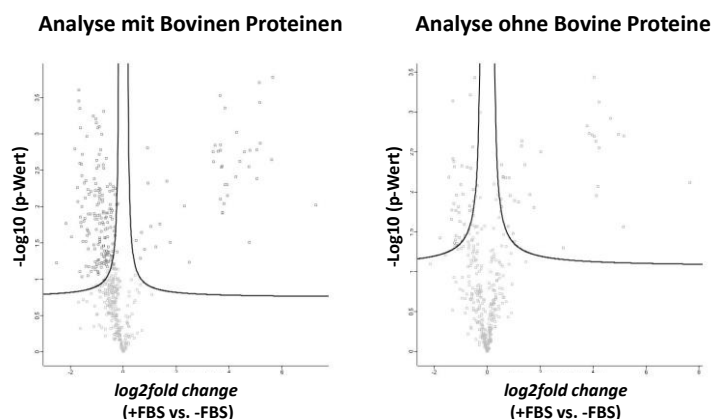


Abbildung 15: Volcano Plot der massenspektrometrischen Untersuchung von EVs produziert mit und ohne FBS. Aufgetragen ist der *Log2fold change* der Proteinexpression der 100K-Pellets, produziert mit EV-depletiertem FBS und ohne FBS, gegen den negativ dekadischen Logarithmus des p-Werts ($-\log_{10}(\text{p-Wert})$). Die schwarzen Linien zeigen an ab welcher Kombination aus *log2fold change* und $-\log_{10}(\text{p-Wert})$ der Unterschied als signifikant angesehen werden kann. Abbildung erstellt von Dr. Katharina Limm.

Im nächsten Versuch wurde getestet, ob die Produktion der EVs in Medium ohne FBS einen Einfluss auf die immunsuppressive Wirkung der EVs auf CD8-T-Zellen hat. Hierzu wurden CD8-T-Zellen vor der Stimulation mit 100K-Pellets behandelt, die mit und ohne FBS von 5×10^6 Zellen produziert worden waren. In Abbildung 16 A und B ist zu sehen, dass die Proliferation der CD8-T-Zellen stärker inhibiert wurde, wenn die EVs ohne FBS produziert worden waren. Die Reduktion der IFN γ und GRZB positiven Zellen war sowohl nach Behandlung mit EVs, die mit FBS produziert worden waren, als auch nach Behandlung mit EVs, die ohne FBS produziert worden waren, signifikant unterschiedlich zur Kontrolle (Abb. 16 C-F). Der Unterschied zwischen den Kulturbedingungen führte nur zu einem statistisch signifikantem Unterschied der Anzahl IFN γ^+ und GRZB $^+$ Zellen, nicht aber der Proliferation.

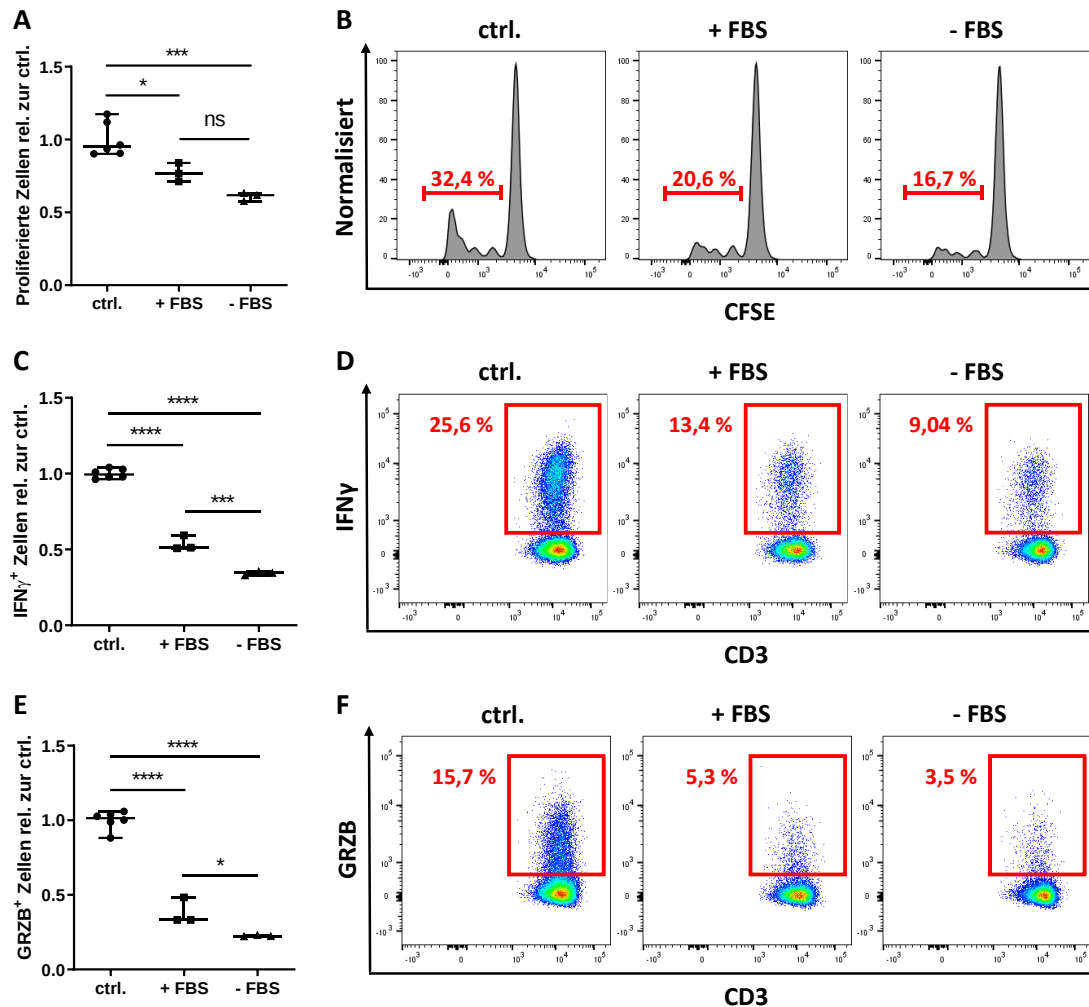


Abbildung 16: Test von EVs produziert mit und ohne FBS im CD8-T-Zell-Assay. A, C und E Änderung des Anteils proliferierter (A) IFN γ ⁺ (C) und GRZB⁺ (D) CD8-T-Zellen relativ zur PBS-behandelten Kontrolle (ctrl.) nach Behandlung mit EVs, produziert mit (+FBS) und ohne FBS (-FBS). Median mit Bereich, *one way* ANOVA mit Tukey's post hoc Mehrfachvergleich, n = 5 und 3. B Histogramme der CFSE Verdünnung je eines Replikats aus (A). D IFN γ ⁺ CD8-T-Zellen dargestellt anhand je eines Replikats aus (C). F GRZB⁺ CD8-T-Zellen dargestellt anhand je eines Replikats aus (E).

Die massenspektrometrische Untersuchung und das Testen der EVs produziert mit und ohne FBS im CD8-T-Zell-Assay haben gezeigt, dass es besser ist, die EVs ohne FBS zu produzieren. Es befinden sich weniger „kontaminierende“ bovine Proteine im 100K-Pellet und der Effekt auf CD8-T-Zellen ist deutlich ausgeprägter.

4.6.2. EV-Produktionsdauer: 24 versus 48 Stunden

Ein weiterer Parameter bei der EV-Produktion ist die Kulturdauer der Zelllinien. Daher wurden EVs aus Medium isoliert, das für 24 und 48 Stunden von den MelDCC10a-Zellen konditioniert worden war. Der Effekt der EVs, produziert von 5×10^6 Zellen, aus der 24- und 48-stündigen Produktion wurde im CD8-T-Zell-Assay verglichen. Die EVs aus der 48-stündigen Produktion hatten einen signifikant stärkeren Einfluss auf die Proliferation, wie auch auf den Prozentsatz IFN γ ⁺ Zellen und GRZB⁺ Zellen, verglichen mit den EVs aus der 24-stündigen Produktion (Abb. 17). Auffallend war, dass die EVs aus der 24-stündigen Produktion keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferation hatten (Abb. 17 A). Diese Daten zeigen, dass eine Behandlung der CD8-T-Zellen mit EVs aus der 48-stündigen Produktion vorteilhaft ist, da die Effekte auf die CD8-T-Zellen, vor allem in Bezug auf die Proliferation, stärker ausgeprägt sind.

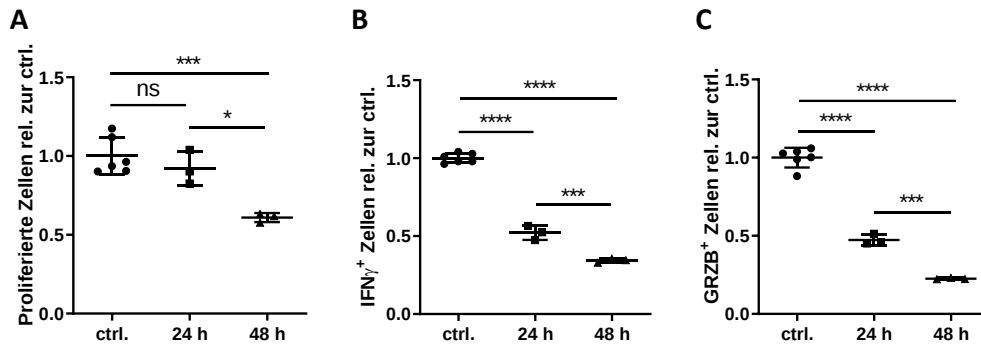


Abbildung 17: Test von EVs mit 24- und 48-stündiger Produktionsdauer im CD8-T-Zell-Assay. A, B und C Änderung des Anteils proliferierter (A) IFN γ ⁺ (B) und GRZB⁺ (C) CD8-T-Zellen relativ zur PBS-behandelten Kontrolle (ctrl.) nach Behandlung mit EVs produziert für 24 Stunden und 48 Stunden. Median mit Bereich, *one way* ANOVA mit Tukey's post hoc Mehrfachvergleich, n = 5 und 3.

4.6.3. Verhältnis von Vesikeln zu CD8-T-Zellen

Nicht nur die Produktionsdauer, sondern auch die Menge an EVs, mit denen 10⁵ CD8-T-Zellen behandelt werden, kann einen Einfluss auf die zu beobachtenden Effekte haben. Die EV-Produktionen wurden anhand der Anzahl der produzierenden Zellen normalisiert. In den bisher gezeigten Versuchen wurden die EVs in einem Verhältnis von 50:1 eingesetzt, d.h. pro CD8-T-Zelle wurden EVs eingesetzt, die von 50 MelDCC10a Zellen produziert worden waren. Um zu testen, ob auch ein geringeres Verhältnis ausreicht um einen Effekt auf die CD8-T-Zellen auszulösen, wurden EVs, welche von 10⁶ Zellen produziert worden waren (entspricht einem Verhältnis von 10:1), mit EVs, welche von 5x10⁶ Zellen produziert worden waren, im CD8-T-Zell-Assay verglichen. Im Gegensatz zum 50:1 hat das 10:1 Verhältnis die Proliferation nicht signifikant reduziert (Abb. 18 A). Der Prozentsatz IFN γ und GRZB positiver Zellen wurde jedoch sowohl vom 50:1 als auch vom 10:1 Verhältnis reduziert (Abb. 18 B, C). Die Behandlung mit EVs im Verhältnis 50:1 ist in allen Fällen signifikant unterschiedlich zur Behandlung mit EVs im Verhältnis 10:1 (Abb. 18).

Aus den Ergebnissen dieses Versuchs folgt, dass nur mit der EV-Behandlung im Verhältnis 50:1 der Prozentsatz IFN γ und GRZB positiver Zellen und gleichzeitig die Proliferation reduziert werden kann.

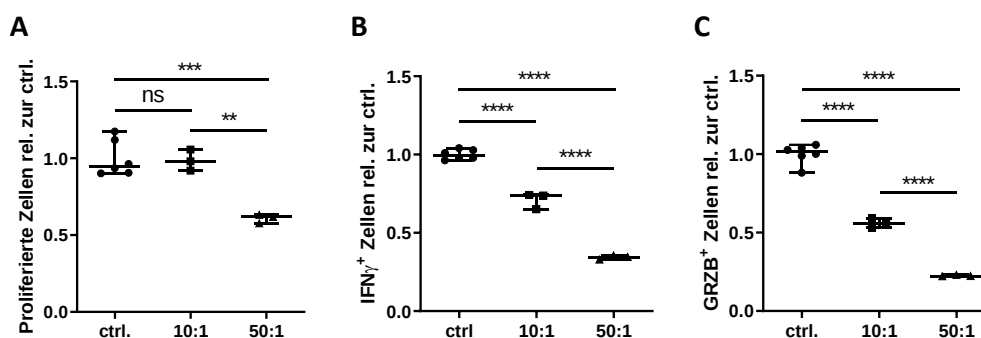


Abbildung 18: Test von EVs produziert von 10⁶ und 5x10⁶ Zellen im CD8-T-Zell-Assay. A, B und C Änderung des Anteils proliferierter (A) IFN γ ⁺ (B) und GRZB⁺ (C) CD8-T-Zellen relativ zur PBS-behandelten Kontrolle (ctrl.) nach Behandlung mit EVs produziert von 10⁶ Zellen (10:1) und 5x10⁶ Zellen (50:1). Median mit Bereich, *one way* ANOVA mit Tukey's post hoc Mehrfachvergleich, n = 5 und 3.

Der Vergleich von EVs aus der 24- und 48-stündigen Produktion, sowie des Verhältnis 10:1 und 50:1 zeigte, dass die EV-Konzentration vermeintlich entscheidend dafür ist, wie stark der suppressive Effekt ausfällt. Der Test unterschiedlicher Produktionsbedingungen und Verhältnisse von Vesikeln zu CD8-T-Zellen legt damit nahe, dass die EV-Produktion für 48 Stunden in Medium ohne FBS erfolgen sollte und die EVs in einem Verhältnis von 50:1 eingesetzt werden sollten.

4.7. Auftrennung des 100K-Pellets in Vesikel- und Protein-Fraktion durch SEC

Zusammen mit den EVs im 100K-Pellet können auch passiv Proteine und Proteinaggregate mitisoliert werden. Um sicherzugehen, dass die Effekte des 100K-Pellets auf CD8-T-Zellen wirklich von EVs und nicht durch mitisolierte lösliche Proteine bedingt sind, wurde das 100K-Pellet mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie (SEC) in Vesikel- und Protein-Fraktion aufgetrennt und die Fraktionen anschließend im CD8-T-Zell-Assay getestet. Das SEC Experiment erfolgte in Kooperation mit Felix Baumann vom Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie der Universität Regensburg.

4.7.1. Kalibrierung der SEC-Säule

Zuerst erfolgte die Kalibrierung der SEC-Säule durch eine Echtzeitmessung der *Kilocounts* pro Sekunde (kcps) der Partikel im Durchfluss. In Abbildung 19 ist die Kurve der Säulenkalibrierung zu sehen. Auf der linken Seite der schwarzen Trennlinie eluierten die Vesikel und auf der rechten Seite die Proteine. Die kcps der Proteine waren sehr gering, da sie zu klein sind, um vom *Zetasizer* erfasst zu werden. Die ersten ca. 14 ml des Durchflusses enthielten kaum Partikel, um jedoch auch EV-Aggregate, die vor dem *Peak* eluieren, aufzufangen, wurde alles bis zur schwarzen Trennlinie als Vesikel-Fraktion aufgefangen. Den Daten aus der Größenbestimmung der Partikel sollte nicht zu große Bedeutung beigemessen werden, da in der Echtzeit-Messung die Partikel mit hoher Geschwindigkeit durch die Messzelle fließen und das Gerät nicht darauf ausgelegt ist die Partikelgröße innerhalb dieser kurzen Zeit zu bestimmen.

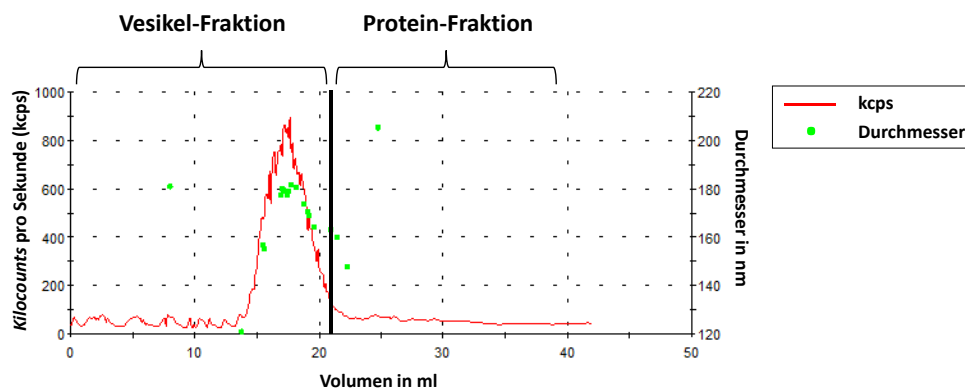


Abbildung 19: Zetasizer Echtzeit-Messung der Auftrennung des 100K-Pellets durch SEC. Die *Kilocounts* pro Sekunde (kcps) und der Durchmesser in nm der gemessenen Partikel im Durchfluss der SEC-Säule sind gegen das Volumen aufgetragen. Die schwarze Trennlinie nach dem Peak der kcps-Kurve markiert die Grenze zwischen Vesikel- und Protein-Fraktion.

4.7.2. Qualitätskontrolle der SEC-Fractionen

Die Vesikel-Fraktion wurde anschließend durch Ultrazentrifugation pelletiert und die Protein-Fraktion durch Ultrafiltration aufkonzentriert, bevor eine Qualitätskontrolle der Trennung durch Gesamtproteinfärbung und Western Blot durchgeführt wurde. Das 100K-Pellet und die Vesikel-Fraktion (SEC V), zeigten sowohl im *stain free gel* als auch im Western Blot ein übereinstimmendes Muster (Abb. 20 A und B). Im Gegensatz dazu war in der Protein-Fraktion (SEC P) auf dem *stain free gel* deutlich weniger Protein zu sehen und auch im Western Blot waren die Marker für kleine Vesikel, insbesondere der Marker für Exosomen TSG101, kaum mehr nachweisbar.

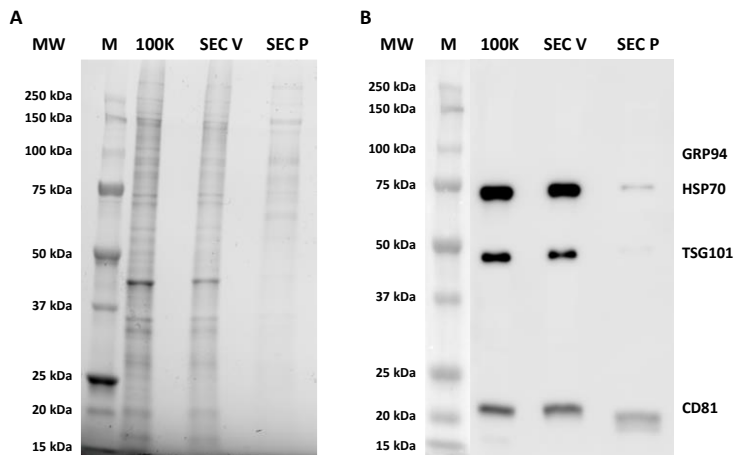


Abbildung 20: Gesamtproteinfärbung und Western Blot der durch SEC gewonnenen Vesikel- und Protein-Fraktion im Vergleich zum 100K-Pellet. **A** Aufnahme des *stain free gels*, nach Aktivierung mit UV-Licht, auf dem 100K-Pellet, Vesikel-Fraktion (SEC V) und Protein-Fraktion (SEC P) aufgetrennt wurden. **B** Western Blot Analyse von 100K-Pellet, SEC V und SEC P. Geladen wurden 100K-Pellets isoliert von $2,5 \times 10^6$ EV-produzierenden Zellen und die SEC V und SEC P aus der Auftrennung des 100K-Pellets isoliert von $2,5 \times 10^6$ EV-produzierenden Zellen. Die Antikörper wurden in folgenden Verdünnungen eingesetzt: GRP94 (1:1.000), HSP70 (1:1.000), TSG101 (1:1.000) und CD81 (1:10.000). M = Marker, MW = Molecular Weight, kDa = Kilodalton.

Die Kalibrierung der SEC-Säule und anschließende Qualitätskontrolle hat gezeigt, dass eine sehr gute Auftrennung des 100K-Pellets in Vesikel- und Protein-Fraktion erfolgt ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Hauptbestandteil des 100K-Pellets Vesikel sind und Proteine damit nur in geringem Maße passiv mitisoliert wurden. Somit konnten die erhaltenen Fraktionen anschließend im CD8-T-Zell-Assay verglichen werden.

4.7.3. Effekt der SEC-Fractionen auf CD8-T-Zellen

Um zu überprüfen, ob der suppressive Effekt des 100K-Pellets auf die Proliferation und Differenzierung der CD8-T-Zellen auf die EVs oder mitisolierte Proteine zurückzuführen ist, wurden 100K-Pellet, Vesikel-Fraktion und Protein-Fraktion im CD8-T-Zell-Assay getestet. Die Vesikel-Fraktion reduzierte die Proliferation der CD8-T-Zellen und die $\text{IFN}\gamma^+$ und GRZB^+ CD8-T-Zellen relativ zur Kontrolle signifikant (Abb. 21). Die Protein-Fraktion hingegen hatte weder einen Einfluss auf die Proliferation der CD8-T-Zellen noch auf die $\text{IFN}\gamma^+$ und GRZB^+ CD8-T-Zellen relativ zur Kontrolle.

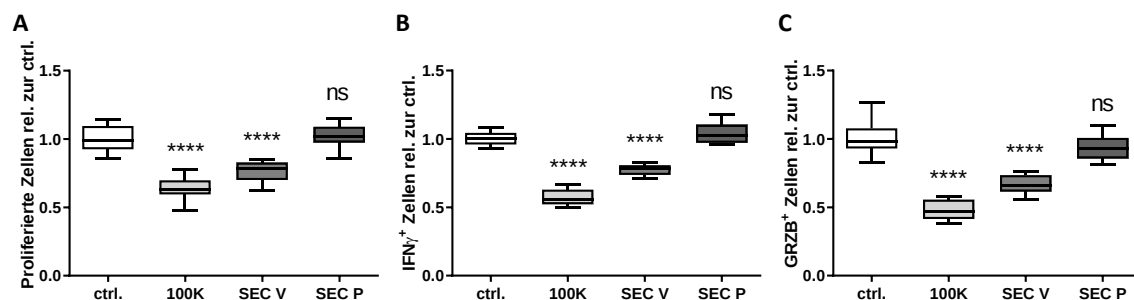


Abbildung 21: Test der durch SEC gewonnenen Vesikel- und Protein-Fraktion im CD8-T-Zell-Assay im Vergleich zum Input (100K). **A, B und C** Änderung des Anteils proliferierter (A) $\text{IFN}\gamma^+$ (B) und GRZB^+ (C) CD8-T-Zellen relativ zur PBS-behandelten Kontrolle (ctrl.) nach Behandlung mit 100K-Pellet, Vesikel-Fraktion (SEC V) und Protein-Fraktion (SEC P). Box-Plots mit Whiskers von min. bis max., one way ANOVA mit Dunnets post hoc Mehrfachvergleich, n (ctrl., SEC V und SEC P) = 12 und n (100K) = 9.

Diese Daten zeigen, dass der beobachtete immunsuppressive Effekt des 100K-Pellets auf Proliferation und Differenzierung der CD8-T-Zellen durch die EVs im 100K-Pellet bedingt ist und nicht auf mitisolierte Proteine zurückgeht.

4.8. Analyse von Checkpoint-Liganden auf MelDCC-EVs

4.8.1. Expression von PD-L1 auf MelDCC-EVs und DCC

Nachdem der suppressive Effekt der EVs auf die Proliferation und Differenzierung von CD8-T-Zellen belegt werden konnte, sollten die dafür verantwortlichen Moleküle identifiziert werden. Der inhibitorische Effekt auf Proliferation und Differenzierung von CD8-T-Zellen weist auf Immuncheckpoint-Liganden hin. Der naheliegendste Kandidat ist der vielbeschriebene Immuncheckpoint-Ligand PD-L1. Es ist bereits bekannt, dass PD-L1 auf EVs von Melanom-Zelllinien zur Suppression von CD8-T-Zellen beiträgt (Chen et al. 2018). Ob dies auch für EVs von DCC aus Lymphknoten von Melanopatienten der Fall ist, wurde noch nicht beschrieben. Deshalb wurde zuerst getestet, ob die EVs der vier MelDCC-Linien, die im CD8-T-Zell-Assay Effekte gezeigt haben, positiv für PD-L1 sind. Die 100K-Pellets und die Lysate aller vier MelDCC-Linien waren negativ für PD-L1, während die Lysate der Positivkontrollen (PBMCs und H1975 Zellen) eine deutliche PD-L1 Bande zeigten (Abb. 22 A). Um sicherzugehen, dass es nicht an der Methode oder dem Antikörper-Klon liegt, wurde die Zelllinie MelDCC10a mit einem anderen Antikörper-Klon für die Durchflusszytometrie gefärbt. Auch hier war im Gegensatz zur Positivkontrolle A-431 kein PD-L1 Signal von MelDCC10a zu detektieren (Abb. 22 B).

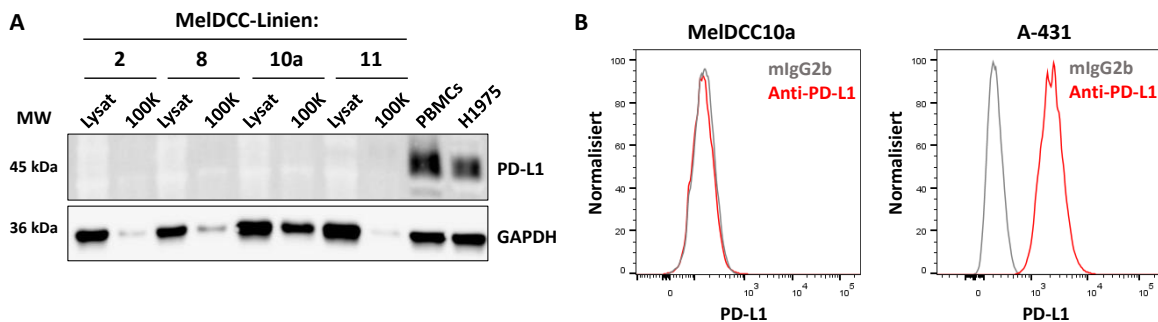


Abbildung 22: PD-L1 Expression auf MelDCC-Zelllinien und 100K-Pellets getestet mit Western Blot und Durchflusszytometrie. A Western Blot Analyse von 100K-Pellets und Zell-Lysaten der MelDCC-Linien 2, 8, 10a und 11 sowie Lysaten von PBMCs und H1975 Zellen als Positivkontrollen. Geladen wurden jeweils 15 µg der Zell-Lysate und 100K-Pellets isoliert von $2,5 \times 10^6$ EV-produzierenden Zellen. Die Antikörper wurden in folgenden Verdünnungen eingesetzt: PD-L1 (1:1.000) und GAPDH (1:1.000). B Histogramme der Messung des PD-L1 Signals in MelDCC10a und A-431 Zellen am Durchflusszytometer. Die rote Linie zeigt die Intensität des Antikörper-konjugierten Fluorochroms und die graue Linie die Intensität des Fluorochrom-konjugierten IgG-Isotypen. MW = Molecular Weight, kDa = Kilodalton.

Auch zeigte die Analyse der *PD-L1* Expression in den scRNAseq Daten der pDCC und cDCC, dass nur in wenigen DCC eine schwache bis mäßige *PD-L1* Expression festzustellen war (Abb. 23). Somit konnte ausgeschlossen werden, dass EV-assoziiertes PD-L1 bei der Immunsuppression von CD8-T-Zellen durch EVs aus den MelDCC-Linien eine Rolle spielt.

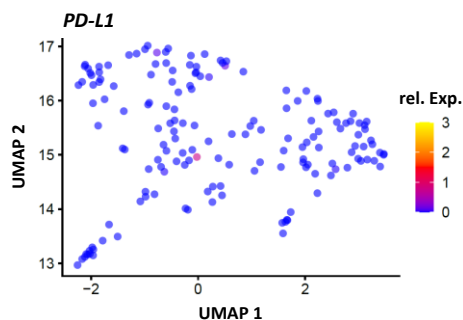


Abbildung 23: UMAP Plot der Expression von PD-L1 in DCC von Melanopatienten. Analyse der Expression von *PD-L1* in scRNAseq Daten von DCC aus Lymphknoten von Melanopatienten. Die Stärke der relativen *PD-L1* Expression ist durch die Farbe der Punkte entsprechend der Farbskala rechts im Bild gekennzeichnet. n = 161. rel. Exp. = relative Expression. Abbildung erstellt von Dr. Huiqin Koerke-Qu.

4.8.2. Expression der Immuncheckpoint-Liganden CD39, CD73, CD155, CD200 und CD276 auf MelDCC-EVs

Da der Immuncheckpoint-Ligand PD-L1 als Kandidat für die Vermittlung des immunsuppressiven Effekts von MelDCC-EVs auf CD8-T-Zellen ausgeschlossen werden konnte, wurde eine Auswahl an anderen Immuncheckpoint-Liganden untersucht. Die Auswahl wurde auf folgender Grundlage getroffen: in der massenspektrometrischen Untersuchung (in Zusammenarbeit mit Katharina Limm) der 100K-Pellets wurden CD276, CD155 und CD73 gefunden, mit Durchflusszytometrie wurden bereits CD276, CD155 und CD200 auf MelDCC-Zelllinien nachgewiesen und CD39 wurde ausgewählt, da bekannt ist, dass es auf EVs von Krebszellen zusammen mit CD73 durch Adenosin-Produktion T-Zellen supprimiert (Clayton et al. 2011).

Die EVs der vier MelDCC-Linien, die alle einen immunsuppressiven Effekt auf CD8-T-Zellen gezeigt hatten, wurden im Western Blot auf die Expression von CD276, CD155, CD39, CD73 und CD200 untersucht (Abb. 24). CD276 und CD155 konnten in den 100K-Pellets aller vier Linien nachgewiesen werden, wobei sie in den 100K-Pellets von MelDCC8 und MelDCC10a besonders stark angereichert waren. CD39 war nur in MelDCC11 stark exprimiert und im 100K-Pellet von MelDCC8 ganz schwach zu sehen. Die CD73 Banden waren in MelDCC2 und MelDCC10a deutlich und im 100K-Pellet von MelDCC8 schwach zu sehen. Der Immuncheckpoint-Ligand CD200 war in den EVs der Linien MelDCC2 und MelDCC10a nachweisbar. Die beiden Ladekontrollen CD81 (für die EVs) und GAPDH (für die Zell-Lysate) zeigten, dass vergleichbare Mengen an Protein geladen wurden.

CD155 und CD276 wurden im Folgenden eingehender untersucht, da sie in den Lysaten und EVs aller vier Zelllinien, die einen suppressiven Effekt auf CD8-T-Zellen hatten, gefunden wurden.

