Aus der Klinik für Hämatologie und Medizinische Onkologie

(Prof. Dr. med. L. Trümper)

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Die Bedeutung der Modulation der Exosomensekretion durch den ABC-Transporter A3 für die intrinsische Zytostatikaresistenz von aggressiven B-Zell-Lymphomen

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Thiha Aung

aus

Taungoo (Myanmar)

Göttingen 2020

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer/in:Prof. Dr. med. G. G. WulfKo-Betreuer/in:Prof. Dr. med. M. Oppermann

Prüfungskommission

Referent/in:Prof. Dr. med. G. G. WulfKo-Referent/in:Prof. Dr. med. M. Oppermann

Datum der mündlichen Prüfung: 10. Juni 2020

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Die Bedeutung der Modulation der Exosomensekretion durch den ABC-Transporter A3 für die intrinsische Zytostatikaresistenz von aggressiven B-Zell-Lymphomen" eigenständig angefertigt, und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden publiziert in:

Aung T, Chapuy B, Vogel D, Wenzel D, Oppermann M, Lahmann M, Weinhage T, Menck K, Hupfeld T, Koch R, et al. (2011): Exosomal evasion of humoral immunotherapy in aggressive B-cell lymphoma modulated by ATP-binding cassette transporter A3. Proc Natl Acad Sci USA <u>108</u>, 15336-15341

Koch R, Aung T, Vogel D, Chapuy B, Wenzel D, Becker S, Sinzig U, Venkataramani V, von Mach T, Jacob R, et al. (2016): Nuclear Trapping through Inhibition of Exosomal Export by Indomethacin Increases Cytostatic Efficacy of Doxorubicin and Pixantrone. Clin Cancer Res <u>22</u>, 395-404

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	. 11
TabellenverzeichnisI	
Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung	.1
1.1. Diffuse großzellige B-Zell-Lymphome – Pathogenese und Therapieoptionen	. 1
1.2. Exosomen – Entstehung und Funktion	.2
1.3. ABC-Transporter und Multidrogenresistenz	.3
1.4. Hypothesen und Zielsetzung	.4
2. Material, Methoden und Patientenproben	.5
2.1. Material	.5
2.2. Methoden1	3
2.3. Patientenproben1	7
3. Ergebnisse1	8
3.1. Die Bedeutung der Modulation der Exosomensekretion durch den ABC-Transporter A3 für die intrinsische Zytostatikaresistenz von aggressiven B-Zell-Lymphomen 1	8
3.1.1. Bindung des Anti-CD20-Antikörpers an Exosomen von B-Zell-Lymphomzellen1	8
3.1.2. Absorption des Anti-CD20-Antikörpers Rituximab und Verbrauch von Komplementfaktoren an Exosomen von B-Zell-Lymphomen in vitro und in vivo2	21
3.1.3. Effekte von Exosomen auf die Rituximab-vermittelte komplementinduzierte Zelllyse2	24
3.1.4. Rituximab stimuliert die Lymphomzellen durch Abschnürung TCC-beladener Exosomen2	25
3.1.5. Inhibition des ABC-Transporters A3 und der Exosomenbildung durch Rapamycin, Indometacin und U18666A2	28
3.1.6. Bedeutung von ABCA3 für die Freisetzung von Exosomen	30
3.2. Erhöhung der Wirksamkeit der Zytostatika Doxorubicin und Pixantron durch Inhibition des exosomalen Exports (nuclear trapping)	33
4. Diskussion3	38
4.1. Die Bedeutung von Exosomen für die intrinsische Zytostatikaresistenz von aggressiven B-Zell-Lymphomen3	38
4.2. Erhöhung der Wirksamkeit der Zytostatika von Doxorubicin und Pixantron durch Inhibition des exosomalen Exports im 3D-in-vivo-Tumor-Modell4	11
5. Zusammenfassung4	3
6. Literaturverzeichnis4	4

Abbildungsverzeichnis

Abb.	1: Charakteristiken der Patienten17
Abb.	2: Bindung des therapeutisch wirksamen, monoklonalen Anti-CD20-Antikörpers an
	Exosomen von B-Zell-Lymphomzellen
Abb.	3: Absorption des Anti-CD20-Antikörpers Rituximab und Verbrauch von
	Komplementfaktoren an Exosomen von B-Zell-Lymphomen in vitro und in vivo23
Abb.	4: Rituximab-vermittelte komplementinduzierte Zelllyse kann durch die Bildung von
	Exosomen verhindert werden25
Abb.	5: Rituximab stimuliert die Lymphomzellen durch Abschnürung TCC-beladener
	Exosomen
Abb.	6: Rapamycin, Indometacin und U18666A führen durch Inhibition des ABC-
	Transporters A3 zur Hemmung der Abschnürung der Exosomenbildung und
	damit zu einer verstärkten CDC-Aktivität29
Abb.	7: Bedeutung von ABCA3 für die Freisetzung von Exosomen und Anti-CD20-
	vermittelte komplementabhängige Zytolyse32
Abb.	8: CAM-Model
Abb.	9: Indometacin steigert die Wirksamkeit von Doxorubicin und Pixantron in vivo35
Abb.	10: Indometacin Behandlung verstärkt sowohl den Verbleib von Doxorubicin im
	Tumor als auch die medikamentinduzierte Gewebeverformung und verschiebt
	Doxorubicin (DXR) aus dem Zytoplasma in den Zellkern
Abb.	11: Indometacin Behandlung verstärkt den zellulären Verbleib von Pixantron im
	Tumor und verschiebt Pixantron aus dem Zytoplasma in den Zellkern
Abb.	12: Übersicht der Interaktion zwischen DLBCL-Zellen, Exosomen, ABCA3 und
	Rituximab42

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Geräte	5
Tabelle 2:	EDV	7
Tabelle 3:	Verbrauchsmaterialien	7
Tabelle 4:	Chemikalien	7
Tabelle 5:	Enzyme	.10
Tabelle 6:	Kits	.10
Tabelle 7:	Primärantikörper	.11
Tabelle 8:	Sekundärantikörper	.11
Tabelle 9:	Zelllinien	.11
Tabelle 10:	Kulturmedien für Zellkultur	.12
Tabelle 11:	Vektoren und Plasmide	.12
Tabelle 12:	shRNA-Sequenzen	.14

Abkürzungsverzeichnis

ABC-Transporter	ATP-Binding-Cassette-Transporter
ABCA3	ATP-Binding-Cassette Subfamily A Member 3
ADCC	Antibody-dependent Cell-mediated Cytotoxicity
B-NHL	B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome
САМ	Chicken Chorioallantoic Membrane
CD	Cluster of Differentiation
CDC	Complement-dependent Cytotoxicity
DXR	Doxorubicin
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorting
MAC	Membrane Attack Complex
MVB	Multivesicular Body
shRNA	Short-hairpin RNA
ТСС	Terminal Complement Complex

1. Einleitung

1.1. Diffuse großzellige B-Zell-Lymphome – Pathogenese und Therapieoptionen

Das diffuse großzellige B-Zell-Lymphom (diffuse large B-cell lymphoma, (DLBCL)) zählt zu den aggressiven Lymphomen (Beham-Schmid 2017; Grimm und O'Malley 2019). Es handelt sich um das weltweit am häufigsten vorkommende Non-Hodgkin-Lymphom, das bei männlichen Patienten vermehrt auftritt. Das durchschnittliche Alter der betroffenen Patienten liegt bei ca. 64 Jahren. Die Mehrheit der Patienten mit DLBCL kann durch die aktuellen Immuntherapien gut therapiert werden (Coiffier et al. 2002; Keating 2010; McLaughlin 1999), jedoch ist die Prognose für Patienten mit primär resistenten oder rezidivierenden Lymphomen häufig sehr schlecht (Gisselbrecht 2008; Pfreundschuh et al. 2014; Glass et al. 2017; Zou et al. 2019). Die Kombination aus Rituximab, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednisolon (R-CHOP) stellt das Gerüst des Behandlungsschemas dar. Durch die Hemmung der Topoisomerase II im Zellkern der Tumore tragen Anthrazykline, wie z. B. Doxorubicin, zur zytostatischen Effizienz bei (Shipp et al. 1995). Aus der Gruppe der Aza-Anthracendione führt Pixantron, ein Inhibitor der Topoisomerase II, zu einer zytostatischen Wirkung mit im Vergleich zu anderen Anthrazyklinen reduzierter Kardiotoxizität (Papadatos-Pastos und Pettengell 2013; Pettengell et al. 2012).

Der Anti-CD20-Antikörper Rituximab war der erste monoklonale Antikörper, der bei malignen B-Zell-Lymphomen eine hohe klinische Effizienz gezeigt hat und somit zum Standard der humoralen Immuntherapie bei dieser Erkrankung wurde (Maloney et al. 1994). Rituximab übt seine zytolytischen Effekte nach Bindung an das B-Lymphozyten-Antigen CD20 aus, indem es (i) die Apoptose induziert, (ii) komplementabhängige Zytolyse (CDC) auslöst und (iii) zur antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC) führt (Manches et al. 2003). Dabei variieren die unterschiedlichen Beiträge zur Zytotoxizität in Abhängigkeit von der B-Zell-Lymphomentität. Dabei erfordert die Initiation der Zytolyse immer die Bindung des Antikörpers an die Zelloberfläche des Tumors. Kürzlich wurde beschrieben, dass GA101/Obinutuzumab, der Nachfolger des Rituximabs, eine höhere Effektivität in ADCC zeigt und einen größeren direkten Apoptose-Effekt über Calcium-vermittelte Signalwege bei B-Zell-Lymphomen ausübt. Jedoch weist der Antikörper einen schwächeren CDC-Effekt verglichen mit Rituximab auf (Latour et al. 2019; Tobinai et al. 2017).

1.2. Exosomen – Entstehung und Funktion

Im Jahr 1987 wurde der Begriff der Exosomen in der Literatur geprägt (Johnstone et al. 1987). Exosomen sind Vesikel endosomalen Ursprungs, die Transferrin beinhalten und entstehen, wenn Retikulozyten zu Erythrozyten reifen (Pan und Johnstone 1983). Der Transferrin-Rezeptor ist an der Plasmamembran von Retikulozyten lokalisiert und wird bei deren Reifung zu Erythrozyten in Form von Exosomen aus der Zelle ausgeschieden.

Bei Exosomen handelt es sich um extrazelluläre, sekretorische Vesikel mit einer charakteristischen Morphologie im Elektronenmikroskop, einer Größe von ca. 50-100 nm und einer Dichte von ca. 1,15 g/ml in der Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation (Thery et al. 2002). Exosomen können durch Ultrazentrifugation bei 100.000 x g präpariert werden. Die Exosomen entstehen aus multivesikulären Körperchen (Multivesicular Bodies (MVB)) im späten endosomalen Kompartiment. Sie werden durch Fusion von MVB mit der Plasmamembran in den Extrazellulärraum freigesetzt (Stoorvogel et al. 2002). Exosomen werden in einer Vielzahl von unterschiedlichen Zellarten freigesetzt. Unter physiologischen Bedingungen werden Exosomen sowohl von erythroiden Progenitorzellen während der Zellreifung hämatopoetischer Progenitorzellen als auch von B-Lymphozyten und dendritischen Zellen freigesetzt. Exosomen wurden auch in den Überständen von verschiedenen Tumorzelllinien nachgewiesen, u. a. in der T-Lymphoblasten-Zelllinie Jurkat.

Prinzipiell können Exosomen Proteine, Lipide und (micro)RNAs enthalten (Colombo et al. 2014; Valadi et al. 2007). Exosomen exprimieren häufig Tetraspanine (u.a. CD9, CD63, CD81 und CD82), die von Bedeutung für lokale Inflammationsprozesse und Metastasierung sind. Zu den biologischen Funktionen von Exosomen, die von Tumoren stammen, zählen Immunsuppression, Stimulation der Angiogenese und Modulation des Tumorstromas (Andreola et al. 2002; Liu et al. 2006; Bobrie et al. 2012; Osaki et al. 2019). Weiterhin können Exosomen durch lokale Immunsuppression prä-metastatische Tumor-Nischen einleiten (Peinado et al. 2012; Osaki et al. 2019). Tumoren können über Exosomen eine Interaktion mit dem Immunsystem herstellen; da Exosomen Antigene präsentieren können, sind sie von großer Bedeutung bei der Induktion und Aufrechterhaltung der Tumorimmunität (Whiteside 2017).

Die Freisetzung von Exosomen trägt möglicherweise auch zu den Resistenzmechanismen von Medikamenten bei. Tumorzellen können einige Medikamente, wie z. B. Anthrazykline, nach Aufnahme in die Zelle in subzelluläre Kompartimente sequestrieren. Von dort wurde ein vesikulärer Transportweg, der über

2

Exosomen zum Export der Zytostatika führt, beschrieben (Chapuy et al. 2008; Chapuy et al. 2009) (Safaei et al. 2005).

Obwohl Exosomen bereits vor 40 Jahren erstmals beschrieben wurden, hat das Verständnis über die biologische Bedeutung und mögliche Einsatzgebiete von Exosomen in der Medizin in den letzten Jahren deutlich zugenommen. So gab es in den letzten Jahren Überlegungen zur möglichen klinischen Anwendung von Exosomen, u.a. bei der Liquid Diagnostic, bei der Körperflüssigkeiten wie Blut für diagnostische Zwecke analysiert werden (Osaki et al. 2019). Auch Exosomen, die von Tumorzellen stammen, wurden erfolgreich in der Diagnostik von Kolonkarzinom eingesetzt, um im Blut vorkommende Exosomen, die von Kolonkarzinom-Zellen abstammen, zu detektieren (Yoshioaka et al. 2014).

1.3. ABC-Transporter und Multidrogenresistenz

Die ABC(ATP-Binding-Cassette)-Transporter gehören zu den primär aktiven Transportern und zeichnen sich durch eine katalytische Einheit, welche ATP binden kann, aus, weshalb sie auch als membranständige ATPasen bezeichnet werden. Die dadurch freisetzbare Energie wird in den aktiven Transport von Lipiden, Aminosäuren, Vitaminen, Ionen sowie Xenobiotika umgesetzt (Dean et al. 2001). Anhand der Substratbindungsspezifität werden den ABC-Transportern unterschiedliche Funktionen zugeordnet und sie werden in sieben Untergruppen (ABC A-G) klassifiziert (Kaminski et al. 2006). Sie erfüllen unterschiedliche Funktionen in epithelialen Zellen, Stromazellen und Parenchymzellen. Während sie im Immunsystem bei der Antigenpräsentation mitbeteiligt sind, sorgen sie im Nervensystem für die Lipidhomöostase. Beim Menschen wurden Mutationen in den ABC-Transporter-Genen beschrieben, die beispielweise Zystische Fibrose oder Adrenoleukodystrophie hervorrufen.