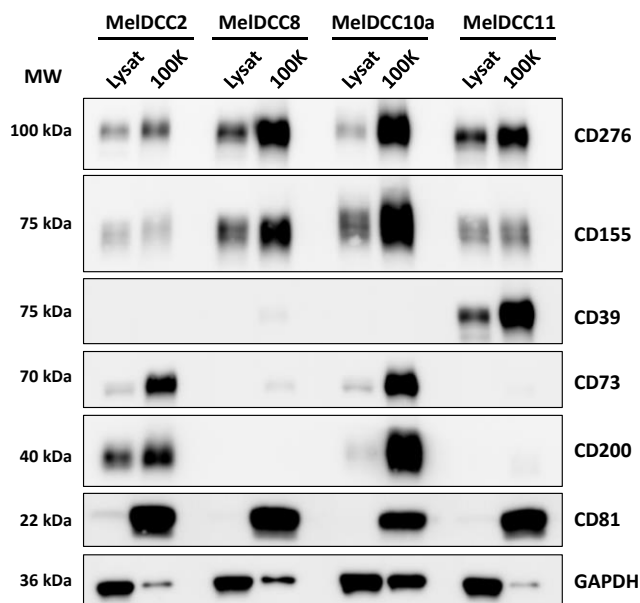


Abbildung 24: Immuncheckpoint-Liganden Western Blot mit Lysaten und 100K-Pellets von 4 MelDCC-Zelllinien. Western Blot Analyse von 100K-Pellets und Zell-Lysaten der MelDCC-Linien 2, 8, 10a und 11. Geladen wurden jeweils 15 µg der Zell-Lysate und 100K-Pellets isoliert von $2,5 \times 10^6$ EV-produzierenden Zellen. Die Antikörper wurden in folgenden Verdünnungen eingesetzt: CD276 (1:5.000), CD155 (1:2.000), CD39 (1:1.000), CD73 (1:1.000), CD200 (1:1.000), CD81 (1:10.000) und GAPDH (1:1.000). MW = Molecular Weight, kDa = Kilodalton.

4.8.3. Analyse der Expression von *CD155* und *CD276* in scRNAseq Daten von DCC

Die scRNAseq Daten der pDCC und cDCC erlaubten es die Expression von *CD155* und *CD276* in den DCC zu analysieren. Nicht in allen DCC war eine Expression von *CD155* nachweisbar, jedoch war in vielen DCC eine moderate und in einigen eine starke Expression von *CD155* zu sehen (Abb. 25 A). Auch *CD276* war nicht in allen DCC exprimiert, aber insgesamt waren verglichen mit *CD155* mehr *CD276* positive DCC zu sehen (Abb. 25 B). Weiterhin waren mehr DCC mit starker *CD276* Expression als mit starker *CD155* Expression zu finden.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sowohl *CD155* als auch *CD276* über die vier MelDCC Modell-Zelllinien hinaus eine Relevanz in DCC von Melanompatienten haben könnten.

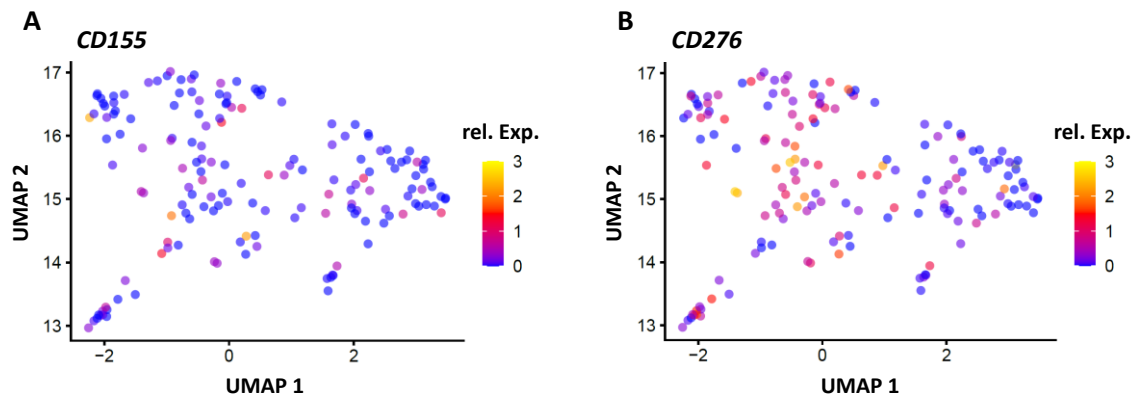


Abbildung 25: UMAP Plot der Expression von *CD155* und *CD276* in DCC von Melanompatienten. A und B Analyse der Expression von *CD155* (A) und *CD276* (B) in scRNAseq Daten von DCC aus Lymphknoten von Melanompatienten. Die Stärke der relativen *CD155* und *CD276* Expression ist durch die Farbe der Punkte entsprechend der Farbskala rechts im Bild gekennzeichnet. n = 161. rel. Exp. = relative Expression. Abbildungen erstellt von Dr. Huiqin Koerker-Qu.

4.8.4. Assoziation von *CD155* und *CD276* mit EVs

Das nächste Experiment wurde durchgeführt, um zu testen, ob die Moleküle *CD276* und *CD155* tatsächlich mit den Vesikeln assoziiert sind und nicht als lösliche Proteine passiv im 100K-Pellet mitisoliert wurden. Hierzu wurden das 100K-Pellet, die Vesikel-Fraktion und die Protein-Fraktion im Western Blot auf *CD276* und *CD155* untersucht. Abbildung 26 zeigt, dass die Immuncheckpoint-Liganden *CD276* und *CD155* eindeutig EV-assoziiert sind.

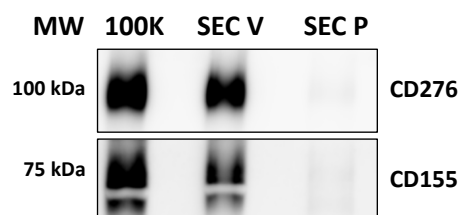


Abbildung 26: Western Blot Analyse der SEC-Fractionen und des Inputs (100K) für die Checkpoint-Liganden *CD155* und *CD276*. Western Blot Analyse von 100K-Pellet, Vesikel-Fraktion (SEC V) und Protein-Fraktion (SEC V). Geladen wurden 100K-Pellets isoliert von $2,5 \times 10^6$ EV-produzierenden Zellen und die SEC V und SEC P aus der Auftrennung des 100K-Pellets isoliert von $2,5 \times 10^6$ EV-produzierenden Zellen. Die Antikörper wurden in folgenden Verdünnungen eingesetzt: *CD276* (1:5.000), *CD155* (1:2.000). MW = Molecular Weight, kDa = Kilodalton.

4.9. CRISPR/Cas9 vermittelter Knock-out von *CD155* und *CD276* in MelDCC10a

4.9.1. Optimierung der Elektroporationsbedingungen

Um zu untersuchen, ob *CD276* und *CD155* für den immunsuppressiven Effekt der MelDCC-EVs auf CD8-T-Zellen verantwortlich sind, sollten die beiden Moleküle in MelDCC10a ausgeknockt werden und die EVs dieser Knock-out-Zelllinien auf ihren CD8-T-Zell-suppressiven Effekt hin getestet werden.

Der Knock-out wurde mit dem Alt-R CRISPR-Cas9 System von IDT und die Transfektion mit dem Neon System von Thermo Fisher, in Kooperation mit Kathrin Schambeck von der Abteilung für Immunologie des Leibnitz-Instituts für Immuntherapie Regensburg durchgeführt. Da die optimalen Elektroporationsbedingungen für die MelDCC10a Zellen unbekannt waren, mussten diese zuerst optimiert werden. Hierfür wurden die Zellen mit einem GFP Vektor mit den 24 verschiedenen Programmen des *24-well optimization protocol* des *Neon Transfection Systems* elektroporiert. Um das beste Programm zu identifizieren, wurden die Zellen dann auf die GFP Expression und den Anteil von Zellen, die die Elektroporation überlebten, untersucht. Die Expression von GFP wurde am Mikroskop visualisiert und am Durchflusszytometer quantifiziert (Abb. 27 A-C). Der Anteil an Zellen, die die Elektroporation überlebten, wurde nach *Viability Dye* Färbung am Durchflusszytometer bestimmt (Abb. 27 D). Als beste Bedingung wurden eine Puls-Spannung von 1600 V, Puls-Weite von 10 ms und Anzahl der Pulse von 3 identifiziert. Mit diesem Programm sollte dann die Transfektion der MelDCC10a Zellen durchgeführt werden.

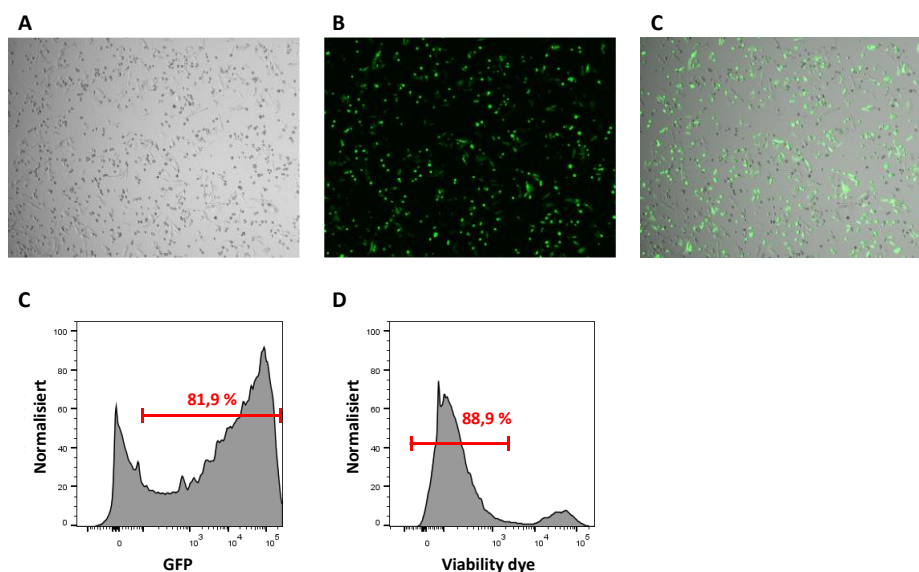


Abbildung 27: Messungen der Transfektionseffizienz und des Überlebens in der Probe mit den besten Elektroporationsbedingungen. A, B und C Durchlichtbild (A), GFP Kanal (B) und Überlagerung von Durchlichtbild und GFP Kanal (C) der MelDCC10a Zellen aufgenommen am Mikroskop 24 Stunden nach Transfektion mit dem GFP Vektor. C und D Histogramme der Messung des GFP (C) und *Viability dye* (D) Signals am Durchflusszytometer, ebenfalls ca. 24 Stunden nach Transfektion. Die Zellen wurden mit folgenden Einstellungen elektroporiert: 1600 V Spannung, 10 ms Puls-Weite in 3 Pulsen.

4.9.2. Herstellung von *CD155* und *CD276* Einzel- und Doppel-Knock-out-Zellen

Für den Knock-out von *CD155* und *CD276* wurden *predesigned guide RNAs* (gRNAs) von IDT ausgewählt, die einen möglichst hohen *on-target* und *off-target score* aufweisen. Die Bindestellen der beiden gRNAs und die Schnittstellen in den Genen *CD155* und *CD276* sind in Abbildung 28 gezeigt. Bei *CD155* bindet das Cas9 RNP an den *sense strand* (-) des Gens und führt den Doppelstrangbruch an Position 44,647,415 in Chromosom 19 aus. Bei *CD276* bindet das Cas9 RNP an den *antisense strand* (+) des Gens und führt den Doppelstrangbruch an Position 73,702,281 in Chromosom 15 aus. Beide gRNAs weisen minimale *off-target* Effekte auf und die Schnittstellen befinden sich am Anfang der kodierenden Sequenz der Gene in Exons, die in allen Transkript-Varianten vorkommen.

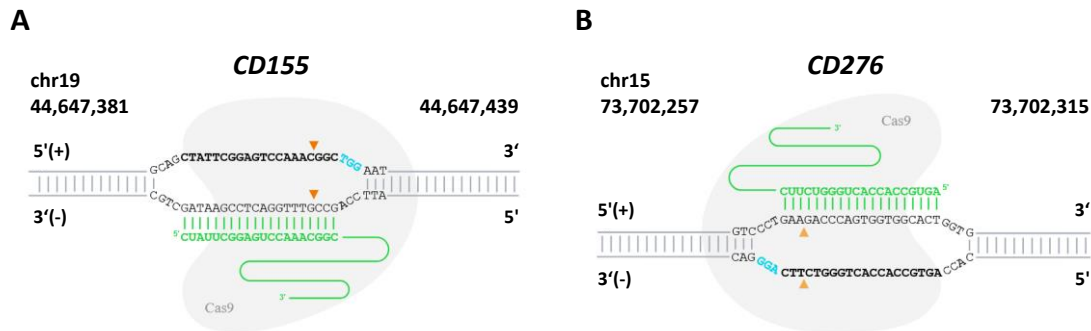


Abbildung 28: Bindestellen der gRNAs für den Knock-out von *CD155* und *CD276* im Genom von MelDCC10a. A und B Schnittstelle des Cas9 Enzyms im *CD155* Gen (A) und im *CD276* Gen (B). Dargestellt ist die Bindung der gRNA (grüne Sequenz) in Nachbarschaft zur PAM Region (türkise Sequenz) an die Zielsequenz (fett gedruckte Sequenz) und die genaue Schnittstelle des Cas9 Enzyms (orangefarbener Pfeilkopf). Die Abbildungen wurden mit dem *Verify Guide Design Tool* von Synthego.com erstellt.

Nach Auswahl der geeigneten gRNAs wurde die Expression von *CD155* und *CD276* in MelDCC10a Zellen am Durchflusszytometer untersucht. Dies ist wichtig, um später die Knock-out-Zellen zu identifizieren und am Durchflusszytometer sortieren zu können. *CD155* war in 100 % der MelDCC10a Zellen exprimiert und die negative Population kann somit später klar abgegrenzt werden (Abb. 29 A). *CD276* war nicht in allen Zellen exprimiert, wodurch die Gefahr besteht bei einer zu groß gefassten Auswahl beim Sortieren auch *CD276* negative Wildtyp-Zellen mitzuisolieren (Abb. 29 B).

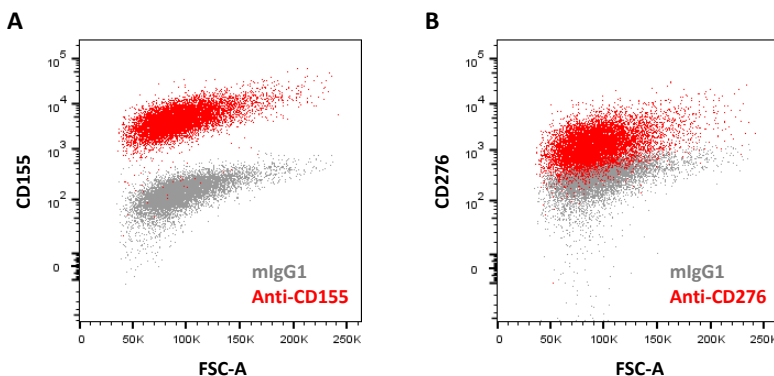


Abbildung 29: Expression von *CD155* und *CD276* auf MelDCC10a. A und B Punktediagramme der Messung des *CD155* (A) und *CD276* (B) Signals am Durchflusszytometer. Die roten Punkte zeigen die Intensität des Antikörper-konjugierten Fluorochroms und die grauen Punkte die Intensität des Fluorochrom-konjugierten IgG-Isotypen des jeweiligen Antikörpers.

In Abbildung 30 sind die anhand der Wildtyp- und Isotyp-Kontrolle gesetzten Auswahlmarkierungen zum Sortieren der Zellen, in welchen der Knock-out erfolgreich war, zu sehen. Der *CD155* Knock-out war mit 50,5 % negativen Zellen sehr effizient und die Populationen waren klar voneinander abgrenzbar (Abb. 30 A). Bei *CD276* wurde die Auswahl sehr stringent festgesetzt, aber trotzdem lagen noch 1,8 % der Wildtyp Zellen in der Auswahl für die *CD276* negativen Zellen. Hier war auch der Knock-out nicht so effizient und es konnten nur 10,9 % *CD276* negative Zellen herausgesortet werden (Abb. 30 B). Da die Effizienz des *CD276* Knock-out so gering war, wurden die *CD155/CD276* Knock-out-Zellen mit einer anderen Strategie hergestellt. Erst wurden die *CD155* Knock-out-Zellen expandiert und anschließend mit dem RNP, welches die *CD276* gRNA enthält, transfiziert. Abbildung 30 C zeigt, dass beim Sortieren zuerst die *CD155*-negativen Zellen und anschließend die *CD276*-negativen Zellen ausgewählt wurden. Die *CD155/CD276* Knock-out-Zellen waren vor der Sortierung zu 99,3 % negativ für *CD155* und von den *CD155* negativen 10,4 % negativ für *CD276*.

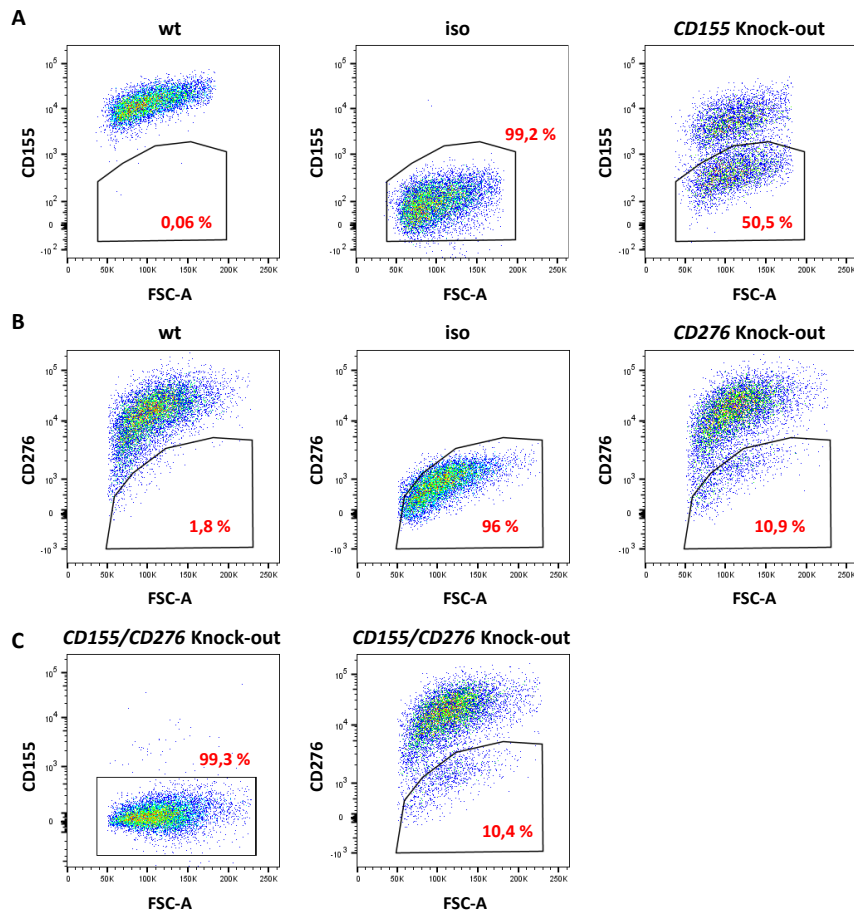


Abbildung 30: Auswahl-Strategie beim Sort der *CD155*, *CD276* und *CD155/CD276* Knock-out-Zelllinien. **A** Auswahl-kriterien für den Sort der *CD155* Knock-out-Zellen anhand der für *CD155* gefärbten Wildtyp (wt) und Isotyp (iso) Kontrollen. **B** Auswahl-Strategie zum Sort der *CD276* Knock-out-Zellen anhand der für *CD276* gefärbten wt und iso Kontrollen. **C** Auswahl der *CD155* negativen Zellen (links) für die anschließende Sortierung der *CD276* negativen Zellen (rechts), um die *CD155/CD276* Knock-out-Zellen herauszusortieren.

Nach dem Sort wurden die Zellen expandiert und vor dem Einfrieren nochmals auf die Expression von *CD155* und *CD276* überprüft. Die *CD155* Knock-out-Zellen waren zu 99,4 % negativ für *CD155* und die *CD276* Knock-out-Zellen zu 97,4 % negativ für *CD276* (Abb. 31 A und B). Der *CD155/CD276* Knock-out war mit 97,2 % *CD155/CD276* negativen Zellen ebenfalls stabil (Abb. 31 C). Die Elektroporations-Kontrolle, welche mit einem RNP der eine *scrambled* RNA enthält, transfiziert und im Anschluss ebenfalls expandiert wurde, war sowohl für *CD155* als auch für *CD276* positiv (Abb. 31 D).

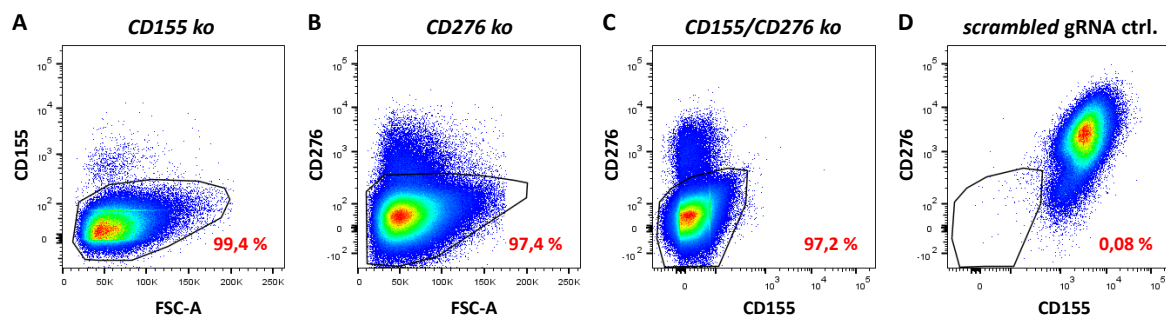


Abbildung 31: Kontrolle der Expression von *CD155* und *CD276* auf den Knock-out-Zelllinien nach EV-Produktion. **A, B, C und D** Analyse der Expression von *CD155* und/oder *CD276* auf *CD155* Knock-out-Zellen (A), *CD276* Knock-out-Zellen (B), *CD155/CD276* Knock-out-Zellen (C) und Zellen transfiziert mit der *scrambled* RNA Kontrolle (D) gemessen am Durchflusszytometer. Die Auswahl zeigt jeweils die *CD155* und/oder *CD276* negative Population.

Der Knock-out von *CD155* und *CD276* in der Zelllinie MelDCC10a war erfolgreich und somit konnten die etablierten Zelllinien für die Produktion von Knock-out-EVs verwendet werden.

4.9.3. Qualitätskontrolle der Knock-out-EVs

Die aus den Knock-out-Zelllinien isolierten EVs wurden im Western Blot auf das Vorhandensein von *CD155* und *CD276* überprüft (Abb. 32). Im Lysat und dem 100K-Pellet aus den Zellen, die mit der *scrambled* gRNA transfiziert wurden, waren beide Proteine detektierbar. Die Lysate und das 100K-Pellet aus *CD155* und *CD155/CD276* Knock-out-Zellen zeigten keine *CD155* Bande. In den EVs der *CD276* und *CD155/CD276* Knock-out-Zellen war nur eine schwache *CD276* Bande zu erkennen, die in den entsprechenden Zell-Lysaten fehlte. Die GAPDH Ladekontrollen zeigten, dass vergleichbare Mengen an Protein geladen wurden.

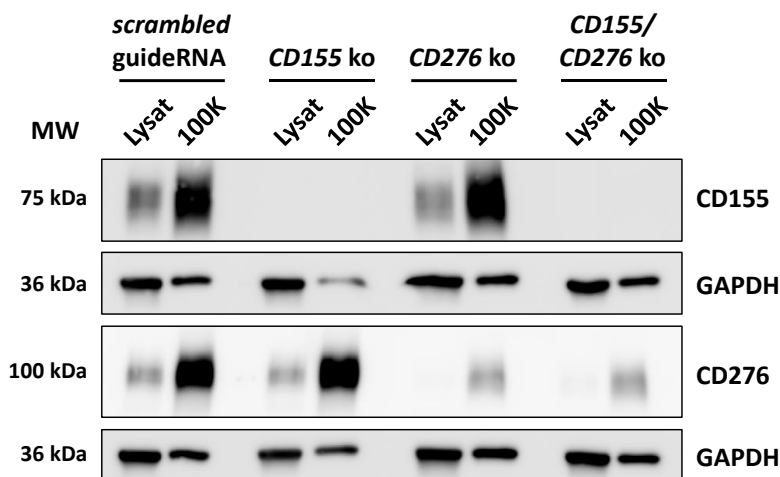


Abbildung 32: Western Blot Analyse der Lysate und 100K-Pellets der Knock-out-Zelllinien für *CD155* und *CD276*. Western Blot Analyse von 100K-Pellets und Zell-Lysaten der *scrambled* gRNA Kontrolle, *CD155* Knock-out (*CD155 ko*), *CD276* Knock-out (*CD276 ko*) und *CD155/CD276* Knock-out (*CD155/CD276 ko*) für die Proteine *CD155* und *CD276*. Geladen wurden jeweils 15 µg der Zell-Lysate und 100K-Pellets isoliert von $2,5 \times 10^6$ EV-produzierenden Zellen. Die Antikörper wurden in folgenden Verdünnungen eingesetzt: *CD276* (1:5.000), *CD155* (1:2.000) und GAPDH (1:1.000). MW = *Molecular Weight*, kDa = Kilodalton.

Somit konnte mit zwei unabhängigen Methoden nachgewiesen werden, dass der Knock-out von *CD155* und *CD276* erfolgreich war. Die schwachen *CD276* Banden in den 100K-Pellets der *CD276* und der *CD155/CD276* Knock-out-Linien lassen den Schluss zu, dass noch *CD276*-positive Zellen vorhanden sind, jedoch in sehr geringer Anzahl. Der Knock-out von *CD276* in über 97 % der Zellen sollte ausreichen, um zu testen, ob ein *CD276* Knock-out den *CD8*-T-Zell-suppressiven Effekt der EVs aufhebt.

4.10. *CD155* und *CD276* Knock-out EVs im CD8-T-Zell-Assay

Im nächsten Schritt wurden die EV-Präparationen der Knock-out-Zelllinien auf ihren immun-suppressiven Effekt im CD8-T-Zell-Assay untersucht. Durch den Knock-out der Immuncheckpoint-Liganden hat sich die suppressive Wirkung der EVs auf die Proliferation der CD8-T-Zellen signifikant verringert (Abb. 33 A) und war fast wieder auf dem Niveau der Kontrolle (Abb. 33 B).

Bei der Analyse der IFN γ und GRZB positiven Zellen hat sich gezeigt, dass der Knock-out der Immuncheckpoint-Liganden eine unterschiedlich starke Auswirkung auf die GRZB-/IFN γ -Subpopulationen hatte (Abb. 33 C-F). Der Anteil der GRZB⁻ IFN γ ⁺ nahm durch den Knock-out nicht zu, wohingegen bei den GRZB⁺ Subpopulationen eine Zunahme zu beobachten war. Interessanterweise war sowohl der alleinige Knock-out von *CD155* als auch der alleinige Knock-out von *CD276* ausreichend um die Effekte abzuschwächen. Der gleichzeitige Knock-out beider Gene führte jedoch nicht zu einer weiteren Abschwächung der Effekte.

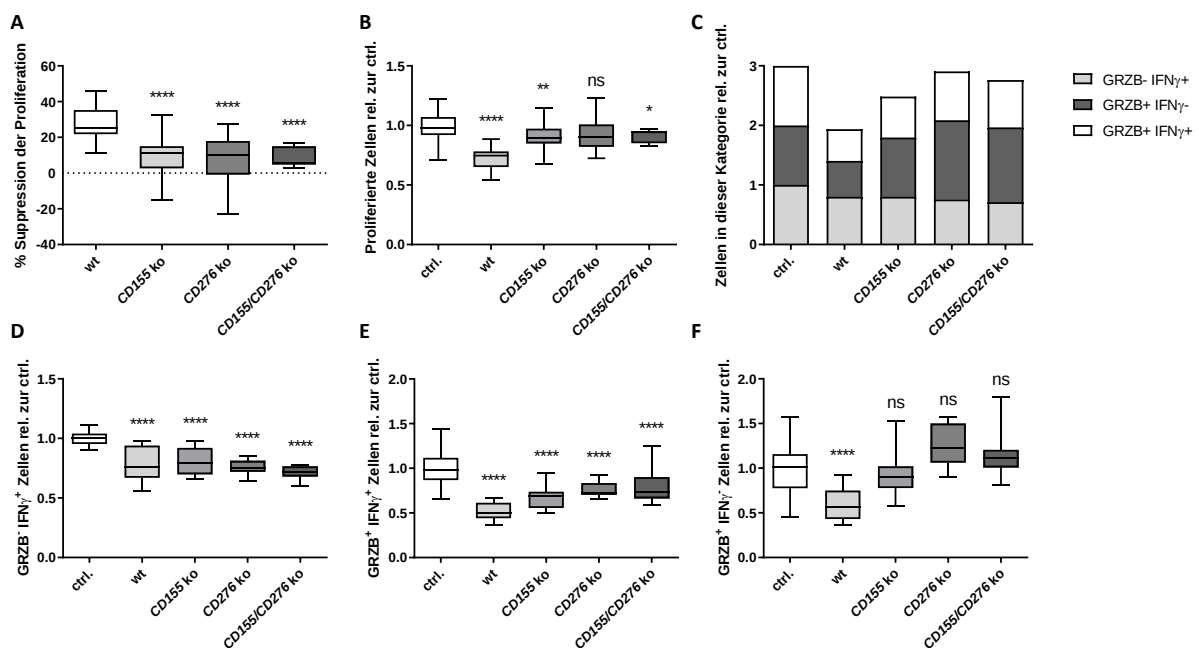


Abbildung 33: Test der Knock-out-EVs im CD8-T-Zell-Assay. **A** Prozentuale Suppression der Proliferation im Vergleich zur PBS-behandelten Kontrolle berechnet aus den Werten aus (B). Formel für die Berechnung = $100 - ((\% \text{ proliferierte Zellen eines Replikats/Mittelwert der \% proliferierter Zellen der PBS-behandelten Kontrolle}) \times 100)$ **B** Änderung des Anteils der proliferierten CD8-T-Zellen relativ zur PBS-behandelten Kontrolle (ctrl.) nach Behandlung mit Wildtyp (wt), *CD155* Knock-out (*CD155* ko), *CD276* Knock-out (*CD276* ko) und *CD155/CD276* Knock-out (*CD155/CD276* ko) EVs. **C** Gestapelte Darstellung der Änderung des Mittelwerts der GRZB- und IFN γ -Subtypen relativ zur PBS-behandelten Kontrolle (ctrl.). **D, E und F** Box-Plots aller Replikate der GRZB⁻ IFN γ ⁺ (D), GRZB⁺ IFN γ ⁺ (E) und GRZB⁺ IFN γ ⁻ (F) -Subtypen relativ zur PBS-behandelten Kontrolle (ctrl.). Box-Plots mit Whiskers von min. bis max., one way ANOVA mit Dunnetts post hoc Mehrfachvergleich. n (ctrl.) = 36, n (wt, *CD155* ko) = 23, n (*CD276* ko, *CD155/CD276* doppel ko) = 12.

Das Knock-out Experiment hat gezeigt, dass die beiden Immuncheckpoint-Liganden am immun-suppressiven Effekt der MelDCC10a EVs auf CD8-T-Zellen beteiligt sind. Die Proliferation wird weniger stark supprimiert und auch der Anteil an GRZB⁺ IFN γ ⁻ Zellen ist nicht mehr reduziert. Auf die nur IFN γ ⁺ Zellen hat der Knock-out keinen positiven Effekt, was auf weitere beteiligte Immuncheckpoint-Liganden oder Proteine hinweist. Der Knock-out von entweder *CD155* oder *CD276* ist ausreichend um den suppressiven Effekt der EVs auf CD8-T-Zellen zu verringern.

4.11. Überprüfung der Erkenntnisse aus den *in vitro* Versuchen in Patientenproben

4.11.1. Expressionsmuster der Rezeptoren von CD155 und CD276 auf CD8-T-Zellen

Es ist bekannt, dass CD155 mit den Rezeptoren CD226, TIGIT (von engl. *T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains*) und CD96 interagiert (Bottino et al. 2003; Fuchs et al. 2004; Yu et al. 2009). Die Interaktion mit CD226 wirkt stimulierend und die Interaktion mit TIGIT und CD96 inhibierend auf die T-Zellaktivität (Mittal et al. 2019; Tahara-Hanaoka et al. 2004; Zhang et al. 2016). Der einzig bekannte Bindungspartner für CD276 ist derzeit IL20R α (Husain et al. 2019).

Zunächst sollte überprüft werden ob die Rezeptoren von CD155 und CD276 auf CD8-T-Zellen exprimiert sind. Die Expression des stimulatorischen Rezeptors CD226 konnte auf 64 % und die des inhibitorischen Rezeptors TIGIT auf 12 % der CD8-T-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 34 A und B). Hingegen konnte die Expression von CD96 auf den CD8-T-Zellen nicht festgestellt werden (Abb. 34 C). Da kein funktionierender IL20R α Antikörper für die Durchflusszytometrie gefunden werden konnte, wurde die Expression von IL20R α auf CD8-T-Zellen im Western Blot untersucht. Abbildung 34 D zeigt, dass IL20R α nicht auf CD8-T-Zellen exprimiert war. Das Lysat der HeLa Positivkontrolle jedoch wies eine kräftige Bande auf. Diese Ergebnisse zeigen, dass IL20R α bzw. CD96 als CD8-T-Zell-supprimierende Interaktionspartner für CD276 bzw. CD155 ausgeschlossen werden können.

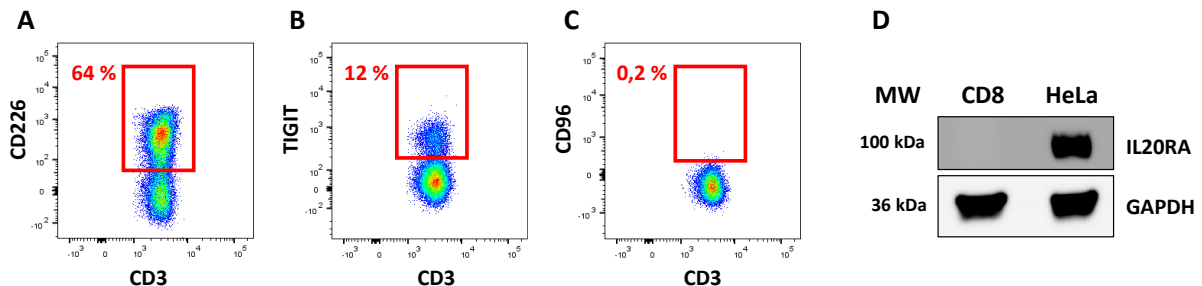


Abbildung 34: Expressionsmuster der von CD226, TIGIT, CD96 und IL20R α auf humanen CD8-T-Zellen. A, B und C Prozentualer Anteil der CD226 (A), TIGIT (B) und CD96 (C) positiven CD8-T-Zellen an allen CD8-T-Zellen gemessen am Durchflusszytometer. D Western Blot Analyse der IL20R α Expression in CD8-T-Zellen und in HeLa Zellen als Positivkontrolle. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet. Es wurden jeweils 20 μ g Zell-Lysat pro Spur aufgetragen. Die Antikörper wurden in folgenden Verdünnungen eingesetzt: IL20R α (1:500) und GAPDH (1:1000). MW = *Molecular Weight*, kDa = Kilodalton.

4.11.2. Expression von CD226 und TIGIT auf CD8-T-Zellen während der metastatischen Kolonisierung

Um die Relevanz der Interaktion von CD155 mit CD226 und TIGIT für die metastatische Kolonisierung zu untersuchen, wurden Wächter- und regionale Lymphknoten von Melanompatienten hinsichtlich ihrer CD226 und TIGIT Expression auf CD8-T-Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Es ist bekannt, dass (1) die Expression von CD226 ein Marker für die Fitness von tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs), bezogen auf ihre Fähigkeit Effektor-Zytokine zu produzieren ist. (2) die Interaktion von CD155 mit CD226 zur Ubiquitinierung und proteasomalen Degradation von CD226 führt (Braun et al. 2020). (3) TIGIT durch direkte Interaktion mit CD226 dessen Signaltransduktion inhibieren kann und (4) TIGIT die Antitumorantwort inhibiert (Johnston et al. 2014). Deshalb wurde das Expressionsmuster der stimulierenden (CD226) bzw. inhibierenden Rezeptoren (TIGIT) in Abhängigkeit des lokalen Tumorzellbefalls (DCCD) untersucht.

Abbildung 35 A zeigt, dass CD8-T-Zellen aus einem Lymphknoten mit DCCD 250.000 eine deutliche Population von PD-1⁺ TIM-3⁺ Zellen aufwiesen. In dieser rot markierten Population von erschöpften CD8-T-Zellen war CD226 nicht exprimiert, wohingegen TIGIT auf allen Zellen exprimiert war (Abb. 35 B und C). Nicht-erschöpfte CD8-T-Zellen mit moderater PD-1 und ohne TIM-3 Expression (schwarze Auswahl) zeigten hingegen eine gemischte Expression von CD226 wie auch TIGIT (Abb. 35 B und C).

Diese Analyse zeigt, dass ein Zusammenhang zwischen der Expression von PD-1 und TIM-3 und dem Vorhandensein von CD226 bzw. TIGIT besteht.

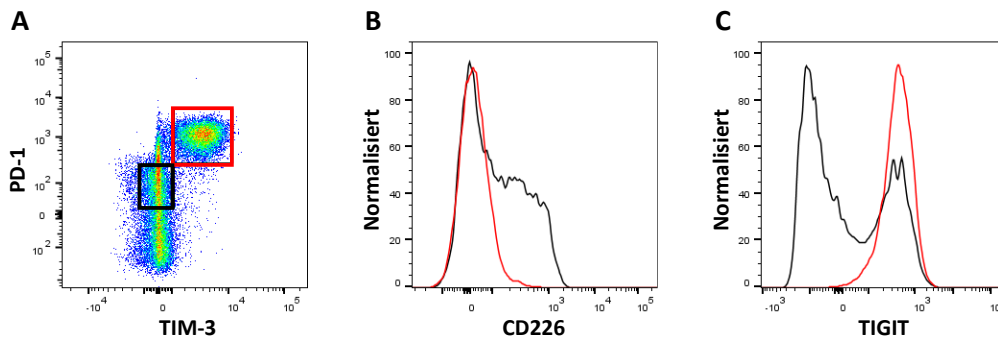


Abbildung 35: Expression von CD226 und TIGIT auf CD8-T-Zellen aus einem Lymphknoten mit DCCD 250.000. **A** Expression von PD-1 und TIM-3 in CD8-T-Zellen aus einem Lymphknoten eines Melanompatienten mit DCCD 250.000. Die rote Auswahl markiert die Population mit hoher PD-1 und TIM-3 Expression und die schwarze Auswahl eine Population mit moderater PD-1 und ohne TIM-3 Expression. **B und C** Histogramme der Intensität des CD226 (B) und TIGIT (C) Signals der Populationen aus der roten und schwarzen Auswahl aus (A). Die Farbe der Linien der Histogramme korrespondiert mit der Farbe der Auswahl aus (A).

Im nächsten Schritt sollte getestet werden, ob die Veränderung der CD226 und TIGIT Expression eine Aussage über die T-Zell Funktionalität zulässt und mit dem DCCD korreliert. Hierzu wurden CD8-T-Zellen, aus Lymphknoten von Melanompatienten mit bekanntem DCCD oder von Nicht-Tumorpatienten, mit Antikörpern gegen CD226 und TIGIT gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. Die Stärke der Expression kann mit dem geometrischen Mittelwert der Fluoreszenz (MFI) der Zellen bestimmt werden. Abbildung 36 A zeigt, dass der MFI der CD226⁺ CD8-T-Zellen negativ mit dem DCCD korrelierte: Je mehr DCC sich im Lymphknoten befanden, desto geringer war die CD226 Expression und damit die Funktionalität der CD8-T-Zellen. Im Gegensatz dazu korrelierte der MFI der TIGIT⁺ CD8-T-Zellen positiv mit dem DCCD: Je höher der DCCD, desto mehr TIGIT exprimierten die CD8-T-Zellen (Abb. 36 B). Die Abbildungen 36 C und D zeigen die Histogramme der Expression von CD226 und TIGIT anhand von drei repräsentativen Beispielen mit DCCD = 0, 1.000 und 300.000. Hier ist zu sehen wie sich der MFI mit steigendem DCCD für CD226 erniedrigte und für TIGIT erhöhte. Die sich ändernde Expressionshöhe von CD226 und TIGIT spiegelte sich im Quotienten aus dem MFI von CD226 und TIGIT wider, der mit steigendem DCCD kleiner wurde.

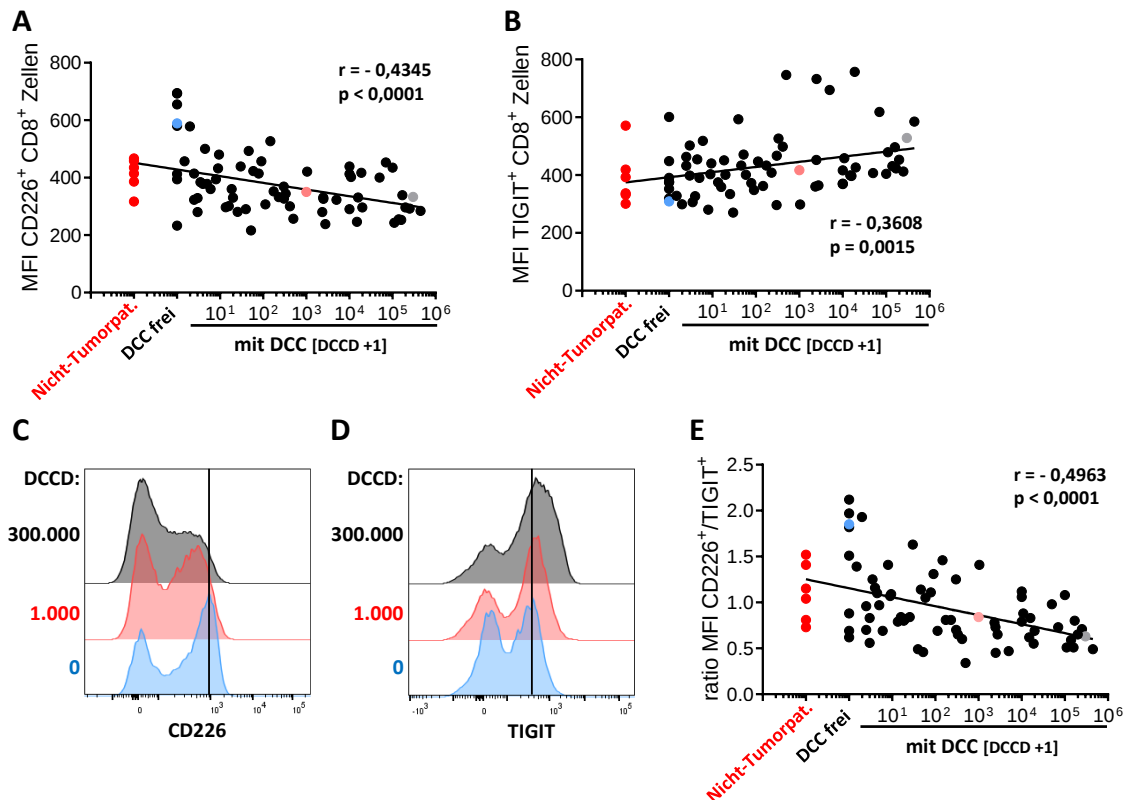


Abbildung 36: Analyse der Korrelation des MFI von CD226 und TIGIT auf CD8-T-Zellen aus Lymphknoten von Melanompatienten mit unterschiedlichem DCCD. **A und B** Korrelationsanalyse des MFI von CD226⁺ (A) und TIGIT⁺ (B) CD8-T-Zellen mit dem log10 transformierten DCCD des zugehörigen Lymphknotens. **C und D** Histogramme der Intensität des Signals von CD226 und TIGIT anhand von drei repräsentativen Beispielen aus (A) und (B) mit DCCD = 0, 1.000 und 300.000. Die Punkte der Beispiele sind in (A), (B) und (E) mit der jeweiligen Farbe (grau, rot und blau) markiert. Der schwarze Strich markiert den Peak der Positiven Population bei DCCD = 0. **E** Korrelationsanalyse des Quotienten aus dem MFI von CD226⁺ und TIGIT⁺ CD8-T-Zellen mit dem log10 transformierten DCCD des zugehörigen Lymphknotens. Die Normalverteilung wurde mit dem D'Agostino-Pearson Omnibus K2 Test überprüft. (A), (B) und (E) sind nicht normalverteilt deshalb wurde die Korrelation nach Spearman berechnet. r- und p-Wert nach Spearman sind im jeweiligen Plot angegeben. n = 75 Lymphknoten, davon 8 Lymphknoten von Nicht-Tumorpatienten.

Im letzten Schritt der Entwicklung eines erschöpften Zustands verlieren CD8-T-Zellen ihre Fähigkeit Effektor-Moleküle, wie zum Beispiel TNF, zu produzieren. Man bezeichnet sie dann als *terminally exhausted*. Um die Korrelation zwischen DCCD und dem MFI von TNF in den CD8-T-Zellen aus den Lymphknoten von Melanompatienten zu testen, wurden sie mit einem Antikörper gegen TNF gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. Wie Abbildung 37 A zeigt, war eine klar negative Korrelation zwischen dem MFI von TNF und dem DCCD gegeben. In Abbildung 37 B und C ist die Expression von TNF in drei Proben mit DCCD = 0, 2.470 und 140.000 dargestellt. Die Histogramme zeigen deutlich die beobachtete Verschiebung des MFI, wie auch die Punktediagramme zeigen, dass mit steigendem DCCD der Anteil TNF-produzierender CD8-T-Zellen sank.

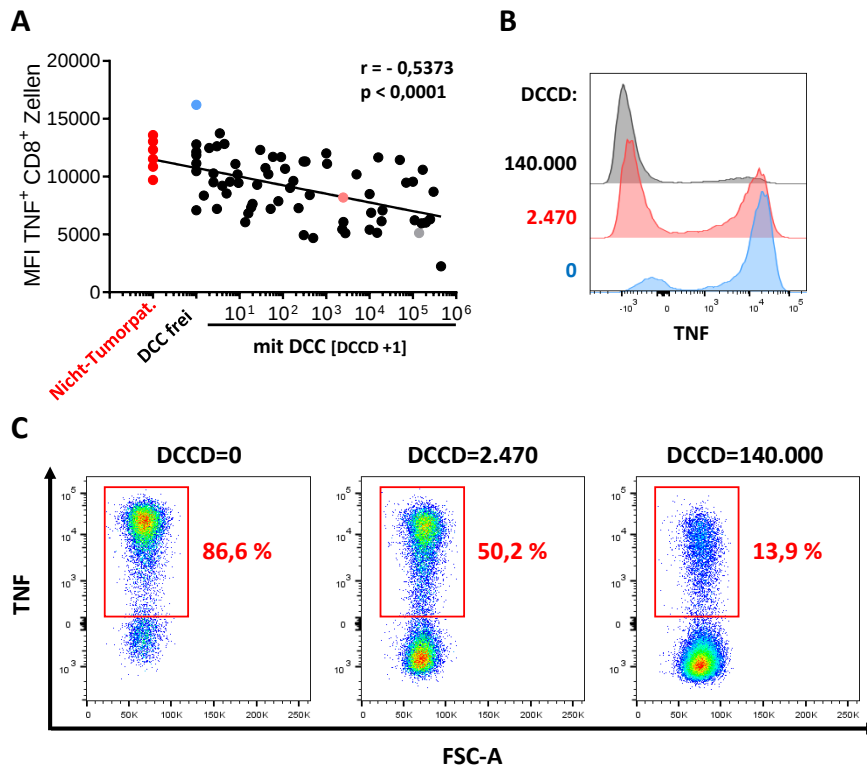


Abbildung 37: Analyse der Korrelation der Expression von TNF auf CD8-T-Zellen aus Lymphknoten von Melanompatienten mit unterschiedlichem DCCD. **A** Korrelationsanalyse des MFI von TNF⁺ CD8-T-Zellen mit dem log10 transformierten DCCD des zugehörigen Lymphknotens. **B und C** Histogramme (B) und Punktediagramme (C) des TNF-Signals anhand von drei repräsentativen Beispielen aus (A) mit DCCD = 0, 2.470 und 140.000. Die Punkte der Beispiele in (B) sind in (A) mit der jeweiligen Farbe (grau, rot und blau) markiert. Die Normalverteilung wurde mit dem D'Agostino-Pearson Omnibus K2 Test überprüft. Die Werte sind normalverteilt, weswegen die Korrelation nach Pearson angewandt wurde. r- und p-Wert nach Pearson sind im Plot angegeben. n = 75 Lymphknoten, davon 8 Lymphknoten von Nicht-Tumorpatienten.

Zusammenfassend hat die Analyse der CD8-T-Zellen aus Lymphknoten von Melanompatienten gezeigt, dass der Quotient aus dem MFI von CD226 und TIGIT und die TNF Expression negativ mit dem DCCD korrelieren. Die genannten Moleküle stellen sogar ein sensitiveres Maß für die Funktionalität der CD8-T-Zellen dar als PD-1 und TIM-3, da bereits ab einem niedrigeren DCCD als bei PD-1 und TIM-3 eine Korrelation zu erkennen ist.

4.12. Untersuchung Extrazellulärer Vesikel auf miRNAs

4.12.1. Aufnahme von EVs durch Makrophagen

Der suppressive Effekt der MelDCC-EVs auf CD8-T-Zellen konnte bereits nachgewiesen werden, jedoch können die CD8-T-Zellen nicht isoliert von den anderen Zellen der Immunmikroumgebung betrachtet werden. Eine Komponente der Immunmikroumgebung die notwendig ist, um CD8-T-Zellen zu aktivieren, sind *Antigen Presenting Cells* (APCs), zu denen auch Makrophagen zählen.

Um zu testen, ob MelDCC-EVs mit Makrophagen interagieren können, wurden humane Monozyten von gesunden Spendern in M1 Makrophagen differenziert und mit CFSE-gefärbten 100K-Pellets behandelt. Die Aufnahmen am Konfokalmikroskop erfolgten in Kooperation mit Dr. Mathias Raß vom Lehrstuhl für Entwicklungsbiologie der Universität Regensburg. In Abbildung 38 B ist zu sehen, dass die mit dem 100K-Pellet behandelten Makrophagen EVs aufgenommen haben. Der weiße Pfeil zeigt auf eine Akkumulation des grünen Signals neben dem Nukleus. Dies sind intakte Vesikel, die von der Zelle aufgenommen wurden. Das grüne CFSE Signal, welches als Schleier um den DAPI gefärbten Nukleus zu erkennen war, stammte wahrscheinlich von Proteinen, die über Vesikel in die Zelle gelangt sind. Im Gegensatz dazu war das grüne Signal in der Kontrolle nicht vom HLA-ABC Signal zu unterscheiden. Auch waren keine intakten Vesikel zu erkennen (Abb. 38 A). Das HLA-ABC Signal in Abbildung 38 B ist leider aufgrund von *Photobleaching* kaum zu sehen. Bei der Aufnahme am Mikroskop war jedoch klar zu erkennen, dass sich die Vesikel innerhalb der HLA-ABC gefärbten Membran befanden.

Zur Validierung der Ergebnisse aus der konfokalen Mikroskopie mit einer zweiten Methode wurde das CFSE Signal der mit 100K-Pellets behandelten Makrophagen am Durchflusszytometer gemessen. Im Vergleich zur Kontrolle, bei der nur 2,4 % der Zellen ein CFSE Signal aufwiesen, waren 13,2 % der mit 100K-Pellet behandelten Makrophagen positiv für CFSE (Abb. 38 C und D). Es kann somit bestätigt werden, dass die zu M1 Makrophagen differenzierten humanen Monozyten in der Lage sind, EVs und ihr Cargo aufzunehmen.

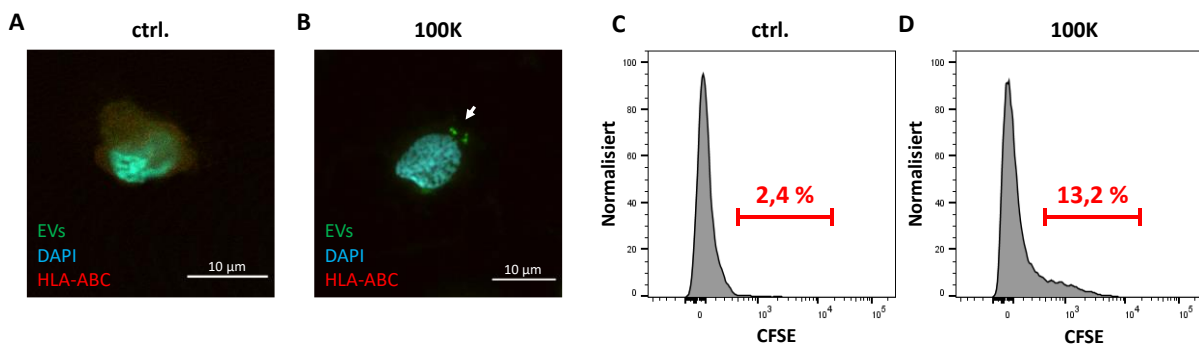


Abbildung 38: Mikroskop-Aufnahmen und durchflusszytometrische Messung von EV-behandelten humanen Monozyten. A, B GM-CSF stimulierte humane Monozyten inkubiert mit CFSE-gefärbter PBS Kontrolle (ctrl.) (A) und CFSE-gefärbtem 100K-Pellet (B) aufgenommen am Konfokalmikroskop. Der Zellkern ist mit DAPI gefärbt und die Membran mit HLA-ABC. Der weiße Pfeil deutet auf die CFSE-gefärbten Vesikel innerhalb der Zelle. C, D Durchflusszytometrische Messung des CFSE Signals in den mit CFSE-gefärbtem PBS (ctrl.) (C) und CFSE gefärbtem 100K-Pellet (D) behandelten Monozyten.

4.12.2. Etablierung eines Protokolls zur Degradierung extravesikulärer, kontaminierender miRNAs

Es wurde gezeigt, dass der Phänotyp und die Funktion von Makrophagen durch die Aufnahme von EVs beeinflusst werden können und insbesondere miRNAs bei diesen Prozessen eine Rolle spielen (Fabbri et al. 2012). Aufgrund dieser Erkenntnisse und des Ergebnisses, dass MelDCC-EVs von Makrophagen aufgenommen werden konnten, wurde eine Sequenzierung der miRNAs aus MelDCC-EVs durchgeführt. Da das 100K-Pellet neben EVs auch Ribonukleoproteine (RNP) und freie, potenziell an den Vesikeln hängende miRNAs enthält, wurde ein RNase Verdau durchgeführt, um diese potenziellen Kontaminanten zu eliminieren. Hierfür wurde entweder nur ein RNase-Verdau oder zuerst ein Proteinase K (PK) Verdau, um die miRNAs aus den RNPs zu befreien, und anschließend ein RNase-Verdau durchgeführt.

Die, nach den beschriebenen Vorbehandlungen, isolierte RNA wurde in Kooperation mit dem Lehrstuhl für Biochemie I der Universität Regensburg (AG Meister) mittels *Next Generation Sequencing* (NGS) analysiert. Vergleicht man die Qualität der miRNA-Sequenzierbibliotheken, so hat diese durch die PK + RNase-Behandlung in Bezug auf den Anteil an gelesenen Sequenzen (engl. *reads*), die miRNAs zugeordnet werden können, gelitten. Wurde die RNA aus unbehandelten (UT) EVs isoliert, lag die Zuordnungsrate (engl. *mapping rate*) bei knapp 50 %. Nach RNase Behandlung sank diese jedoch auf ca. 30 % und nach PK + RNase Behandlung noch weiter auf etwa 10 % (Abb. 39 A und Tab. 14).

Um zu testen, warum die Zuordnungsrate so stark gesunken war, wurde eine Analyse der Länge der *reads* in je einem Replikat der drei unterschiedlichen Behandlungen durchgeführt. Es ist zu sehen, dass die Anzahl an *reads* mit einer Länge von 0 Nukleotiden (nt), was leeren Adaptoren entspricht, nach RNase Behandlung zunahm und nach PK + RNase Behandlung am größten war (Abb. 39 B). Die Anzahl der *reads*, die in die mirDeep2 Software flossen (Länge des Reads >17 nt), nahmen dementsprechend nach Behandlung ab, was im Umkehrschluss zu einer geringeren Zuordnungsrate, bezogen auf die Gesamtanzahl der *reads*, führte (Abb. 39 A und B, Tab. 14).

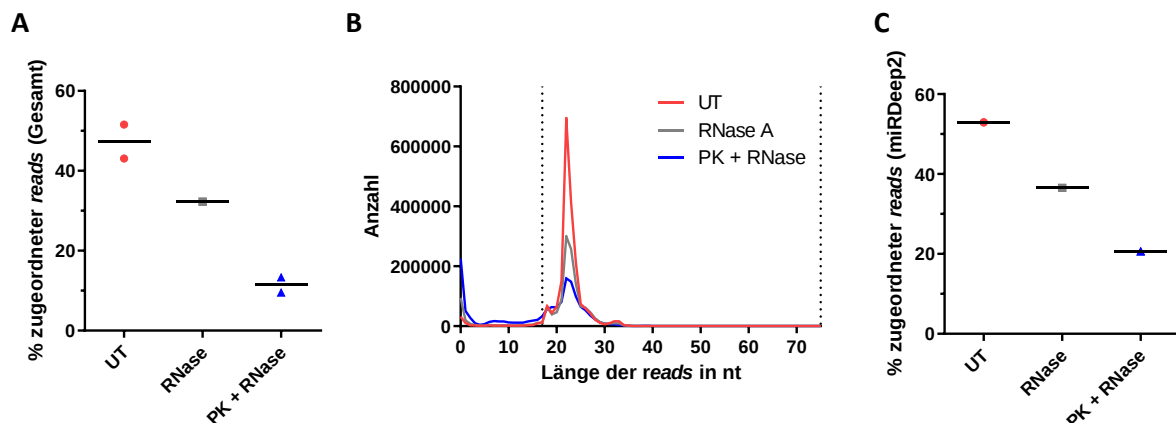


Abbildung 39: Analyse der Qualität der miRNA-Sequenzierbibliotheken nach verschiedenen Vorbehandlungen der EVs. A Dargestellt ist der Median des prozentualen Anteils der erfolgreich miRNAs zugeordneten *reads* an den gesamten *reads* der jeweiligen miRNA-Sequenzierbibliothek. B Analyse der *read*-Längenverteilung jeweils eines Replikats nach *adapter trimming*. *Reads* länger als 75 nt oder *untrimmed reads* wurden nicht analysiert. Der Bereich zwischen den vertikalen gestrichelten Linien bei 17 und 75 nt umfasst alle *reads*, die in die RNA-Biotypisierung eingeflossen sind. C Prozentualer Anteil der erfolgreich miRNAs zugeordneten *reads* an den *reads*, die in die mirDeep2 Analyse eingingen. Die in (C) gezeigten Replikate entsprechen den in (B) gezeigten *reads* zwischen 17 und 75 nt + den *reads* größer als 75 nt und den *untrimmed reads*.

Wird die Zuordnungsrate auf die *reads* bezogen, die in die mirDeep2 Analyse eingingen, verbesserten sich zwar die Zuordnungsraten der mit RNase und PK + RNase behandelten Proben, fielen aber immer noch sehr viel geringer aus als in der UT Probe (Abb. 39 C und Tab. 14).

Tabelle 14: Überblick der Analyse der miRNA-Sequenzierbibliotheken

	Kriterien	UT Replikat 1	RNase	PK + RNase Replikat 1
Gesamt reads	Ausgabe MiSeq	2.045.149	1.402.660	1.446.287
Eingabe in mirDeep2	>17 + <i>untrimmed Reads</i>	1.953.351	1.219.414	922.925
Zugeordnete reads	Zuordnung einer miRNA von miRBase	1.034.083	452.856	190.362
Eingabe in die Biotypisierung	>17 und <76 nt	1.913.766	1.194.975	892.388

Daher wurde eine RNA-Biotypisierung durchgeführt, um zu untersuchen auf welchen RNA-Subtyp die *reads* zurückgehen, welche mit mirDeep2 nicht miRNAs zugeordnet werden konnten. Bei der RNA-Biotypisierung wurden die Sequenzen der *reads* mit Datenbanken von allen bekannten RNA-Spezies verglichen (Abb. 40). Das Ergebnis zeigt, dass in der UT-Probe der größte Teil der vorhandenen *reads* miRNAs und *Long noncoding* RNAs zugeordnet wurde. Der Anteil dieser beiden Spezies verringerte sich bei der RNase Probe und war in der PK + RNase Probe am geringsten. Mit Behandlung nahm der Anteil an Sequenzen zu, die Pol1rRNA und Pol3RNA sowie Protein-kodierenden RNAs zugeordnet werden konnten. Das Auftreten dieser Spezies in der Biotypisierung spricht dafür, dass der Verdau zwar erfolgreich, aber unvollständig war. Dadurch sind Fragmente langer RNAs erhalten geblieben und waren somit in der miRNA-Sequenzierbibliothek enthalten.

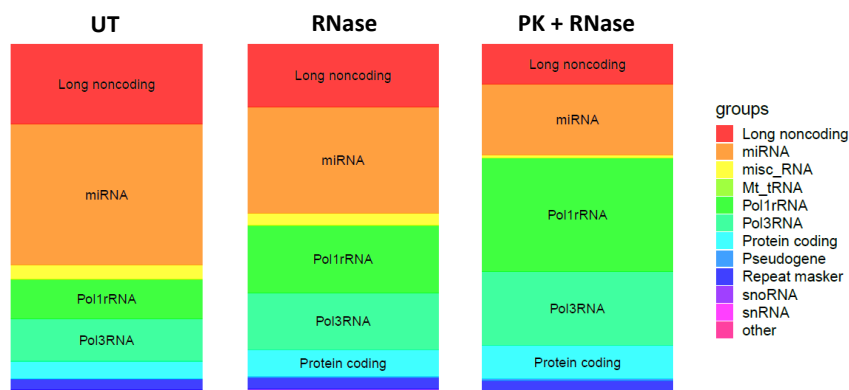


Abbildung 40: Biotypisierung der *reads*. *Reads* mit einer Länge >17 und <76 nt wurden mit Datenbanken von allen bekannten RNA Spezies verglichen. Zu sehen ist die Zugehörigkeit der zugeordneten *reads* zu den unterschiedlichen RNA-Spezies. Abbildung erstellt von Gerhard Lehmann (AG Meister).

Die Analyse der Qualität der miRNA-Sequenzierbibliotheken und die Biotypisierung haben gezeigt, dass mit dem RNase und PK Verdau die Anzahl und der Anteil von miRNAs an den *reads* abnimmt, wohingegen der Anteil von Pol1rRNA und Pol3RNA zunimmt. Daher wurde im Folgenden untersucht welche miRNAs durch den Verdau verloren gegangen sind. Diese Analyse wurde nur für UT und PK + RNase durchgeführt, da bekannt ist, dass extrazelluläre miRNAs, die z.B. von toten Zellen stammen, im Zellkulturmedium an Ago2 gebunden eine hohe Stabilität aufweisen (Turchinovich et al. 2011). Deshalb ist der Proteinase K Verdau ein essenzieller Schritt, um sicherzustellen, dass Ago-2 verdaut wird und die miRNAs zugänglich für den anschließenden RNase-Verdau werden.