Nach der initialen Entdeckung der Mitglieder ABCA1 und ABCA2 der ABC-Transporter-Familie wurde 1996 ein drittes homologes Protein, bezeichnet als ABCA3, beschrieben: Die Arbeitsgruppe von Klugbauer und Hofmann klonierte ABCA3 aus einer human medullären Schilddrüsenkarzinom-Zelllinie. Aufgrund der Homologie mit ABCC1 und ABCB1 wurde eine Bedeutung von ABCA3 für Zytostatikaresistenz postuliert (Klugbauer und Hofmann 1996). Yamano et al. (2001) wiesen die Lokalisation von ABCA3 auf Chromosom 16p13.3 nach und klonierten daraus das 190 kDa große Protein.

In der normalen Physiologie wird ABCA3 in der Lunge, im Gehirn und im Pankreas exprimiert und ist für den Lipidtransport zuständig (Hallman 2004; Kaminski et al. 2006; Klugbauer und Hofmann 1996). Ultrastruktur-Untersuchungen zeigten, dass ABCA3 in

1. Einleitung

der Lunge ausschließlich in Lamellar Bodies von Alveolar-Typ-II-Pneumozyten exprimiert ist (Yamano et al. 2001). Die Hauptfunktion von ABCA3 in Melanosomen und Lamellar Bodies ist der Transport von Phospholipiden und Cholesterol (Hallman 2004; Mulugeta et al. 2002; Raposo und Marks 2007; Yamano et al. 2001).

Die subzelluläre Sequestrierung bestimmter Chemotherapeutika, die damit verbundene Detoxifikation, Chemoresistenz sowie das Therapieansprechen und das Gesamtüberleben korrelierte in der akuten myeloischen Leukämie mit dem Expressionsniveau von ABCA3 (Chapuy et al. 2008; Hirschmann-Jax et al. 2005; Hirschmann-Jax et al. 2004; Norwood et al. 2004; Steinbach et al. 2006; Wulf et al. 2001).

1.4. Hypothesen und Zielsetzung

Um die Therapie von Patienten mit aggressiven B-Zell-Lymphomen zu verbessern, ist es wichtig, die Resistenzmechanismen gegen therapeutische Antikörper und vesikulär transportierte Zytostatika zu verstehen. Die vorliegende Arbeit sollte daher Rolle von Exosomen in der Resistenz von Lymphomzellen gegenüber humoraler Immunchemotherapie adressieren.

Die daraus abgeleiteten Fragen der Arbeit waren:

- 1) Bilden B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome Exosomen?
- 2) Welche Rolle spielt das Komplementsystem im Zusammenhang mit der Antikörpertherapie und Exosomenbildung?
- 3) Welche Rolle spielen ABC-Transporter in der Biogenese und Funktion sekretorischer Vesikel?
- 4) Zur Inhibition der Biogenese und der Ausschüttung sekretorischer Vesikel als therapeutisches Prinzip: Ermöglicht die Inhibition des vesikulären Transports durch Hemmung der ABC-Transporter die Resistenz von Tumorzellen gegenüber Zytostatika zu durchbrechen?

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Tabelle 1: Geräte

Art des Gerätes	Firma
Absaugsystem EcoVac	Schütt Labortechnik
Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
Casy Cell Counter®	Schärfe System, Reutlingen
CO2-Inkubator HERA Cell	Heraeus, Osterode
CSC-Kamera, Intelligent Dark Box II	FujiFilm, Düsseldorf
Dampfsterilisator Varioklav ®	H.u.P. Labortechnik, Oberschleißheim
Laminiergerät	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
Eismaschine	ZIEGRA, Isernhagen
Elektrophorese-Apparaturen:	
- Electrophoresis Power Supply	Invitrogen, Karlsruhe
(Consort EV202)	
- Electrophoresis Power Supply	Pharmacia Fine Chemicals, Schweden
(EPS 500/400)	
- Elektrophoresis Power Supply	BioRad, München
(PowerPad Basis)	
- Electrophoresis Power Supply (EPS 500/400)	Pharmacia Fine Chemicals, Schweden
- für LDS/SDS-Gele, XCell SurelockTM	Invitrogen, Karlsruhe
- für Agarosegele	
ELISA, Model iMark	BioRad, München
ELISA, Model 680	BioRad, München
Flüssigkeitsszintillationszähler, Typ 1450	PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim
MicroBeta Trilux	
FACScan	Becton Dickinson, Heidelberg
FACSCantoll	Becton Dickinson, Heidelberg
Fujifilm LAS – 4000	Fujifilm, Düsseldorf
Gefrierschränke:	SANYO, Wiesloch
-80°C, -150°C	Liebherr, Biberach
-20°C	Liebisch, Bielefeld
Heizblock	Heraeus, Osterode
Heizofen	Heidolph, Bremen
Horizontalrotierer, Rotamax 120	Janke & Kunkel, Staufen
Magnetrührer IKA-COMBIMAG RCT	Hamilton, Schweiz

Art des Gerätes	Firma
Mikroskope:	
- Axiovert 100	Zeiss, Oberkochen
- LABOVERT FS	Leitz, Oberkochen
- Standard 25	Zeiss, Oberkochen
Mikrowellenherd	AEG Micromat, Stockholm
Neubauer-Zählkammer, 0,0025mm ²	Brand Gläser, Wertheim
Nukleofektor TM II	Amaxa AG, Köln
Pipetten:	
- Einfach-Pipetten, 10µl, 200µl, 1000µl	Eppendorf, Hamburg
- Mehrkanal-Pipetten, 50µl, 300µl	Thermo Labsystems, Egelsbach
- Multipette, Combitips	Eppendorf, Hamburg
- Multipipette Accu-jet ® pro	Brand, Wertheim
Photometer, 8,5mm Lichtstrahlhöhe	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter, pH211	HANNA Instruments, Kehl am Rhein
Rotationsmischer 5432; 3300	Eppendorf, Hamburg
Rotoren:	
- VTI65.1	
- TL-100.3	BECKMANN, München
- SW-Ti 32	
Skalpell (11er, 15er, 21er)	AESCULAP, Tuttlingen
Sterilbank HERA safe	Heraeus, Osterode
Taqman-Reader 7500 HAT (ABI PRISM)	Applied Biosystems
Tecan SLT Spectra	Tecan Deutschland GmbH
Thermocycler T3000	Biometra, Göttingen
Trockenschrank	Memmert, Schwabach
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Wasserbad (250 V, 0,5 AMP-T)	Köttermann, Hänningse
Wipptisch, SSL4 (Stuart)	Barloworld Scientific, Staffordshire, UK
Zentrifugen:	
- Biofuge pico	Heraeus, Osterode
- Multifuge 3, Aussschwingmotor	Heraeus, Osterode
- Tischzentrifuge Centrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg
- Tabletop Ultrazentrifuge TL-100	Beckmann, München
- Ultrazentrifuge L80	Beckmann, München
- Zytospin-Zentrifuge	Shandon, Frankfurt

2.1.2. EDV

Tabelle 2: EDV

Programm	Firma
Adobe Photoshop 7.0.1	Adobe Systems Inc, San Jose(USA)
AxioVision	Zeiss, Oberkochen
Cell Quest Version 3.3	Becton Dickinson
Cell Quest Pro 5.2	Becton Dickinson, Heidelberg
Flowjo Pro Version 5.7.2 Tree Star Inc.	Tree star Inc, Ashland (USA)
GraphPad Prism 5.03 für Windows	GraphPad Software, San Diego California
	(USA)
ImageReader LAS 4000 Pro V 2.1	FujiFilm, Düsseldorf
ImageJ 1.41	W.Rasband, National Institut of Health (USA)
MAC OS 9	Apple Macintosh, USA
Microplate Manager 2.6	BioRad, München
Office XP	Microsoft, Redmond, USA
SDS 2.1	Applied Biosystems, USA
Windows 7	Microsoft, Redmond,USA

2.1.3. Verbrauchsmaterialen

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

Material	Firma
Ampuwa ®	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Deckgläschen, rund, Ø 1cm	Menzel Gläser, Braunschweig
Eindrückstopfen	Sarstedt, Braunschweig
Einfrierboxen	Nalgene, Herford, UK
Einmalkanülen:	
- BD Microlance 0,45x13mm; 26G1/2	Becton Dickinson, Heidelberg
- mit Lanzettenschliff, 2x70mm	EHRHARDT Söhne GmBH, Geislingen
Einmalspritzen:	
- Omnifix ® 10ml, Schraubverschluss	Braun, Melsungen
- Omnifix ® 1ml/40i.U. Insulinspritze	Braun, Melsungen
Gewebekulturflaschen, 25cm ² , 75cm ² ,	Sarstedt, Braunschweig
175cm ²	

Material	Firma
Gewebekulturschalen:	
- Ø 35mm	greiner bio-one, Nürtingen
- Ø 10cm	Sarstedt, Braunschweig
- Ø 15cm	greiner bio-one, Nürtingen
Multi-Well-Platten:	
- 6-Well-Platte	greiner bio-one, Nürtingen
- 24-Well-Platte	Becton Dickinson, Heidelberg
- 96-Well-Platte (Rund-, Flachboden)	Sarstedt, Braunschweig
- 386-Well-Platte	Abgene, Hamburg
Nitrozellulosemembran, HybondTM-c extra,	Amersham-Buchler, Braunschweig
0,2µM	
Objektträger, 76x26mm, Mattrand	Knittel Gläser, Braunschweig
Parafilm ®	American National CanTM, Chicago
Pipetten:	
- Pasteurpipetten, 230mm	Brand, Wertheim
- Serologische Pipetten, 5ml, 10ml, 25ml	Sarstedt, Braunschweig
- Pipettenspitzen 10µl, 200µl, 1000µl	Sarstedt, Braunschweig
- Reaktionsgefäße, 0,5ml, 2ml	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen:	
- Für Casy® 18-ml-Röhrchen	Sarstedt, Braunschweig
- Für FACS-Analysen 5-ml-Röhrchen	Sarstedt, Braunschweig
- Polystyrol-Rundbodenröhrchen 5ml	Becton Dickinson, Heidelberg
- Für Ultrazentrifuge Polycarbonat-	Beckmann, München
Zentrifugenröhrchen, 2ml	
Zentrifugenröhrchen, 15ml	
Zentrifugenröhrchen, 30ml	
- Kryoröhrchen, 1,8ml	Nalgene, Herford, UK
- Sterile Plastikröhrchen, 15ml, 50ml	Sarstedt, Braunschweig
Serologische Pipetten, 5ml, 10ml, 25ml	Sarstedt, Braunschweig
Sterifilter	Sarstedt, Braunschweig
Szintillationsflüssigkeit	PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim
Zellschaber; 25mm	Sarstedt, Braunschweig
Zellsieb; 70µm	Becton Dickinson, Heidelberg
Zellsieb: 0,25	Becton Dickinson, Heidelberg

2.1.4. Chemikalien

Tabelle 4: Chemikalien

Substanz	Firma
Agar	Sigma, Deisenhofen
Amilorid	Sigma, Steinheim
Bromphenolblau	BioRad, München
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT, 0,1M)	Invitrogen, Karlsruhe
dNTP Mix (2,5mM)	Invitrogen, Karlsruhe
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Sigma, Deisenhofen
FACSFlow [™]	Becton Dickinson, Heidelberg
Glycin	Roth, Karlsruhe
Imidazol	Merck, Darmstadt
Indometacin	Sigma, Steinheim
Isopropanol	J.T.Baker, Griesheim
LB Broth Base	Invitrogen, Karlsruhe
Lade-Pufer (6x)	peqlab, Erlangen
Magermilchpulver	BioRad, München
Methanol	J.T.Baker, Griesheim
MgCl ₂	Invitrogen, Karlsruhe
ß-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
4-Nitrophenyl N-acetyl-ß-DGlucosaminid	Sigma, Deisenhofen
(ß-Hexosaminidase-Substrat)	
NuPAGE® Antioxidant	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x)	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE® SDS Running Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE® Transfer Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE® 4-12% Bis-Tris Gel	Invitrogen, Karlsruhe
Rapamycin	LC Laboratories, Woburn, USA
RNAse-Free DNAse Set	QIAGEN, Hilden
RNase Out™ (5.000 U, 40 U/µI)	Invitrogen, Karlsruhe
U18666A	Sigma, Steinheim

Substanz	Firma
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck, Darmstadt
TritonX-100	Merck, Darmstadt
Trizma® Acetat	Sigma, Deisenhofen
Trypan-Blau (0,4%)	Sigma, Deisenhofen
Trypsin/EDTA, 0,05%	Invitrogen, Karlsruhe
Tween® 20, SigmaUltra	Sigma, Deisenhofen
Universal Agarose	peqlab, Erlangen

2.1.5. Enzyme

Tabelle 5: Enzyme

Name des Enzyms	Firma
Superscript™ II RT (10.000 U; 200 U/µI)	Invitrogen, Karlsruhe
Taq-DNA Polymerase (500 U, 5 U/µl)	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.6. Fertige Kits zur Bearbeitung von RNA, DNA und Proteinen

Tabelle 6: Kits

Name des Kits	Firma
Dako REAL™ Detection System	Dako, Hamburg
DC Protein Assay	BioRad, München
ECL [™] Western Blotting Detection Reagents	Amersham-Buchler, Braunschweig
SYBR® Green Kit	QIAGEN, Hilden
QIAprep® Spin Midiprep Kit	QIAGEN, Hilden
QIAprep® Spin Miniprep Kit (250)	QIAGEN, Hilden
QIAprep® Maxiprep Kit	QIAGEN, Hilden
Rneasy® Mini Kit	QIAGEN, Hilden
Cellline Nucleofector Kit V	Amaxa AG, Köln

2.1.7. Primärantikörper

Tabelle 7: Primärantikörper

Antigen,	Spezies	Verdünnung		Herkunft/Referenz
Bezeichnung des		WB	IF	
AK				
CD20 (Klon: 2H7)	Maus	1:1000	1:50	BD Pharmingen
CD46 (Klon: E4.3)	Maus	1:1000	1:50	BD Pharmingen
CD55 (Klon: IA10)	Maus	1:1000	1.50	BD Pharmingen
CD59 (Klon: p282)	Maus	1:1000	1:50	BD Pharmingen
CD63 (Klon: H5C6)	Maus	1:1000	1:50	BD Pharmingen
CD9 (Klon: M-L13)	Maus	1:1000	1:50	BD Pharmingen
Flotillin-2 (Klon: 29)	Maus	1:1000	1:50	BD Tansduction Laboratories
GAPDH	Maus	1:10000		Sigma Aldrich

2.1.8. Sekundärantikörper

Tabelle 8: Sekundärantikörper

Konjugat	Spezies	Verdünnung		Herkunft/Referenz
		WB	II	
HRP-Konjugat	Ziege anti Maus	1:10000		Santa Cruz, CA, USA

2.1.9. Eukaryotische Zelllinien

Tabelle 9: Zelllinien

Zelllinie	Charakteristika	Herkunft	Referenz
Balm3	DLBCL	B.Glass	Lok et al. 1979
HEK293T	Humane Nierenzelllinie	Cheong et al. 2006	Graham et al. 1977
			Cheong et al. 2006
HEK293-	Humane Nierenzelllinie mit	Cheong et al. 2006	Cheong et al. 2006
ABCA3/eGFP	stabiler ABCA3-Expression		
HEK293A	Humane Nierenzelllinie zur	CLONTECH	Graham et al. 1977
	Produktion des Adenovirus		Aiello et al. 1979
	Ad5F35		
HL-60	Zelllinie einer myeloischen	DSMZ,	
	Leukämie	Braunschweig	
SuDHL4	DLBCL	DSMZ,	Epstein et al. 1976
		Braunschweig	
OCI Ly1	DLBCL	Dana Farber	
		Cancer Institute	