Die in den UT und PK + RNase Proben identifizierten miRNAs wurden anhand ihrer *reads* gruppiert und für jede Gruppe wurde der prozentuale Anteil der bekannten miRNAs berechnet. Ein Vergleich der nicht normalisierten Rohwerte der *reads* zwischen UT und PK + RNase zeigte, dass durch die PK + RNase Behandlung hauptsächlich die in geringer Anzahl vorhandenen miRNAs mit weniger als 10 *reads* betroffen waren. Ab 11-100 *reads* glichen sich die beiden Proben zunehmend an (Abb. 41 A). Eine ähnliche Aussage ergab die Analyse der normalisierten *reads* als *reads per million* (RPM), welche zeigte, dass es zwischen UT und PK + RNase Behandlung bei den häufiger vorhandenen miRNAs ab dem

Bereich von 101-1.000 RPM keinen Unterschied mehr gab (Abb. 41 B). Ferner war eine vergleichbare Korrelation zwischen den Replikaten der UT oder PK + RNase Probe beobachtbar (Abb. 41 C, D).

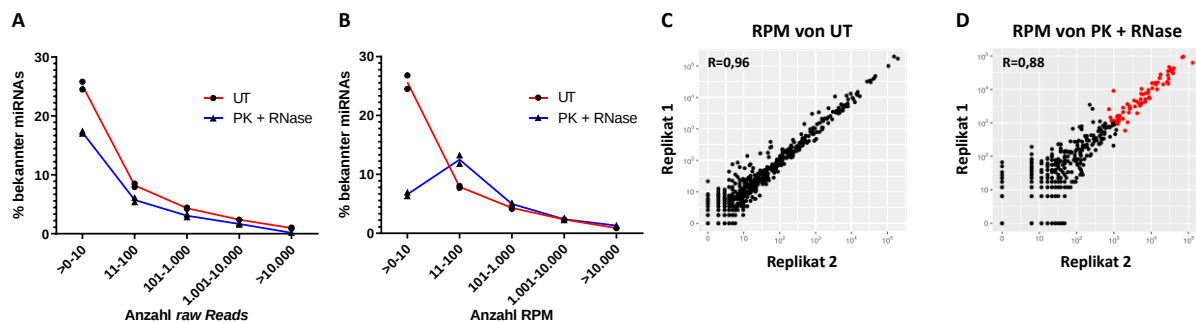


Abbildung 41: Verteilung der reads ohne und mit PK + RNase Behandlung der 100K-Pellets. A, B Prozentualer Anteil der miRNAs bezogen auf die Rohdaten der reads (A) und reads per million (RPM) (B) ohne Behandlung (UT) und mit PK + RNase Behandlung in den Bereichen >0-10, 11-100, 101-1.000, 1.001-10.000 und >10.000. Gezeigt ist der Median des prozentualen Anteils der Anzahl von miRNAs in den definierten Bereichen an allen bekannten humanen miRNAs. C, D Korrelationsanalyse der RPM der Replikate von UT (C) und PK + RNase (D). Die Punkte der miRNAs mit >1.000 RPM nach PK + RNase Behandlung sind rot hervorgehoben. R = Pearson Korrelation. Abbildungen C und D erstellt von Dr. Huiqin Koerke-Qu.

Um festzustellen, ob die häufig vorhandenen miRNAs (>1.000 RPM) auch außerhalb des EV-Lumens vorkamen, wurde die Log₂-fache Änderung (engl. *log₂fold change*) der RPM der miRNAs zwischen UT und PK + RNase Behandlung (rot markierte miRNAs in Abbildung 41 D) berechnet. Ist der *log₂fold change* der RPM positiv, ist der Anteil der miRNA an den Gesamt-reads der miRNA-Sequenzierbibliothek nach Behandlung größer geworden und zeigt, dass sich die betreffenden miRNAs hauptsächlich im EV-Lumen befanden. Ist der *log₂fold change* negativ, ist der Anteil der miRNA an den Gesamt-reads der miRNA-Sequenzierbibliothek nach Behandlung kleiner geworden und weist darauf hin, dass sich viele Kopien der betreffenden miRNA außerhalb der Vesikel befanden, d.h. Vesikel assoziiert waren oder passiv mitosoliert wurden. Abbildung 42 zeigt, dass der Großteil der miRNAs mit >1.000 RPM einen positiven *log₂fold change* aufwies und sich diese miRNAs folglich präferentiell innerhalb der Vesikel befanden. Jedoch konnte auch beobachtet werden, dass z.B. die auch nach PK + RNase Behandlung am häufigsten vorhandene miRNA miR-21-5p einen negativen *log₂fold change* aufwies, d.h. diese sowohl extravesikulär wie auch im EV-Lumen vorkommt.

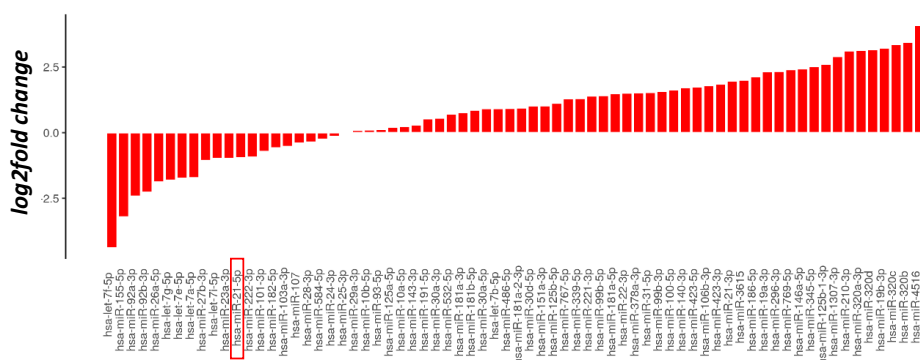


Abbildung 42: Log₂fold change der RPM der miRNAs mit mehr als 1.000 RPM nach PK + RNase Behandlung verglichen mit UT. Abbildung erstellt von Dr. Huiqin Koerke-Qu.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine Vorbehandlung der EVs mit PK + RNase angezeigt ist, um extravesikulär vorliegende, kontaminierende miRNAs zu entfernen, ohne die Identifizierung häufig vorhandener miRNAs im EV-Lumen zu beeinträchtigen. Zwar sinkt die Zuordnungsrate der miRNAs und damit auch deren Sequenziertiefe, aber es werden passiv mitosolierte miRNAs, die in geringer Häufigkeit vorkommen, eliminiert und es bleiben die relevanten, weil in großer Anzahl

vorkommenden miRNAs innerhalb der Vesikel erhalten. Somit ist das Ergebnis der Sequenzierung bezogen auf die Fragestellung verlässlicher. In der folgenden Sequenzierung der miRNAs aus EVs von 4 MelDCC-Linien wurde daher die Behandlung mit PK + RNase vor RNA-Isolation und Generierung der miRNA-Sequenzierbibliotheken durchgeführt.

4.12.3. Sequenzierung von miRNAs aus vier MelDCC-Linien und -EVs

Nachdem die Vorbehandlung der 100K-Pellets vor RNA-Isolation und miRNA Sequenzierung etabliert wurde, wurden die miRNAs aus drei Replikaten der 100K-Pellets von MelDCC2, 8, 10a und 11 sequenziert. Zusätzlich wurde RNA aus den EV-produzierenden Zellen isoliert und die darin enthaltenen miRNAs wurden ebenfalls sequenziert. Die Qualität der miRNA Sequenzierung der Zellen war in allen 4 Zelllinien ausreichend und die drei Replikate jeder Zelllinie lieferten vergleichbar viele zugeordnete *reads* (Abb. 43 A). Die meisten zugeordneten *reads* lieferte die Zelllinie MelDCC2 mit über 60 %, gefolgt von MelDCC10a und 11, die beide etwas mehr als 40 % zugeordnete *reads* aufwiesen. Am schlechtesten war die Sequenzierung von MelDCC8, welche nur knapp über 25 % zugeordnete *reads* lieferte.

Im Gegensatz zu den miRNA-Sequenzierbibliotheken aus den Zelllinien war die Qualität der miRNA-Sequenzierbibliotheken aus den 100K-Pellets nicht zufriedenstellend (Abb. 43 B). Am besten war die Sequenzierung der miRNAs des 100K-Pellets von MelDCC10a mit einem Median der zugeordneten *reads* von ca. 4,7 %, gefolgt von MelDCC2 und 11 mit ca. 1,3 %. Das schlechteste Ergebnis wurde bei der Sequenzierung des 100K-Pellets von MelDCC8, mit einem Median der zugeordneten *reads* von ca. 0,8 %, erzielt. Ein Replikat des 100K-Pellets von MelDCC8 lag sogar bei nur 0,3 % zugeordneten *reads*.

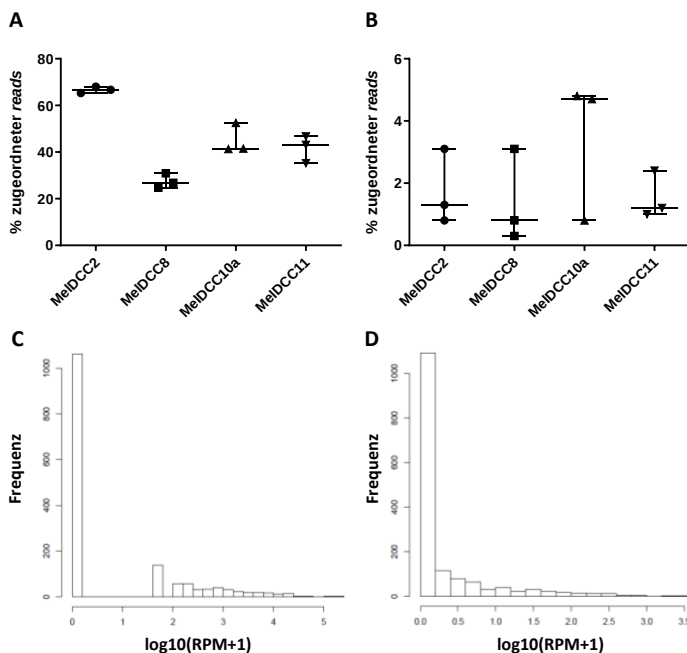


Abbildung 43: Qualitätsanalyse der miRNA-Sequenzierbibliotheken anhand der zugeordneten *reads*. A und B Dargestellt ist der Median mit Bereich des prozentualen Anteils der erfolgreich auf miRNAs zugeordneten *reads* aus der Sequenzierung der miRNAs von Zellen (A) und 100K-Pellets (B). Der Prozentsatz zugeordneter *reads* bezieht sich auf den Anteil zugeordneter *reads* an den in die miRDeep2-Analyse eingeflossenen *reads*. C und D Log10(RPM+1) der miRNAs aus dem 100K-Pellet von MelDCC8 (C) und MelDCC10a (D) aufgetragen gegen die Frequenz (Anzahl an miRNAs). Die Balken unterteilen den log10(RPM+1) in Bereiche, um das Vorkommen von miRNAs im jeweiligen Bereich darzustellen. Abbildungen C und D erstellt von Dr. Huiqin Koerke-Qu.

Die miRNA-Sequenzierbibliotheken wurden durch Berechnung der *reads per million* (RPM) normalisiert und vor der bioinformatischen Analyse auf die Frequenz der miRNAs mit einer definierten Anzahl von normalisierten *reads* analysiert. In Abbildung 43 C ist das Profil des Mittelwerts der

log10(RPM+1) der drei Replikate des MelDCC8 100K-Pellets zu sehen. Es fällt auf, dass hier, im Gegensatz zum 100K-Pellet von MelDCC10a, durch die Normalisierung die miRNAs mit wenigen *reads* verschwanden und künstlich sehr viele *reads* erhielten (Abb. 43 C und D). Dies hat damit zu tun, dass insgesamt sehr wenige miRNAs annotiert werden konnten. Die Sequenziertiefe für miRNAs des 100K-Pellets von MelDCC8 reichte nicht aus, um sie mit den miRNAs der anderen 100K-Pellets zu vergleichen. Aus den genannten Gründen wurde die Zelllinie MelDCC8 und ihre 100K-Pellets von der Analyse ausgeschlossen.

Um zu untersuchen wie unterschiedlich die einzelnen Proben bzw. Replikate voneinander sind, wurde eine *Principal Component Analysis* (PCA) durchgeführt (Abb. 44 A). Die miRNA Profile der drei Zelllinien und ihrer Replikate unterschieden sich anhand von PC1 nicht sehr stark, nur anhand der PC2 Achse trennten sie sich auf. Auch die miRNA-Profile der 100K-Pellets und ihrer Replikate waren sich sehr ähnlich und gruppieren, vor allem anhand PC2, noch näher zusammen. Interessant ist, dass die miRNA Profile der 100K-Pellets sehr eng zusammen gruppieren und damit weniger unterschiedlich zueinander waren als zur jeweiligen Zelllinie, von der sie produziert worden waren. Dies deutet darauf hin, dass die MelDCC-Linien bestimmte miRNAs aktiv in den EVs anreichern könnten, was dann zu einem ähnlichen miRNA Profil führt.

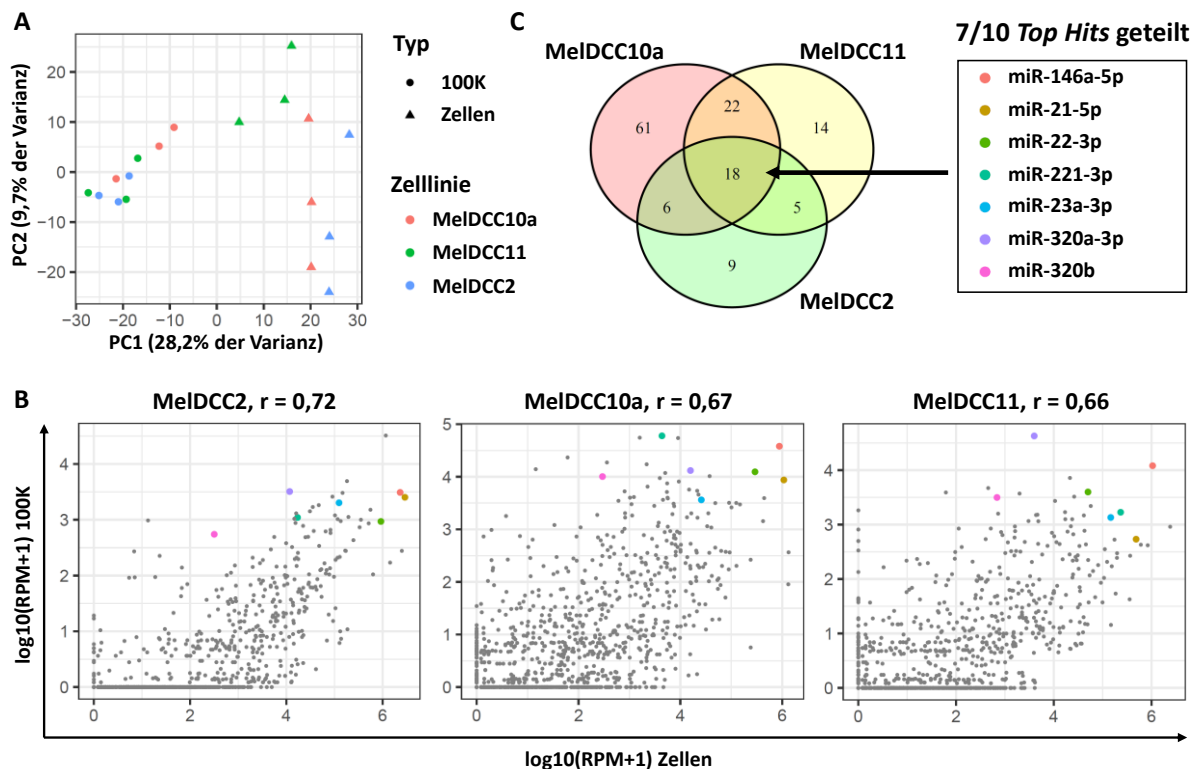


Abbildung 44: Ergebnisse der Analyse der Daten der miRNA Sequenzierung von MelDCC2, 10a und 11. **A** *Principal Component Analysis* (PCA) der miRNA Sequenzierung von MelDCC10a, MelDCC11 und MelDCC2 und den von ihnen produzierten 100K-Pellets. Die Sequenzierbibliotheken wurden vor der PCA durch Berechnung der *reads per million* (RPM) zueinander normalisiert. **B** In den Punktdiagrammen ist der log10(RPM+1) der miRNAs aus den Zellen gegen den log10(RPM+1) der miRNAs aus den 100K-Pellets aufgetragen. Gezeigt ist der Mittelwert des log10(RPM+1) der drei Replikate. Die 7/10 *Top Hits* aus (C) sind farblich markiert. **C** Venn Diagramm der miRNAs mit einem log10(RPM+1) > 2,5 aus den 100K-Pellets. Durch Berechnung des Mittelwerts des log10(RPM+1) jeder miRNA aus den 100K-Pellets der drei Zelllinien wurden die 10 durchschnittlich am stärksten exprimierten miRNAs identifiziert. 7 dieser 10 *Top Hits* weisen in den 100K-Pellets von allen 3 Linien einen log10(RPM+1) > 2,5 auf und sind rechts neben dem Venn Diagramm aufgeführt. Die Korrelation wurde nach Pearson bestimmt und der r-Wert ist über den Plots angegeben. Abbildung erstellt in Zusammenarbeit mit Dr. Huiqin Koerker-Qu.

Als nächstes wurde die Korrelation der miRNA Expression zwischen 100K-Pellet und der jeweiligen Zelllinie aufgetragen, um festzustellen, ob miRNAs, welche häufig in den Zellen vertreten sind, auch

vermehrt in den EVs vorkommen (Abb. 44 B). Die Korrelation der zellulären und 100K miRNAs unterschied sich zwischen den Zelllinien nicht sehr stark, war aber bei MelDCC2 mit $R = 0,72$ am höchsten und bei MelDCC10a mit $R = 0,67$ und MelDCC11 mit $R = 0,66$ fast identisch. Insgesamt waren in den Zellen mehr miRNAs mit höheren RPM zu finden als in den 100K-Pellets und es gab auch miRNAs, die nicht in den Vesikeln zu finden waren.

Um miRNAs, die mit großer Häufigkeit in den 100K-Pellets aller drei MelDCC-Linien vorkommen, zu identifizieren, wurde ein Schwellenwert von $\log_{10}(\text{RPM}) > 2,5$ gewählt, wodurch 18 miRNAs identifiziert wurden (Abb. 44 C). Weiterhin wurden die 10 miRNAs, welche durchschnittlich in allen drei 100K-Pellets die höchste Anzahl von RPM aufwiesen (10 *Top Hits*), mit den 18 Geteilten verglichen. Am Ende konnten 7 der 10 *Top Hits* innerhalb der 18 geteilten miRNAs identifiziert werden. Dies sind die miRNAs, die sowohl in allen drei 100K-Pellets mit einem $\log_{10}(\text{RPM}) > 2,5$ als auch unter den 10 durchschnittlich am stärksten exprimierten miRNAs vorkommen.

Unter diesen sieben miRNAs fanden sich miR-146a und miR-21, für welche publiziert ist, dass sie Differenzierung und Funktion von angeborenen Immunzellen beeinflussen können (Smyth et al. 2015; Testa et al. 2017; Hsieh et al. 2018; Fabbri et al. 2012). Ob Melanom-DCC den Phänotyp und die Funktion von Zellen des angeborenen Immunsystems verändern, indem sie EVs freisetzen, die miR-146a, miR-21 oder andere miRNAs übertragen, muss jedoch noch untersucht werden.

5. Diskussion

In dieser Arbeit wurden die Hypothesen untersucht, dass (i) DCC als Antwort auf den Kontakt mit IFN γ -produzierenden CD8-T-Zellen den *EV-Pathway* hochregulieren und (ii) die DCC-EVs mit den CD8-T-Zellen oder APCs interagieren, diese inhibieren und dadurch die *immune surveillance* im Lymphknoten einschränken und so die Bildung einer Metastase vorantreiben.

Die Untersuchungen dieser Dissertation zeigen, dass die Interaktion von DCC im SLN von Melanompatienten zur lokalen *Exhaustion* von CD8 T-Zellen führt, da mit steigendem DCCD der Anteil PD-1⁺ TIM-3⁺ CD8-T-Zellen zunimmt. Aufgrund molekularer Analysen der DCC, die eine Hochregulation des Signalwegs zur Produktion Extrazellulärer Vesikel nahelegten, wurden EVs von Melanom-DCC-Zelllinienmodellen (MelDCCs) auf ihre immunmodulatorischen Eigenschaften überprüft. EVs können sowohl über miRNA als auch über Proteininteraktionen immunsuppressiv wirken und zwar auf das angeborene, wie auch auf das erworbene Immunsystem. Für beide Mechanismen wurden in dieser Arbeit wichtige Einsichten gewonnen. Entscheidend hierfür waren saubere Präparationen von EVs. Dadurch gelang insbesondere die Identifizierung von CD155 und CD226 als wesentliche immunmodulatorische Moleküle. Als therapeutische Konsequenz der Ergebnisse dieser Arbeit wäre zu prüfen, ob eine Therapie aus anti-CD155/anti-TIGIT oder anti-CD276 in Kombination mit anti-PD-1/PD-L1 Antikörpern die Bildung von Metastasen reduzieren kann.

5.1. Die Anzahl von DCC im SLN ist mit lokaler CD8-T-Zell *exhaustion* assoziiert

Die Analyse der CD8-T-Zellen aus Lymphknoten von Melanompatienten zeigte, dass mit steigendem DCCD die Population an PD-1⁺ TIM-3⁺ Zellen zunahm und die PD-1⁺ TIM-3⁺ im Vergleich zu den PD-1⁺ TIM-3⁻ Zellen eine verminderte Expression von IFN γ aufwiesen. Bei der Untersuchung von mehreren Lymphknoten, je eines Patienten mit unterschiedlich starkem Tumorzellbefall, wurde deutlich, dass es sich hierbei nicht um einen systemischen, sondern um einen lokalen Effekt handelt. Hingegen wurde für Melanompatienten im Stadium IV beschrieben, dass im Blut, also systemisch, eine erhöhte Ko-Expression von PD-1 und TIM-3 auf CD8-T-Zellen festzustellen war und dies im Zusammenhang mit einer tumorspezifischen Dysfunktionalität der CD8-T-Zellen stand, die als *exhaustion* bezeichnet wird (Fourcade et al. 2010). Die Schlussfolgerung aus diesen Beobachtungen ist, dass bereits in einem frühen Stadium der Krankheit lokal in Lymphknoten mit hohem DCCD *exhaustion* auftritt und dadurch die Effektor-Funktionen der CD8-T-Zellen eingeschränkt sind, was das Auswachsen der DCC zu metastatischen Kolonien im Lymphknoten begünstigen könnte.

5.2. Isolation einer homogenen Population kleiner EVs von MelDCC10a

In den scRNAseq Daten wurde die Hochregulation des *EV-Pathways* und der IFN γ -Antwort in den DCC, während der frühen metastatischen Kolonisierung gezeigt. Um die Effekte der DCC-EVs studieren zu können, wurde zuerst die Isolation von EVs aus Kulturen von MelDCCs, welche als DCC-Surrogat dienen, etabliert. Auf den durch dUZ isolierten Pellets aus dem konditionierten Medium der Zelllinie MelDCC10a konnten im Western Blot sowohl Marker für kleine als auch große Vesikel nachgewiesen werden. Beide Arten von Vesikeln könnten eine Relevanz in Bezug auf die Inhibition der CD8-T-Zellen haben, da für kleine (sEVs) und große Vesikel (IEVs) bereits eine Beteiligung an der Metastasierung beschrieben wurde (Di Vizio et al. 2012; Fabbri et al. 2012; Hood et al. 2011; Peinado et al. 2012).

Es war jedoch auffällig, dass das 2K-Pellet und das Zell-Lysat im Western Blot ein identisches Bandenmuster aufwiesen und es kamen Zweifel auf, ob wirklich IEVs im 2K-Pellet isoliert wurden oder es sich um die Überreste toter Zellen handelte. Die Untersuchung des 2K-Pellets am TEM zeigte tatsächlich, dass sich das 2K-Pellet hauptsächlich aus Bestandteilen des Zytoskeletts toter Zellen zusammensetzte. Diese Erkenntnis stand im Widerspruch zu den Ergebnissen von Kowal et al. 2016, die mit dem gleichen Protokoll intakte IEVs im 2K-Pellet anhand von Western Blot und TEM nachweisen konnten. In dieser Studie wurden die EVs jedoch aus humanen Dendritischen Zellen isoliert, was die

unterschiedliche Zusammensetzung des 2K-Pellets erklären könnte. Um MelDCC10a-IEVs zukünftig zu studieren, könnte man das Protokoll verändern und z.B. wie in der Studie von Mathieu et al. 2021 vor der Isolation des 2K-Pellets die Zellkulturüberstände drei Mal für 20 min, anstatt einmal für 10 min, bei 300g zentrifugieren, um Zellen oder Bestandteile toter Zellen zu entfernen, bevor das 2K-Pellet bei 2.000g pelletiert wird. In einer anderen Studie wiederum wurden zuerst bei 2.800g für 10 min tote Zellen und Zellbestandteile entfernt, um anschließend aus dem Überstand dieser Zentrifugation die EVs bei 100.000g für 80 min aufzukonzentrieren und die IEVs anhand ihrer Größe mit dem FACS zu isolieren (Di Vizio et al. 2012). Im Gegensatz zum 2K-Pellet zeigte das 100K-Pellet am TEM eine klar definierbare homogene Population von intakten sEVs und es konnten sogar Membranproteine sichtbar gemacht werden. Daher wurden die weiteren funktionellen Studien nur mit dem 100K-Pellet durchgeführt.

5.3. Die Marker-unabhängige Isolation kleiner EVs durch dUZ ist vorteilhaft

Mit der *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA), die auf der Bestimmung der Anzahl aller lichtbrechenden Partikel im 100K-Pellet basierte, konnte die hohe Reproduzierbarkeit der EV-Isolation durch dUZ nachgewiesen werden. Zur spezifischen Messung von EVs kann der Marker CD81 herangezogen werden, welcher hauptsächlich auf kleinen EVs vorhanden ist (Kowal et al. 2016). Die Antikörper-basierte Färbung der Vesikel für CD81 zeigte, dass 27 % aller Partikel im 100K-Pellet CD81 positiv waren, was vergleichbar mit den Werten für die HTC116 Darmkrebslinie ist (Herstellinformation des im Rahmen dieser Dissertation verwendeten NTA-Messgeräts). Im Vergleich dazu waren in einer Studie von Fortunato et al. 2021 ca. 45 % der EVs, welche aus dem Überstand der HT29 Darmkrebs-Zelllinie mittels 10.000g Zentrifugation isoliert worden waren, CD81 positiv. Diese Daten zeigen, dass je nach Art der Ursprungszelle und Isolationsprotokoll, der Anteil der EVs, welche positiv für einen Marker sind, variieren kann und individuell bestimmt werden muss. Die durchschnittliche Größe der CD81 gefärbten MelDCC-EVs war mit 118 nm deutlich geringer als der Durchschnittswert aller Partikel (CD81+ und CD81-) mit 150 nm. Im Vergleich hierzu lag die durchschnittliche Größe der CD81⁺ HT28 EVs mit ca. 75 nm weit darunter (Fortunato et al. 2021). Dies ist dadurch zu erklären, dass in der Studie von Fortunato et al. 2021 die EVs, die zur Größenbestimmung verwendet wurden, mit SEC und anschließender Ultrafiltration oder Ultrafiltration allein aufgereinigt wurden, wobei der *Molecular weight cut of* (MWCO) bei 100 kDa lag. Dies resultierte, wie in den Ergebnissen zu sehen, in der Isolation einer Population mit weitaus kleineren EVs als mit dem in dieser Arbeit verwendeten dUZ Protokoll. Die Diskrepanz in der Anzahl und Größe der CD81 gefärbten Vesikel gegenüber allen Vesikeln spiegelt wider, dass CD81 spezifisch auf kleinen EVs (50 nm - 200 nm) vorhanden ist Kowal et al. 2016, welche 27 % aller Partikel im 100K-Pellet ausmachten. Dies war zu erwarten, da mit der dUZ, wie eingangs beschrieben, die Vesikel anhand ihrer Größe und Dichte isoliert werden. Das 100K-Pellet besteht also aus einem Gemisch von Vesikeln unterschiedlicher Biogenese und molekularen Zusammensetzung, die zelltypspezifisch sein kann und von denen nur ein Teil CD81 inkorporiert hat (Kowal et al. 2016). Eine genauere Analyse der Zusammensetzung des 100K-Pellets könnte durch die Untersuchung des Vorkommens der Marker CD9 und CD63 erfolgen. In einer Studie von Mathieu et al. 2021 konnten CD9 als auch CD63 in kleinen Ektosomen von HeLa Zellen nachgewiesen werden, welche an der Plasmamembran gebildet wurden. Exosomen stellten nur eine kleine Subpopulation von kleinen EVs dar, die CD63 zusammen mit anderen Proteinen aus späten Endosomen, wie LAMP1/2, aufwiesen. CD81 verhielt sich in HeLa Zellen eher wie CD9 und war überwiegend auf sEVs nicht endosomalen Ursprungs zu finden (Mathieu et al. 2021). Ob dies ein generelles Muster oder zelltypspezifisch ist, bleibt jedoch zu beweisen.

Die Technik der differentiellen Ultrazentrifugation wurde bewusst gewählt um alle kleinen Vesikel, die von den MelDCCs produziert werden, zu analysieren. Man könnte auch beispielsweise durch immunomagnetische Separation nur einen bestimmten Vesikel-Subtypen anhand eines Markers, wie z.B. CD9, CD63 oder CD81 isolieren (Kowal et al. 2016). Einerseits könnten dadurch jedoch die

magnetischen Beads, an die die EVs gebunden sind, den Test der EV-Präparation in einem funktionellen Assay erschweren und zum anderen könnten Effekte, die ein anderer Subtyp auslöst, übersehen werden. Wären in dieser Arbeit nur die CD81 positiven EVs isoliert worden, wären von vornherein 73 % der im 100K-Pellet isolierten Partikel von der Analyse ausgeschlossen gewesen. Die bessere Herangehensweise, welche auch in der vorgelegten Arbeit gewählt wurde, ist, zuerst den Effekt der dUZ 100K-Pellets zu evaluieren und anschließend das 100K-Pellet z.B. mit Größenausschlusschromatographie, einem Dichtegradienten oder mittels Marker-spezifischer magnetischer Separation weiter aufzutrennen und die erhaltenen Fraktionen erneut zu testen. Dies ermöglicht es zu überprüfen, ob der Effekt EV- bzw. EV-Subtyp-spezifisch ist.

5.4. MelDCC-EVs wirken immunsuppressiv auf CD8-T-Zellen

Durch die Behandlung aufgereinigter CD8-T-Zellen mit MelDCC-EVs konnte ein immunsuppressiver Effekt der MelDCC-EVs auf die CD8-T-Zellen in Bezug auf die Proliferation, Differenzierung in Antigen-erfahrene Zellen und die Produktion der Effektor-Zytokine IFN γ und GRZB nachgewiesen werden. Ein wichtiger Faktor bei der Produktion von EVs in Zellkulturüberständen ist der Einsatz von FBS im Wachstumsmedium. Zwar kann durch Ultrazentrifugation des für die Zellkultur eingesetzten FBS der Großteil an bovinen Vesikeln entfernt werden, jedoch verbleiben restliche EVs und die bovinen Proteine im FBS, welche sich an die MelDCC-EVs haften können und dann passiv mitisoliert werden (Freitas et al. 2019; Shelke et al. 2014). Dies ist bei der Analyse des Proteoms von EVs hinderlich, da Peptide, die von bovinen Proteinen stammen und Homologien zu Peptiden von humanen Proteinen aufweisen, in der massenspektrometrischen Analyse unter Umständen nicht voneinander unterschieden werden können. Außerdem könnten die bovinen Proteine die Wirkung der EVs auf ihre Zielzellen verändern. Weiterhin kann auch RNA durch Ultrazentrifugation nicht vollständig aus dem FBS entfernt werden (Wei et al. 2016). Wird die RNA aus dem FBS bei der Aufreinigung der EVs mitisoliert, hat dies natürlich Auswirkungen auf die RNA Profile der EVs. Eine Produktion der Vesikel ohne FBS hätte daher einige Vorteile und würde die Analyse der Ergebnisse aus allen folgenden Versuchen deutlich verlässlicher machen. Der Vergleich des Proteoms von EVs, die mit und ohne FBS produziert worden waren, ergab, dass der Unterschied hauptsächlich von den bovinen Proteinen stammte, die passiv mitisoliert wurden. Der suppressive Effekt des 100K-Pellets im CD8-T-Zell-Assay war sogar größer, wenn es mit FBS-freiem Medium produziert worden war. Das FBS im Medium führte also in der Tat dazu, dass bovine Proteine im 100K-Pellet mitisoliert wurden. Dies könnte durch Assoziation der Proteine an MelDCC-EVs oder durch die Bildung von Proteinaggregaten, die bei 100.000g pelletieren, erklärt werden. Die Abschwächung des suppressiven Effekts auf CD8-T-Zellen lässt darauf schließen, dass die bovinen Proteine mit der Interaktion zwischen EVs und CD8-T-Zellen interferierten. Die bovinen Proteine haben evtl. an Moleküle auf den EVs gebunden, die für die Bindung an oder die Interaktion mit den CD8-T-Zellen verantwortlich waren, und verhinderten diese so. Eine weitere mögliche Erklärung wäre, dass die MelDCC-Zellen als Stressreaktion auf die FBS-freien Bedingungen mehr EVs produzierten und dadurch auch der Effekt im CD8-T-Zell-Assay stärker ausfiel. Auch dies würde sich durch die Bestimmung der EV-Anzahl am NTA überprüfen lassen. Im Fall der MelDCC-Linien überwiegen die Vorteile der Produktion der EVs ohne FBS, ob dies auch bei anderen Zelllinien der Fall ist, muss jedoch individuell überprüft werden.

Ein möglicher Kritikpunkt daran, dass der immunsuppressive Effekt des 100K-Pellets im CD8-T-Zell-Assay extrazellulären Vesikeln zugeschrieben wurde, könnte die Isolationsmethode sein, da mit dUZ potenziell ein Gemisch aus verschiedenen Arten von kleinen EVs und möglicherweise zusätzlich noch Proteinaggregaten isoliert wird. Ob der T-Zellsuppressive Effekt des 100K-Pellets von den EVs oder löslichen Proteinen im 100K-Pellet ausgelöst wurde, war deshalb zunächst unklar. Entsprechend den *Minimal information for studies of extracellular vesicles guidelines 2018* (MISEV2018 *guidelines*) von Théry et al. 2018 wurde durch die Auftrennung des 100K-Pellets mit Größenausschlusschromatographie (SEC) in Vesikel- und Protein-Fraktion nachgewiesen, dass der immunsuppressive

Effekt des 100K-Pellets im CD8-T-Zell-Assay auf die EVs und nicht auf die isolierten Proteine im 100K-Pellet zurückzuführen war. Gemessen am Vorkommen des Proteins Hsp70, welches sowohl in Vesikeln aber auch löslich im Zytosol vorliegen kann (Gastpar et al. 2005; Daugaard et al. 2007; Komarova et al. 2021), waren EVs der Hauptbestandteil des 100K-Pellets, wobei lösliche Proteine nur in sehr geringem Maße mitisoliert wurden. Der im Vergleich zum 100K-Pellet etwas abgeschwächte suppressive Effekt der Vesikel-Fraktion im CD8-T-Zell-Assay mag darauf zurückzuführen sein, dass während des zusätzlichen Schritts der SEC ein gewisser Verlust an EVs aufgetreten ist. Weiterhin könnte es sein, dass die zusätzliche physikalische Einwirkung auf die Vesikel während der SEC ihre Integrität negativ beeinflusst hat. Diese Punkte könnten durch die Untersuchung der Vesikel-Fraktion am NTA und TEM adressiert werden.

Der immunsuppressive Effekt wurde damit zweifelsfrei den EVs zugeschrieben, wobei es keine Rolle spielte, ob die Behandlung der T-Zellen mit MelDCC-EVs vor oder nach ihrer anti-CD3/CD28 vermittelten Stimulation erfolgte. Daraus kann geschlossen werden, dass die EVs nicht passiv durch den Aufbau einer physikalischen Barriere zwischen CD3/CD28 Antikörpern und CD8-T-Zellen, z.B. durch Anlagerung um die CD8-T-Zellen herum, die Aktivierung verhinderten. Vielmehr haben sie aktiv mit den, dem T-Zellrezeptor nachgeschalteten, Signalen interferiert und so verhindert, dass die initialen Aktivierungssignale zu Proliferation und Differenzierung der CD8-T-Zellen führten. Dies könnte entweder durch Rezeptor-Liganden-Interaktion z.B. mit Immuncheckpoint-Molekülen auf der Oberfläche der CD8-T-Zellen oder durch die Internalisierung der Vesikel z.B. durch Rezeptor vermittelte Endozytose oder direkte Fusion mit der Plasmamembran stattgefunden haben (Möller und Lobb 2020). Überträgt man die beschriebenen Effekte auf die Immunumgebung im Wächterlymphknoten von Melanompatienten, zeigt sich die Relevanz der Ergebnisse. Die eingeschränkte Proliferation und Differenzierung der CD8-T-Zellen könnte die klonale Expansion von antigenspezifischen T-Zellen im Lymphknoten einschränken oder verhindern. Die verminderte Anzahl GRZB-positiver CD8-T-Zellen könnte einen direkten Einfluss auf die Fähigkeit der CD8-T-Zellen DCC zu eliminieren haben, da GRZB die Aktivierung von Caspase 3 in den Zielzellen vermittelt und damit die Apoptose der Zellen einleitet (Cullen et al. 2010). Auch die reduzierte Anzahl von IFN γ produzierenden Zellen könnte einen direkten Einfluss auf die *immune surveillance* im Lymphknoten haben. IFN γ wirkt sich positiv auf die Immunerkennung aus, da es in den Krebszellen die Expression von MHC-I anregt und so die DCC besser von den CD8-T-Zellen erkannt werden könnten (Rosa und Fellous 1988; Dhatchinamoorthy et al. 2021). Weiterhin kann IFN γ direkt die Apoptose von Tumorzellen auslösen, indem es die Expression von Caspase-1 und -8 sowie von Fas und FasL hochreguliert (Chin et al. 1997; Fulda und Debatin 2002; Xu et al. 1998). Auch die Proliferation von Krebszellen kann von IFN γ durch die Induktion der Expression des Cyclin-abhängigen Kinase Inhibitors p21 gebremst werden (Bromberg et al. 1996; Chin et al. 1996). Des Weiteren wurde beschrieben, dass IFN γ in Kombination mit TNF sowohl die Seneszenz als auch die *dormancy* von Krebszellen auslösen kann (Braumüller et al. 2013). Diese Studien zeigen, dass IFN γ über verschiedenen Mechanismen zur Abwehr von Tumorzellen beitragen kann und verdeutlichen damit, dass die Reduktion der IFN γ positiven CD8-T-Zellen durch die MelDCC-EVs einen fundamentalen Einfluss auf ihre Effektor-Funktion haben könnte. Übertragen auf die Situation im Wächterlymphknoten könnte eine verringerte Anzahl IFN γ positiver CD8-T-Zellen das Auswachsen der DCC und damit die metastatische Kolonisierung des Lymphknotens begünstigen.

Dass es sich dabei um keine Beobachtung handelte, die nur auf die MelDCC-Linie eines Patienten beschränkt war, zeigten die vergleichbaren Ergebnisse, die mit drei weiteren MelDCC-Linien anderer Patienten erhalten wurden. Im CD8-T-Zell-Assay wurden die EVs anhand der Anzahl produzierender Zellen normalisiert. Dennoch muss bedacht werden, dass es zwischen den Zelllinien quantitative wie qualitative Unterschiede der von ihnen produzierten EVs geben kann. So können sich die Anzahl der EVs, die EV-Subtypen und die molekulare Ausstattung der einzelnen EVs zwischen den Zelllinien unterscheiden. Eine Quantifizierung anhand der Proteinmenge hätte dazu geführt, dass die Größe der

EVs und ihre Proteinausstattung stark ins Gewicht gefallen wäre (Théry et al. 2018). Der Vergleich des Effekts der EVs der vier verschiedenen Zelllinien sollte jedoch zunächst unabhängig von diesen Faktoren erfolgen, um die Unterschiede der EVs, bezogen auf die Zelllinien, von welchen sie produziert worden waren, zu berücksichtigen. Deshalb wurden EVs produziert von jeweils 5×10^6 Zellen der jeweiligen Zelllinie im CD8-T-Zell-Assay eingesetzt. Hierbei wurde deutlich, dass es durchaus Unterschiede zwischen den Zelllinien gab, aber die EVs von allen Zelllinien zumindest auf die Anzahl GRZB positiver Zellen einen Einfluss hatten. Der T-Zellsupprimierende Effekt von MelDCC11 war in allen drei getesteten Parametern am schwächsten ausgeprägt (Abb. 14). Die Gründe dafür könnten sein, dass MelDCC11 weniger Vesikel produzierte als die anderen Zelllinien oder die Ausstattung der EVs mit den Molekülen, die für den inhibitorischen Effekt verantwortlich waren, nicht so ausgeprägt war wie die der anderen Linien. Einen Hinweis für den Einfluss der EV-Anzahl auf den immunsuppressiven Effekt lieferte der Vergleich von EVs aus der 24- und 48-stündigen Produktion und des Einsatzes der EVs im Verhältnis 10:1 und 50:1. Je länger die Zellen EVs an das Zellkulturmedium abgeben konnten, desto stärker war der durch sie vermittelte Effekt. Wurden EVs eingesetzt, die von mehr Zellen produziert worden waren, waren die Effekte ebenfalls stärker ausgeprägt. Um zweifelsfrei aufzuklären, warum der Effekt der MelDCC11 EVs schwächer ausfiel, könnte am NTA die Anzahl der Vesikel, die pro 10^6 Zellen von den vier Zelllinien produziert werden, bestimmt und verglichen werden. Würde sich herausstellen, dass MelDCC11 weniger EVs produziert, könnte man die Anzahl der EVs von MelDCC10a und 11 am NTA bestimmen und in einem Versuch die gleiche absolute Anzahl von Vesikeln einsetzen. Auf diese Weise könnte aufgeklärt werden, ob es an der Anzahl oder der Beschaffenheit der MelDCC11-EVs lag, dass der suppressive Effekt im CD8-T-Zellassay schwächer ausfiel. Dieses Experiment konnte leider nicht mehr im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführt werden, da das NTA Gerät erst sehr spät zur Verfügung stand.

5.5. Nachweis von Immuncheckpoint-Liganden auf MelDCC-EVs

5.5.1. Der immunsuppressive Effekt wird nicht durch PD-L1 vermittelt

Der generelle Vorteil der Produktion von Immuncheckpoint-Liganden tragenden EVs durch die DCC liegt darin, dass die Krebszellen damit eine höhere Reichweite haben, mit vielen T-Zellen gleichzeitig interagieren können und somit die Chancen steigen, dass sie die Immunzellen erfolgreich inhibieren. Da in den Wächterlymphknoten des Melanom-Kollektivs mit steigendem DCCD ein erhöhter Anteil an $PD1^+ TIM3^+ CD8$ -T-Zellen gefunden wurde, wäre eine Interaktion zwischen PD-1 auf den CD8-T-Zellen und dem Immuncheckpoint-Liganden PD-L1 auf den DCC-EVs als Auslöser des immunsuppressiven Effekts naheliegend. Auf den Zell-Lysaten und EVs der vier MelDCC-Linien war PD-L1 jedoch im Western Blot nicht nachweisbar und auch die Färbung von MelDCC10a mit einem anderen anti-PD-L1 Antikörper-Klon war am Durchflusszytometer negativ. EV-assoziiertes PD-L1 konnte damit in dieser Arbeit als Vermittler des immunsuppressiven Effekts im CD8-T-Zell-Assay ausgeschlossen werden. Diese Beobachtung unterscheidet sich von anderen Studien, die beschrieben, dass die Inhibition von CD8-T-Zellen durch PD-L1 auf EVs von Krebszellen ausgelöst wurde. So wurde bereits gezeigt, dass EVs, von aus Metastasen generierten Melanomzelllinien, über PD-L1 mit PD-1 auf CD8-T-Zellen interagierten und sie dadurch inhibierten (Chen et al. 2018). Außerdem wurde nachgewiesen, dass die Produktion von IFN γ , IL-2 und TNF durch CD8-T-Zellen in Anwesenheit von PD-L1 positiven EVs von Brust-, Colon- Lungen und Prostatakrebszelllinien reduziert war (Yang et al. 2018; Kim et al. 2019; Poggio et al. 2019; Cordonnier et al. 2020).

Dass die Abwesenheit von PD-L1 nicht nur ein Phänomen ist, welches in den vier MelDCC-Linien zu beobachten war, zeigte sich bei der Analyse der scRNAseq Daten von 161 DCC, die aus Wächterlymphknoten von Melanompatienten isoliert worden waren und bei der nur in wenigen DCC eine schwache bis mäßige Expression von *PD-L1* festgestellt werden konnte. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Daten, welche zeigten, dass der chromosomale Abschnitt 9p21-24, auf dem das *PD-L1*

Gen kodiert ist, in DCC während der metastatischen Kolonisierung im Lymphknoten häufig deletiert war (Werner-Klein et al. 2018). Ob die Abwesenheit des *PD-L1* Transkripts in den scRNAseq-Daten und der möglicherweise nur monoallelische Verlust von *PD-L1* eine verminderte Proteinexpression zur Folge hat, ist jedoch unklar und müsste erst noch durch Antikörperfärbungen nachgewiesen werden. Auch ergibt sich keineswegs ein Widerspruch zum Einsatz einer anti-PD-1/anti-PD-L1 Therapie bei Melanompatienten mit geringer PD-L1 Expression auf den Tumorzellen. Die Ausschüttung von IFN γ durch initial aktivierte CD8-T-Zellen in der Tumormikroumgebung führt nämlich nicht nur in Krebszellen, sondern auch in anderen Zellen zur Hochregulation der PD-L1 Expression, wie z.B. in Stromazellen, Dendritischen Zellen und Makrophagen (Dong et al. 2002; Chen und Han 2015). PD-1 auf den CD8-T-Zellen kann also z.B. auch mit PD-L1 auf Stromazellen oder Tumor-assoziierten APCs interagieren, was dann zur Erschöpfung und Anergie der CD8-T-Zellen führt (Wang et al. 2017). In Darmkrebs, Eierstockkrebs und Melanom Mausmodellen wurde gezeigt, dass die Expression von PD-L1 auf tumorassoziierten APCs (Makrophagen und Dendritische Zellen) von größerer Relevanz für das Ansprechen auf die anti-PD-L1 Immuntherapie war als die Expression auf Tumorzellen. In einem Versuch wurden PD-L1 Knock-out Mäusen B16-F10 Melanomzellen injiziert und ab Tag drei nach Injektion mit anti-PD-L1 Antikörpern behandelt. Das Tumorwachstum in Tieren, die mit anti-PD-L1 Antikörpern behandelt wurden, unterschied sich nicht vom Tumorwachstum in Tieren, die mit der Isotyp-Kontrolle behandelt wurden. Dieser Versuch gab erste Hinweise darauf, dass die Expression von PD-L1 auf den Nicht-Tumorzellen entscheidend für ein Ansprechen auf die anti-PD-L1 Therapie sein könnte. Den Beweis hierzu lieferten die Ergebnisse des nächsten Versuchs, in dem Wildtyp Mäuse, welchen PD-L1 Knock-out B16-F10 Melanomzellen injiziert wurden, mit verringertem Tumorwachstum und verlängertem Überleben auf die anti-PD-L1 Behandlung reagierten (Lin et al. 2018). Die Relevanz der PD-L1 Expression in der Tumormikroumgebung von Patienten für den Erfolg von anti-PD-L1 Therapien ist nicht eindeutig. So wurde z.B. eine stärkere Korrelation des Therapieerfolgs mit der PD-L1 Expression auf den Immunzellen in der Mikroumgebung des Tumors als auf den Krebszellen bei Melanom, Lungenkrebs und Urothelkarzinom beschrieben (Rosenberg et al. 2016; Herbst et al. 2014). In Studien zu Lungenkrebs und Urothelkarzinom, bei denen ähnliche Gesamtansprechraten oder verbessertes Überleben auftraten, zeigte sich diese Korrelation nicht, unabhängig davon ob PD-L1 auf Zellen der Mikroumgebung oder Tumorzellen exprimiert war (Balar et al. 2017; Rittmeyer et al. 2017). In Studien zur Behandlung von Merkelzellkarzinom und Urothelkarzinom gab es auch Patienten, in denen weder Tumorzellen noch Immunzellen PD-L1 exprimierten, die aber trotzdem ein Ansprechen auf die anti-PD-L1 Therapie zeigten (Rosenberg et al. 2016; Kaufman et al. 2016). Die Mechanismen, die dem Ansprechen der PD-L1 negativen Patienten auf anti-PD-L1 Therapien zugrunde liegen, sind unbekannt. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die PD-L1 Expression aus technischen Gründen nicht nachgewiesen werden konnte oder dass nur zum Zeitpunkt der Antikörperfärbung keine PD-L1 Expression vorhanden war (Xu-Monette et al. 2017).

Die fehlende Expression von *PD-L1* auf den DCC deutet darauf hin, dass in diesem frühen Stadium der Erkrankung die PD-L1 Expression auf den Nicht-Tumorzellen relevanter für die Suppression von anti-tumoralen T-Zellantworten sein könnte und andere von den DCC exprimierte Immuncheckpoint-Liganden eine größere Rolle spielen könnten, wie z.B. CD276 und CD155.

5.5.2. CD276 und CD155 sind am immunsuppressiven Effekt beteiligt

Der Anteil der DCC mit einer mRNA-Expression von *CD276* und *CD155* war größer als der Anteil der DCC mit *PD-L1* Expression, wobei die relative Expression von *CD276* in den DCC stärker als die von *CD155* war. Auch konnten CD155 und CD276 im Western Blot auf allen vier untersuchten MelDCC-Linien und ihren EVs detektiert werden. Die Analyse der Vesikel- und Protein-Fractionen aus dem SEC-Versuch zeigte weiterhin, dass die beiden Proteine Vesikel-assoziiert waren. Der T-Zellsupprimierende Effekt der MelDCC10a-EVs konnte durch Knock-out von CD276 und/oder CD155 teilweise aufgehoben

werden, was die Relevanz der beiden Moleküle in Bezug auf eine Beteiligung an der Inhibition der CD8-T-Zellen bestätigte.

CD276, welches auch als Protein B7 Homolog 3 Protein (B7-H3) bekannt ist, wurde als Mitglied der B7-CD28 Familie entdeckt, zu der auch PD-L1 zählt, und bindet an einen Rezeptor auf T-Zellen (Chapoval et al. 2001). Dabei ist die Funktion von CD276 nicht eindeutig geklärt und wurde sowohl als ko-stimulatorisch als auch als ko-inhibitorisch beschrieben. Ursprünglich wurde CD276 als ko-stimulatorisches Molekül identifiziert. Die Proliferation und IFN γ -Produktion von humanen CD4- und CD8-T-Zellen und die Induktion von zytotoxischen T-Zellen nach anti-CD3 Stimulation war in Anwesenheit von CD276-Ig oder in Ko-Kultur mit HEK293 Zellen, die mit einem B7-H3 Expressionsvektor transfiziert waren, erhöht (Chapoval et al. 2001). Außerdem hatte die Stimulation von murinen CD8-T-Zellen mit B7-H3 transfizierten P815 Zellen eine erhöhte Proliferation und IFN γ -Produktion zur Folge (Hashiguchi et al. 2008). In Darmkrebs Mausmodellen hatte die Behandlung mit adenoviralem B7-H3 ein unterdrücktes Tumorwachstum und ein reduziertes Auftreten von sekundär Metastasen mit signifikant höheren Frequenzen von IFN γ produzierenden CD8-T-Zellen als in Mäusen der Kontrollgruppe zur Folge (Lupu et al. 2006; Lupu et al. 2007). Diese Erkenntnisse würden der immunsuppressiven Wirkung von CD276 auf CD8-T-Zellen, vermittelt durch CD276 positive EVs, widersprechen.

Bei humanen CD4-T-Zellen wurde eine inhibitorische Wirkung von CD276, in Bezug auf die Proliferation und Zytokin-Produktion, beschrieben. Dies passt wiederum zu den Beobachtungen im CD8-T-Zellassay, in dem gezeigt wurde, dass ein Knock-out von CD276 die immunsupprimierende Wirkung der EVs teilweise aufheben konnte. In dem durchgeführten Experiment wurden aufgereinigte humane CD4-T-Zellen mit CD3/CD28 Antikörpern in Anwesenheit von Paraformaldehyd fixierten CHO.HLA-DR2 Zellen, die CD276 oder GFP als Kontrolle exprimierten, stimuliert. Die Anwesenheit der CD276 exprimierenden hatte im Vergleich zu den GFP exprimierenden CHO.HLA-DR2 Zellen eine verminderte Proliferation und Produktion von IL-10, TNF, IFN γ und GM-CSF der CD4-T-Zellen zur Folge (Ling et al. 2003). Wenig später folgten die ersten Studien, durchgeführt im murinen System, in denen die inhibitorische Wirkung von CD276 auf CD4- und CD8-T-Zellen beschrieben wurde. Die Proliferation und Produktion von IL-2 und IFN γ durch aufgereinigte murine CD4- und CD8-T-Zellen, die mit CD3 Antikörpern stimuliert wurden, war in Anwesenheit eines CD276-Ig Fusionsproteins eingeschränkt (Suh et al. 2003; Prasad et al. 2004). Der Effekt konnte in der Studie von Prasad et al., 2004 durch Zugabe von IL-2 aufgehoben werden. Im humanen System hatte CD276 sowohl auf naive als auch auf aktivierte CD4- und CD8-T-Zellen eine inhibitorische Wirkung (Leitner et al. 2009). Dies deckt sich mit dem Ergebnis, dass die MelDCC-EVs die CD8-T-Zellen inhibierten, unabhängig davon, ob die Behandlung vor oder nach Stimulation erfolgt ist. Jedoch konnte in der Studie von Leitner et al. 2009 die direkte inhibitorische Wirkung der extrazellulären Domäne eines CD276-immunglobulin Fusionsproteins (CD276-Ig) auf CD8-T-Zellen nur in Anwesenheit von CD4-T-Zellen festgestellt werden. Wurden aufgereinigte CD4-T-Zellen mit CD276-Ig kultiviert, war die Inhibition vorhanden. Die Schlussfolgerung daraus war, dass die starke Inhibition der CD8-T-Zellen durch die fehlende Hilfe der CD4-T-Zellen ausgelöst wurde. Weiterhin konnte die Inhibition der CD4- und CD8-T-Zellen durch Zugabe von IL-2 zu Beginn des Assays aufgehoben werden, jedoch nicht durch Zugabe von IL-2 24 Stunden nach Beginn des Assays (Leitner et al. 2009). Die Beobachtung, dass aufgereinigte CD8-T-Zellen nicht durch CD276 inhibiert werden konnten, widersprechen den Erkenntnissen aus dem CD8-T-Zell-Assay dieser Arbeit. Die Experimente können aber nicht 1:1 verglichen werden, da Leitner et al. 2009 die Zellen nur mit CD3 Antikörpern in sehr hoher Konzentration stimulierten und die Interaktion mit CD276, exprimiert von transfizierten Zellen, stattgefunden hat. Die EVs haben nicht nur CD276 auf ihrer Oberfläche, sondern auch CD155 und andere Moleküle, die zum inhibitorischen Effekt beitragen könnten. Deshalb kann nicht angenommen werden, dass allein CD276 für den Effekt verantwortlich war. Ein interessanter Versuch wäre,

zusammen mit den EVs IL-2 zu den CD8-T-Zellen zu geben, um zu testen, ob das IL-2 den inhibitorischen Effekt komplett oder partiell aufheben kann.

Ebenso widersprüchlich wie die Studien, die den Effekt von CD276 auf CD8-T-Zellen beschreiben, sind die Studien zum vermeintlichen Rezeptor von CD276. Im murinen System wurde der Rezeptor *Triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM)-like transcript 2* (TLT-2, TREML2) auf CD8-T-Zellen und CD4-T-Zellen beschrieben. Die Bindung von CD276 an diesen Rezeptor regulierte die Proliferation und IFN γ Produktion in CD8-T-Zellen hoch (Hashiguchi et al. 2008). Obwohl dieses Molekül seither in der Literatur als Rezeptor von CD276 genannt wird, konnten zwei weitere Studien die Interaktion mit CD276 sowohl im murinen als auch im humanen System nicht reproduzieren (Leitner et al. 2009; Lee et al. 2017). Ein weiterer Rezeptor, der in einer Interaktionsstudie gefunden wurde, ist IL20-RA. In dieser Interaktionsstudie wurden die extrazellulären Domänen (ECD) von ~1200 humanen *singlepass* Transmembranproteinen (STM) in Expi293F Zellen exprimiert. Das konditionierte Medium, in dem sich die ECD je eines STM befand, wurde mit der rekombinant exprimierten ECD von CD276 inkubiert und die Interaktion analysiert (Husain et al. 2019). Die Entdeckung des CD276 Rezeptors IL20RA wurde also in einem sehr artifiziellen System gemacht und es gibt zu diesem Zeitpunkt weder Literatur mit Hinweisen auf die funktionelle Relevanz dieser Interaktion noch Hinweise auf die Expression von IL20RA auf T-Zellen. Auch konnte im Rahmen dieser Arbeit IL20RA nicht auf den CD8-T-Zellen aus dem T-Zell-Assay nachgewiesen werden. Der einfachste Versuch um den inhibitorischen Effekt von EV-assoziiertem CD276 auf CD8-T-Zellen nachzuweisen, wäre der Einsatz eines blockierenden Antikörpers. Dies war jedoch nicht möglich, da bislang noch kein spezifischer humaner blockierender Antikörper für CD276 beschrieben ist (Zhou und Jin 2021).

Im Gegensatz zu CD276 ist die Literatur zur Interaktion von CD155 mit Immunzellen eindeutiger. CD155 ist an der Regulation von Immunzellen beteiligt, indem es mit den Rezeptoren CD226, TIGIT und CD96 interagiert (Bottino et al. 2003; Fuchs et al. 2004; Yu et al. 2009). Dabei hat die Bindung an CD226 eine stimulierende und die Bindung an TIGIT und CD96 eine inhibierende Wirkung auf die T-Zellaktivität (Mittal et al. 2019; Tahara-Hanaoka et al. 2004; Zhang et al. 2016). Die Expression der Rezeptoren CD226 und TIGIT war auf den CD8-T-Zellen im CD8-T-Zellassay nachweisbar, jedoch nicht die Expression von CD96. Es liegt also nahe, dass im CD8-T-Zellassay EV-assoziiertes CD155 den inhibitorischen Effekt auf die CD8-T-Zellen über TIGIT vermittelte, da bereits gezeigt wurde, dass TIGIT direkt die durch CD8-T-Zellen vermittelte Antitumorantwort inhibieren konnte (Johnston et al. 2014). Um nachzuweisen, dass CD155 auf den EVs an der Vermittlung des inhibitorischen Effekts auf CD8-T-Zellen beteiligt war, wäre es denkbar gewesen entweder einen anti-CD155 oder einen anti-TIGIT Antikörper zu verwenden. Ein gut charakterisierter CD155 Antikörper, der sich momentan in einer klinischen Studie befindet, war nicht verfügbar (Atieh et al. 2021). Dasselbe galt für TIGIT, hier waren zwar Antikörper für die Forschung erhältlich, welche jedoch in Bezug auf ihre blockierende Wirkung nicht gut charakterisiert waren. Erst seit Kurzem ist ein anti-TIGIT Antikörper, der auch in klinischen Studien verwendet wird unter dem Handelsnamen Tiragolumab erhältlich (Patil et al. 2021).

Aufgrund des Mangels an gut charakterisierten, blockierenden Antikörpern für die Inhibition der Interaktion von CD276 und CD155 mit CD8-T-Zellen, ist die Strategie eines CRISPR Knock-out verfolgt worden. Mit Antikörper-Färbungen konnte am Durchflusszytometer gezeigt werden, dass die Knock-out-Zelllinien zu mindestens 97 % negativ für CD155 und/oder CD276 waren. Im Western Blot war CD155 nicht und CD276 nur sehr schwach auf den Knock-out-EVs nachweisbar. Ein Kritikpunkt am Design des Knock-out Experiments könnte sein, dass keine Einzelzellklone zur Etablierung der Zelllinien verwendet wurden und die Zellen somit nicht genetisch uniform waren. In den Zelllinien, die hier etabliert wurden, befanden sich Zellen, in denen durch die gRNA und das Cas9 Enzym unterschiedliche Deletions- und Insertionsereignisse stattgefunden haben und die damit genetisch divers waren. Dies kann zu verschiedenen verkürzten oder veränderten Versionen der CD155 und CD276 Proteine führen.

Da die gRNAs so gewählt wurden, dass sie möglichst in einem frühen Exon binden, sollten diese kurzen Proteine in keinem Fall die Funktion der ursprünglichen Proteine ausführen können. Weiterhin würden off-target Effekte in Zelllinien, die aus Einzelzell-Klonen etabliert wurden, weitaus stärker zu tragen kommen als in heterogenen Zelllinien wie den hier verwendeten Knock-out-Linien. Ein weiterer Kritikpunkt wäre, dass die Zelllinien nicht zu hundert Prozent negativ für CD155 und/oder CD276 waren und damit noch Protein exprimiert wurde. Dem widerspricht, dass der erfolgreiche Knock-out in über 97 % der Zellen bei weitem ausreichen sollte, um den Effekt im CD8-T-Zell-Assay abzuschwächen. In dem Experiment in dem die EVs im Verhältnis 10:1 eingesetzt wurden, war bereits ein Titrationseffekt zu sehen. Die Expression von CD155 und CD276 auf weniger als 3 % der Zellen sollte daher nicht ausreichen, um einen supprimierenden Effekt der EVs auf die CD8-T-Zellen beobachten zu können.