2.1.10. Kulturmedien für die Zellkultur

Tabelle 10: Kulturmedien für Zellkultur

Zelllinie	Medium	Firma
HEK293	DMEM (1x), 1% L-Glut,	Invitrogen, Karlsruhe
	1% Pen/Strep, 10% FCS	
HEK293-ABCA3/eGFP	DMEM (1x), 1% L-Glut,	Invitrogen, Karlsruhe
	1% Pen/Strep, 10% FCS,	
	100µg/ml G418	
HEK293A	DMEM (1x), 1% L-Glut,	Invitrogen, Karlsruhe
	1% Pen/Strep, 10% FCS	
HL-60, Balm-3, SU-DHL-4	RPMI-1640 (1x), 1% L-Glut,	Biochrom AG, Berlin
	1% Pen/Strep, 10% FCS	
OCI-Ly-1	IMDM 1640 (1x), 1% L-Glut,	Invitrogen, Karlsruhe
	1% Pen/Strep, 10% FCS	

2.1.11. Vektoren und Plasmide

Tabelle 11: Vektoren und Plasmide

Name	Bezugsquelle
pEGFP-N1+ABCA3	Cheong et al. 2006
pLKO.1-puro	Open Biosystems, Lafayette, USA
pLKO.1-GFP	Addgene, Boston, USA
pMD.G-VSV-G	Addgene, Boston, USA
pCMV-dR8.91	Addgene, Boston, USA

2.2. Methoden

2.2.1. Präparation und Quantifizierung von Exosomen

Die Präparation der Exosomen erfolgte mittels differentieller Zentrifugation nach Standardprotokollen (Valadi et al. 2007). Nachdem 5 x 10⁷ Lymphomzellen für 48 h in exosomenfreiem Medium inkubiert worden waren, wurden die Zellen und größere Zellreste durch Zentrifugation (10 min, 500 x g, 4°C) entfernt. Der Überstand wurde erneut zentrifugiert (20 min, 10,000 x g, 4 °C; Beckman L8-55 Ultrazentrifuge, Rotor Ti32), um die Partikel mittlerer Größe zu entfernen. Anschließend wurde der Überstand filtriert und zentrifugiert (240 min, 120,000 x g, 4 °C; Beckman L8-55 Ultrazentrifuge, rRotor Ti32), um ein Exosomen-Pellet zu bekommen, das in PBS gewaschen und in 50 μ I PBS resuspendiert wurde. Die Quantifizierung der Exosomen erfolgte durch Bestimmung des Gesamtproteins (Bio-Rad DC Protein Assay) und die Western BlotAnalyse mit Detektion von Flotillin-2 und CD63 im Vergleich zu Kontroll-Exosomen-Präparationen (Savina et al. 2005) oder AChE-Aktivität (Safaei et al. 2005).

2.2.2. Durchflusszytometrie

Zur Detektion sowohl von membrangebundener als auch von intrazellulärer Fluoreszenz wurden Standard-Protokolle für die Durchflusszytometrie benutzt. FACS-Analysen von exosomalen Oberflächenproteinen wurden durchgeführt, nachdem die Exosomen an 4µm-Aldehyd/Sulfat Latex-Beads gekoppelt worden waren (Testa et al. 2010). Für die Fluoreszenz-Analyse von CAM-Lymphomzellen wurden die CAM-Lymphome homogenisiert, in PBS gewaschen und mit FITC-markierten anti-humanen CD20-Antikörpern (monoklonal, abcam ab46895) gefärbt. CD20-positive Zellen wurden sortiert und deren Doxorubin- oder Pixantron-Fluoreszenz analysiert. Die von Doxorubicin abgegebene Fluoreszenz nach Anregung bei 351 nm wurde bei 560 nm detektiert, die von Pixantron wurde nach Anregung bei 650 nm bei 670 nm detektiert.

2.2.3. Komplement-Analyse und Rituximab-Messungen

Um Rituximab im Medium und in Serumproben von Patienten zu detektieren und zu quantifizieren, wurde ein ELISA mit dem anti-idiotypischen, monoklonalen Antikörper MB2A4 benutzt (Andreola et al. 2002). MB2A4 wurde mit einer Konzentration von 5 µg/ml mit Coating-Puffer in 96-Well-Platten versetzt, blockiert, gewaschen, und verdünnte Rituximab-beinhaltende Proben wurden für 90 min zugegeben. Nach dem Waschen wurden die Wells mit anti-humaner Fc-Meerrettich-Peroxidase für 60 min inkubiert, bevor erneut gewaschen wurde und die Substratlösung 3,3',5,5'-

Tetramethylbenzidin (TMB) hinzugegeben wurde. Das Produkt wurde in einem Mikroplatten-Lesegerät bei 450/540 nm gemessen. Der Hintergrund des Mediums oder der Serumproben vor Zugabe von Rituximab wurde abgezogen; Standard-Verdünnungsreihen von Rituximab wurden parallel durchgeführt, um die Quantifizierung von Rituximab zu ermöglichen. Um CDC zu messen, wurde Rituxmab zu den Lymphomzellen in komplettem Medium mit Zusatz von humanem Serum hinzugefügt. Nach 24 h bei 37°C wurde die Zellviabilität mittels MTT-Färbung in Triplikaten bestimmt. Der Effekt auf die Viabilität wurde als Verhältnis der Werte der behandelten vs. der nichtbehandelten Proben ausgedrückt, d. h.: spezifische Viabilität = 100 x Absorption mit Antikörper-Behandlung / Absorption der unbehandelten Kontrolle. Um die Komplement-Dekomposition von C3 im Überstand der Exosomen (gekoppelt an Beads) zu messen, wurde der monoklonale Antikörper I3/I5 in 96-Well-Medisorp-Platten (NUNC, Medisorp, Thermo Fisher Scientific) aufgebracht, blockiert und gewaschen. Anschließend wurde ein entsprechend verdünnter Überstand des Exosomen-Bead-Komplexes für 60 min zur Platte hinzugefügt, gewaschen und mit dem Anti-C3d-Antikörper für 60 min inkubiert. Schließlich wurde der anti-FC, konjugiert an Meerrettich-Peroxidase, für 60 min hinzugefügt, gewaschen und das TMB-Substrat hinzugegeben. Zymosan (Sigma) wurde als Positivkontrolle für maximale Komplement-Fixierung verwendet und die Hinzugabe von Beads ohne Exosomen diente als Negativkontrolle.

2.2.4. Lentivirale Transfektion mittels shRNA / Knockdown von ABCA3 mittels shRNA

Für den Knockdown von ABCA3 wurden zwei spezifische shRNA-Sequenzen benutzt, die in den pLKO.1-eGF-Vektor (Addgene) umkloniert wurden:

Primer	TRC Klon ID TRCN0000059338:	TRC Klon ID
	shABCA3.38	TRCN0000059339:
		shABCA3.39
Forward-	CCGG(GCCCAGCTCATTGGGAAAT	CCGGGCCCAGCTCATTGGG
Primer	TT)CTCGAG(AAATTTCCCAATGA-	AAATTTCTCGAGAAATTTCC
5'-3'	GCTGGGC)TTTTTG	CAATGAGCTGGGCTTTTTG
Reverse-	AATTCAAAAA(AAATTTCCCAATGA	AATTCAAAAAGCCCAGCTCA
Primer	GCTGGGC)CTCGAG(GCCCAGCTC	TTGGGAAATTTCTCGAGAAA
5'-3'	ATTG-GGAAATTT)	TTTCCC AATGAGCTGGGC

Tabelle 12: shRNA-Sequenzen

Davon wurden lentivirale Partikel in HEK293-T-Zellen mit dem pCMV- Δ R8.91-Plasmid und dem pMD.G-Plasmid hergestellt. Zur verstärkten Expression von ABCA3 in Lymphomzellen wurden die Plasmide pEGFP-N1-ABCA3 wt bzw. pEGFP-N1-ABCA3 N568D (Mutante mit einer Mutation in der ATP-Bindungsstelle des Transporters) benutzt. 5 x 10⁶ Zellen in 180 µl OptiMEM (Gibco-BRL) wurden gemischt und in ein vorgekühltes Reaktionsgefäß (1,5 ml) mit 30 µg pEGFP-N1-ABCA3 wt oder pEGFP-N1-ABCA3 N568D überführt. Insgesamt wurden 100 µl der Zellen/Plasmid-Mischung in einer vorgekühlten Elektroporationsküvette elektroporiert (Multiporator, Eppendorf) (1200 V, 100 µs) und schließlich in 2 ml Wachstumsmedium über Nacht inkubiert. Für die Selektion wurden alle drei Tage 800 mg/L G418 ins Wachstumsmedium gegeben.

2.2.5. MTT-Viabilitätsassay

Die Viabilität der Zellen wurde unter Verwendung des 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyltetrazoliumbromid-MTT-Assays (Farbtestverfahren) untersucht. Bei MTT handelt es sich um einen membrangängigen, gelben Farbstoff, der in lebenden Zellen durch Dehydrogenasen im Mitochondrium metabolisiert wird, wodurch sich blaue MTT-Formazan-Kristalle bilden, die wasserunlöslich, nicht mehr membrangängig, sind. Diese Kristalle reichern sich in proliferierenden Zellen an; die Anzahl der blauen Kristalle ist direkt proportional zu der Anzahl an proliferierenden Zellen. Zur Durchführung des MTT-Assays wurden die Zellen als Triplikate in 96-Well-Platten in einer Dichte von 1 x 10⁵ Zellen/Well ausgesät und mit den angegebenen Konzentrationen des spezifischen Reagenzes und einer DMSO-Kontrolle behandelt und anschließend bei 37°C inkubiert. 24 h danach wurde MTT in PBS zum Zellkulturvolumen von 100 µL dazugegeben, um eine finale Konzentration von 0,5 mg/ml zu erreichen. Nach 4 h Inkubation wurden die suspendierten Zellen abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 33 % DMSO und 5 % Ameisensäure aufgelöst. Die Lichtabsorption wurde im Tecan Plattenphotometer gemessen. Die Effekte auf die Viabilität der Zellen wurden als Verhältnis der Werte von behandelten vs. unbehandelten Proben ausgedrückt; IC₅₀ wurde bestimmt als Konzentration, die zur 50 % Inhibition des Zellwachstums führte, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle.

2.2.6. Konfokale Mikroskopie

Zur Durchführung der konfokalen Mikroskopie wurden die Zellen mit 3,7 % Paraformaldehyd für 20 min bei Raumtemperatur fixiert. Zum Blockieren unspezifischer Bindungen wurde 50 mM NH₄CI für 15 min verwendet und zur Permeabilisierung 0,05 % Triton X-100 in PBS für 15 min. Die primären Antikörper wurden 1:100 in PBS verdünnt und für 1 h inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS und Inkubation in 10 % Ziegenserum wurden die primären Antikörper mittels der sekundären Antikörper (1:500 in PBS) visualisiert. Die Proben wurden in Fluoromount (DAKO) eingedeckelt und mit dem TCS-2 AOBS konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Leica) analysiert.

2.2.7. TIRF Mikroskopie

Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (TIRF) wurde an einem Leica AM TIRF MC Setup (Leica LAS AF Software) durchgeführt. Die Zellen befanden sich zum Mikroskopieren in einer Zellkulturschale mit Glasboden (WillCo dish®, 0,17 mm dünn) und waren mit einem Deckgläschen abgedeckt.

2.2.8. CAM-Assay

Zur Vorbereitung des CAM (Chorionallantoismembran)-Assays wurden befruchtete Eier in einen Hühnereier-Brutschrank (Humidität 80 %, Temperatur 37°C) bei stündlicher Rotation inkubiert. Am 3. Tag wurde die Eihülle mechanisch mit einer Feile oder mit Hilfe eines Kugelfräsers geöffnet (Fenstergröße ca. 1 cm x 1 cm). Die Schale wurde mit einer scharfen Pinzette vorsichtig angehoben und die obere Membran langsam abgehoben, so dass die Chorion-Allantois-Membran sichtbar wurde. Die befruchteten Eier zeigten zu diesem Zeitpunkt vaskuläre Strukturen. Das geöffnete Fenster wurde mit weißem Pflasterverband (Cellotape) wieder verschlossen und die Eier wurden weiter im Brutschrank inkubiert. Nach weiteren 5 Tagen (8. Tag) wurden die Lymphomzelllinien SU-DHL-4, OCI-Ly1 oder OCI-Ly3 vorbereitet und in Matrigel vermischt, um ein Gel zu bilden, und anschließend auf die Chorion-Allantois-Membran aufgetragen. 2 x 106 SU-DHL-4 Lymphomzellen wurden in 50 µl Zellkulturmedium mit 50 ml vorgekühltem Matrigel gemischt und für 15 min bei 37°C inkubiert, um ein Gel zu bilden (Papoutsi et al. 2000). Anschließend wurden die Lymphome mit 1 ml 10 µmol/l Indometacin oder 1 ml PBS inkubiert. Mit Hilfe einer 32-Chariere-Nadel wurden entweder 50 µg Doxorubicin oder Pixantron in ein Blutgefäß, das die Chorionallantoismembran kreuzt, injiziert. Danach wurde die Zugabe von Indometacin oder PBS wiederholt. Um die Effekte der medikamentösen Behandlung auf das Tumorwachstum zu beurteilen, wurden die Tumore am Ende des Experiments herausgeschnitten und gewogen.

2.3. Patientenproben

Table S2. Charakteristiken der Patiente						n		
PIN	Alter	Geschled	cht Histolog	gie Stag	ge IPI	Status der Probe	Reaktion	Regime
1	75	F	DLBCL	IIIAE	4	Unbehandelt	CR	R-CHOP
2	57	F	DLBCL	IVB	4	Relaps	PD	R-DHAP
3	81	M	DLBCL	IVA	4	Unbehandelt	PR	R-CHOP
4	45	M	DLBCL	IVA	2	Unbehandelt	RD	R-CHOP
5	64	M	IC	IVA	NA	Unbehandelt	PR	R-FC
6	72	M	DLBCL	IIAE	1	Unbehandelt	CR	R-CHOP
7	64	M	FL	IVB	NA	Unbehandelt	CRu	R -Bendamustin
8	55	M	DLBCL	IVB	2	Relaps	CRu	Allo tx
9	47	M	DLBCL	IIA	1	Unbehandelt	NA	R-CHOP
10	72	F	MCL	IVB	NA	Unbehandelt	NA	R-CHOP
11	46	F	MZL	IIIA	NA	Unbehandelt	NA	R-CHOP
12	67	M	DLBCL	IAE	1	Unbehandelt	NA	R-CHOP
13	83	F	FL	IIIB	NA	Relaps	NA	R -Bendamustin
14	72	M	DLBCL	IAE	1	Unbehandelt	NA	R-CHOP
15	69	м	DLBCL	IBE	1	Unbehandelt	NA	R-CHOP

Abb. 1: Charakteristiken der Patienten.