Der Einsatz von MelDCC10a *CD155* und *CD276* Knock-out-EVs im CD8-T-Zell-Assay zeigte, dass der suppressive Effekt auf die Proliferation verglichen mit den Wildtyp-EVs signifikant vermindert war. Jedoch sprachen nicht alle CD8-T-Zellen gleichermaßen an: Beim Anteil der GRZB⁺ IFN γ ⁻ Subpopulation war eine Zunahme auf das Niveau der Kontrolle und bei der GRZB⁺ IFN γ ⁺ Subpopulation eine leichte Zunahme zu beobachten, wohingegen der Anteil der GRZB⁻ IFN γ ⁺ Subpopulation durch den Knock-out nicht zunahm. Interessanterweise gab es keinen synergistischen Effekt durch den Doppel-Knock-out was darauf schließen lässt, dass CD155 und CD276 mit demselben Signalweg interferieren. Obwohl der suppressive Effekt der MelDCC-EVs durch den Knock-out nicht komplett neutralisiert werden konnte, wurde eine Beteiligung der Immuncheckpoint-Liganden CD155 und CD276 an der Inhibition der CD8-T-Zellen durch MelDCC-EVs eindeutig nachgewiesen. Die Beobachtung, dass der Knock-out von CD155 und/oder CD276 den Effekt auf die IFN γ ⁺ Zellen im Gegensatz zu den GRZB⁺ IFN γ ⁻ Zellen nicht neutralisieren konnte, legt nahe, dass die EVs die IFN γ Expression der CD8-T-Zellen über andere Immuncheckpoint-Moleküle inhibiert haben könnten. Dies könnten bei EVs der Zelllinie MelDCC10a zum Beispiel die Moleküle CD200 und CD73 gewesen sein, die ebenfalls im Western Blot nachgewiesen wurden. In einer Studie von Misstear et al. 2012 wurde gezeigt, dass PBMCs, die mit autologen APCs ko-kultiviert wurden, welche stabil CD200 exprimierten und mit Epstein Barr Virus Antigen gepulst waren, eine um bis zu 50 % eingeschränkte Produktion von IFN γ aufwiesen. Weiterhin war in CD8-T-Zell Klonen, die mit CD200 exprimierenden APC ko-kultiviert wurden, welche mit dem Peptid spezifisch für den TCR des CD8-T-Zell Klon gepulst waren, die intrazelluläre IFN γ Akkumulation um knapp 60 % verringert (Misstear et al. 2012). In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass Exosomen-assoziiertes CD73 der Blasenkrebs Zelllinie HT1376 5'AMP zu Adenosin umwandelte, welches die Proliferation, IL-2- und TNF-Produktion von anti-CD3/CD28 stimulierten CD3⁺T-Zellen über den A_{2A} Adenosin Rezeptor (A_{2A} AR) auf den T-Zellen verminderte (Clayton et al. 2011). Auch im murinen System konnte beobachtet werden, dass die Aktivierung des A_{2A} AR auf anti-CD3 stimulierten CD4-T-Zellen die IFN γ -Produktion der CD4-T-Zellen um 98 % reduzierte (Lappas et al. 2005). Diese Studien deuten auf einen Einfluss von CD200 bzw. CD73 auf die IFN γ -Produktion von T-Zellen und eine mögliche Beteiligung dieser Moleküle am verringerten Anteil IFN γ -exprimierender CD8-T-Zellen nach Behandlung mit MelDCC-EVs hin.

In weiteren Versuchen könnten diese Moleküle in MelDCC10a Zellen entweder durch blockierende Antikörper inhibiert, mit CRISPR/Cas9 ausgeknockt oder mit shRNAs herunterreguliert werden und die entsprechend Knock-out- und Wildtyp-EVs im CD8-T-Zell-Assay auf ihre supprimierende Wirkung hin getestet werden.

5.6. Nachweis von miRNAs in MelDCC-EVs

5.6.1. Makrophagen inkorporieren MelDCC-EVs

Die Aktivierung von CD8-T-Zellen erfordert die Bindung des T-Zell-Rezeptors an den Antigen-beladenen MHC-I-Komplex und zusätzlich das ko-stimulatorische Signal über die Bindung des CD28-Rezeptors an CD80 oder CD86. Diese Aufgabe erfüllen hauptsächlich Dendritische Zellen, aber auch Makrophagen sind in der Lage den CD8-T-Zellen Antigene zu präsentieren und über CD80 das ko-stimulatorische Signal zu liefern, welches nötig ist um sie zu aktivieren (Muntjewerff et al. 2020). Das heißt, dass auch eine Inhibierung der Makrophagen oder Dendritischen Zellen indirekt zu einer Inhibierung der CD8-T-Zellantwort führen könnte. Im Lymphknoten sind viele Makrophagen direkt der Lymphflüssigkeit ausgesetzt, was es ihnen im Prinzip ermöglicht Antigene aus der Lymphflüssigkeit aufzunehmen und sie T-Zellen zu präsentieren (Gray und Cyster 2012). Es könnten also vom Primärtumor sezernierte Antigene und EVs von den Makrophagen aus der Lymphflüssigkeit aufgenommen werden. Aber auch DCC, die im Wächterlymphknoten sitzen, könnten über sezernierte Antigene oder EVs mit den Makrophagen interagieren. Insbesondere die Interaktion mit oder die Aufnahme von EVs könnte so zu einer Inhibierung der Makrophagen führen.

Die Behandlung von M1 Makrophagen mit CFSE-gefärbten EVs zeigte, dass die M1 Makrophagen in der Tat EVs inkorporierten und damit alle Moleküle, die sich auf der Oberfläche und im Lumen der EVs befanden, aufnehmen konnten. Von M1 Makrophagen ist bekannt, dass sie an der Abwehr von Tumorzellen beteiligt sind, indem sie Tumorzellen direkt nach der Phagozytose lysieren, eine pro-inflammatorische Wirkung haben, Tumor-Antigene präsentieren und indirekt die Proliferation von CD8-T-Zellen durch die Ausschüttung von z.B. IL6, IL-12 und TNF fördern (Liu et al. 2021). Weiterhin ist bekannt, dass der Phänotyp und die Funktion von Makrophagen durch die Aufnahme von EVs beeinflusst werden können und insbesondere miRNAs bei diesen Prozessen eine Rolle spielen (Fabbri et al. 2012; Park et al. 2019; Qian et al. 2020). Aus diesem Grund und der Beobachtung, dass M1 Makrophagen in der Lage waren MelDCC-EVs aufzunehmen, wurde eine Sequenzierung der miRNAs aus MelDCC-EVs durchgeführt, um miRNAs zu identifizieren, die möglicherweise einen inhibitorischen Effekt auf Makrophagen haben könnten.

5.6.2. Nicht-EV-assoziierte miRNAs können entfernt werden

Der Vergleich der verschiedenen Vorbehandlungen der EVs (unbehandelt (UT), RNase, PK + RNase) zur Degradation passiv mitisolierter miRNAs zeigte, dass mit zunehmender Behandlung die Sequenzier-tiefe bezogen auf miRNAs sank und damit der Anteil von Nicht-miRNA-Biotypen in der Sequenzierbibliothek zunahm. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass der Verdau nicht vollständig war und die Überreste von längeren RNAs wie z.B. Pol1RNA, Pol3RNA und mRNA in die Sequenzierbibliothek gelangt sind, da sie nach dem unvollständigen Verdau eine ähnliche Länge wie miRNAs aufwiesen. Es wurde gezeigt, dass von z.B. toten Zellen stammende miRNAs, die im Zellkulturmedium an AGO gebunden vorlagen, eine hohe Stabilität aufwiesen (Turchinovich et al. 2011). Aus diesem Grund war es zwingend notwendig mit einem Proteinase K Verdau die miRNAs aus den im 100K-Pellet passiv mitisolierten Ribonukleoprotein-Komplexen (RNP) zu befreien, um sie für die RNase zugänglich zu machen. Ein positiver Effekt der Behandlung zeigte sich daran, dass die Zahl der miRNAs, die in geringer Anzahl in der Sequenzierbibliothek vorhanden waren, durch die PK + RNase Behandlung abnahm. Dieser Effekt war nach der Normalisierung durch die Berechnung der *reads per million* (RPM) noch verstärkt, wobei die mit großer Häufigkeit vorhandenen miRNAs erhalten blieben. Durch Berechnung der Log2-fachen Änderung (engl. *log2fold change*) der miRNAs mit >1.000 RPM zwischen UT und PK + RNase konnte gezeigt werden, dass die meisten miRNAs nach PK + RNase Behandlung innerhalb der EVs vorkamen. Es gab aber auch miRNAs, wie z.B. miR-21-5p, die einen negativen *log2fold change* aufwiesen, also auch in großer Anzahl außerhalb der EVs vorkamen und durch die PK + RNase Behandlung erfolgreich degradiert werden konnten. Diese Ergebnisse führten zu

der Entscheidung, die Sequenzierung der miRNAs aus den EVs von vier MelDCC-Linien mit vorherigem PK + RNase Verdau durchzuführen, um unspezifische miRNAs zu entfernen.

5.6.3. Spezifische EV-miRNAs können Makrophagen beeinflussen

Die Idee hinter der miRNA Sequenzierung war, miRNAs zu finden, die in allen vier MelDCC-Linien mit großer Häufigkeit vorkommen und so diejenigen miRNAs zu identifizieren, für welche ein Effekt auf Makrophagen beschrieben ist. Die Qualität der miRNA-Sequenzierbibliotheken der EVs war leider sehr schlecht und reichte von maximal 4,7 % bis gerade einmal 0,3 % der *reads* die miRNAs zugeordnet werden konnten. Die Qualität der miRNA-Sequenzierbibliotheken der Zellen von denen die EVs produziert worden waren, war deutlich besser. Nachdem die Sequenzierbibliotheken normalisiert worden waren, fiel auf, dass bei den EVs von MelDCC8 im Vergleich zu MelDCC10a die miRNAs mit wenig *reads* verschwanden und künstlich sehr viele *reads* erhielten. Die miRNA Sequenzierung der EVs von MelDCC8 konnte deshalb nicht in die Analyse einfließen. Insgesamt war die Durchführung der Sequenzierung erfolgreich, aber die Sequenziertiefe, bezogen auf die miRNAs, war so gering, dass eine Analyse der Daten zwar möglich, aber die Zuverlässigkeit der Ergebnisse zweifelhaft war. Es war nicht nachzuvollziehen, warum in den Vorversuchen zur Etablierung des PK + RNase Verdau die Zuordnungsrate so viel höher gewesen war. Die Isolation der RNA aus den Vesikeln wurde in beiden Versuchen auf die gleiche Weise durchgeführt. Die Proben wurden jedoch nicht, wie bei den Vorversuchen, auf dem MiSeq, sondern auf dem NextSeq sequenziert. Da das Protokoll auf die miRNA Sequenzierung am MiSeq optimiert wurde, könnte es sein, dass hier Anpassungen vorgenommen werden müssten, um zu einem besseren Ergebnis zu kommen. Da in den letzten Jahren das Feld der miRNA EV-Forschung gewachsen ist, könnte versucht werden eine Methode, die spezifisch auf die miRNA Sequenzierung aus EVs zugeschnitten ist, zu verwenden, um bessere Ergebnisse zu erzielen. In der Studie von Chettimada et al. 2020 z.B. wurde nach der Zugabe von Qiazol (analog zu TRIzol) direkt miRNA mit dem miRNeasy Kit von Qiagen isoliert. Die Sequenzierbibliothek wurde mit dem kommerziellen Kit NEBNext small RNA Library Prep Kit von NEB durchgeführt. Das Protokoll zur Erstellung der miRNA Sequenzierbibliothek ist im Vergleich zu dem Protokoll, das in dieser Arbeit verwendet wurde, wesentlich einfacher und könnte auch direkt am Lehrstuhl für Experimentelle Medizin durchgeführt werden.

Die PCA-Analyse der miRNA Sequenzierungen ergab, dass die miRNA Profile der EVs von den drei MelDCC-Linien ähnlicher zueinander waren als zu den miRNA Profilen der Zellen, von denen sie produziert wurden. Auch die Korrelationsanalyse ergab, dass nicht alle in den Zellen vorhandenen miRNAs auch in den EVs zu finden waren und somit eine spezifische Anreicherung von miRNAs in den EVs stattgefunden hat. Es wurden 18 miRNAs gefunden, die in den EVs aller drei Zelllinien mit einem $\log_{10}(\text{RPM}+1) > 2,5$ vorkamen. Von diesen 18 miRNAs waren sieben unter den zehn miRNAs, die durchschnittlich die meisten RPM aufwiesen. Eine dieser sieben miRNAs war miR-21, für welche beschrieben wurde, dass sie die M2-Polarisierung von Makrophagen bei Kopf-Hals-Krebs durch miR-21-haltige Exosomen, die von den Tumorzellen produziert wurden, fördert (Hsieh et al. 2018). Weiterhin wurde im murinen System gezeigt, dass miRNA-21 aus EVs von Lungenkrebs-Zelllinien durch Bindung an *Toll-like Receptor 8* in Makrophagen eine pro-metastatische Entzündungsreaktion auslöst, die letztlich zu Tumorwachstum und Metastasierung führen könnte (Fabbri et al. 2012). Eine Studie von Jenike und Halushka 2021 hat jedoch zusammengefasst, dass miR-21 in mindestens 29 Krankheiten als Biomarker beschrieben wurde und damit keine Spezifität für eine Krankheit aufweist. Sie ist eine der am häufigsten vorkommenden miRNAs, hoch konserviert und damit als Biomarker ungeeignet. Es ist also nicht überraschend, dass miR-21 auch in großer Häufigkeit in den EVs aller drei MelDCC-Linien vorkam. Von miR-146a ist bekannt, dass sie die Freisetzung von Entzündungs-Zytokinen durch Makrophagen und Dendritische Zellen negativ reguliert. Außerdem erhöht sie in Dendritischen Zellen die spontane Apoptose und reguliert Moleküle wie CD80/86, CD40, HLA-DR und CCR-7 herunter, die wichtig für die T-Zell-Aktivierung sind (Testa et al. 2017). Über miR-320a ist wenig bekannt, jedoch

wurde beschrieben, dass zirkulierende miR-320 die M2-Polarisation von Makrophagen in Lungenkrebs fördert (Fortunato et al. 2019).

Um zu zeigen, dass die miRNAs aus den EVs in den Makrophagen oder Dendritischen Zellen tatsächlich funktionell sind, müsste ein Versuch durchgeführt werden, in dem spezifisch die Bindung der miRNA aus den EVs an die mRNA oder den *Toll-like Receptor* in der Zielzelle nachgewiesen wird. Weiterhin ist nicht klar, ob die Anzahl an miRNAs in den EVs ausreicht um einen Effekt auszulösen. Dies müsste in funktionellen Assays mit Makrophagen oder Dendritischen Zellen, analog zum CD8-T-Zell-Assay, getestet werden. Somit kann abschließend zusammengefasst werden, dass miRNAs, für die eine inhibitorische Wirkung auf Makrophagen und Dendritische Zellen beschrieben ist, in den MelDCC-EVs gefunden wurden. Ein funktioneller Nachweis für die Relevanz dieser EV-assoziierten miRNAs EVs muss jedoch noch erbracht werden.

5.7. Die Expression von CD155 Rezeptoren von CD8-T-Zellen aus SLN von Melanompatienten verändert sich mit steigendem DCCD

Die Relevanz der *in vitro* Ergebnisse konnte anhand der Expression der Rezeptoren für CD155, TIGIT und CD226, auf CD8-T-Zellen aus kryokonservierten Lymphknoten von Melanompatienten mit bekanntem DCCD bestätigt werden. Die Expression des inhibitorischen Rezeptors TIGIT nahm mit steigendem DCCD zu und die des stimulatorischen Rezeptors CD226 nahm ab. Die erhöhte TIGIT Expression spiegelte die zunehmende Inhibierung der CD8-T-Zellen mit dem Fortschreiten der metastatischen Kolonisierung des Lymphknotens wieder und steht im Einklang mit der Studie von Johnston et al. 2014, die zeigte, dass TIGIT direkt die durch CD8-T-Zellen vermittelte Antitumorantwort inhibierte. Auch die Reduktion der CD226 Expression mit steigendem DCCD deckte sich mit diesen Ergebnissen, da CD226, bezogen auf die Fähigkeit der CD8-T-Zellen Effektor-Zytokine zu produzieren, ein Marker für die Fitness der CD8-T-Zellen ist und durch die Interaktion mit CD155 ubiquitiniert und infolgedessen im Proteasom degradiert wird (Braun et al. 2020). Auch ist bekannt, dass eine verminderte CD226-Expression die antivirale und antitumorale T-Zell-Effektor-Funktion einschränkt (Cella et al. 2010; Ramsbottom et al. 2014; Welch et al. 2012; Braun et al. 2020). Es wurde auch gezeigt, dass TIGIT direkt um die Liganden-Bindung mit ko-stimulatorischen Rezeptoren und im speziellen mit CD226 konkurrieren kann (Lozano et al. 2012; Stengel et al. 2012; Yu et al. 2009). Johnston et al. 2014 zeigten ferner, dass TIGIT direkt mit CD226 interagiert und diese Interaktion die CD226-Homodimerisierung und Funktionalität behindert. Die CD226 Ko-Stimulation konnte in primären humanen und murinen CD8-T-Zellen, welche mit einem Antikörper behandelt wurden, der die TIGIT-CD226 Interaktion verhinderte, gesteigert werden. Außerdem war die Behandlung von Tumortragenden Mäusen mit anti-CD226 Antikörpern ausreichend, um die positiven Effekte der anti-TIGIT Behandlung aufzuheben. Diese Beobachtungen verdeutlichen eine Beziehung zwischen TIGIT und CD226, die die von CTLA-4 und CD28 widerspiegelt. CTLA-4 konkurriert mit dem ko-stimulatorischen Rezeptor CD28 um die Bindung an CD80/CD86, verhindert so die Aktivität von CD28 und damit die Aktivierung der T-Zelle (McCoy und Le Gros 1999). Auch bei TIGIT und CD226 ist die Unterdrückung der CD226 Aktivität ein Schlüsselmechanismus, durch den TIGIT die CD8-T-Zell-Antwort hemmt (Johnston et al. 2014). Interessanterweise ist die Affinität von CD155 zum ko-inhibitorischen Rezeptor TIGIT ($K_d = 1-3$ nM) höher als zum ko-stimulatorischen Rezeptor CD226 ($K_d = 119$ nM), was eine weitere Parallele zu CTLA-4 und CD28 darstellt (Yu et al. 2009). Hier ist ebenfalls die Affinität des ko-inhibitorischen Rezeptors CTLA-4 zu CD80/CD86 höher als die des ko-stimulatorischen Rezeptors CD28 (Alegre et al. 2001). Der Quotient aus dem MFI von CD226 und TIGIT berücksichtigt die eben genannten Erkenntnisse und zeigte in den CD8-T-Zellen aus den Lymphknoten der Melanompatienten tatsächlich die beste negative Korrelation mit dem DCCD. Weiterhin zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der *exhaustion* der CD8-T-Zellen, gemessen an der Expression von PD-1 und TIM-3 mit der Expressionstärke von TIGIT und CD226 auf den T-Zellen. Auf PD-1⁺ TIM-3⁺ CD8-T-Zellen war eine hohe

TIGIT Expression festzustellen, während eine CD226 Expression fehlte. Im Gegensatz hierzu waren beide Moleküle auf PD-1⁺ TIM3⁻ Zellen exprimiert. Der deutlichste Beweis für einen zunehmenden Funktionsverlust der CD8-T-Zellen mit steigendem DCCD lieferte die negative Korrelation mit der Expression des Effektor-Zytokins TNF.

Die Daten dieser Arbeit vor dem Hintergrund der publizierten Daten führen zu folgender Interpretation der Ergebnisse der Untersuchung von CD8-T-Zellen und DCC aus den Wächterlymphknoten von Melanompatienten: (i) DCC im Wächterlymphknoten regulieren während der metastatischen Kolonisierung den *EV-Pathway* hoch, (ii) produzieren, wie die MelDCC-Linien, CD155 und CD276 positive EVs und (iii) könnten dadurch mit TIGIT und CD226 und dem Rezeptor für CD276 auf der Oberfläche von CD8-T-Zellen interagieren. Dies führt zur: (iv) Aktivierung des inhibitorischen Rezeptors TIGIT, (v) Internalisierung und Degradation von CD226, (vi) vermehrten Präsenz von TIGIT im Gegensatz zu CD226 auf der Oberfläche der CD8-T-Zellen, (vii) Inhibierung der CD8-T-Zellen gekennzeichnet durch den Verlust der Fähigkeit Effektor-Zytokine zu produzieren und der Ko-Expression der *exhaustion* Marker PD1 und TIM3 und (viii) schlussendlich zum Verlust der *immune surveillance* durch CD8-T-Zellen im Wächterlymphknoten. Dies ist ein gradueller Prozess, denn je höher der DCCD des Lymphknotens ist, desto weiter verschiebt sich das Gleichgewicht zwischen der Expression von CD226 und TIGIT in Richtung TIGIT, bis die CD8-T-Zellen nicht mehr in der Lage sind TNF zu produzieren und ihre Effektor-Funktion auszuüben. Als Maß für die *Fitness* der CD8-T-Zellen in Wächterlymphknoten kann also neben PD-L1 und TIM-3 auch das Verhältnis der Expression von CD226 und TIGIT herangezogen werden. Dieser Quotient kann bereits zu einem Zeitpunkt, an dem die klassischen *exhaustion* Marker PD-L1 und TIM-3 noch nicht detektierbar sind, Aufschluss darüber geben in welchem Zustand sich die CD8-T-Zellen befinden. Inwiefern dieser informativ für den weiteren Krankheitsverlauf ist und als prognostischer Marker herangezogen werden könnte, müsste weiter untersucht werden.

Der Beweis, dass die DCC im Lymphknoten tatsächlich CD155 und CD276 positive EVs produzieren, wurde in dieser Arbeit nicht erbracht. Dies ist aufgrund technischer Limitationen derzeit äußerst schwierig umzusetzen, vor allem im frühen Stadium der Erkrankung. Eine Möglichkeit wäre die immunomagnetische Isolation von DCC-EVs aus dem Serum von Melanompatienten, anhand eines melanomspezifischen Oberflächenmarkers wie zum Beispiel MCSP. Das große Problem hierbei ist, dass EVs der Interzellkommunikation dienen und als solche von vielen Zellen produziert werden. Daher ist zu erwarten, dass, gerade bei niedriger Gesamtumorlast des Patienten, nur eine sehr geringe Menge an DCC-EVs im Blut zu finden sein würde. Auch stellt sich die Frage nach einem melanomspezifischen Oberflächenmarker, der zur Isolierung genutzt werden könnte. MCSP ist hier nur wenig geeignet, da es auch auf Nicht-Krebszellen im Blut mit dem Antikörper Klon 9.2.27 nachgewiesen wurde und nur in Kombination mit anderen, teilweise intrazellulären Melanommarkern, melanomspezifisch ist (unveröffentlichte Daten Courtney König). Ferrone und Whiteside 2020 berichteten jedoch von einem anti-MCSP Antikörper der hochspezifisch nur Melanomzellen erkennt und mit welchem sie MCSP positive Exosomen aus dem Plasma von Melanompatienten isolieren konnten. Dieser Antikörper ist bislang leider nicht kommerziell erhältlich, jedoch eventuell auf Anfrage bei Ferrone und Whiteside 2020 verfügbar. Eine andere Möglichkeit wäre zu versuchen die EVs direkt aus dem Lymphknoten zu isolieren. Es gibt bereits Protokolle die beschreiben wie man aus Gewebe EVs isolieren kann (Hurwitz et al. 2019; Crescitelli et al. 2021). Auch hier wäre vor allem bei Lymphknoten mit geringem Tumorzellbefall das Problem die DCC-EVs weiter anzureichern und es stellt sich die Frage nach einem melanomspezifischen Marker, der zur Isolierung genutzt werden könnte.

5.8. Implikationen für therapeutische Strategien

Da (i) CD155 und CD276 Transkripte in den scRNAseq Daten gefunden wurden, (ii) der, durch EV vermittelte, immunsuppressive Effekt der Moleküle auf CD8-T-Zellen nachgewiesen wurde, (iii) das Verhältnis aus CD226/TIGIT mit steigendem DCCD sank und (iv) der Anteil PD-1⁺ TIM-3⁺ CD8-T-Zellen anstieg, wäre eine Kombinationstherapie aus PD-L1/CD155 oder PD-L1/CD276 denkbar und könnte synergistische Effekte entfalten. Kombinationstherapien sind aber nicht nur aufgrund des synergistischen Effekts eine gute Option, sondern auch weil sowohl bei der Ansprechrate als auch bei der Entwicklung von Resistenzen eine erhöhte Chance besteht, dass zumindest eine Komponente seine Wirkung zeigt (Aggarwal et al. 2022; Dammeijer et al. 2017; Wolchok et al. 2017). Aus diesen Gründen wäre auch eine CD155/CD276 -Kombinationstherapie möglicherweise erfolgsversprechend, obwohl im CD8-T-Zell-Assay kein additiver Effekt der beiden Moleküle festgestellt werden konnte.

Für Anfang 2022 war eine klinische Studie (*ClinicalTrials.gov Identifier*: NCT05378425) mit einem anti-CD155 monoklonalen Antikörper geplant, für den gezeigt wurde, dass er die Immunzellaktivierung, gemessen an der Ausschüttung von IFN γ durch CD8-T-Zellen, erhöhte. Der Antikörper blockierte *in vitro* die Interaktion von CD155 mit TIGIT und CD96 und verhinderte so die Vermittlung negativer Signale von Tumorzelllinien an die CD8-T-Zellen. Weiterhin verhinderte er die Interaktion mit CD226, was dazu führte, dass CD226 nicht internalisiert wurde, auf der Oberfläche der Zellen verblieb und in einer robusten anti-Tumor Aktivität der CD8-T-Zellen resultierte. In Kombination mit dem anti-PD-1 Inhibitor Pembrolizumab wurden synergistische Effekte festgestellt, die stärker ausgeprägt waren als bei der Kombination aus Pembrolizumab und einem anti-TIGIT Antikörper (Atieh et al. 2021). Diese Kombinationstherapie würde sehr gut die Charakteristika der DCC und CD8-T-Zellen aus den Lymphknoten der Melanompatienten dieser Arbeit adressieren. Erstaunlicherweise ist dies jedoch momentan die einzige konkret geplante klinische Studie, die sich direkt mit einem monoklonalen Antikörper gegen CD155 richtet. Ein möglicher Grund dafür könnte sein, dass wenig über die Expression von CD155 in gesunden Zellen bekannt ist. Obwohl CD155 nur in geringen Mengen in gesunden Geweben exprimiert ist, wird es als stress-induziertes Molekül betrachtet. Diese Funktion könnte besonders in Patienten wichtig sein, die Chemotherapien erhalten, da für manche Chemotherapeutika gezeigt wurde, dass sie die Expression von CD155 induzieren (Niu et al. 2017). Leider war der in klinischen Studien eingesetzte anti-CD155 Antikörper nicht verfügbar, um ihn im CD8-T-Zell-Assay zu testen und zu evaluieren, ob er die Interaktion von CD155 auf den EVs mit CD226 und TIGIT auf den CD8-T-Zellen verhindern und so die Proliferation und Zytokin-Produktion der CD8-T-Zellen wiederherstellen könnte.

Es gibt weitere Therapieansätze die CD155 oder seine Rezeptoren als Ziel haben. Direkt gegen CD155 gerichtet ist z.B. ein rekombinanter onkolytischer Poliovirus mit dem Namen PVSRIP0, welcher sich momentan in einer klinischen Studie der Phase zwei zur Behandlung von Gliom befindet (Desjardins et al. 2018). Weiterhin gibt es einige klinische Studien, die sich gegen den inhibitorischen Rezeptor TIGIT richten. Als Grundlage für die Entwicklung monoklonaler Antikörper gegen TIGIT dient z.B. die Studie von Chauvin et al. 2015 in der die Inhibition von TIGIT und PD-1 die Proliferation, Zytokin-Produktion und Degranulation von Tumor-infiltrierenden CD8-T-Zellen bei metastasierten Melanompatienten steigerte. Im Juni 2020 wurden 15 Antikörper, die den TIGIT-CD155 Signalweg als Ziel hatten, kommerziell produziert und befanden sich in verschiedenen Stadien der klinischen Entwicklung. Neun Moleküle befanden sich in klinischen Studien und Tiragolumab, welches von Genetech entwickelt wurde, befand sich in Phase III der SKYSCRAPER-02 Studie (Rotte et al. 2021). Hier wurde Tiragolumab in Kombination mit Atezolizumab (anti-PD-L1 Antikörper) und Chemotherapie (Carboplatin und Etoposid) bei Patienten mit bereits metastasiertem Lungenkrebs eingesetzt (Hoffmann-La Roche 2022). Auch diese Kombinationstherapie hätte sehr gut zu den Charakteristika der DCC und CD8-T-Zellen aus den Lymphknoten der Melanompatienten dieser Arbeit gepasst. Leider wurde Anfang April 2022 bekanntgegeben, dass die Kombinationstherapie das progressionsfreie Überleben der Patienten

nicht signifikant verbesserte und die klinische Studie damit gescheitert war. Die Phase 3 der SKYSCRAPER-01 Studie, in der ebenfalls Tiragolumab in Kombination mit Atezolizumab zur Behandlung von Lungenkrebspatienten eingesetzt wird, läuft jedoch noch (Rosa 2022). Auch eine klinische Studie mit Tiragolumab in Kombination mit Atezolizumab zur Behandlung von Melanompatienten im Stadium II, bei denen ctDNA (von engl. *circulating tumor DNA*) im Blut gefunden wurde, ist geplant (*ClinicalTrials.gov Identifier*: NCT05060003). In Bezug auf die Fragestellung der vorgelegten Arbeit wäre diese Studie in Stadium II Patienten viel relevanter als die Studien in bereits metastasierten Patienten im Stadium IV. Es bleibt abzuwarten wie die Ergebnisse ausfallen werden und ob die Behandlung in Zukunft bei Melanompatienten zur Anwendung kommen kann. Ein genereller Nachteil der anti-TIGIT Therapien ist jedoch, dass dadurch nicht die Interaktion von CD226 und CD155 und damit die Internalisierung von CD226 verhindert werden kann. Die Präsenz von CD226 auf den CD8-T-Zellen wäre jedoch, wie bereits ausführlich diskutiert, wichtig für die Effektor-Funktion der CD8-T-Zellen.

Die Kombinationstherapie mit anti-PD-L1/CD276 Antikörpern wäre aufgrund der höheren Expression von *CD276* als von *CD155* in den scRNAseq Daten theoretisch die beste Wahl bezogen auf das Melanom-Kollektiv aus dieser Arbeit. Es wurde bereits gezeigt, dass der Einsatz von CD276 blockierenden Antikörpern die CD8-T-Zell- und NK-Zell-Tumorinfiltration erhöhte, das Tumorstadium verringerte und das Überleben in Mausmodellen für hämatopoetische Krebsarten, Eierstockkrebs, Melanom und Darmkrebs verlängerte (Cai et al. 2020; Lee et al. 2017; Lu et al. 2020). In der Studie von Lee et al. 2017 wurde gezeigt, dass die Behandlung mit CD276 blockierenden Antikörpern das Wachstum von Kolonien in den Lungen von Mäusen, denen B16-F10 Melanomzellen injiziert wurden, reduzierte. In der gleichen Studie wurde auch die Kombination der Therapie mit anti-CD276 und anti-PD-1 Antikörpern an Mäusen, denen E.G7 Lymphom Zellen injiziert wurden, getestet. Hier zeigte sich, dass der Effekt der Einzeltherapie durch die Kombination der beiden Antikörper in Bezug auf die Reduktion des Tumorstadiums und -gewichts noch verstärkt werden konnte, wenn am Tag 7 nach Tumorzellinjektion mit der Therapie begonnen wurde. Interessanterweise war dieser Effekt nicht zu beobachten, wenn die Behandlung bereits am Tag 3 begonnen wurde, da hier bereits die Einzeltherapie effektiv war. Daraus wurde gefolgert, dass die Kombinationstherapie vor allem im späten Krankheitsstadium effektiv sein könnte (Lee et al. 2017). Dieses Ergebnis würde eher gegen den Einsatz einer Kombinationstherapie im frühen Krankheitsstadium sprechen. Jedoch wurde die Kombinationstherapie erstens im Mausmodell und zweitens bei einer hämatopoetischen Krebsart getestet, wodurch die Vergleichbarkeit mit den Melanompatienten dieser Arbeit nicht gegeben ist. Obwohl die genannten Ergebnisse eine vielversprechende Wirkung der CD276 Blockade auch in Kombination mit der PD-1 Blockade zeigten, ist bis zu diesem Zeitpunkt kein spezifischer humaner blockierender Antikörper für CD276 beschrieben worden (Zhou und Jin 2021). Eine Möglichkeit wäre der Einsatz des von Loo et al. 2012 entwickelten Antikörpers MGA271 (Enoblituzumab), welcher durch *Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* (ADCC) die Abtötung CD276 positiver Zellen induziert. Dabei bindet das Fab-Fragment des Antikörpers an die Tumorzellen und der Fc-Teil an den Fc-Rezeptor auf der Oberfläche von Immunzellen und vermittelt so die direkte Abtötung der Tumorzelle durch die Immunzelle (Loo et al. 2012). Dieser Antikörper befindet sich derzeit in einigen klinischen Studien, unter anderem in einer Studie zur Kombinationstherapie mit Pembrolizumab (anti-PD-1) von Hals-, Kopf- und Lungenkrebs und zeigte dabei eine akzeptable Sicherheit und Antitumor-Aktivität. In Checkpoint-Inhibitor-Therapie naiven metastasierten Lungenkrebspatienten lag die Gesamtansprechrate bei 36 % und bei Hals- und Kopfkrebepatienten bei 33 %. Auch eine kleine Gruppe von 13 Melanompatienten, die zuvor schon eine Checkpoint-Inhibitor-Therapie bekommen hatten, nahm an der Studie teil. Hier sprach die Therapie bei einem Patienten teilweise an und die Gesamtansprechrate lag somit bei 7,7 % (Aggarwal et al. 2022). Der Ansatz dieser Kombinationstherapie einerseits durch ADCC direkt die Tumorzellen zu adressieren und andererseits durch Immuncheckpoint-Blockade die

CD8-T-Zellen wiederzubeleben, ist sehr interessant. Es bleibt abzuwarten wie sich die klinischen Studien hierzu entwickeln.