Es sind die Eigenschaften der männlichen (M) und weiblichen (F) Lymphompatienten [diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), immunocytoma (IC), follicular lymphoma (FI), mantle cell lymphoma (MCL), marginal zone lymphoma (MZL)] zusammengefasst und die jeweilige persönliche Identifikationsnummer (PIN) angegeben. Alle Patienten waren im aktiven Stadium der Krankheit, das nach dem Ann Arbor Staging System (Stage) klassifiziert wird. Der "international prognostic index" (IPI) zum Zeitpunkt der Blutabnahme ist angegeben. Das Anschlagen auf die Therapie wurde folgendermaßen klassifiziert: complete response (CR), complete response unconfirmed (CRu), partial response (PR), progressive disease (PD), Patienten mit andauernder Therapie (NA). Die Immunchemotherapie bestand aus Rituximab/Cyclophosphamid/Doxorubicin/Vincristin/

Prednisolon (R-CHOP), Rituximab/ Dexamethason/Ara-C/Cisplatin (R-DHAP), Rituximab/Fludarabin/ Cyclo-phosphamid (R-FC), Rituximab/Bendamustin (R-Bendamustin) oder allogener Stammzell-transplantation (Allo tx). *Abb. übersetzt aus Aung et al., 2011 (mit freundlicher Genehmigung von PNAS).*

3.1. Die Bedeutung der Modulation der Exosomensekretion durch den ABC-Transporter A3 für die intrinsische Zytostatikaresistenz von aggressiven B-Zell-Lymphomen

3.1.1. Bindung des Anti-CD20-Antikörpers an Exosomen von B-Zell-Lymphomzellen

Der Nachweis Exosomenbildung erfolgte mikroskopische der über und proteinbiochemische Verfahren. Um die Exosomenbildung B-Zellvon Lymphomzelllinien zu untersuchen, wurden mikrovesikuläre Strukturen durch differentielle Ultrazentrifugationsschritte aus den Zellkulturüberständen gewonnen. Diese mikrovesikulären Strukturen wiesen die typische Morphologie und Größe von Exosomen auf (Abb. 2A). Mittels Goldpartikelfärbung in der Elektronenmikroskopie, die mit Unterstützung von Dr. Dirk Wenzel am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen durch durchgeführt wurde, ließ sich die Bindung des Anti-CD20-Antikörpers Rituximab, der mit Protein-A-Immunogoldpartikeln markiert war, auf den Exosomen nachweisen. Dazu wurde das Pellet nach den Ultrazentrifugationsschritten in PBS resuspendiert und anschließend eingebettet.

Für den Nachweis auf Ebene von exosomalen Markerproteinen wurden die durch die verschiedenen Ultrazentrifugationsschritte gewonnenen Exosomen in Lysispuffer aufgenommen; eine Verdünnungsreihe der Exosomen (beginnend bei 50 µg bis zu 10 µg Protein) wurde im Western Blot analysiert (Abb. 2B). Zunächst wurde die Bindung von Rituximab an die exosomalen Proteine mittels des anti-Idiotyp monoklonalen Antikörpers gegen Rituximab (MB2A4) gezeigt. Es ließen sich die typischen Exosomenmarker (Alix, Flotillin-2) detektieren. CD20, welches Rituximab bindet, wurde ebenfalls deutlich nachgewiesen.

In Abb. 2C sind die Ergebnisse einer FACS-Analyse dargestellt, wobei die Exosomen an Beads gekoppelt wurden. Dabei ließen sich CD20, Flotillin-2, die Tetraspanine (CD9 und CD63) sowie Rituximab und GA101 im FITC-Kanal nachweisen.

In weiteren FACS-Analysen wurden bei SU-DHL-4-, Balm-3- und OCI-Ly1-Lymphomzelllinien die Expression von CD20 sowie die Expression der Komplement-Regulatorproteine (CRPs: CD46, CD55, CD59) nachgewiesen (Abb. 2D). In den von allen drei Lymphomzelllinien gebildeten Exosomen, die an Beads gekoppelt waren, ließ

sich CD20 Expression nachweisen. Ebenso waren die CRPs auf den Exosomen hochreguliert. Bei Su-DHL-4 und OCL-Ly-1 Zellen war die Expression von CRPs bei den Exosomen deutlich höher als bei den Zellen.

Zusammenfassend zeigen die in Abb. 2 dargestellten Ergebnisse, dass Lymphomzellen Exosomen bilden, auf denen sich das Antigen CD20 und Tetraspanine befinden, die auch als Exosomenmarker benutzt werden; Rituximab bindet über das auf den Exosomen vorhandene CD20 bzw. CRPs an Exosomen.



Abb. 2: Bindung des Anti-CD20-Antikörpers an Exosomen von B-Zell-Lymphomzellen.

(A) Mikrovesikuläre Strukturen von typischer Größe und Morphologie von Exosomen der B-Zell-Lymphomzelllinie Balm-3 differentieller wurden mittels Ultrazentrifugation aus Zellkulturüberständen gewonnen. Die Exosomen zeigten Bindung des Anti-CD20-Antikörpers Rituximab, der mit Protein-A-Immunogoldpartikeln markiert worden war. Die Pfeilspitze stellt die Immunogold-Färbung dar (Maßstab, 100 nm.) (B) Bindung von Rituximab an die exosomalen Proteine – dargestellt mittels Western Blot unter Verwendung eines anti-Idiotyp monoklonalen Antikörpers gegen Rituximab (MB2A4). Parallel dazu wurden die typischen Exosomen-Marker, CD20, Alix und Flotillin-2m untersucht. **(C)** Die Bindung der therapeutisch wirksamen monoklonalen Antikörper Rituximab und GA101 sowie CD20, Flotillin-2, CD63 und CD9 wurde auch mittels FACS an aufgereinigten Exosomen (SU-DHL-4), die an Beads gekoppelt waren. dokumentiert. (D) CD20- und CRP- (CD46, grün; CD55, türkis; CD59, braun; Isotyp (isot.) Kontrolle, rot) positive Zellen und Exosomen, die an Beads gekoppelt waren, wurden mit fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern mittels FACS analysiert. Abb. übersetzt aus Aung et al., 2011 (mit freundlicher Genehmigung von PNAS).

3.1.2. Absorption des Anti-CD20-Antikörpers Rituximab und Verbrauch von Komplementfaktoren an Exosomen von B-Zell-Lymphomen in vitro und in vivo.

Um zu untersuchen, ob Exosomen lösliches Rituximab "abfangen" und dadurch weniger Rituximab bei den Tumor-/Lymphomzellen ankommt, wurde ein spezieller ELISA mit einem anti-idiotypischen MB2A4 Antikörper etabliert, mit dem man lösliches und exosomengebundes Rituximab nachweisen kann (Cragg et al. 2004; Hampson et al. 2010) (Abb. 3A). Dazu wurde ein konzentrationsabhängiger Effekt von Exosomen auf die Bindung von Rituximab unter Verwendung von SU-DHL-4-Zellen analysiert. Es zeigt sich, dass mit steigender Exosomenzahl (Exosomen von SU-DHL-4 Zellen an Beads gekoppelt) die lösliche Konzentration von Rituximab im Überstand abfällt. Somit fingen die Exosomen den größten Teil von Rituximab ab, so dass Rituximab dadurch die Ziel-Lymphomzellen weniger gut erreichte.

Außerdem wurde eine FACS-Analyse mit Verwendung des MB2A4-Antikörpers durchgeführt, um die Bindung von Rituximab an die Exosomen im Plasma von Patienten nachzuweisen (3h nach Ende der Rituximab-Infusion) (Abb. 3B). Daneben konnte unter Verwendung von Patientenplasma im ELISA gezeigt werden, dass der Hauptteil des Rituximabs an die Exosomen gebunden war und ein geringerer Anteil in löslicher Form vorlag (Abb. 3C).

Ziel des nächsten Experiments war die Detektion des Komplement-Verbrauchs (Abb. 3D). Um den Komplementverbrauch nachzuweisen, wurde ein ELISA entwickelt, bei dem das Komplementzerfallsprodukt Cd3 mittels eines polyklonalen Antikörpers (I3/15) detektiert wurde. Dieser Antikörper fängt Cd3 ab; je mehr Cd3 nachgewiesen wurde, desto höher war der Komplementverbrauch.

Dazu wurden die folgenden drei Kontrollen verwendet: Als Positivkontrolle wurde Zymosan das maximalen Komplementverbrauch Als benutzt, induzierte. Negativkontrolle wurden nur Beads (ohne Exosomen) verwendet, wobei auch hier ein geringer Komplementverbrauch stattfand (2. Balken). Eine weitere Negativkontrolle war das "leere Well" (keine Beads, keine Exosomen) - da Komplement spontane Aktivität zeigt, war auch hier ein minimaler Komplementverbrauch zu sehen (3. Balken). Bei abfallender Konzentration von Beads (1 x10⁵; 5 x10⁴; 2,5 x10⁴), gekoppelt an Exosomen, ließ sich immer weniger Komplementverbrauch nachweisen (4./5./6. Balken). Im Umkehrschluss zeigt sich, dass eine höhere Anzahl an Exosomen, gebunden an Beads, mit einem höheren Komplementverbrauch korrelierte.

Um den terminalen Komplementkomplex (TCC) auf den Exosomen nachzuweisen, wurden die Beads, die mit Exosomen beladen worden waren, mit Rituximab in Gegenwart von aktivem humanen Serum inkubiert (Abb. 3E). Dabei zeigte sich in FACS-Analysen die Bildung des TCC auf den Exosomen, was sich durch den Anti-S5b9-Antikörpers nachweisen ließ (Balm-3, Su-DHL-4, OCI-Ly-1). Auch der Exosomenmarker Flotillin-2 konnte im FACS detektiert werden.



Abb. 3: Absorption des Anti-CD20-Antikörpers Rituximab und Verbrauch von Komplementfaktoren an Exosomen von B-Zell-Lymphomen in vitro und in vivo.

(A) Exosomen von SU-DHL-4-Zellen wurden zum Medium gegeben, das mit Rituximab in einer initialen Konzentration von 35 ng/100 µl für 1 h bei 21 °C versetzt war. Lösliches Rituximab wurde mittels ELISA gemessen, die Mittelwerte von Triplikaten von einem repräsentativen Experiment sind als prozentualer Anteil der Kontrollgruppe (Beads, die nicht mit Exosomen gekoppelt wurden) dargestellt. Signifikanzen sind durch Sterne markiert (Mehrfach-ANOVA, Bonferroni-Post-Hoc-Test). (B) Exosomen aus dem Plasma von Patienten wurden 3 h nach Ende der Rituximab-Infusion präpariert und die Rituximab-Bindung wurde mittels eines spezifischen Antikörpers (MB2A4) und unter Verwendung von FACS detektiert. (C) Exosomen aus dem Plasma von vier Patienten wurden 3 h nach Ende der Rituximab-Infusion präpariert. Zur Quantifizierung von freiem versus exosomengebundenem Rituximab-Antikörper wurde dieser mittels ELISA gemessen. Rituximab, gebunden an Exosomen, ist in dunkelgrau dargestellt, lösliches Rituximab in hellgrau. (D) Um den Komplement-Verbrauch zu detektieren, wurden C3d-Konzentrationen mittels ELISA und Verwendung eines polyklonalen Kaninchen-Antikörpers (I3/15) gemessen. Als Positivkontrolle dient Zymogen, als Negativkontrollen dienen sowohl Beads ohne Exosomen als auch spontaner Komplementverbrauch. Außerdem wurden drei unterschiedliche Konzentrationen an Beads, mit Exosomen gekoppelt, gemessen. Die Fehlerbalken stellen SD von Triplikaten eines repräsentativen Experiments dar (Mehrfach-ANOVA, Bonferroni-Post-Hoc-Test). (E) Beads, welche mit Exosomen beladen wurden, wurden mit 20 % humanem Serum mit Rituximab für 30 min inkubiert. Die Bildung des terminalen Komplementkomplexes (TCC) wurde unter Verwendung des primären Anti-SC5b-9- Antikörpers und des sekundären Antikörpers WI3/I5, gelabelt mit Phycoerythrin(PE), mittels FACS detektiert. Als Kontrolle wurden Beads mit dem Exosomen-Marker Flotillin-2 gefärbt. Abb. übersetzt aus Aung et al., 2011 (mit freundlicher Genehmigung von PNAS).

3.1.3. Effekte von Exosomen auf die Rituximab-vermittelte komplementinduzierte Zelllyse

Um einen möglichen protektiven Effekt von Exosomen zu untersuchen, wurde ein MTT-Viabilitäts-Assay mit 10 % aktivem humanen Serum durchgeführt. Dazu wurden OCI-Ly1-Lymphomzellen mit einer zunehmenden Anzahl an Exosomen (autolog) in Gegenwart von Rituximab inkubiert (Abb. 4A). In der Positivkontrolle, in Abwesenheit von sowohl Exosomen als auch Rituximab, zeigte sich die maximale Viabilität der Lymphomzellen (1. Balken). Bei Rituximab-Zugabe (ohne Anwesenheit von Exosomen) ließ sich ein deutlicher Effekt von Rituximab auf die Zellen, d.h. eine klare Abnahme der Viabilität der Zellen, nachweisen (2. Balken). Mit steigenden Konzentrationen von Exosomen (5, 10, 15 µg) wurde eine steigende Viabilität der Zellen im MTT-Assay erreicht (3./4./5. Balken).

Ziel des nächsten Experiments war es, den Effekt auf Zellviabilität bei steigenden Exosomenkonzentrationen (allogen, aus 3 Zelllinien) nachzuweisen (Abb. 4B). OCI-Ly-1-Zellen wurden mit isolierten Exosomen aus den drei Lymphomzelllinien (OCI-Ly-1, Karpas 422, SU-DHL-4) inkubiert, um zu untersuchen, welche Exosomen die höchsten "Abfangkapazitäten" haben. Der MTT-Assay zeigte, dass bei steigender Exosomenkonzentration bei allen drei Zelllinien die Viabilität der Zellen stieg; dabei ließ sich die höchste Viabilität bei Zugabe von Exosomen von Karpas 422 und SU-DHL-4-Zellen nachweisen.

Darüber hinaus wurde Plasma (in An-/Abwesenheit von Exosomen) mit SU-DHL-4-Zellen (Abb. 4C) bzw. autologen Lymphomzellen (Abb. 4D) mit zunehmenden Konzentrationen von Rituximab inkubiert. Abb. 4C zeigt, dass die Viabilität der Zellen bei Depletion von Exosomen und steigender Rituximab-Konzentration (konstante Exosomenanzahl) deutlich abnahm (rote Kurve). Dagegen sank bei steigender Rituximab-Konzentration in Anwesenheit von Exosomen die Viabilität der Zellen deutlich weniger (schwarze Kurve).

Um den Effekt der Anwesenheit von Exosomen auf die Viabilität der Zellen nachzuweisen, wurde außerdem ein weiterer MTT-Assay mit Plasma (Verdünnungen von 1:2 bis zu 1:64) in An- bzw. Abwesenheit von Exosomen durchgeführt (Abb. 4D). Die Ergebnisse zeigten, dass Zellen, die mit Plasma mit Anwesenheit von Exosomen behandelt wurden, besser überlebten. Bei der 1:2 bzw. 1:4 Verdünnung des Plasmas ließ sich eine signifikant höhere Viabilität der Zellen bei Anwesenheit von Exosomen im Vergleich zu Plasma ohne Exosomen nachweisen.



Abb. 4: Effekte von Exosomen auf die Rituximab-vermittelte komplementinduzierte Zelllyse

(A, B) OCI-Ly1-Zellen werden mit steigender Konzentration von Exosomen (exo.) (autolog (A) bzw. allogen (B) und Rituximab (ritux.) inkubiert. Nach 1 h Inkubation bei 37°C wurde im MTT die Zellviabilität gemessen. Dargestellt sind repräsentative Beispiele von mindestens drei Replikaten mit SD-Werten (Two-way ANOVA, Bonferroni-Post-Hoc-Test). (C, D) Plasma (mit oder ohne Depletion von Exosomen) zusammen mit SU-DHL-4-Zellen (C) bzw. autologen Lymphomzellen (D) wurden mit steigender Konzentration von Rituximab behandelt. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel von drei Replikaten. Signifikanzen wurden mittels Student's T-Test berechnet. *Abb. übersetzt aus Aung et al., 2011 (mit freundlicher Genehmigung von PNAS).*

3.1.4. Rituximab stimuliert die Lymphomzellen durch Abschnürung TCCbeladener Exosomen

Um eine möglicherweise stärkere Exosomensekretion, die durch niedrige Rituximab-Konzentrationen stimuliert wurde, nachzuweisen, wurde eine AChE-Aktivitätsmessung durchgeführt (Abb. 5A). AChE befindet sich auf Exosomen. SU-DHL-4-Lymphomzellen wurden mit sublytischen Konzentrationen an Rituximab (22 bzw. 325 pM) in Anwesenheit von inaktivem oder aktivem 10 % Serum, d.h. Komplementsystem inaktiviert bzw. aktiv, inkubiert. Dabei zeigte sich eine signifikante Zunahme der AChE-Aktivität.

Außerdem wurden die mit TCC-beladenen Exosomen in einer Verdünnungsreihe im Dot Blot mit sublytischen Konzentrationen an Rituximab analysiert (Abb. 5B). Die Dot Blot Ergebnisse zeigen, dass vermehrt Exosomen gebildet wurden, auf denen sich TCC befindet. Ebenso wurde auch vermehrt Komplement verbraucht und gebunden.

In Abb. 5C wurden die Dot Blot Ergebnisse densitometrisch quantifiziert. Bei steigender Konzentration von aktivem Serum mit vorhandenem Komplement nahm die Exosomenbildung zu – nachgewiesen anhand des Exosomenmarkers Flotillin-2. Daneben zeigte sich, dass durch die Stimulation des aktiven humanen Serums auch mehr Exosomen (mit TCC beladen) detektiert wurden.

In weiteren Experimenten wurde der Effekt von ABCA3 auf die Menge der Exosomen-Bildung im Western Blot analysiert. Dazu wurden SU-DHL-4- bzw. OCI-Ly-1-Zellen verwendet, die WT-ABCA3 bzw. lentiviralen Knock-out von ABCA3 aufwiesen (Abb. 5D) und ohne bzw. mit sublytischen Konzentrationen an Rituximab behandelt wurden. Bei Gabe von sublytischen Konzentrationen an Rituximab zeigte sich sowohl bei WT- als auch bei den Lymphomzellen mit ABCA3-Knock-out eine Steigerung der Exosomenbildung. Dies konnte anhand der Exosomenmarker Flotillin-2 und CD63 nachgewiesen werden. Bei den Zellen mit Knock-out von ABCA3 ließ sich eine reduzierte Exosomenbildung im Vergleich zu den WT-Zellen nachweisen. In Zellen mit Knock-out von ABCA3 führte die anschließende Gabe sublytischer Konzentrationen von Rituximab wieder zu einem Anstieg der Exosomenbildung.

Mittels TIRF-Mikroskopie ließ sich eine Kolokalisation von TCC-Komplexen (grün) und Exosomen (rot) darstellen, wobei die Zellen mit dem Membranmarker PKH26 (rot) gefärbt waren (Abb. 5E).

Zusammenfassend zeigen die Daten in Abb. 5, dass sublytische Konzentrationen von Rituximab die Lymphomzellen zu einer stärkeren Exosomenbildung anregte und dies zu einer stärkeren Abschnürung TCC-beladener Exosomen führt.





Abb. 5: Rituximab stimuliert die Lymphomzellen durch Abschnürung TCC-beladener Exosomen.

SU-DHL-4-Lymphomzellen wurden mit sublytischen Konzentrationen von Rituximab (22 und 325 pM) mit bzw. ohne aktives Komplementsystem inkubiert. Nach 24 h wurden die Exosomen geerntet. (A) Die geernteten Exosomen wurden mittels AChE-Aktivität gemessen (Mehrfach-ANOVA, Bonferroni-Post- Hoc-Test). (B) Entsprechend wurden die mit TCC beladenen Exosomen mittels Verdünnungsreihe im Dot-Blot für W13/15 gemessen. (C) Quantifizierung der Dot-Blot-Ergebnisse aus (B) mittels Densitrometrie. (D) Rituximab (325 pM) wurde zu SU-DHL-4 (WT bzw. ABCA3-knock out: Iv shABCA.38) oder OCI-Ly1-Zellen gegeben. Exosomen wurden nach 48 h geerntet. Flottilin-2, CD63 und GAPDH wurden mittels Western Blot detektiert. *Abb. übersetzt aus Aung et al., 2011 (mit freundlicher Genehmigung von PNAS).* (E) TIRF-Aufnahmen zeigen die Freisetzung von Exosomen von TCC aus Lymphomzellen.

3.1.5. Inhibition des ABC-Transporters A3 und der Exosomenbildung durch Rapamycin, Indometacin und U18666A

Um die Exosomenbildung zu beeinflussen, wurden in den folgenden Experimenten Inhibitoren der Exosomen-Synthese (Rapamycin, Indometacin, U18666A) eingesetzt (Chalmin et al. 2010; Fader et al. 2008; Strauss et al. 2010). Auf den Exosomen befindet sich AChE. Die Messung der Aktivität der AChE wurde zur Quantifizierung von OCI-Ly1-Lymphomzellen Exosomen eingesetzt. wurden mit steigenden Konzentrationen (1; 5; 10 µM) der drei Inhibitoren für 24 h inkubiert und anschließend die Exosomen aus den Überständen mittels Ultrazentrifugation isoliert. Danach wurden die Exsomenpellets in PBS aufgenommen und für AChE-Aktivitätsmessungen eingesetzt (Abb. 6A). Es zeigte sich, dass bei steigenden Konzentrationen der Inhibitoren die AChE-Aktivität und damit die Exosomenkonzentration im Überstand deutlich abnahm. Bei Rapamycin und Indometacin trat eine signifikante Abnahme der Exosomenbildung bei 5 und 10 µM der Inhibitoren auf; jedoch zeigte sich eine signifikante Abnahme erst bei 10 µM U18666A.

Die Exosomenpellets wurden nach der Lyse auch im Western Blot analysiert (Abb. 6B). So nahm die Anzahl der Exosomen, nachgewiesen an der Expression des Exosomenmarkers Flotillin-2, bei steigender Konzentration aller drei Inhibitoren ab. Bei 10 µM Rapamycin bzw. Indometacin zeigte sich kaum ein Nachweis von Flotillin-2 im Vergleich zu U18666A.

Um einen synergistischen Effekt von Rituximab + Rapamycin, Rituximab + Indometacin oder Rituximab + U18666A auszutesten, wurde ein MTT-Assay durchgeführt (Abb. 6C). Hierbei wurde Rituximab in Gegenwart von 10 % aktivem humanen Serum und 1 bzw. 5 μ M Rapamycin bzw. Indometacin bzw. U18666A untersucht. Im Vergleich zur Kontrolle (nur Rituximab) zeigte sich bei der Kombinationstherapie Rapamycin bzw. Indometacin bzw. U18666A mit Rituximab eine deutliche Abnahme der Viabilität der Zellen.



Abb. 6: Rapamycin, Indometacin und U18666A führen durch Inhibition des ABC-Transporters A3 zur Hemmung der Abschnürung der Exosomenbildung und damit zu einer verstärkten CDC-Aktivität.

OCI-Ly1-Lymphomzellen (5×10^7) wurden mit Inhibitoren der Exosomen-Synthese versetzt. Nach 24 h wurden die Exosomen geerntet und die AChE-Aktivität gemessen **(A)**. **(B)** Detektion von Flotillin-2 als Exosomenmarker. GAPDH diente als Kontrolle für die behandelten Parenteralzellen (Mehrfach-ANOVA, Bonferroni-Post-Hoc-Test). **(C)** Darstellung der Viabilität der Lymphomzellen nach gleichzeitiger Inkubation mit Exosomen-Synthese-Inhibitoren (zwei Konzentrationen) und Rituximab in Gegenwart von 10%igem aktiven humanen Komplement (Two-way ANOVA, Bonferroni-Post-Hoc-Test). *Abb. übersetzt aus Aung et al., 2011 (mit freundlicher Genehmigung von PNAS).*

3.1.6. Bedeutung von ABCA3 für die Freisetzung von Exosomen

Um die Rolle von ABCA3 bei der Exosomenfreisetzung zu analysieren, wurde ABCA3 durch zwei verschiedene lentivirale Konstrukte (PLKO.1-shRNA.38 und .39) in den drei Lymphomzelllinien Balm-3, SU-DHL-4, OCI-Ly-1 unterdrückt (Abb. 7A). Diese WT bzw. ABCA3-Knock-out-Zelllinien wurden im MTT-Assay eingesetzt. Dabei zeigte sich bei steigenden Konzentrationen von Rituximab mit 10 % aktivem humanen Serum eine signifikante Reduktion der Viabilität bei Abwesenheit von ABCA3 im Vergleich zur Kontrolle. Bei Balm-3 und OCI-Ly-1 zeigt sich ein größerer Viabilitätsabfall als bei SU-DHL-4.

Um die Exosomensekretion von den Zelllinien Balm-3, SU-DHL-4 und OCI-Ly-1, bei denen ABCA3 unterdrückt worden war, und der Kontrolle nachzuweisen, wurden die Überstände der Zellen nach 48 h gesammelt, die Exosomen durch Ultrazentrifugationsschritte aufgearbeitet und die Proteine gemessen. Bei allen drei Zelllinien zeigte sich ein signifikanter Abfall der exosomalen Proteine im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 7B).

Außerdem wurde die Proteinexpression des Exosomenmarkers Flotillin-2 im Western Blot in den drei WT bzw. Knock-out Zellen untersucht (Abb. 7C). Die reduzierte Expression von Flotillin-2 bei vorliegendem Knock-out von ABCA3 bestätigt eine reduzierte Exosomensekretion. Bei Verwendung des Konstrukts 39 (shABCA.39) zeigte sich bei Su-DHL-4 und OCL-Ly-1 ein deutlicher Abfall der Exsomensekretion im Vergleich zu Balm-3. Bei Einsatz des Konstrukts 38 (shABCA.38) ließ sich bei Balm-3 und Su-DHL-4 eine niedrigere Exosomensekretion verglichen mit OCL-Ly-1 nachweisen.

In Abb. 7D/E wurden die Effekte einer Überexpression von ABCA3 bzw. der Expression eines nichtfunktionellen ABCA3-Transporters (Mutation in der ATP-Bindungsstelle N568D) auf die Exosomenbildung im Western Blot mittels Nachweis der Exosomenmarker Flotillin-2 und CD63 dargestellt. Die Überexpression von ABCA3 resultierte in einer vermehrten Exosomenbildung im Überstand der Zelllinien (SU-DHL-4 (Abb. 7D) und OCI-Ly-1 (Abb. 7E)). Jedoch war ein nichtfunktioneller ABCA3 Transporter mit Mutation in der ATP-Bindungsstelle N568D nicht ausreichend, um ähnliche Effekte zu induzieren.

Um die Überexpression von ABCA3 und die damit verbundene erhöhte Exosomensekretion und höhere Resistenz gegenüber Rituximab nachzuweisen, wurde

30

ein MTT-Assay durchgeführt (Abb. 7F). Dabei wurden SU-DHL-4- und OCI-Ly-1-Zellen mit nichtfunktionellem ABCA3-Transporter, überexprimiertem ABCA3 und Kontrollzellen eingesetzt. Bei steigenden Konzentrationen von Rituximab mit 10 % aktivem humanen Serum zeigte sich bei beiden Zelllinien mit überexprimiertem ABCA3 ein besseres Überleben der Zellen im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen (N568D und Kontrolle).

Zusammenfassend zeigten diese Daten, dass der ABCA3-Transporter die Exosomen-Bildung bei B-Zelllymphomen modulierte. Diese Modulation war für die Empfindlichkeit der Lymphomzellen auf den Antikörper Rituximab von Bedeutung und kann eine Möglichkeit zur zusätzlichen pharmakologischen Intervention bieten.



Abb. 7: Bedeutung von ABCA3 für die Freisetzung von Exosomen.

Um die ABCA3-Funktion bei der Exosomen-Freisetzung zu analysieren, wurde ABCA3 mit Hilfe von zwei unabhängigen shABCA3-Konstrukten (PLKO.1-shRNA.38 und .39) ausgeknockt und die forcierte Genexpression mit einem ABCA3-WT-Plasmid und einer nichtfunktionellen Mutante (pABCA3 N568D) untersucht. (A) Darstellung der Viabilität von Lymphomzellen (WT bzw. PLKO.1-shRNA.38 und .39) und Rituximab in Gegenwart von 10% igem aktivem humanen Komplement (Two-way ANOVA, Bonferroni-Post-Hoc-Test). (B) Bestimmung der Proteinmenge der Exosomen von Lymphomzellen (WT bzw. PLKO.1-shRNA.38 und .39) 48 h nach Inkubation (Student's T-Test). (C) Detektion von Flotillin-2 als Exosomenmarker von Lymphomzellen (WT bzw. PLKO.1-shRNA.38 und .39) mittels Western Blot 48 h nach Inkubation (Student's T-Test). (D, E) Detektion von Flotillin-2 bzw. CD63 als Exosomenmarker von Lymphomzellen (SU-DHL-4 [WT, pABCA3wt und Kontrollplasmid pABCA3N568D] und OCI-Ly1 [WT, pABCA3wt und Kontrollplasmid pABCA3N568D]) mittels Western Blot 48 h nach Inkubation. (F) Darstellung der Viabilität von Lymphomzellen (WT, pABCA3wt und Kontrollplasmid pABCA3N568D) und Rituximab in Gegenwart von 10% igem aktivem humanen Komplement (Two-way ANOVA, Bonferroni-Post-Hoc-Test). Abb. übersetzt aus Aung et al., 2011 (mit freundlicher Genehmigung von PNAS).