Die optimale Therapie von Melanompatienten im frühen Stadium sollte anhand der Ergebnisse dieser Arbeit individuell an die Charakteristika der Immunmikroumgebung des SLN und der DCC angepasst werden. In einer klinischen Studie sollte hierzu zuerst durch scRNAseq überprüft werden, ob die DCC im SLN CD155 und oder CD276 exprimieren (auch durch Antikörperfärbung möglich) und ob der *EV-Pathway* hochreguliert ist. Weiterhin sollten die CD8-T-Zellen aus der Immunmikroumgebung des SLN auf die Expression der *exhaustion* Marker PD-1 und TIM-3 sowie der CD155 Rezeptoren TIGIT und CD226 untersucht werden. Zusätzlich sollte die Expression von PD-L1 auf den APCs und Stromazellen des SLN bestimmt werden. Ein hoher Prozentsatz PD-1 TIM-3 positiver CD8-T-Zellen und die Expression von PD-L1 im SLN würde für eine anti-PD-L1/PD-1 Therapie sprechen. Je nachdem ob bzw. wie stark CD155 und CD276 auf den DCC exprimiert wären könnten zusätzlich anti-CD155 Antikörper und Enoblituzumab zum Einsatz kommen. Für den Einsatz eines anti-CD155 Antikörpers würde auch eine hohe TIGIT und niedrige CD226 Expression auf den CD8-T-Zellen sprechen. Der anti-CD155 Antikörper wäre hierbei gegenüber einem anti-TIGIT Antikörper vorteilhaft, da er auch die Degradation von CD226 nach Interaktion mit CD155 verhindern könnte. Klinische Studienprotokolle für frühe Krankheitsstadien sind jedoch schlecht entwickelt und daher wäre eine solche Studie unwahrscheinlich. Wahrscheinlicher wäre eine Studie in Patienten eines späteren Stadiums. Hierzu müsste zuerst nachgewiesen werden, ob die in dieser Arbeit gefundenen Phänomene auch in metastasierten Organen wie der Lunge, dem Gehirn, der Niere oder der Haut auftreten. Eine Möglichkeit dies aufzuklären, würde die Autopsie-Studie des Sonderforschungsbereichs TRR305, in dessen Rahmen auch diese Doktorarbeit durchgeführt wurde, bieten. Da hier Zugriff auf alle Organmetastasen eines Patienten besteht, wäre es möglich die Immunmikroumgebung der Metastasen sowie die Krebszellen analog zu dieser Arbeit zu untersuchen und dabei herauszufinden, ob die eben diskutierten therapeutischen Implikationen auch in bereits metastasierten Patienten zutreffend wären.

Literaturverzeichnis

- Agata, Y.; Kawasaki, A.; Nishimura, H.; Ishida, Y.; Tsubata, T.; Yagita, H.; Honjo, T. (1996): Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. In: *International immunology* 8 (5), S. 765–772. DOI: 10.1093/intimm/8.5.765.
- Aggarwal, Charu; Prawira, Amy; Antonia, Scott; Rahma, Osama; Tolcher, Anthony; Cohen, Roger B. et al. (2022): Dual checkpoint targeting of B7-H3 and PD-1 with enoblituzumab and pembrolizumab in advanced solid tumors: interim results from a multicenter phase I/II trial. In: *J Immunother Cancer* 10 (4), e004424. DOI: 10.1136/jitc-2021-004424.
- Aguirre-Ghiso, Julio A. (2007): Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. In: *Nat Rev Cancer* 7 (11), S. 834–846. DOI: 10.1038/nrc2256.
- Alegre, M. L.; Frauwirth, K. A.; Thompson, C. B. (2001): T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. In: *Nat Rev Immunol* 1 (3), S. 220–228. DOI: 10.1038/35105024.
- Alexandrov, Ludmil B.; Nik-Zainal, Serena; Wedge, David C.; Aparicio, Samuel A. J. R.; Behjati, Sam; Biankin, Andrew V. et al. (2013): Signatures of mutational processes in human cancer. In: *Nature* 500 (7463), S. 415–421. DOI: 10.1038/nature12477.
- Atieh, Anas; Obiedat, Akram; Cinamon, Guy; Rovis, Tihana Lenac; Brlic, Paola Kucan; Hirs, Lea et al. (2021): 254 NTX-1088, a potent anti-PVR Mab induces DNAM1-mediated antitumor immunity. In: *J Immunother Cancer* 9 (Suppl 2), A275-A275. DOI: 10.1136/jitc-2021-SITC2021.254.
- Balar, Arjun V.; Galsky, Matthew D.; Rosenberg, Jonathan E.; Powles, Thomas; Petrylak, Daniel P.; Bellmunt, Joaquim et al. (2017): Atezolizumab as first-line treatment in cisplatin-ineligible patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. In: *The Lancet* 389 (10064), S. 67–76. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)32455-2.
- Barber, Daniel L.; Wherry, E. John; Masopust, David; Zhu, Baogong; Allison, James P.; Sharpe, Arlene H. et al. (2006): Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. In: *Nature* 439 (7077), S. 682–687. DOI: 10.1038/nature04444.
- Bidwell, Bradley N.; Slaney, Clare Y.; Withana, Nimali P.; Forster, Sam; Cao, Yuan; Loi, Sherene et al. (2012): Silencing of Irf7 pathways in breast cancer cells promotes bone metastasis through immune escape. In: *Nat Med* 18 (8), S. 1224–1231. DOI: 10.1038/nm.2830.
- Bottino, Cristina; Castriconi, Roberta; Pende, Daniela; Rivera, Paola; Nanni, Marina; Carnemolla, Barbara et al. (2003): Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. In: *The Journal of experimental medicine* 198 (4), S. 557–567. DOI: 10.1084/jem.20030788.
- Braumüller, Heidi; Wieder, Thomas; Brenner, Ellen; Aßmann, Sonja; Hahn, Matthias; Alkhaled, Mohammed et al. (2013): T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. In: *Nature* 494 (7437), S. 361–365. DOI: 10.1038/nature11824.
- Braun, M.; Aguilera, A. R.; Sundarajan, A.; Corvino, D.; Stannard, K.; Krumeich, S. et al. (2020): CD155 on Tumor Cells Drives Resistance to Immunotherapy by Inducing the Degradation of the Activating Receptor CD226 in CD8 + T Cells. In: *Immunity* 53 (4). DOI: 10.1016/j.immuni.2020.09.010.
- Bromberg, J. F.; Horvath, C. M.; Wen, Z.; Schreiber, R. D.; Darnell, J. E. (1996): Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (15), S. 7673–7678. DOI: 10.1073/pnas.93.15.7673.
- Cai, Dongli; Li, Jiaming; Liu, Dingfeng; Hong, Shanjuan; Qiao, Qin; Sun, Qinli et al. (2020): Tumor-expressed B7-H3 mediates the inhibition of antitumor T-cell functions in ovarian cancer insensitive to PD-1 blockade therapy. In: *Cell Mol Immunol* 17 (3), S. 227–236. DOI: 10.1038/s41423-019-0305-2.

- Cella, Marina; Presti, Rachel; Vermi, William; Lavender, Kerry; Turnbull, Emma; Ochsenbauer-Jambor, Christina et al. (2010): Loss of DNAM-1 contributes to CD8⁺ T-cell exhaustion in chronic HIV-1 infection. In: *European journal of immunology* 40 (4), S. 949–954. DOI: 10.1002/eji.200940234.
- Chambers, Ann F.; Groom, Alan C.; MacDonald, Ian C. (2002): Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. In: *Nature reviews. Cancer* 2 (8), S. 563–572. DOI: 10.1038/nrc865.
- Chapoval, A. I.; Ni, J.; Lau, J. S.; Wilcox, R. A.; Flies, D. B.; Liu, D. et al. (2001): B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-gamma production. In: *Nature immunology* 2 (3), S. 269–274. DOI: 10.1038/85339.
- Chauvin, Joe-Marc; Pagliano, Ornella; Fourcade, Julien; Sun, Zhaojun; Wang, Hong; Sander, Cindy et al. (2015): TIGIT and PD-1 impair tumor antigen-specific CD8⁺ T cells in melanoma patients. In: *J Clin Invest* 125 (5), S. 2046–2058. DOI: 10.1172/JCI80445.
- Chen, Gang; Huang, Alexander C.; Zhang, Wei; Zhang, Gao; Wu, Min; Xu, Wei et al. (2018): Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response. In: *Nature* 560 (7718), S. 382–386. DOI: 10.1038/s41586-018-0392-8.
- Chen, Lieping; Han, Xue (2015): Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: past, present, and future. In: *The Journal of clinical investigation* 125 (9), S. 3384–3391. DOI: 10.1172/JCI80011.
- Chettimada, Sukrutha; Lorenz, David R.; Misra, Vikas; Wolinsky, Steven M.; Gabuzda, Dana (2020): Small RNA sequencing of extracellular vesicles identifies circulating miRNAs related to inflammation and oxidative stress in HIV patients. In: *BMC Immunol* 21 (1), S. 57. DOI: 10.1186/s12865-020-00386-5.
- Chin, Y. E.; Kitagawa, M.; Kuida, K.; Flavell, R. A.; Fu, X. Y. (1997): Activation of the STAT signaling pathway can cause expression of caspase 1 and apoptosis. In: *Molecular and cellular biology* 17 (9), S. 5328–5337. DOI: 10.1128/MCB.17.9.5328.
- Chin, Y. E.; Kitagawa, M.; Su, W. C.; You, Z. H.; Iwamoto, Y.; Fu, X. Y. (1996): Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 WAF1/CIP1 mediated by STAT1. In: *Science (New York, N.Y.)* 272 (5262), S. 719–722. DOI: 10.1126/science.272.5262.719.
- Clayton, A.; Al-Taei, S.; Webber, J.; Mason, M. D.; Tabi, Z. (2011): Cancer exosomes express CD39 and CD73, which suppress T cells through adenosine production. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 187 (2). DOI: 10.4049/jimmunol.1003884.
- Clemente, Claudio G.; Mihm, Martin C.; Bufalino, Rosaria; Zurrida, Stefano; Collini, Paola; Cascinelli, Natale (1996): Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. In: *Cancer* 77 (7), S. 1303–1310. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0142(19960401)77:7<1303::AID-CNCR12>3.0.CO;2-5.
- Coleman, Bradley M.; Hill, Andrew F. (2015): Extracellular vesicles--Their role in the packaging and spread of misfolded proteins associated with neurodegenerative diseases. In: *Seminars in Cell & Developmental Biology* 40, S. 89–96. DOI: 10.1016/j.semcdb.2015.02.007.
- Colombo, Marina; Raposo, Graça; Théry, Clotilde (2014): Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. In: *Annual review of cell and developmental biology* 30, S. 255–289. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122326.
- Cordonnier, M.; Nardin, C.; Chanteloup, G.; Derangere, V.; Algros, M. P.; Arnould, L. et al. (2020): Tracking the evolution of circulating exosomal-PD-L1 to monitor melanoma patients. In: *Journal of extracellular vesicles* 9 (1). DOI: 10.1080/20013078.2019.1710899.
- Costa-Silva, Bruno; Aiello, Nicole M.; Ocean, Allyson J.; Singh, Swarnima; Zhang, Haiying; Thakur, Basant Kumar et al. (2015): Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. In: *Nat Cell Biol* 17 (6), S. 816–826. DOI: 10.1038/ncb3169.
- Crescitelli, Rossella; Lässer, Cecilia; Lötvall, Jan (2021): Isolation and characterization of extracellular vesicle subpopulations from tissues. In: *Nat Protoc* 16 (3), S. 1548–1580. DOI: 10.1038/s41596-020-00466-1.
- Cullen, S. P.; Brunet, M.; Martin, S. J. (2010): Granzymes in cancer and immunity. In: *Cell Death Differ* 17 (4), S. 616–623. DOI: 10.1038/cdd.2009.206.

- Dammeijer, Floris; Lau, Sai Ping; van Eijck, Casper H. J.; van der Burg, Sjoerd H.; Aerts, Joachim G. J. V. (2017): Rationally combining immunotherapies to improve efficacy of immune checkpoint blockade in solid tumors. In: *Cytokine & Growth Factor Reviews* 36, S. 5–15. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2017.06.011.
- Daugaard, Mads; Rohde, Mikkel; Jäättelä, Marja (2007): The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. In: *FEBS letters* 581 (19), S. 3702–3710. DOI: 10.1016/j.febslet.2007.05.039.
- Day, Cheryl L.; Kaufmann, Daniel E.; Kiepiela, Photini; Brown, Julia A.; Moodley, Eshia S.; Reddy, Sharon et al. (2006): PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. In: *Nature* 443 (7109), S. 350–354. DOI: 10.1038/nature05115.
- Desjardins, Annick; Gromeier, Matthias; Herndon, James E.; Beaubier, Nike; Bolognesi, Dani P.; Friedman, Allan H. et al. (2018): Recurrent Glioblastoma Treated with Recombinant Poliovirus. In: *The New England journal of medicine* 379 (2), S. 150–161. DOI: 10.1056/NEJMoa1716435.
- Dhatchinamoorthy, Karthik; Colbert, Jeff D.; Rock, Kenneth L. (2021): Cancer Immune Evasion Through Loss of MHC Class I Antigen Presentation. In: *Front. Immunol.* 12, S. 636568. DOI: 10.3389/fimmu.2021.636568.
- Di Vizio, Dolores; Morello, Matteo; Dudley, Andrew C.; Schow, Peter W.; Adam, Rosalyn M.; Morley, Samantha et al. (2012): Large oncosomes in human prostate cancer tissues and in the circulation of mice with metastatic disease. In: *The American journal of pathology* 181 (5), S. 1573–1584. DOI: 10.1016/j.ajpath.2012.07.030.
- Dong, Haidong; Strome, Scott E.; Salomao, Diva R.; Tamura, Hideto; Hirano, Fumiya; Flies, Dallas B. et al. (2002): Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. In: *Nature medicine* 8 (8), S. 793–800. DOI: 10.1038/nm730.
- Eyles, Jo; Puaux, Anne-Laure; Wang, Xiaojie; Toh, Benjamin; Prakash, Celine; Hong, Michelle et al. (2010): Tumor cells disseminate early, but immunosurveillance limits metastatic outgrowth, in a mouse model of melanoma. In: *J Clin Invest* 120 (6), S. 2030–2039. DOI: 10.1172/JCI42002.
- Fabbri, Muller; Paone, Alessio; Calore, Federica; Galli, Roberta; Gaudio, Eugenio; Santhanam, Ramasamy et al. (2012): MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (31), E2110-6. DOI: 10.1073/pnas.1209414109.
- Faries, Mark B.; Steen, Shawn; Ye, Xing; Sim, Myung; Morton, Donald L. (2013): Late recurrence in melanoma: clinical implications of lost dormancy. In: *Journal of the American College of Surgeons* 217 (1), 27-34; discussion 34-6. DOI: 10.1016/j.jamcollsurg.2013.03.007.
- Ferrone, S.; Whiteside, T. L. (2020): CSPG4 im Fokus zur Isolierung von aus Melanomzellen stammenden Exosomen aus Körperflüssigkeiten. In: *HNO* 68 (2), S. 100–105. DOI: 10.1007/s00106-019-00811-1.
- Fortunato, Diogo; Mladenović, Danilo; Criscuoli, Mattia; Loria, Francesca; Veiman, Kadi-Liis; Zocco, Davide et al. (2021): Opportunities and Pitfalls of Fluorescent Labeling Methodologies for Extracellular Vesicle Profiling on High-Resolution Single-Particle Platforms. In: *International Journal of Molecular Sciences* 22 (19), S. 10510. DOI: 10.3390/ijms221910510.
- Fortunato, Orazio; Borzi, Cristina; Milione, Massimo; Centonze, Giovanni; Conte, Davide; Boeri, Mattia et al. (2019): Circulating mir-320a promotes immunosuppressive macrophages M2 phenotype associated with lung cancer risk. In: *International journal of cancer* 144 (11), S. 2746–2761. DOI: 10.1002/ijc.31988.
- Fourcade, Julien; Sun, Zhaojun; Benallaoua, Mourad; Guillaume, Philippe; Luescher, Immanuel F.; Sander, Cindy et al. (2010): Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8+ T cell dysfunction in melanoma patients. In: *The Journal of experimental medicine* 207 (10), S. 2175–2186. DOI: 10.1084/jem.20100637.
- Freeman, G. J.; Long, A. J.; Iwai, Y.; Bourque, K.; Chernova, T.; Nishimura, H. et al. (2000): Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. In: *The Journal of experimental medicine* 192 (7), S. 1027–1034. DOI: 10.1084/jem.192.7.1027.

- Freitas, Daniela; Balmaña, Meritxell; Poças, Juliana; Campos, Diana; Osório, Hugo; Konstantinidi, Andriana et al. (2019): Different isolation approaches lead to diverse glycosylated extracellular vesicle populations. In: *Journal of extracellular vesicles* 8 (1), S. 1621131. DOI: 10.1080/20013078.2019.1621131.
- Fuchs, Anja; Cella, Marina; Giurisato, Emanuele; Shaw, Andrey S.; Colonna, Marco (2004): Cutting edge: CD96 (tactile) promotes NK cell-target cell adhesion by interacting with the poliovirus receptor (CD155). In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 172 (7), S. 3994–3998. DOI: 10.4049/jimmunol.172.7.3994.
- Fulda, Simone; Debatin, Klaus-Michael (2002): IFN γ sensitizes for apoptosis by upregulating caspase-8 expression through the Stat1 pathway. In: *Oncogene* 21 (15), S. 2295–2308. DOI: 10.1038/sj.onc.1205255.
- Gan, Xin; Gould, Stephen J. (2011): Identification of an inhibitory budding signal that blocks the release of HIV particles and exosome/microvesicle proteins. In: *Molecular biology of the cell* 22 (6), S. 817–830. DOI: 10.1091/mbc.E10-07-0625.
- Gao, Yanan; Qin, You; Wan, Chao; Sun, Yajie; Meng, Jingshu; Huang, Jing et al. (2021): Small Extracellular Vesicles: A Novel Avenue for Cancer Management. In: *Front. Oncol.* 11, S. 638357. DOI: 10.3389/fonc.2021.638357.
- Gastpar, Robert; Gehrmann, Mathias; Bausero, Maria A.; Asea, Alexzander; Gross, Catharina; Schroeder, Josef A.; Multhoff, Gabriele (2005): Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells. In: *Cancer research* 65 (12), S. 5238–5247. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3804.
- Gray, Elizabeth E.; Cyster, Jason G. (2012): Lymph node macrophages. In: *Journal of Innate Immunity* 4 (5-6), S. 424–436. DOI: 10.1159/000337007.
- Harper, Kathryn L.; Sosa, Maria Soledad; Entenberg, David; Hosseini, Hedayatollah; Cheung, Julie F.; Nobre, Rita et al. (2016): Mechanism of early dissemination and metastasis in Her2+ mammary cancer. In: *Nature* 540 (7634), S. 588–592. DOI: 10.1038/nature20609.
- Hartmann, Claudia H.; Klein, Christoph A. (2006): Gene expression profiling of single cells on large-scale oligonucleotide arrays. In: *Nucleic Acids Research* 34 (21), e143. DOI: 10.1093/nar/gkl740.
- Hashiguchi, Masaaki; Kobori, Hiroko; Ritprajak, Patcharee; Kamimura, Yosuke; Kozono, Haruo; Azuma, Miyuki (2008): Triggering receptor expressed on myeloid cell-like transcript 2 (TLT-2) is a counter-receptor for B7-H3 and enhances T cell responses. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (30), S. 10495–10500. DOI: 10.1073/pnas.0802423105.
- Herbst, Roy S.; Soria, Jean-Charles; Kowanetz, Marcin; Fine, Gregg D.; Hamid, Omid; Gordon, Michael S. et al. (2014): Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. In: *Nature* 515 (7528), S. 563–567. DOI: 10.1038/nature14011.
- Hoffmann-La Roche (2022): A Phase III, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study of Atezolizumab Plus Carboplatin and Etoposide With or Without Tiragolumab (Anti-Tigit Antibody) in Patients With Untreated Extensive-Stage Small Cell Lung Cancer. NCT04256421, GO41767. Hg. v. ClinicalTrials.gov. Online verfügbar unter <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04256421>, zuletzt aktualisiert am 17.03.2022, zuletzt geprüft am 25.04.2022.
- Hood, Joshua L.; San, Roman Susana; Wickline, Samuel A. (2011): Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. In: *Cancer Res* 71 (11), S. 3792–3801. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-4455.
- Hosseini, Hedayatollah; Obradović, Milan M. S.; Hoffmann, Martin; Harper, Kathryn L.; Sosa, Maria Soledad; Werner-Klein, Melanie et al. (2016): Early dissemination seeds metastasis in breast cancer. In: *Nature* 540 (7634), S. 552–558. DOI: 10.1038/nature20785.
- Hsieh, Chia-Hsin; Tai, Shyh-Kuan; Yang, Muh-Hwa (2018): Snail-overexpressing Cancer Cells Promote M2-Like Polarization of Tumor-Associated Macrophages by Delivering MiR-21-Abundant Exosomes. In: *Neoplasia (New York, N.Y.)* 20 (8), S. 775–788. DOI: 10.1016/j.neo.2018.06.004.

- Hurwitz, Stephanie N.; Olcese, James M.; Meckes, David G. (2019): Extraction of Extracellular Vesicles from Whole Tissue. In: *Journal of visualized experiments : JoVE* (144). DOI: 10.3791/59143.
- Husain, B.; Ramani, SR; Chiang, E.; Lehoux, I.; Paduchuri, S.; Arena, T. A. et al. (2019): A Platform for Extracellular Interactome Discovery Identifies Novel Functional Binding Partners for the Immune Receptors B7-H3/CD276 and PVR/CD155. In: *Molecular & cellular proteomics : MCP* 18 (11). DOI: 10.1074/mcp.TIR119.001433.
- Hüsemann, Yves; Geigl, Jochen B.; Schubert, Falk; Musiani, Piero; Meyer, Manfred; Burghart, Elke et al. (2008): Systemic spread is an early step in breast cancer. In: *Cancer cell* 13 (1), S. 58–68. DOI: 10.1016/j.ccr.2007.12.003.
- Iwai, Yoshiko; Ishida, Masayoshi; Tanaka, Yoshimasa; Okazaki, Taku; Honjo, Tasuku; Minato, Nagahiro (2002): Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (19), S. 12293–12297. DOI: 10.1073/pnas.192461099.
- Jenike, Ana E.; Halushka, Marc K. (2021): miR-21: a non-specific biomarker of all maladies. In: *Biomark Res* 9 (1), S. 18. DOI: 10.1186/s40364-021-00272-1.
- Jiang, Tao; Shi, Tao; Zhang, Henghui; Hu, Jie; Song, Yuanlin; Wei, Jia et al. (2019): Tumor neoantigens: from basic research to clinical applications. In: *J Hematol Oncol* 12 (1), S. 93. DOI: 10.1186/s13045-019-0787-5.
- Johnston, R. J.; Comps-Agrar, L.; Hackney, J.; Yu, X.; Huseni, M.; Yang, Y. et al. (2014): The immunoreceptor TIGIT regulates antitumor and antiviral CD8(+) T cell effector function. In: *Cancer cell* 26 (6). DOI: 10.1016/j.ccell.2014.10.018.
- Kahlert, Christoph; Melo, Sonia A.; Protopopov, Alexei; Tang, Jiabin; Seth, Sahil; Koch, Moritz et al. (2014): Identification of double-stranded genomic DNA spanning all chromosomes with mutated KRAS and p53 DNA in the serum exosomes of patients with pancreatic cancer. In: *The Journal of biological chemistry* 289 (7), S. 3869–3875. DOI: 10.1074/jbc.C113.532267.
- Kakavand, Hojabr; Vilain, Ricardo E.; Wilmott, James S.; Burke, Hazel; Yearley, Jennifer H.; Thompson, John F. et al. (2015): Tumor PD-L1 expression, immune cell correlates and PD-1+ lymphocytes in sentinel lymph node melanoma metastases. In: *Mod Pathol* 28 (12), S. 1535–1544. DOI: 10.1038/modpathol.2015.110.
- Kaufman, Howard L.; Russell, Jeffery; Hamid, Omid; Bhatia, Shailender; Terheyden, Patrick; D'Angelo, Sandra P. et al. (2016): Avelumab in patients with chemotherapy-refractory metastatic Merkel cell carcinoma: a multicentre, single-group, open-label, phase 2 trial. In: *The Lancet Oncology* 17 (10), S. 1374–1385. DOI: 10.1016/S1470-2045(16)30364-3.
- Kim, Dong Ha; Kim, HyeongRyul; Choi, Yun Jung; Kim, Seon Ye; Lee, Jung-Eun; Sung, Ki Jung et al. (2019): Exosomal PD-L1 promotes tumor growth through immune escape in non-small cell lung cancer. In: *Exp Mol Med* 51 (8), S. 1–13. DOI: 10.1038/s12276-019-0295-2.
- Klein, Christoph A. (2020): Cancer progression and the invisible phase of metastatic colonization. In: *Nat Rev Cancer* 20 (11), S. 681–694. DOI: 10.1038/s41568-020-00300-6.
- Komarova, Elena Y.; Suezov, Roman V.; Nikotina, Alina D.; Aksenov, Nikolay D.; Garaeva, Luiza A.; Shtam, Tatiana A. et al. (2021): Hsp70-containing extracellular vesicles are capable of activating of adaptive immunity in models of mouse melanoma and colon carcinoma. In: *Sci Rep* 11 (1), S. 21314. DOI: 10.1038/s41598-021-00734-4.
- Koppers-Lalic, Danijela; Hackenberg, Michael; Bijnsdorp, Irene V.; van Eijndhoven, Monique A. J.; Sadek, Payman; Sie, Daud et al. (2014): Nontemplated nucleotide additions distinguish the small RNA composition in cells from exosomes. In: *Cell reports* 8 (6), S. 1649–1658. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.08.027.
- Kowal, J.; Arras, G.; Colombo, M.; Jouve, M.; Morath, J. P.; Primdal-Bengtson, B. et al. (2016): Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (8). DOI: 10.1073/pnas.1521230113.

- Krall, Jordan A.; Reinhardt, Ferenc; Mercury, Oblaise A.; Pattabiraman, Diwakar R.; Brooks, Mary W.; Dougan, Michael et al. (2018): The systemic response to surgery triggers the outgrowth of distant immune-controlled tumors in mouse models of dormancy. In: *Science translational medicine* 10 (436). DOI: 10.1126/scitranslmed.aan3464.
- Lambert, Arthur W.; Pattabiraman, Diwakar R.; Weinberg, Robert A. (2017): Emerging Biological Principles of Metastasis. In: *Cell* 168 (4), S. 670–691. DOI: 10.1016/j.cell.2016.11.037.
- Lappas, Courtney M.; Rieger, Jayson M.; Linden, Joel (2005): A2A adenosine receptor induction inhibits IFN- γ production in murine CD4 $^{+}$ T cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 174 (2), S. 1073–1080. DOI: 10.4049/jimmunol.174.2.1073.
- Larkin, James; Chiarion-Sileni, Vanna; Gonzalez, Rene; Grob, Jean-Jacques; Rutkowski, Piotr; Lao, Christopher D. et al. (2019): Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. In: *The New England journal of medicine* 381 (16), S. 1535–1546. DOI: 10.1056/NEJMoa1910836.
- Laulagnier, Karine; Motta, Claude; Hamdi, Safouane; Roy, Sébastien; Fauvelle, Florence; Pageaux, Jean-François et al. (2004): Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization. In: *The Biochemical journal* 380 (Pt 1), S. 161–171. DOI: 10.1042/BJ20031594.
- Lee, Jii Bum; Ha, Sang-Jun; Kim, Hye Ryun (2021): Clinical Insights Into Novel Immune Checkpoint Inhibitors. In: *Frontiers in pharmacology* 12, S. 681320. DOI: 10.3389/fphar.2021.681320.
- Lee, Joo Sang; Ruppén, Eytan (2019): Multiomics Prediction of Response Rates to Therapies to Inhibit Programmed Cell Death 1 and Programmed Cell Death 1 Ligand 1. In: *JAMA Oncol* 5 (11), S. 1614–1618. DOI: 10.1001/jamaoncol.2019.2311.
- Lee, Young-hee; Martin-Orozco, Natalia; Zheng, Peilin; Li, Jing; Zhang, Peng; Tan, Haidong et al. (2017): Inhibition of the B7-H3 immune checkpoint limits tumor growth by enhancing cytotoxic lymphocyte function. In: *Cell Res* 27 (8), S. 1034–1045. DOI: 10.1038/cr.2017.90.
- Leitner, Judith; Klauser, Christoph; Pickl, Winfried F.; Stöckl, Johannes; Majdic, Otto; Bardet, Anaïs F. et al. (2009): B7-H3 is a potent inhibitor of human T-cell activation: No evidence for B7-H3 and TREM2 interaction. In: *European journal of immunology* 39 (7), S. 1754–1764. DOI: 10.1002/eji.200839028.
- Li, Tianhang; Liu, Tianyao; Zhao, Zihan; Xu, Xinyan; Zhan, Shoubin; Zhou, Shengkai et al. (2022): The Lymph Node Microenvironment May Invigorate Cancer Cells With Enhanced Metastatic Capacities. In: *Frontiers in oncology* 12, S. 816506. DOI: 10.3389/fonc.2022.816506.
- Lim, Andrea R.; Ghajar, Cyrus M. (2022): Thorny ground, rocky soil: Tissue-specific mechanisms of tumor dormancy and relapse. In: *Seminars in cancer biology* 78, S. 104–123. DOI: 10.1016/j.semcancer.2021.05.007.
- Lin, Heng; Wei, Shuang; Hurt, Elaine M.; Green, Michael D.; Zhao, Lili; Vatan, Linda et al. (2018): Host expression of PD-L1 determines efficacy of PD-L1 pathway blockade-mediated tumor regression. In: *J Clin Invest* 128 (2), S. 805–815. DOI: 10.1172/JCI96113.
- Ling, Vincent; Wu, Paul W.; Spaulding, Vikki; Kieleczawa, Jan; Luxenberg, Deborah; Carreno, Beatriz M.; Collins, Mary (2003): Duplication of primate and rodent B7-H3 immunoglobulin V- and C-like domains: divergent history of functional redundancy and exon loss. In: *Genomics* 82 (3), S. 365–377. DOI: 10.1016/s0888-7543(03)00126-5.
- Liu, Jiuyang; Geng, Xiafei; Hou, Jinxuan; Wu, Gaosong (2021): New insights into M1/M2 macrophages: key modulators in cancer progression. In: *Cancer Cell Int* 21 (1), S. 389. DOI: 10.1186/s12935-021-02089-2.
- Llorente, Alicia; Skotland, Tore; Sylvänne, Tuulia; Kauhanen, Dimple; Róg, Tomasz; Orłowski, Adam et al. (2013): Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells. In: *Biochimica et biophysica acta* 1831 (7), S. 1302–1309. DOI: 10.1016/j.bbailp.2013.04.011.
- Loo, Deryk; Alderson, Ralph F.; Chen, Francine Z.; Huang, Ling; Zhang, Wenjun; Gorlatov, Sergey et al. (2012): Development of an Fc-enhanced anti-B7-H3 monoclonal antibody with potent antitumor activity. In: *Clin Cancer Res* 18 (14), S. 3834–3845. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0715.