3.2. Erhöhung der Wirksamkeit der Zytostatika Doxorubicin und Pixantron durch Inhibition des exosomalen Exports (nuclear trapping)

3.2.1 Behandlung mit Indometacin verstärkt den Verbleib von Pixantron / Doxorubicin in den Tumorzellen und verschiebt Pixantron / Doxorubicin aus dem Zytoplasma in den Zellkern.

Um mögliche synergistische Effekte des Cyclooxygenase-Inhibitors Indometacin auf die Zytostatika Doxorubicin und Pixantron beim diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom *in vivo* zu untersuchen, wurde das 3D-in-vivo-CAM-Modell (CAM: Chorionallantoismembran) verwendet. Dazu wurden die Lymphomzellen SU-DHL-4, OCI-Ly1 auf die CAM implantiert und wachsen gelassen. Abb. 8A zeigt das Tumorwachstum von SU-DHL-4-Zellen auf der CAM nach 10 Tagen nach der Implantation. Zur Untersuchung der Effekte von Pixantron auf das Tumorwachstum wurde Pixantron in ein Blutgefäß der CAM intravenös injiziert (Abb. 8B).

Neben Pixantron wurden auch Doxorubicin intravenös injiziert und Indometacin topisch gegeben. Nach Explantation der Tumoren wurden die Effekte dieser Medikamente auf das Tumorwachstum/-gewicht bestimmt (Abb. 8C). Die Kombinationstherapie von Doxorubicin und Indometacin resultierte in einer deutlichen Abnahme des Tumorvolumens im 3D-in-vivo-CAM-Modell im Vergleich zu Doxorubicin alleine.

Die Balkendiagramme in Abb. 9 stellen die Effekte der Behandlung der Tumore mit Doxorubicin bzw. Pixantron in An-/Abwesenheit von Indometacin auf das Tumorgewicht und Tumorwachstum (von SU-DHL-4- bzw. OCI-Ly-1-Zellen) dar. Die Behandlung mit Indometacin alleine zeigte keinen Effekt auf das Tumorwachstum/-gewicht; dagegen wies die Kombinationstherapie von Indometacin mit Doxorubicin bzw. Pixantron eine synergistische Wirkung auf und steigerte die Wirksamkeit, gemessen an der Abnahme der Tumormasse, gegenüber der Monotherapie von Doxorubicin bzw. Pixantron (Abb. 9).

Die Tumore, die im CAM-Modell, aus den SU-DHL-4-Zellen gewachsen waren, wurden 24 h nach Doxorubicin-Behandlung (-/+ Indometacin) mittels konfokaler Fluoreszenz-Mikroskopie analysiert. Bei der Kombination von Doxorubicin mit Indometacin zeigte sich sowohl eine deformierte Architektur der Tumoren als auch eine signifikante Reduktion der Tumorzelldichte. Weiterhin konnte bei der Kombinationstherapie eine verstärkte Retention von Doxorubicin in den Tumorzellen als auch eine erhöhte Akkumulation von

33

Doxorubicin im Zellkern im Vergleich zu Doxorubicin alleine nachgewiesen werden (Abb. 10A/B).

Darüber hinaus wurden die Effekte einer Kombinationstherapie von Pixantron mit Indometacin untersucht (Abb. 11). Wie auch bei der Kombinationstherapie mit Doxorubicin beschrieben, war eine verstärkter Verbleib von Pixantron in den Tumorzellen sichtbar (Abb. 11A). Bei den mit Indometacin vorbehandelten Lymphomen zeigte sich ein signifikant stärkeres Signal von Pixantron im Kern verglichen mit den Zellen mit nur Pixantron (Abb. 11B). Ohne Vorbehandlung mit Indometacin ließ sich im Zytoplasma der Lymphomzellen kaum Pixantron nachweisen. Bei den vorbehandelten Tumoren war jedoch eine deutliche Akkumulation von Doxorubicin und Pixantron im Zytoplasma nachweisbar (Abb. 10B, 11B). Bei den Lymphomzellen ließ sich mittels FACS-Analyse eine signifikante Zunahme der Pixantron-Fluoreszenz bei Indometacinvorbehandelten Lymphomen im Vergleich zu nur Pixantron nachweisen (Abb. 11 C).



Abb. 8: CAM-Model.

 (A) Wachstum von Lymphomzellentumor auf der Chorionallantoismembran am Tag 10 nach Implantation von SU-DHL-4 Zellen. (B) IV-Gabe von Pixantron (blaue Flüssigkeit) im CAM-Model.
(C) Beispiele von Tumoren nach Behandlung mit Doxorubicin (DXR) -/+ Indometacin. Abb. übersetzt aus Koch, Aung et al., 2016 (mit freundlicher Genehmigung des AACR-Verlags).



Abb. 9: Indometacin steigert die Wirksamkeit von Doxorubicin und Pixantron in vivo.

SU-DHL-4- und OCI-Ly1-Lymphomzellen wurden auf einer CAM-Membran ausgesät. Nach sieben Tagen wurden die Lymphomzellen mit 50 ng Doxorubicin oder Pixantron intravenös behandelt. Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit PBS behandelt bzw. mit 1 ml 10 µmol/L Indometacin für 24 h vorbehandelt (Student's T-Test; *, P < 0,05; **, P < 0,01; ***, P < 0,001). Abb. übersetzt aus Koch, Aung et al., 2016 (mit freundlicher Genehmigung des AACR-Verlags).



Abb. 10: Indometacin Behandlung verstärkt sowohl den Verbleib von Doxorubicin im Tumor als auch die medikamentinduzierte Gewebeverformung und verschiebt Doxorubicin (DXR) aus dem Zytoplasma in den Zellkern.

SU-DHL-4 CAM-Tumore wurden 24 h nach Doxorubicin-Behandlung mit oder ohne Indometacin-Vorbehandlung mittels konfokaler Mikroskopie analysiert, wobei DXR mittels Fluoreszenz nach Anregung bei 560 nm mit DAPI-Kofärbung dargestellt wurde. Doxorubicin-Behandlung führte zu einer Deformation des Lymphomgewebes, wobei diese nach Indometacin-Behandlung signifikant verstärkt war (offene Pfeilspitzen in **A**). Indometacin-Vorbehandlung ging mit einer verstärkten DXR-Retention in den Tumorzellen einher (**A**) und mit einer Verschiebung der Doxorubicin-Fluoreszenz aus dem Zytoplasma in den Zellkern (**B**). *Abb. übersetzt aus Koch, Aung et al., 2016* (*mit freundlicher Genehmigung des AACR-Verlags*).



Abb. 11: Indometacin Behandlung verstärkt den zellulären Verbleib von Pixantron im Tumor und verschiebt Pixantron aus dem Zytoplasma in den Zellkern.

SU-DHL-4-CAM-Tumore wurden 24 h nach Pixantron-Behandlung mit oder ohne Indometacin Vorbehandlung mittels konfokaler Mikroskopie analysiert, wobei DXR mittels Fluoreszenz nach Anregung bei 650 nm mit DAPI-Kofärbung dargestellt wurde. Pixantron-Vorbehandlung ging mit einer verstärkten DXR-Retention in den Tumorzellen einher (A) und mit einer Verschiebung der Doxorubicin-Fluoreszenz aus dem Zytoplasma in den Zellkern (B; Pfeilspitzen deuten die entsprechenden Stellen an). Lymphomgewebe der SU-DHL-4- und der OCI-Ly1-Zellen wurde entnommen, mit anti-hCD20-FITC gefärbt und der Mittelwert des Fluoreszenzsignals mittels CD20-positiven Zellen im FACS bei 670 nm quantifiziert. (C) PBS: Kontrolle mit PBS; I: Kontrolle mit 1 ml 10 μ mol/l Indometacin; P: 50 μ g Pixantron; IbP: 1 ml 10 μ mol/l Indometacin und 50 μ g Pixantron; SU-DHL-4 n=6; OCI-Ly1 n=4; *, P < 0,05; ***, P < 0,001; Mehrfach-ANOVA, Bonferroni-Post-Hoc-Test). Abb. übersetzt aus Koch, Aung et al., 2016 (mit freundlicher Genehmigung des AACR-Verlags).

4. Diskussion

4.1. Die Bedeutung von Exosomen für die intrinsische Zytostatikaresistenz von aggressiven B-Zell-Lymphomen

Die beschriebenen Ergebnisse belegen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Sekretion von Exosomen von B-Zell-Lymphomzellen, die Expression von CD20 auf den Exosomen, den Schutz der Lymphomzellen vor Rituximab-vermittelter CDC und die regulatorische Rolle der intrazellulären ABC-Transporter A3 für die Exosomen-Sekretion. Diese Befunde sind sowohl von klinischer als auch immunpathologischer Relevanz.

Zunächst zeigen die hier aufgeführten Daten, dass CD20 in die Membran der Exosomen eingebettet ist und den Antikörper Rituximab binden kann (Abb. 2, 3, 4). Eine solche Epitop-spezifische Bindung des Anti-CD20-Antikörpers außerhalb der Plasmamembran war neu, da weder das Transmembranprotein CD20 noch die antigenen Anteile des CD20-Proteins als freie Moleküle zirkulieren (Anderson et al. 1984; Einfeld et al. 1988). Die bisher genutzten Testsysteme für die Pharmakokinetik von Rituximab verwenden den anti-idiotypischen Antikörper MB2A4, der sowohl löslichen als auch - wie erstmalig hier gezeigt – an Exosomen-gebundenen Antikörper erkennt (Abb. 2). Rituximab, das an Exosomen gebunden ist, steht für einen "Angriff" des therapeutischen Antikörpers an der Plasmamembran der Lymphomzelle nicht zur Verfügung (Abb. 3A). Die Verfügbarkeit von zytotoxischen Antikörpern wird damit in Situationen, in denen eine große Menge an Tumor oder Tumorexosomen vorliegen, d.h. zu Beginn der Therapie, auf eine geringe Menge begrenzt, da Rituximab "abgefangen" wird. Diese Ergebnisse korrelieren mit der klinischen Beobachtung, dass zu Beginn der Rituximab-Therapie eine hohe Antikörper-Dosis benötigt wird, um effiziente Plasma-Level zu erreichen (Reiser et al. 2006). Dabei trägt die Absorption des Rituximabs an die zirkulierenden Exosomen zu dieser initialen Abnahme bei. Somit stellt exosomales CD20 ein Target für Rituximab dar, indem es die Anzahl der Antikörper-Moleküle, welche die Tumorzelle tatsächlich erreichen, reduziert (Abb. 3, 4).

Die Ergebnisse zeigen weiterhin, dass Rituximab, das an Exosomen gebunden ist, Komplement *in vitro* und *in vivo* bindet und, dass der Komplementverbrauch die Wirksamkeit der Rituximab-vermittelten CDC abschwächt (Abb. 3, 4). Der Verbrauch von Komplement findet in der Zirkulation und im Gewebe statt. Jedoch ist der lokale Verbrauch von Komplement im Tumormikromilieu vermutlich *in vivo* von größerer Bedeutung, besonders in der Nähe von Blutgefäßen innerhalb des Tumors, wo das

4. Diskussion

Verhältnis von Antikörper und Komplement ein Optimum zur Fixierung und Zelllyse erreicht (Press et al. 1987). Berücksichtigt man die Anreichung der Exosomen im Interstitium, könnte der Komplement-Verbrauch in den Exosomen zum Schutz der Tumorzellen, besonders in der Nähe der Blutgefäße, beitragen. Exosomen von Lymphomzellen wiesen eine große Menge an CRPs auf (Abb. 2). Dieser Befund wurde auch für Exosomen von normalen B-Zellen und von Antigen-präsentierenden Zellen (Clayton et al. 2003; Hakulinen et al. 2004) beschrieben. Außerdem zeigen die hier aufgeführten Ergebnisse, dass der Angriff des Antikörpers die Sekretion der Exosomen bei Konzentrationen (22 und 325 pM) verstärkt, die nicht ausreichend waren, um Apoptose in unseren Zelllinien zu induzieren (Abb. 5). Dabei weisen die in Abb. 5E gezeigten TIRF-Aufnahmen darauf hin, dass die Vesikelbildung direkt an der Plasmamembran zur Exosomenbildung beiträgt. Durch diese Dynamik in der Exosomenbildung stellen die protektiven Effekte der Exosomen aus den Lymphomzellen Tumorzellen als sowohl eine konstitutive Eigenschaft der auch einen Resistenzmechanismus dar, der als adaptive Antwort auf den CDC-assoziierten zellulären Stress angeschaltet wird. Interessanterweise zeigen in diesem Zusammenhang Ergebnisse aus den Arbeitsgruppen um Hu et al. und You et al., dass eine Rituximab-Therapie durch die gleichzeitige Gabe eines Inhibitors von CD59 oder des Anti-Complement Factors H verstärkt werden kann. CD59 inhibiert die Bildung des Membran-attackierenden-Komplexes im terminalen Komplementweg, der u.a. zur Lyse von Zellen führt. Anti-Complement Factor H (CFH) ist ein negativer Regulator des Komplementsystems (Hu et al. 2011, You et al. 2011, Winkler et al. 2017).

Die hier gezeigten Daten weisen auf eine kritische Bedeutung des ABC-Transporters A3 in der Biogenese von Exosomen hin (Abb. 6, 7). ABCA3 ist ein intrazellulärer Lipidtransporter, der für die Bildung von Surfactant entscheidend ist (Matsumura et al. 2007; Mulugeta et al. 2002; Wenzel et al. 2007; Yamano et al. 2001). In Mausmodellen, bei denen ABCA3 ausgeschaltet wurde, weisen die Pneumozyten der heterozygoten Tiere weniger Lamellenkörperchen auf und zeigten eine verringerte Aufnahme von markierten Substraten in die neu synthetisierten Phospholipide (Ban et al. 2007; Cheong et al. 2007). Das Sortieren von Membranlipiden ist essentiell für die MVB Biogenese und die Exosomen-Sekretion (Strauss et al. 2010). Da Mitglieder der Gruppe A der ABC-Transporter meistens mit Lysosomen-bezogenen Organellen (LROs) (Wenzel et al. 2007) assoziiert sind, kann angenommen werden, dass sie die Exosomen-Biogenese modulieren können. Es war gezeigt worden, dass Leukämie-Zellen ABCA3 exprimieren und, dass die Expression des Transporters mit einer verringerten Empfindlichkeit gegenüber Zytostatika-Therapie einhergeht (Abb. 7) (Chapuy et al. 2008; Chapuy et al.

39

2009; Efferth et al. 2006; Steinbach et al. 2006). ABCA3 schützt so Tumorzellen vor den Zytostatika (Vincristin, Anthrazykline, Etopside), die bei Lymphomtherapien verabreicht werden (Chapuy et al. 2008).

Das klassische Konzept der ABC-Transporter-vermittelten Resistenz gegenüber Medikamenten beschreibt den Transport von zytotoxischen Substraten über die äußere Plasmamembran (Gottesman und Pastan 1993; Hedley et al. 1997). Die hier gezeigten Beobachtungen dokumentieren, dass ABC-Transporter-Funktionen die Zellstruktur und den Zellmetabolismus beeinflussen können und, dass derartige Modulationen einen signifikanten Mechanismus der Resistenz gegenüber Medikamenten erklären können (Abb. 7). Die ABCA3-Expression wurde in einer Vielzahl an Tumor-Entitäten beschrieben, sodass anzunehmen ist, dass dieser Resistenzmechanismus über Leukämie und Lymphome hinaus von Bedeutung ist (Chapuy et al. 2008; Chapuy et al. 2009; Hirschmann-Jax et al. 2004; Schimanski et al. 2010; Song et al. 2008; Steinbach et al. 2006; Yang et al. 2010; Yasui et al. 2004).

An dieser Stelle soll betont werden. dass Inhibitoren der Exosomen-Biogenese/Sekretion die zytotoxischen Effekte der Anti-CD20-Antikörper im in-vitro-Testsystem verstärkt haben (Abb. 6C). Der bekannte Hemmmechanismus der verwendeten Substanzen weist jedoch deutliche Unterschiede auf. So wurde z. B. bereits ein Synergismus für die Inhibition der MVB-Biogenese durch Rapamycin mit der Anti-CD20-Antikörper-vermittelten Lyse beschrieben (Wanner et al. 2006). Bei Indometacin läuft der zentrale Mechanismus der Hemmung der Exosomen-Sekretion über die Herunterregulation der ABCA3-Expression auf Transkriptionslevel (Song et al. 2008). Sowohl in klinischen als auch in präklinischen Modelsystemen wurde gezeigt, dass Indometacin vor Krebs schützt (Hull et al. 2003).

Die dargestellten Untersuchungen haben auf die Antikörper-Bindung und den Komplement-Verbrauch fokussiert. Da die anderen Effektor-Mechanismen des Rituximabs, z. B. Induktion der Apoptose und ADCC, auch von der Plasmamembran-Bindung von Rituximab abhängen, kann extrapoliert werden, dass solche zytotoxischen Mechanismen durch CD20-positive Exosomen gestört werden könnten (Johnson et al. 2009).

4.2. Erhöhung der Wirksamkeit der Zytostatika von Doxorubicin und Pixantron durch Inhibition des exosomalen Exports im 3D-in-vivo-Tumor-Modell

Bei der Therapie von aggressiven B-Zell Lymphomen wird Chemotherapie nach dem R-CHOP-Schema eingesetzt. Dabei steht das H in diesem Akronym für Doxorubicin als wesentlicher Bestandteile der R-CHOP Therapie (McKelvey et al. 1976). Basierend auf den Ergebnissen, dass Exosomeninhibitoren wie Indometacin eine Steigerung des Therapieeffekts von Rituximab hervorrufen können, wurde die Hypothese adressiert, dass Indometacin mittels Exosomeninhibition zu einer höheren Effektivität des Anthrazyklins führen könnte.

Es war in Vorarbeiten gezeigt worden, dass in den zellulären Stoffwechseln von Zytostatika Mikrovesikel eine wichtige Rolle spielen: zunächst kommt es zu einer Anreicherung des Medikaments in den Zellen. Anschließend können Mikrovesikel zu dem Abtransport der chemotherapeutischen Substanz aus den Tumorzellen beitragen. Diese Mechanismen des "Drug-Efflux" können bei Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika eine Rolle spielen (Shedden et al., 2003). Beim "Drug-Efflux" spielen die ABC-Transporter eine entscheidende Rolle, da diese Anthrazykline über die Plasmamembran in den Extrazellulärraum transportieren (Chapuy et al. 2008; Gottesman et al. 2002). So konnte Chapuy et al. zeigen, dass das Gesamt-Überleben von Patienten mit Akuter Myeloischer Leukämie mit der Expression von ABCA3 korrelierte und dass eine hohe Expression von ABCA3 mit einer schlechten Prognose einherging (Chapuy et al. 2008). Indometacin führt zu einer Inhibition von ABCA3 (Song et al. 2008), wodurch wie Anzahl an Exosomen reduziert wird (Abb. 6, 7). Folglich verbleiben Doxorubicin und Pixantron vermehrt in den Tumorzellen (Abb. 10, 11). Die mit Indometacin führt zu einem Vorbehandlung erhöhten Verbleib von Chemotherapeutika in den Zellkernen der Tumorzellen (Abb. 10B, 11B), wo die Chemotherapeutika ihre Effekte über zytolytische DNA-Schäden erzeugen (Adnan et al. 2010). Somit unterscheidet sich Indometacin von den bisher beschriebenen Inhibitoren der ABC-Transporter: Es greift nicht an einer Transporterfunktion direkt an, sondern erhöht die zytotoxische Wirkung des Chemotherapeutikums durch Modulation der Exosomensekretion.

Das 3D-in-vivo-CAM-Modell wurde eingesetzt, um mögliche synergistische Effekte von Indometacin auf Doxorubicin und Pixantron bei DLBCL *in vivo* zu untersuchen. In diesem Modell ist die Vorhersage der Pixantron/Indometacin-Toxizität in Bezug auf eine Behandlung beim Menschen limitiert. Jedoch lag die Konzentration von Indometacin in

4. Diskussion

unserer Versuchsreihe (0,075 µg/ml) weit unter den Plasma-Konzentrationen (1,14 ± 0.58 µg/ml), die durch eine Einzeldosis von 50 mg Indometacin beim Patienten erreicht werden (Seideman und Melander 1988). Somit lässt sich die Indometacin-Dosis in Kombination mit Doxorubicin und Pixantron vom CAM-Modell in die Klinik übertragen.

Die Kombination von COX-Inhibition und Chemotherapie wurde bei Patienten mit nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom mit vielversprechenden Ergebnissen eingesetzt, bisher jedoch nur mit Taxanen und Platinderivaten in der Chemotherapie (Altorki et al. 2003). Die Kombination von Anthrazyklinen und COX-Inhibitoren wurden bisher weder in klinischen Studien noch in retrospektiven Studien untersucht. Da die Anthrazykline kardiotoxisch wirken, wäre es nach den Ergebnissen dieser Arbeit relevant, Anthrazykline mit geringer Kardiotoxizität wie Pixantron mit Indometacin zu kombinieren, um die kardiotoxischen Nebenwirkungen zu minimieren.

Zusammenfassend weisen die hier gezeigten Experimente die Exosomen-Sekretion aus Zellen aggressiver Lymphome nach, moduliert über ABCA3 (Abb. 12). Dies führt zur Exosomen-vermittelten Abschirmung der Zielzellen, was einen kritischen Faktor der Empfindlichkeit der Tumorzellen gegenüber der Antikörper-Therapie darstellt. Die Inhibition der ABCA3-Transporter führt zu verminderter Exosomenbildung, wodurch sich die Effektivität von Rituximab, Pixantron und Doxorubicin steigerte.



Abb. 12: Übersicht der Interaktion zwischen DLBCL-Zellen, Exosomen, ABCA3 und Rituximab

5. Zusammenfassung

In Therapie malignen B-Zell Lymphomen der von ist die humorale Immunochemotherapie mit Anthrazyklin-basierter Chemotherapie und mit monoklonalen Antikörpern gegen das Differenzierungsantigen CD20 die Basis der Primärtherapie. Die hier vorgelegte Doktorarbeit fasst Ergebnisse zusammen, die zeigen, dass aus Lymphomzellen gebildete Exosomen Anti-CD20-Antikörper binden, Komplementfaktoren aufbrauchen und somit die malignen Tumorzellen vor Komplementattacken schützen können. Weitere Versuche unter Anwendung des CAMin-vivo-Modells zeigten zudem, dass die zytostatische Aktivität von Chemotherapeutika vom Typ der Anthrazykline mit Modulatoren der zytoplasmatischen Sequestration gesteigert wurde. Durch die Verwendung der Substanzen Rapamycin, Indometacin und U18666A, die mit der Sekretion von Exosomen interagieren, wurde in Zelllinienmodellen eine Inhibition der exosomenbasierten Resistenzmechanismen gegen humorale Immunochemotherapie bei aggressiven Lymphomen gezeigt.

Mittels differentieller Ultrazentrifugation wurden eine Methode optimiert, mit der Exosomen aus dem Überstand von Lymphomzellenkulturen angereichert wurden. Die Exosomen der Lymphomzelllinien waren durch die Expression der Exosomenmarker CD63, Flotillin-2 und Alix gekennzeichnet. Weiterhin wurde auf den Exosomen das Antigen CD20 nachgewiesen, sowie die Komplement-regulierenden Proteine CD46, CD55 und CD59. Es wurde funktionell gezeigt, dass durch die Komplementregulierenden Proteine die Komplementattacke begrenzt, Komplementfaktoren verbraucht und damit die zytolytische Effektivität des Anti-CD20-Antikörpers Rituximab reduziert wurde. Basierend auf der Bedeutung des ABC-Transporters A3 für die Exosomensekretion wurde die Bedeutung von ABCA3 Inhibitoren wie Rapamycin, Indometacin und U18666A auf die Exosomensekretion überprüft. Inhibitoren von ABCA3 reduzierten die Exososomensekretion und verstärkten den zytolytischen Effekt des Anti-CD2-0 Antikörpers Rituximab. Weiterhin verminderte eine genetische Suppression der ABCA3-Expression mittels spezifischer shRNA-Konstrukte die Exosomenbiogenese und erhöhte die CDC-Aktivität des Antikörpers Rituximab. Umgekehrt verminderte eine verstärkte Exosomenbiogenese die spezifische CDC-Aktivität des Antikörpers. Weiterhin wurde gezeigt, dass durch die Hemmung der Exosomensekretion mittels Indometacin auch die Sekretion von Anthrazyklinen aus der Zelle vermindert, und damit die Retention der Zytostatika im Kern erhöht wurde.

6. Literaturverzeichnis

Adnan N, Buck DP, Evison BJ, Cutts SM, Phillips DR, Collins JG (2010): DNA binding by pixantrone. Org Biomol Chem <u>8</u>, 5359-5366

Altorki NK, Keresztes RS, Port JL, Libby DM, Korst RJ, Flieder DB, Ferrara CA, Yankelevitz DF, Subbaramaiah K, Pasmantier MW, et al. (2003): Celecoxib, a selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor, enhances the response to preoperative paclitaxel and carboplatin in early-stage non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol <u>21</u>, 2645-2650

Anderson KC, Bates MP, Slaughenhoupt BL, Pinkus GS, Schlossman SF, Nadler LM (1984): Expression of human B cell-associated antigens on leukemias and lymphomas: a model of human B cell differentiation. Blood <u>63</u>, 1424-1433

Andreola G, Rivoltini L, Castelli C, Huber V, Perego P, Deho P, Squarcina P, Accornero P, Lozupone F, Lugini L, et al. (2002): Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. J Exp Med <u>195</u>, 1303-1316

Aung T, Chapuy B, Vogel D, Wenzel D, Oppermann M, Lahmann M, Weinhage T, Menck K, Hupfeld T, Koch R, et al. (2011): Exosomal evasion of humoral immunotherapy in aggressive B-cell lymphoma modulated by ATP-binding cassette transporter A3. Proc Natl Acad Sci USA <u>108</u>, 15336-15341

Ban N, Matsumura Y, Sakai H, Takanezawa Y, Sasaki M, Arai H, Inagaki N (2007): ABCA3 as a lipid transporter in pulmonary surfactant biogenesis. J Biol Chem <u>282</u>, 9628-9634

Beham-Schmid C (2017): Aggressive lymphoma 2016: revision of the WHO classification. Memo <u>10</u>, 248-254

Bobrie A, Krumeich S, Reyal F, Recchi C, Moita LF, Seabra MC, Ostrowski M, Thery C (2012): Rab27a supports exosome-dependent and -independent mechanisms that modify the tumor microenvironment and can promote tumor progression. Cancer Res 72, 4920-4930

Chalmin F, Ladoire S, Mignot G, Vincent J, Bruchard M, Remy-Martin JP, Boireau W, Rouleau A, Simon B, Lanneau D, et al. (2010): Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells. J Clin Invest 120, 457-471

Chapuy B, Koch R, Radunski U, Corsham S, Cheong N, Inagaki N, Ban N, Wenzel D, Reinhardt D, Zapf A, et al. (2008): Intracellular ABC transporter A3 confers multidrug resistance in leukemia cells by lysosomal drug sequestration. Leukemia <u>22</u>, 1576-1586

Chapuy B, Panse M, Radunski U, Koch R, Wenzel D, Inagaki N, Haase D, Truemper L, Wulf GG (2009): ABC transporter A3 facilitates lysosomal sequestration of imatinib and modulates susceptibility of chronic myeloid leukemia cell lines to this drug. Haematologica <u>94</u>, 1528-1536

Cheong N, Zhang H, Madesh M, Zhao M, Yu K, Dodia C, Fisher AB, Savani RC, Shuman H (2007): ABCA3 is critical for lamellar body biogenesis in vivo. J Biol Chem <u>282</u>, 23811-23817

Clayton A, Harris CL, Court J, Mason MD, Morgan BP (2003): Antigen-presenting cell exosomes are protected from complement-mediated lysis by expression of CD55 and CD59. Eur J Immunol <u>33</u>, 522-531

Coiffier B, Lepage E, Briere J, Herbrecht R, Tilly H, Bouabdallah R, Morel P, Van Den Neste E, Salles G, Gaulard P, et al. (2002): CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. N Engl J Med <u>346</u>, 235-242

Colombo M, Raposo G, Thery C (2014): Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. Annu Rev Cell Dev Biol <u>30</u>, 255-289

Cragg MS, Bayne MB, Tutt AL, French RR, Beers S, Glennie MJ, Illidge TM (2004): A new anti-idiotype antibody capable of binding rituximab on the surface of lymphoma cells. Blood <u>104</u>, 2540-2542

Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R (2001): The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. Genome Res <u>11</u>, 1156-1166

Efferth T, Gillet JP, Sauerbrey A, Zintl F, Bertholet V, de Longueville F, Remacle J, Steinbach D (2006): Expression profiling of ATP-binding cassette transporters in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. Mol Cancer Ther <u>5</u>, 1986-1994

Einfeld DA, Brown JP, Valentine MA, Clark EA, Ledbetter JA (1988): Molecular cloning of the human B cell CD20 receptor predicts a hydrophobic protein with multiple transmembrane domains. Embo J <u>7</u>, 711-717

Fader CM, Sanchez D, Furlan M, Colombo MI (2008): Induction of autophagy promotes fusion of multivesicular bodies with autophagic vacuoles in k562 cells. Traffic <u>9</u>, 230-250

Gisselbrecht C (2008): Use of rituximab in diffuse large B-cell lymphoma in the salvage setting. Br J Haematol <u>143</u>, 607-621

Glass B, Dohm AJ, Truemper LH, Pfreundschuh M, Bleckmann A, Wulf GG, Rosenwald A, Ziepert M, Schmitz N, German High-grade Lymphoma Study G (2017): Refractory or relapsed aggressive B-cell lymphoma failing (R)-CHOP: an analysis of patients treated on the RICOVER-60 trial. Ann Oncol 28, 3058-3064

Gottesman MM, Pastan I (1993): Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. Annu Rev Biochem <u>62,</u>385-427

Gottesman MM, Fojo T, Bates SE (2002): Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. Nat Rev Cancer <u>2</u>, 48-58.