- Lozano, Ester; Dominguez-Villar, Margarita; Kuchroo, Vijay; Hafler, David A. (2012): The TIGIT/CD226 axis regulates human T cell function. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 188 (8), S. 3869–3875. DOI: 10.4049/jimmunol.1103627.
- Lu, Huimin; Shi, Tongguo; Wang, Mingyuan; Li, Xiaomi; Gu, Yanzheng; Zhang, Xueguang et al. (2020): B7-H3 inhibits the IFN- γ -dependent cytotoxicity of V γ 9V δ 2 T cells against colon cancer cells. In: *Oncol Immunology* 9 (1), S. 1748991. DOI: 10.1080/2162402X.2020.1748991.
- Lupu, Catalin; Eisenbach, Christoph; Lupu, Alaviana; Kuefner, Michael; Hoyler, Birgit; Stremmel, Wolfgang; Encke, Jens (2007): Adenoviral B7-H3 therapy induces tumor specific immune responses and reduces secondary metastasis in a murine model of colon cancer. In: *Oncol Rep* 18 (3), S. 745–748. DOI: 10.3892/or.18.3.745.
- Lupu, Catalin M.; Eisenbach, Christoph; Kuefner, Michael A.; Schmidt, Jan; Lupu, Alaviana D.; Stremmel, Wolfgang; Encke, Jens (2006): An orthotopic colon cancer model for studying the B7-H3 antitumor effect in vivo. In: *J Gastrointest Surg* 10 (5), S. 635–645. DOI: 10.1007/BF03239969.
- Luzzi, Keith J.; MacDonald, Ian C.; Schmidt, Eric E.; Kerkvliet, Nancy; Morris, Vincent L.; Chambers, Ann F.; Groom, Alan C. (1998): Multistep Nature of Metastatic Inefficiency. In: *The American journal of pathology* 153 (3), S. 865–873. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)65628-3.
- Ma, Michelle W.; Medicherla, Ratna C.; Qian, Meng; Vega-Saenz de Miera, Eleazar; Friedman, Erica B.; Berman, Russell S. et al. (2012): Immune response in melanoma: an in-depth analysis of the primary tumor and corresponding sentinel lymph node. In: *Mod Pathol* 25 (7), S. 1000–1010. DOI: 10.1038/modpathol.2012.43.
- Maas, Sybren L. N.; Breakefield, Xandra O.; Weaver, Alissa M. (2017): Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles. In: *Trends in cell biology* 27 (3), S. 172–188. DOI: 10.1016/j.tcb.2016.11.003.
- Marin-Acevedo, Julian A.; Kimbrough, ErinMarie O.; Lou, Yanyan (2021): Next generation of immune checkpoint inhibitors and beyond. In: *J Hematol Oncol* 14 (1), S. 45. DOI: 10.1186/s13045-021-01056-8.
- Massagué, Joan; Obenauf, Anna C. (2016): Metastatic colonization by circulating tumour cells. In: *Nature* 529 (7586), S. 298–306. DOI: 10.1038/nature17038.
- Mathieu, Mathilde; Névo, Nathalie; Jouve, Mabel; Valenzuela, José Ignacio; Maurin, Mathieu; Verweij, Frederik J. et al. (2021): Specificities of exosome versus small ectosome secretion revealed by live intracellular tracking of CD63 and CD9. In: *Nat Commun* 12 (1), S. 4389. DOI: 10.1038/s41467-021-24384-2.
- McCoy, K. D.; Le Gros, G. (1999): The role of CTLA-4 in the regulation of T cell immune responses. In: *Immunology and cell biology* 77 (1), S. 1–10. DOI: 10.1046/j.1440-1711.1999.00795.x.
- Michalek, Ryan D.; Rathmell, Jeffrey C. (2010): The metabolic life and times of a T-cell. In: *Immunological reviews* 236, S. 190–202. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2010.00911.x.
- Misstear, Karen; Chanas, Simon A.; Rezaee, S. A. Rahim; Colman, Rachel; Quinn, Laura L.; Long, Heather M. et al. (2012): Suppression of antigen-specific T cell responses by the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus viral OX2 protein and its cellular orthologue, CD200. In: *Journal of virology* 86 (11), S. 6246–6257. DOI: 10.1128/JVI.07168-11.
- Mittal, Deepak; Lepletier, Ailin; Madore, Jason; Aguilera, Amelia Roman; Stannard, Kimberley; Blake, Stephen J. et al. (2019): CD96 Is an Immune Checkpoint That Regulates CD8+ T-cell Antitumor Function. In: *Cancer immunology research* 7 (4), S. 559–571. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-18-0637.
- Mohos, Anita; Sebestyén, Tímea; Liszkay, Gabriella; Plótár, Vanda; Horváth, Szabolcs; Gaudi, István; Ladányi, Andrea (2013): Immune cell profile of sentinel lymph nodes in patients with malignant melanoma - FOXP3+ cell density in cases with positive sentinel node status is associated with unfavorable clinical outcome. In: *Journal of translational medicine* 11, S. 43. DOI: 10.1186/1479-5876-11-43.
- Möller, Andreas; Lobb, Richard J. (2020): The evolving translational potential of small extracellular vesicles in cancer. In: *Nat Rev Cancer* 20 (12), S. 697–709. DOI: 10.1038/s41568-020-00299-w.
- Muntjewerff, Elke M.; Meesters, Luca D.; van den Bogaart, Geert (2020): Antigen Cross-Presentation by Macrophages. In: *Front. Immunol.* 11, S. 1276. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01276.

- Nabhan, Joseph F.; Hu, Ruoxi; Oh, Raymond S.; Cohen, Stanley N.; Lu, Quan (2012): Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (11), S. 4146–4151. DOI: 10.1073/pnas.1200448109.
- Niu, Chao; Jin, Haofan; Li, Min; Zhu, Shan; Zhou, Lei; Jin, Feng et al. (2017): Low-dose bortezomib increases the expression of NKG2D and DNAM-1 ligands and enhances induced NK and $\gamma\delta$ T cell-mediated lysis in multiple myeloma. In: *Oncotarget* 8 (4), S. 5954–5964. DOI: 10.18632/oncotarget.13979.
- Nolte-'t Hoen, Esther N. M.; Buermans, Henk P. J.; Waasdorp, Maaïke; Stoorvogel, Willem; Wauben, Marca H. M.; Hoen, Peter A. C. 't (2012): Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions. In: *Nucleic Acids Research* 40 (18), S. 9272–9285. DOI: 10.1093/nar/gks658.
- Obst, Reinhard (2015): The Timing of T Cell Priming and Cycling. In: *Frontiers in immunology* 6, S. 563. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00563.
- Pan, Hongchao; Gray, Richard; Braybrooke, Jeremy; Davies, Christina; Taylor, Carolyn; McGale, Paul et al. (2017): 20-Year Risks of Breast-Cancer Recurrence after Stopping Endocrine Therapy at 5 Years. In: *The New England journal of medicine* 377 (19), S. 1836–1846. DOI: 10.1056/NEJMoa1701830.
- Park, Jung Eun; Dutta, Bamaprasad; Tse, Shun Wilford; Gupta, Nikhil; Tan, Chee Fan; Low, Jee Keem et al. (2019): Hypoxia-induced tumor exosomes promote M2-like macrophage polarization of infiltrating myeloid cells and microRNA-mediated metabolic shift. In: *Oncogene* 38 (26), S. 5158–5173. DOI: 10.1038/s41388-019-0782-x.
- Patil, N.; Cho, B. C.; Johnson, M.; Caro, R. B.; Spira, A.; Chiu, C. et al. (2021): P77.02 Efficacy of Tiragolumab + Atezolizumab in PD-L1 IHC and TIGIT Subgroups in the Phase II CITYSCAPE Study in First-Line NSCLC. In: *Journal of Thoracic Oncology* 16 (3), S635-S636. DOI: 10.1016/j.jtho.2021.01.1160.
- Peinado, Héctor; Alečković, Maša; Lavotshkin, Simon; Matei, Irina; Costa-Silva, Bruno; Moreno-Bueno, Gema et al. (2012): Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. In: *Nat Med* 18 (6), S. 883–891. DOI: 10.1038/nm.2753.
- Poggio, Mauro; Hu, Tianyi; Pai, Chien-Chun; Chu, Brandon; Belair, Cassandra D.; Chang, Anthony et al. (2019): Suppression of Exosomal PD-L1 Induces Systemic Anti-tumor Immunity and Memory. In: *Cell* 177 (2), 414-427.e13. DOI: 10.1016/j.cell.2019.02.016.
- Pommier, Arnaud; Anaparthi, Naishitha; Memos, Nicoletta; Kelley, Z. Larkin; Gouronnec, Alizée; Yan, Ran et al. (2018): Unresolved endoplasmic reticulum stress engenders immune-resistant, latent pancreatic cancer metastases. In: *Science (New York, N.Y.)* 360 (6394). DOI: 10.1126/science.aao4908.
- Prasad, Durbaka V. R.; Nguyen, Thang; Li, Zhaoxia; Yang, Yang; Duong, Julie; Wang, Ying; Dong, Chen (2004): Murine B7-H3 is a negative regulator of T cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 173 (4), S. 2500–2506. DOI: 10.4049/jimmunol.173.4.2500.
- Qian, Mingyu; Wang, Shaobo; Guo, Xiaofan; Wang, Jian; Zhang, Zongpu; Qiu, Wei et al. (2020): Hypoxic glioma-derived exosomes deliver microRNA-1246 to induce M2 macrophage polarization by targeting TERF2IP via the STAT3 and NF- κ B pathways. In: *Oncogene* 39 (2), S. 428–442. DOI: 10.1038/s41388-019-0996-y.
- Quintana, Elsa; Shackleton, Mark; Sabel, Michael S.; Fullen, Douglas R.; Johnson, Timothy M.; Morrison, Sean J. (2008): Efficient tumour formation by single human melanoma cells. In: *Nature* 456 (7222), S. 593–598. DOI: 10.1038/nature07567.
- Ramsbottom, Kelly M.; Hawkins, Edwin D.; Shimon, Raz; McGrath, Mairi; Chan, Christopher J.; Russell, Sarah M. et al. (2014): Cutting edge: DNAX accessory molecule 1-deficient CD8⁺ T cells display immunological synapse defects that impair antitumor immunity. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 192 (2), S. 553–557. DOI: 10.4049/jimmunol.1302197.
- Raskov, Hans; Orhan, Adile; Christensen, Jan Pravsgaard; Gögenur, Ismail (2021): Cytotoxic CD8⁺ T cells in cancer and cancer immunotherapy. In: *Br J Cancer* 124 (2), S. 359–367. DOI: 10.1038/s41416-020-01048-4.

- Rittmeyer, Achim; Barlesi, Fabrice; Waterkamp, Daniel; Park, Keunchil; Ciardiello, Fortunato; Pawel, Joachim von et al. (2017): Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial. In: *The Lancet* 389 (10066), S. 255–265. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)32517-X.
- Rosa, F. M.; Fellous, M. (1988): Regulation of HLA-DR gene by IFN-gamma. Transcriptional and post-transcriptional control. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 140 (5), S. 1660–1664. Online verfügbar unter <https://www.jimmunol.org/content/140/5/1660.short>.
- Rosa, Kristi (2022): Tiragolumab/Atezolizumab Fails to Improve PFS in Extensive-Stage SCLC. In: *Oncology Nursing News*, 09.04.2022. Online verfügbar unter <https://www.oncnursingnews.com/view/tiragolumab-atezolizumab-fails-to-improve-pfs-in-extensive-stage-sclc>, zuletzt geprüft am 25.04.2022.
- Rosenberg, Jonathan E.; Hoffman-Censits, Jean; Powles, Tom; van der Heijden, Michiel S.; Balar, Arjun V.; Necchi, Andrea et al. (2016): Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. In: *The Lancet* 387 (10031), S. 1909–1920. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)00561-4.
- Rotte, Anand; Sahasranaman, Srikumar; Budha, Nageshwar (2021): Targeting TIGIT for Immunotherapy of Cancer: Update on Clinical Development. In: *Biomedicines* 9 (9). DOI: 10.3390/biomedicines9091277.
- Sallusto, F.; Lenig, D.; Förster, R.; Lipp, M.; Lanzavecchia, A. (1999): Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. In: *Nature* 401 (6754), S. 708–712. DOI: 10.1038/44385.
- Sato, Shinya; Vasaikar, Suhas; Eskaros, Adel; Kim, Young; Lewis, James S.; Zhang, Bing et al. (2019): EPHB2 carried on small extracellular vesicles induces tumor angiogenesis via activation of ephrin reverse signaling. In: *JCI insight* 4 (23). DOI: 10.1172/jci.insight.132447.
- Schardt, Julian A.; Meyer, Manfred; Hartmann, Claudia H.; Schubert, Falk; Schmidt-Kittler, Oleg; Fuhrmann, Christine et al. (2005): Genomic analysis of single cytokeratin-positive cells from bone marrow reveals early mutational events in breast cancer. In: *Cancer cell* 8 (3), S. 227–239. DOI: 10.1016/j.ccr.2005.08.003.
- Schmidt-Kittler, Oleg; Ragg, Thomas; Daskalakis, Angela; Granzow, Martin; Ahr, Andre; Blankenstein, Thomas J. F. et al. (2003): From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (13), S. 7737–7742. DOI: 10.1073/pnas.1331931100.
- Schoenfeld, Adam J.; Hellmann, Matthew D. (2020): Acquired Resistance to Immune Checkpoint Inhibitors. In: *Cancer cell* 37 (4), S. 443–455. DOI: 10.1016/j.ccell.2020.03.017.
- Shelke, Ganesh Vilas; Lässer, Cecilia; Ghossein, Yong Song; Lötvall, Jan (2014): Importance of exosome depletion protocols to eliminate functional and RNA-containing extracellular vesicles from fetal bovine serum. In: *Journal of extracellular vesicles* 3. DOI: 10.3402/jev.v3.24783.
- Smyth, Lesley A.; Boardman, Dominic A.; Tung, Sim L.; Lechler, Robert; Lombardi, Giovanna (2015): MicroRNAs affect dendritic cell function and phenotype. In: *Immunology* 144 (2), S. 197–205. DOI: 10.1111/imm.12390.
- Smyth, M. J.; Thia, K. Y.; Cretney, E.; Kelly, J. M.; Snook, M. B.; Forbes, C. A.; Scalzo, A. A. (1999): Perforin is a major contributor to NK cell control of tumor metastasis. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 162 (11), S. 6658–6662. Online verfügbar unter <https://www.jimmunol.org/content/162/11/6658.short>.
- Speeckaert, Reinhart; Vermaelen, Karim; van Geel, Nanja; Autier, Philippe; Lambert, Jo; Haspeslagh, Marc et al. (2012): Indoleamine 2,3-dioxygenase, a new prognostic marker in sentinel lymph nodes of melanoma patients. In: *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 48 (13), S. 2004–2011. DOI: 10.1016/j.ejca.2011.09.007.
- Stengel, Katharina F.; Harden-Bowles, Kristin; Yu, Xin; Rouge, Lionel; Yin, Jianping; Comps-Agrar, Laëtita et al. (2012): Structure of TIGIT immunoreceptor bound to poliovirus receptor reveals a cell-cell adhesion and signaling mechanism that requires cis-trans receptor clustering. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (14), S. 5399–5404. DOI: 10.1073/pnas.1120606109.

- Stoecklein, Nikolas H.; Hosch, Stefan B.; Bezler, Martin; Stern, Franziska; Hartmann, Claudia H.; Vay, Christian et al. (2008): Direct genetic analysis of single disseminated cancer cells for prediction of outcome and therapy selection in esophageal cancer. In: *Cancer cell* 13 (5), S. 441–453. DOI: 10.1016/j.ccr.2008.04.005.
- Suh, Woong-Kyung; Gajewska, Beata U.; Okada, Hitoshi; Gronski, Matthew A.; Bertram, Edward M.; Dawicki, Wojciech et al. (2003): The B7 family member B7-H3 preferentially down-regulates T helper type 1-mediated immune responses. In: *Nature immunology* 4 (9), S. 899–906. DOI: 10.1038/ni967.
- Tahara-Hanaoka, Satoko; Shibuya, Kazuko; Onoda, Yuko; Zhang, Hua; Yamazaki, Satoshi; Miyamoto, Akitomo et al. (2004): Functional characterization of DNAM-1 (CD226) interaction with its ligands PVR (CD155) and nectin-2 (PRR-2/CD112). In: *International immunology* 16 (4), S. 533–538. DOI: 10.1093/intimm/dxh059.
- Tawbi, Hussein A.; Schadendorf, Dirk; Lipson, Evan J.; Ascierto, Paolo A.; Matamala, Luis; Castillo Gutiérrez, Erika et al. (2022): Relatlimab and Nivolumab versus Nivolumab in Untreated Advanced Melanoma. In: *The New England journal of medicine* 386 (1), S. 24–34. DOI: 10.1056/NEJMoa2109970.
- Testa, Ugo; Pelosi, Elvira; Castelli, Germana; Labbaye, Catherine (2017): miR-146 and miR-155: Two Key Modulators of Immune Response and Tumor Development. In: *Non-coding RNA* 3 (3). DOI: 10.3390/ncrna3030022.
- Thakur, Basant Kumar; Zhang, Haiying; Becker, Annette; Matei, Irina; Huang, Yujie; Costa-Silva, Bruno et al. (2014): Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. In: *Cell Res* 24 (6), S. 766–769. DOI: 10.1038/cr.2014.44.
- Théry, Clotilde; Amigorena, Sebastian; Raposo, Graça; Clayton, Aled (2006): Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. In: *Current Protocols in Cell Biology* Chapter 3 (1), Unit 3.22. DOI: 10.1002/0471143030.cb0322s30.
- Théry, Clotilde; Witwer, Kenneth W.; Aikawa, Elena; Alcaraz, Maria Jose; Anderson, Johnathon D.; Andriantsitohaina, Ramarason et al. (2018): Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. In: *Journal of extracellular vesicles* 7 (1), S. 1535750. DOI: 10.1080/20013078.2018.1535750.
- Tkach, Mercedes; Théry, Clotilde (2016): Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. In: *Cell* 164 (6), S. 1226–1232. DOI: 10.1016/j.cell.2016.01.043.
- Trajkovic, Katarina; Hsu, Chieh; Chiantia, Salvatore; Rajendran, Lawrence; Wenzel, Dirk; Wieland, Felix et al. (2008): Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. In: *Science (New York, N.Y.)* 319 (5867), S. 1244–1247. DOI: 10.1126/science.1153124.
- Turchinovich, Andrey; Weiz, Ludmila; Langheinz, Anne; Burwinkel, Barbara (2011): Characterization of extracellular circulating microRNA. In: *Nucleic Acids Research* 39 (16), S. 7223–7233. DOI: 10.1093/nar/gkr254.
- Ulmer, Anja; Dietz, Klaus; Hodak, Isabelle; Polzer, Bernhard; Scheitler, Sebastian; Yildiz, Murat et al. (2014): Quantitative measurement of melanoma spread in sentinel lymph nodes and survival. In: *PLoS medicine* 11 (2), e1001604. DOI: 10.1371/journal.pmed.1001604.
- Ulmer, Anja; Dietz, Klaus; Werner-Klein, Melanie; Häfner, Hans-Martin; Schulz, Claudia; Renner, Philipp et al. (2018): The sentinel lymph node spread determines quantitatively melanoma seeding to non-sentinel lymph nodes and survival. In: *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 91, S. 1–10. DOI: 10.1016/j.ejca.2017.12.002.
- Valadi, Hadi; Ekström, Karin; Bossios, Apostolos; Sjöstrand, Margareta; Lee, James J.; Lötvall, Jan O. (2007): Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. In: *Nat Cell Biol* 9 (6), S. 654–659. DOI: 10.1038/ncb1596.
- Valastyan, Scott; Weinberg, Robert A. (2011): Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. In: *Cell* 147 (2), S. 275–292. DOI: 10.1016/j.cell.2011.09.024.

- Wang, Jun; Yuan, Ruirong; Song, Wenru; Sun, Jingwei; Liu, Delong; Li, Zihai (2017): PD-1, PD-L1 (B7-H1) and Tumor-Site Immune Modulation Therapy: The Historical Perspective. In: *J Hematol Oncol* 10 (1), S. 34. DOI: 10.1186/s13045-017-0403-5.
- Wei, Zhiyun; Batagov, Arsen O.; Carter, David R. F.; Krichevsky, Anna M. (2016): Fetal Bovine Serum RNA Interferes with the Cell Culture derived Extracellular RNA. In: *Sci Rep* 6 (1), S. 1–6. DOI: 10.1038/srep31175.
- Weinstein, David; Leininger, Jennifer; Hamby, Carl; Safai, Bijan (2014): Diagnostic and prognostic biomarkers in melanoma. In: *The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology* 7 (6), S. 13–24.
- Welch, Megan J.; Teijaro, John R.; Lewicki, Hanna A.; Colonna, Marco; Oldstone, Michael B. A. (2012): CD8 T cell defect of TNF- α and IL-2 in DNAM-1 deficient mice delays clearance in vivo of a persistent virus infection. In: *Virology* 429 (2), S. 163–170. DOI: 10.1016/j.virol.2012.04.006.
- Werner-Klein, Melanie; Grujovic, Ana; Irlbeck, Christoph; Obradović, Milan; Hoffmann, Martin; Koerker-Qu, Huiqin et al. (2020): Interleukin-6 trans-signaling is a candidate mechanism to drive progression of human DCCs during clinical latency. In: *Nat Commun* 11 (1), S. 4977. DOI: 10.1038/s41467-020-18701-4.
- Werner-Klein, Melanie; Scheitler, Sebastian; Hoffmann, Martin; Hodak, Isabelle; Dietz, Klaus; Lehnert, Petra et al. (2018): Genetic alterations driving metastatic colony formation are acquired outside of the primary tumour in melanoma. In: *Nat Commun* 9 (1), S. 595. DOI: 10.1038/s41467-017-02674-y.
- Wolchok, Jedd D.; Chiarion-Sileni, Vanna; Gonzalez, Rene; Grob, Jean-Jacques; Rutkowski, Piotr; Lao, Christopher D. et al. (2021): CheckMate 067: 6.5-year outcomes in patients (pts) with advanced melanoma. In: *Journal of Clinical Oncology* 39 (15_suppl), S. 9506. DOI: 10.1200/JCO.2021.39.15_suppl.9506.
- Wolchok, Jedd D.; Chiarion-Sileni, Vanna; Gonzalez, Rene; Rutkowski, Piotr; Grob, Jean-Jacques; Cowey, C. Lance et al. (2017): Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. In: *The New England journal of medicine* 377 (14), S. 1345–1356. DOI: 10.1056/NEJMoa1709684.
- Wubbolts, Richard; Leckie, Rachel S.; Veenhuizen, Peter T. M.; Schwarzmann, Guenter; Möbius, Wiebke; Hoernschemeyer, Joerg et al. (2003): Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (13), S. 10963–10972. DOI: 10.1074/jbc.M207550200.
- Wykes, Michelle N.; Lewin, Sharon R. (2018): Immune checkpoint blockade in infectious diseases. In: *Nat Rev Immunol* 18 (2), S. 91–104. DOI: 10.1038/nri.2017.112.
- Xu, Dongping; Gu, Peidi; Pan, Ping-Ying; Li, Qingsheng; Sato, Alice I.; Chen, Shu-Hsia (2004): NK and CD8+ T cell-mediated eradication of poorly immunogenic B16-F10 melanoma by the combined action of IL-12 gene therapy and 4-1BB costimulation. In: *International journal of cancer* 109 (4), S. 499–506. DOI: 10.1002/ijc.11696.
- Xu, Xiulong; Fu, Xin-Yuan; Plate, Janet; Chong, Anita S-F. (1998): IFN- γ Induces Cell Growth Inhibition by Fas-mediated Apoptosis: Requirement of STAT1 Protein for Up-Regulation of Fas and FasL Expression. In: *Cancer Res* 58 (13), S. 2832–2837. Online verfügbar unter <https://aacrjournals.org/cancerres/article/58/13/2832/504206/IFN-Induces-Cell-Growth-Inhibition-by-Fas-mediated>.
- Xu-Monette, Zijun Y.; Zhang, Mingzhi; Li, Jianyong; Young, Ken H. (2017): PD-1/PD-L1 Blockade: Have We Found the Key to Unleash the Antitumor Immune Response? In: *Front. Immunol.* 8, S. 1597. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01597.
- Yaddanapudi, Kavitha; Stamp, Bryce F.; Subrahmanyam, Priyanka B.; Smolenkov, Andrei; Waigel, Sabine J.; Gosain, Rahul et al. (2022): Single-Cell Immune Mapping of Melanoma Sentinel Lymph Nodes Reveals an Actionable Immunotolerant Microenvironment. In: *Clin Cancer Res*, OF1-OF13. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-21-0664.
- Yang, Yi; Li, Chia-Wei; Chan, Li-Chuan; Wei, Yongkun; Hsu, Jung-Mao; Xia, Weiya et al. (2018): Exosomal PD-L1 harbors active defense function to suppress T cell killing of breast cancer cells and promote tumor growth. In: *Cell Res* 28 (8), S. 862–864. DOI: 10.1038/s41422-018-0060-4.

Yu, Xin; Harden, Kristin; Gonzalez, Lino C.; Francesco, Michelle; Chiang, Eugene; Irving, Bryan et al. (2009): The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. In: *Nat Immunol* 10 (1), S. 48–57. DOI: 10.1038/ni.1674.

Zhang, Baofu; Zhao, Weina; Li, Huizhong; Chen, Yuanyuan; Tian, Hui; Li, Liantao et al. (2016): Immunoreceptor TIGIT inhibits the cytotoxicity of human cytokine-induced killer cells by interacting with CD155. In: *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 65 (3), S. 305–314. DOI: 10.1007/s00262-016-1799-4.

Zhou, Wu-Tong; Jin, Wei-Lin (2021): B7-H3/CD276: An Emerging Cancer Immunotherapy. In: *Front. Immunol.* 12, S. 701006. DOI: 10.3389/fimmu.2021.701006.

Danksagung

Zuerst möchte ich meiner Betreuerin Melanie Werner-Klein danken, die, obwohl sie am LEX gefühlt für alles zuständig ist, immer Zeit für meine Fragen und Probleme hatte. Sie hat nicht nur mich unermüdlich angetrieben um die Doktorarbeit zu einem erfolgreichen Ende zu bringen, sondern auch selbst dazu beigetragen, indem sie zum Beispiel an Wochenenden meine Doktorarbeit korrigiert hat. Melanie hat immer gesagt: „Den Doktor bekommt man nicht für gute Ergebnisse, sondern dafür, dass man das Tal der Tränen durchschreitet.“ Du hast mich zwar oft in das Tal der Tränen getrieben, aber hattest auch in den entscheidenden Momenten Verständnis und aufbauende Worte, die mir geholfen haben, das Tal zu durchschreiten. Vielen Dank Melanie, für Alles!

Christoph Klein gilt mein Dank dafür, dass er den Rahmen geboten hat meine Forschung zu betreiben. Die unzähligen Data Clubs, Journal Clubs und Progress Days haben mir geholfen mich weiterzuentwickeln und gute wissenschaftliche Vorträge zu halten. Auch für die Möglichkeit Konferenzen in den USA und der Schweiz zu besuchen, bin ich ihm sehr dankbar. Und natürlich danke ich ihm auch dafür mein Doktorvater und mir in wissenschaftlicher Hinsicht ein Vorbild gewesen zu sein.

Auch Markus Feuerer danke ich dafür, dass ich die ersten eineinhalb Jahre Teil des Lehrstuhls für Immunologie sein und dort meine Experimente durchführen durfte. Die AG Feuerer hat mich aber auch nach dem Umzug ans LEX, während der gesamten Zeit meiner Doktorarbeit, insbesondere bei der Durchflusssyztometrie unterstützt, allen voran Sebastian Bittner und Lisa Schmidtleithner.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Freundin Kathrin Schambeck bedanken, die immer hinter mir steht, meine Launen erträgt und mich in allen Lebenslagen, vor allem aber während des Schreibens der Doktorarbeit, unterstützt hat. Auch in wissenschaftlicher Hinsicht bin ich ihr zu großem Dank verpflichtet, da sie mit mir die Knock-out Zelllinien hergestellt hat und ich mit ihr jegliche Probleme rund ums Labor besprechen konnte. Danke, dass du es mit mir aushältst! Für mich bist du die beste TA und Frau der Welt!

Nimm es mir nicht übel Doro, du bist nämlich die zweitbeste TA der Welt gleich nach Kathrin. Doro will ich herzlich dafür danken, dass sie mir gezeigt hat, wie man einen perfekten Western Blot macht und auch sonst ein Experiment vernünftig durchführt! Deine Verbindungen am UKR haben mir immer sehr geholfen und du warst meistens die Erste, die ich gefragt habe, wenn ich irgendwas gebraucht habe.

Mein Dank gilt auch Sandra Grunewald, die für mich die scRNAseq Libraries pipettiert hat und dabei wie immer gnadenlos durchgezogen hat. Sandra, bei dir wird sogar mir das Tempo manchmal ein bisschen zu hoch und das mag was heißen. Es war auch sehr schön, dich als Nachbarin im Büro zu haben und über Dinge außerhalb der Arbeit zu sprechen!

Danken möchte ich auch meinen Leidensgenossinnen Sandra Huber, Christina Fischer und Dania Riegel, die in der Arbeit zu Freunden geworden sind und mit denen ich in den letzten 5 Jahren viel erlebt habe. Wir werden auch über die Doktorarbeit hinaus gute Freunde bleiben!

Auch bei Huiqin Koerke-Qu, Isabell Blochberger, Miriam Kokal, Eva Maria Brandl, Zbigniew Czyz, Saba Sameri, Tobias Mederer, Julia Greindl-Junghans und allen anderen vom LEX möchte ich mich für die schöne Zeit bedanken.

Ohne die Hilfe der Kooperationspartner wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Hier möchte ich ganz besonders Mathias Raß, Felix Baumann, Norbert Eichner, Gerhard Lehmann, Franziska Saller, Gunter Meister, Phillip Schuster, Anette Rohrhofer, Barbara Schmitt, Katharina Limm, Reinhard Rachel, Anita Zügner und Stefan Kirsch danken.

Zu guter Letzt auch ein Dankeschön an meine Familie, insbesondere an meine Mutter Gabi, die mich immer unterstützt. Ohne dich wäre es nicht möglich gewesen den langen Weg bis zum Doktor zu gehen. Vielen Dank Mama!