Grimm KE, O'Malley DP (2019): Aggressive B cell lymphomas in the 2017 revised WHO classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues. Ann Diagn Pathol <u>38</u>, 6-10

Hakulinen J, Junnikkala S, Sorsa T, Meri S (2004): Complement inhibitor membrane cofactor protein (MCP; CD46) is constitutively shed from cancer cell membranes in vesicles and converted by a metalloproteinase to a functionally active soluble form. Eur J Immunol <u>34</u>, 2620-2629

Hallman M (2004): Lung surfactant, respiratory failure, and genes. N Engl J Med <u>350</u>, 1278-1280

Hampson G, Ward TH, Cummings J, Bayne M, Tutt AL, Cragg MS, Dive C, Illidge TM (2010): Validation of an ELISA for the determination of rituximab pharmacokinetics in clinical trials subjects. J Immunol Methods <u>360</u>, 30-38

Hedley DW, Xie SX, Minden MD, Choi CH, Chen H, Ling V (1997): A novel energy dependent mechanism reducing daunorubicin accumulation in acute myeloid leukemia. Leukemia <u>11</u>, 48-53

Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, Nuchtern JG, Jax TW, Gobel U, Goodell MA, Brenner MK (2004): A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. Proc Natl Acad Sci U S A. <u>101</u>, 14228-14233

Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, Goodell MA, Brenner MK (2005): A distinct "side population" of cells in human tumor cells: implications for tumor biology and therapy. Cell Cycle <u>4</u>, 203-205

Hu W, Ge X, You T, Xu T, Zhang J, Wu G, Peng Z, Chorev M, Aktas BH, Halperin JA, et al. (2011): Human CD59 inhibitor sensitizes rituximab-resistant lymphoma cells to complement-mediated cytolysis. Cancer Res 71, 2298-2307

Hull MA, Gardner SH, Hawcroft G (2003): Activity of the non-steroidal antiinflammatory drug indomethacin against colorectal cancer. Cancer Treat Rev <u>29</u>, 309-320

Johnson NA, Boyle M, Bashashati A, Leach S, Brooks-Wilson A, Sehn LH, Chhanabhai M, Brinkman RR, Connors JM, Weng AP, et al. (2009): Diffuse large B-cell lymphoma: reduced CD20 expression is associated with an inferior survival. Blood <u>113</u>, 3773-3780

Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C (1987): Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). J Biol Chem <u>262</u>, 9412-9420

Kaminski WE, Piehler A, Wenzel JJ (2006): ABC A-subfamily transporters: structure, function and disease. Biochim Biophys Acta <u>1762</u>, 510-524

Keating GM (2010): Rituximab: a review of its use in chronic lymphocytic leukaemia, low-grade or follicular lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma. Drugs <u>70</u>, 1445-1476

Klugbauer N, Hofmann F (1996): Primary structure of a novel ABC transporter with a chromosomal localization on the band encoding the multidrug resistance-associated protein. FEBS Lett <u>391</u>, 61-65

Koch R, Aung T, Vogel D, Chapuy B, Wenzel D, Becker S, Sinzig U, Venkataramani V, von Mach T, Jacob R, et al. (2016): Nuclear Trapping through Inhibition of Exosomal Export by Indomethacin Increases Cytostatic Efficacy of Doxorubicin and Pixantrone. Clin Cancer Res <u>22</u>, 395-404

Latour S, Zanese M, Le Morvan V, Vacher AM, Menard N, Bijou F, Durrieu F, Soubeyran P, Savina A, Vacher P, et al. (2019): Role of Calcium Signaling in GA101-Induced Cell Death in Malignant Human B Cells. Cancers (Basel) 11

Liu C, Yu S, Zinn K, Wang J, Zhang L, Jia Y, Kappes JC, Barnes S, Kimberly RP, Grizzle WE, et al. (2006): Murine mammary carcinoma exosomes promote tumor growth by suppression of NK cell function. J Immunol <u>176</u>, 1375-1385

Maloney DG, Liles TM, Czerwinski DK, Waldichuk C, Rosenberg J, Grillo-Lopez A, Levy R (1994): Phase I clinical trial using escalating single-dose infusion of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8) in patients with recurrent B-cell lymphoma. Blood <u>84</u>, 2457-2466

Manches O, Lui G, Chaperot L, Gressin R, Molens JP, Jacob MC, Sotto JJ, Leroux D, Bensa JC, Plumas J (2003): In vitro mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas. Blood <u>101</u>, 949-954

Matsumura Y, Sakai H, Sasaki M, Ban N, Inagaki N (2007): ABCA3-mediated choline-phospholipids uptake into intracellular vesicles in A549 cells. FEBS Lett 581, 3139-3144

McKelvey EM, Gottlieb JA, Wilson HE, Haut A, Talley RW, Stephens R, Lane M, Gamble JF, Jones SE, Grozea PN, et al. (1976): Hydroxyldaunomycin (Adriamycin) combination chemotherapy in malignant lymphoma. Cancer <u>38</u>, 1484-1493

McLaughlin P (1999): Treatment of follicular and other indolent lymphomas. Curr Opin Oncol <u>11</u>, 333-338

Mulugeta S, Gray JM, Notarfrancesco KL, Gonzales LW, Koval M, Feinstein SI, Ballard PL, Fisher AB, Shuman H (2002): Identification of LBM180, a lamellar body limiting membrane protein of alveolar type II cells, as the ABC transporter protein ABCA3. J Biol Chem. <u>277</u>, 22147-221558

Norwood K, Wang RY, Hirschmann-Jax C, Andreeff M, Brenner MK, Goodell MA, Wulf GG (2004): An in vivo propagated human acute myeloid leukemia expressing ABCA3. Leuk Res <u>28</u>, 295-299

Osaki M, Okada F (2019): Exosomes and Their Role in Cancer Progression. Yonago Acta Med 62, 182-190

Pan BT, Johnstone RM (1983): Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. Cell <u>33</u>, 967-978

Papadatos-Pastos D, Pettengell R (2013): Pixantrone: merging safety with efficacy. Expert Rev Hematol <u>6</u>, 25-33

Papoutsi M, Kurz H, Schachtele C, Marme D, Christ B, Prols F, Wilting J (2000): Induction of the blood-brain barrier marker neurothelin/HT7 in endothelial cells by a variety of tumors in chick embryos. Histochem Cell Biol <u>113</u>, 105-113

Pettengell R, Coiffier B, Narayanan G, de Mendoza FH, Digumarti R, Gomez H, Zinzani PL, Schiller G, Rizzieri D, Boland G, et al. (2012): Pixantrone dimaleate versus other chemotherapeutic agents as a single-agent salvage treatment in patients with relapsed or refractory aggressive non-Hodgkin lymphoma: a phase 3, multicentre, open-label, randomised trial. Lancet Oncol <u>13</u>, 696-706

Peinado H, Aleckovic M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, Hergueta-Redondo M, Williams C, Garcia-Santos G, Ghajar C, et al. (2012): Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a prometastatic phenotype through MET. Nat Med 18, 883-891

Pfreundschuh M, Poeschel V, Zeynalova S, Hanel M, Held G, Schmitz N, Viardot A, Dreyling MH, Hallek M, Mueller C, et al. (2014): Optimization of rituximab for the treatment of diffuse large B-cell lymphoma (II): extended rituximab exposure time in the SMARTE-R-CHOP-14 trial of the german high-grade non-Hodgkin lymphoma study group. J Clin Oncol 32, 4127-4133

Press OW, Appelbaum F, Ledbetter JA, Martin PJ, Zarling J, Kidd P, Thomas ED (1987): Monoclonal antibody 1F5 (anti-CD20) serotherapy of human B cell lymphomas. Blood <u>69</u>, 584-591

Raposo G, Marks MS (2007): Melanosomes--dark organelles enlighten endosomal membrane transport. Nat Rev Mol Cell Biol <u>8</u>, 786-797

Reiser M, Wenger MK, Nickenig C, Peter N, Kuhn C, Metzner B, Theisohn M, Pfreundschuh M (2006): Serum Levels and Pharmacokinetic of Rituximab in Bi-Weekly R-CHOP in Elderly Patients with DLBCL Treated in the RICOVER-60 Trial. Blood <u>108</u>, 2748

Safaei R, Larson BJ, Cheng TC, Gibson MA, Otani S, Naerdemann W, Howell SB (2005): Abnormal lysosomal trafficking and enhanced exosomal export of cisplatin in drug-resistant human ovarian carcinoma cells. Mol Cancer Ther <u>4</u>, 1595-1604

Savina A, Fader CM, Damiani MT, Colombo MI (2005): Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner. Traffic <u>6</u>, 131-143

Schimanski S, Wild PJ, Treeck O, Horn F, Sigruener A, Rudolph C, Blaszyk H, Klinkhammer-Schalke M, Ortmann O, Hartmann A, et al. (2010): Expression of the lipid transporters ABCA3 and ABCA1 is diminished in human breast cancer tissue. Horm Metab Res <u>42</u>, 102-109

Seideman P, Melander A (1988): Equianalgesic effects of paracetamol and indomethacin in rheumatoid arthritis. Br J Rheumatol <u>27</u>, 117-122

Shipp MA, Neuberg D, Janicek M, Canellos GP, Shulman LN (1995): High-dose CHOP as initial therapy for patients with poor-prognosis aggressive non-Hodgkin's lymphoma: a dose-finding pilot study. J Clin Oncol <u>13</u>, 2916-2923

Song JH, Kim SH, Kim HJ, Hwang SY, Kim TS (2008): Alleviation of the drugresistant phenotype in idarubicin and cytosine arabinoside double-resistant acute myeloid leukemia cells by indomethacin. Int J Oncol <u>32</u>, 931-936

Steinbach D, Gillet JP, Sauerbrey A, Gruhn B, Dawczynski K, Bertholet V, de Longueville F, Zintl F, Remacle J, Efferth T (2006): ABCA3 as a possible cause of drug resistance in childhood acute myeloid leukemia. Clin Cancer Res <u>12</u>, 4357-4363

Stoorvogel W, Kleijmeer MJ, Geuze HJ, Raposo G (2002): The biogenesis and functions of exosomes. Traffic <u>3</u>, 321-330

Strauss K, Goebel C, Runz H, Mobius W, Weiss S, Feussner I, Simons M, Schneider A (2010): Exosome secretion ameliorates lysosomal storage of cholesterol in Niemann-Pick type C disease. J Biol Chem <u>285</u>, 26279-26288

Testa JS, Apcher GS, Comber JD, Eisenlohr LC (2010): Exosome-driven antigen transfer for MHC class II presentation facilitated by the receptor binding activity of influenza hemagglutinin. J Immunol <u>185</u>, 6608-6616

Thery C, Zitvogel L, Amigorena S (2002): Exosomes: composition, biogenesis and function. Nat Rev Immunol <u>2</u>, 569-579

Tobinai K, Klein C, Oya N, Fingerle-Rowson G (2017): A Review of Obinutuzumab (GA101), a Novel Type II Anti-CD20 Monoclonal Antibody, for the Treatment of Patients with B-Cell Malignancies. Adv Ther 34, 324-356

Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO (2007): Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. Nat Cell Biol <u>9</u>, 654-659

Wanner K, Hipp S, Oelsner M, Ringshausen I, Bogner C, Peschel C, Decker T (2006): Mammalian target of rapamycin inhibition induces cell cycle arrest in diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) cells and sensitises DLBCL cells to rituximab. Br J Haematol <u>134</u>, 475-484

Wenzel JJ, Piehler A, Kaminski WE (2007): ABC A-subclass proteins: gatekeepers of cellular phospho- and sphingolipid transport. Front Biosci <u>12</u>, 3177-3193

Whiteside TL (2017): The effect of tumor-derived exosomes on immune regulation and cancer immunotherapy. Future Oncol 13, 2583-2592

Winkler MT, Bushey RT, Gottlin EB, Campa MJ, Guadalupe ES, Volkheimer AD, Weinberg JB, Patz EF, Jr. (2017): Enhanced CDC of B cell chronic lymphocytic leukemia cells mediated by rituximab combined with a novel anti-complement factor H antibody. PLoS One 12, e0179841

Wulf GG, Wang RY, Kuehnle I, Weidner D, Marini F, Brenner MK, Andreeff M, Goodell MA (2001): A leukemic stem cell with intrinsic drug efflux capacity in acute myeloid leukemia. Blood <u>98</u>, 1166-1173

Yamano G, Funahashi H, Kawanami O, Zhao LX, Ban N, Uchida Y, Morohoshi T, Ogawa J, Shioda S, Inagaki N (2001): ABCA3 is a lamellar body membrane protein in human lung alveolar type II cells. FEBS Lett <u>508</u>, 221-225

Yang X, Liu Y, Zong Z, Tian D (2010): The Rho kinase inhibitor fasudil inhibits the migratory behaviour of 95-D lung carcinoma cells. Biomed Pharmacother <u>64</u>, 58-62

Yasui K, Mihara S, Zhao C, Okamoto H, Saito-Ohara F, Tomida A, Funato T, Yokomizo A, Naito S, Imoto I, et al. (2004): Alteration in copy numbers of genes as a mechanism for acquired drug resistance. Cancer Res <u>64</u>, 1403-1410

Yoshioka Y, Kosaka N, Konishi Y, Ohta H, Okamoto H, Sonoda H, Nonaka R, Yamamoto H, Ishii H, Mori M, et al. (2014): Ultra-sensitive liquid biopsy of circulating extracellular vesicles using ExoScreen. Nat Commun 5, 3591

You T, Hu W, Ge X, Shen J, Qin X (2011): Application of a novel inhibitor of human CD59 for the enhancement of complement-dependent cytolysis on cancer cells. Cell Mol Immunol 8, 157-163

Zou L, Song G, Gu S, Kong L, Sun S, Yang L, Cho WC (2019): Mechanism and Treatment of Rituximab Resistance in Diffuse Large Bcell Lymphoma. Curr Cancer Drug Targets 19, 681-687

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater, Prof. Dr. G. G. Wulf, bedanken, der mir dieses Thema anvertraut hat und bei mir mit viel Geduld die Begeisterung an der Forschung geweckt hat. Beeindruckend waren die langen und konstruktiven Besprechungen bei der Entstehung der Publikationen. Die Weihnachtsfeiertage und Silvester im Labor werde ich lange in Erinnerung behalten!

Bei Herrn Prof. Dr. Oppermann bedanke ich mich ganz herzlich für die Übernahme des Koreferats.

Außerdem bedanke ich mich bei Dr. R. Koch für die gemeinsamen Stunden im Labor, seine technische Unterstützung und den ersten gemeinsamen Aufenthalt in Boston. Bei Prof. Dr. B. Chapuy bedanke ich mich für seine konstruktiven Beiträge. Ein Dankeschön auch an alle Masterstudenten, die mich bei meiner Forschung unterstützt haben.