

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

Modifizierung und Charakterisierung von Exosomen als therapeutisches Transportsystem

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Stephan Thomas Otto Bauer

aus München

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Peter Jon Nelson

Mitberichterstatter/in: Prof. Dr. Andreas G. Ladurner

Prof. Dr. Anne Krug

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 23.10.2019

Diese Dissertation wurde in der apceth Biopharma GmbH in München unter der Betreuung von Prof. Dr. Peter J. Nelson, Medizinische Klinik und Poliklinik IV des Klinikums der Universität München, verfasst.

Für meine Kinder

*Kraft, Infinität und Liebe in aller Namen -
Noch immer kann Leben alles sein*

M. C. Schiller, 2019

A Zusammenfassung	VII
B Einleitung	1
1 Exosomen	1
1.1 Anfänge	1
1.2 Biogenese	1
1.2.1 Endosomales System.....	1
1.2.2 Sortierungssignal und Beladung von <i>MVBs</i>	4
1.3 Aufnahme	5
1.4 Molekulare Zusammensetzung	6
1.5 Vorkommen	7
1.6 Funktionen und Anwendungen	7
1.7 Ziele	15
C Material und Methoden	16
2 Material	16
2.1 Zellen	16
2.2 Bakterien	16
2.3 Medien	17
2.3.1 Kultivierung von Bakterien	17
2.3.2 Herstellung retroviraler Überstände.....	17
2.3.3 Kultivierung von Zellen	17
2.4 Plasmide	18
2.5 Restriktionsenzyme	19
2.6 Primer	19
2.7 Puffer	21
2.7.1 Western Blot.....	21
2.7.2 Gelelektrophorese	22
2.8 Antikörper	22
2.9 Reagenzien	23
2.10 Kits	25
2.11 Verbrauchsmaterial	26
2.12 Geräteliste	27
2.13 Software	30

3	Methoden	31
3.1	Kultivierung von Bakterien	31
3.1.1	Herstellung von Selektionsagarplatten	31
3.1.2	Herstellung von Selektionsmedium	31
3.1.3	Inokulation und Mini-Kultivierung	31
3.1.4	Inokulation und Midi-Kultivierung	32
3.2	Zellbiologische Methoden	32
3.2.1	Kultivierung von Zellen	32
3.2.2	Passagieren von Zellen	32
3.2.3	Bestimmung der Zellzahl	33
3.2.4	Antibiotika-Selektion	33
3.2.4.1	Selektion transduzierter HT1080-Zellen	33
3.2.4.2	Selektion transfizierter L87/4 -Zellen	33
3.2.5	Herstellung eines Zell-Batches	33
3.2.6	Kryokonservierung von Zelllinien	34
3.2.7	Auftauen von Zellen	34
3.2.8	Inkubation von Zellen mit Exosomen	34
3.2.9	Blockieren des Liganden <i>CXCL10</i>	34
3.3	Gewinnung von Exosomen	35
3.3.1	Aussaat der Zellen	35
3.3.2	Aufreinigung von Exosomen aus dem Zellkulturüberstand	35
3.4	Biochemische Methoden	36
3.4.1	Herstellung von Zelllysaten	36
3.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels <i>BCA</i>	36
3.5	Molekularbiologische Methoden	36
3.5.1	Klonierungsarbeiten	36
3.5.1.1	Klonierung der Konstrukte #230, #231 und #232	37
3.5.1.2	Klonierung der Konstrukte #233 und #234	37
3.5.2	Dephosphorylierung von 5´-DNS-Fragmentenden	38
3.5.3	Ligation	38
3.5.4	Transformation	39
3.5.5	Retransformation	39
3.5.6	Isolierung von Plasmid-DNS	39
3.5.6.1	Mini-Präparation	39
3.5.6.2	Midi-Präparation	40
3.5.6.3	Restriktionsverdau	40
3.5.6.4	Gelelektrophorese	40
3.5.6.5	Gelextraktion	41

3.5.7	Herstellung gamma-retroviraler Überstände.....	41
3.5.7.1	Aussaat von 293T-Zellen	41
3.5.7.2	Transfektion der 293T-Zellen zur Virusproduktion.....	41
3.5.7.3	Ernte der Virusüberstände	42
3.5.8	Titration gamma-retroviraler Überstände auf HT1080-Zellen	42
3.5.9	Transduktion von HT1080-Zellen mit viralem Überstand.....	43
3.5.10	DNS-Sequenzierung.....	44
3.5.11	Aufreinigung der RNS.....	44
3.5.12	Verdau von DNS.....	44
3.5.13	Synthese der <i>cDNA</i>	45
3.5.14	Amplifizierung der <i>cDNA</i> mittels <i>qRT-PCR</i>	46
3.5.15	Bestimmung der RNS- und DNS-Konzentration	47
3.5.16	Amplifizierung von DNS.....	48
3.5.17	Plasmidkopienzahl.....	48
3.6	Proteinanalytische Methoden	50
3.6.1	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Nanophotometer.....	50
3.6.2	Western Blot.....	51
3.6.2.1	SDS-PAGE	51
3.6.2.2	Proteintransfer	52
3.6.2.3	Immundetektion	52
3.6.2.4	Coomassie-Färbung des Gels	52
3.6.2.5	Ponceau S-Färbung der Membran.....	53
3.6.3	Durchflusszytometrie	53
3.6.3.1	Oberflächenfärbung von Zellen	53
3.6.3.2	Intrazelluläre Färbung.....	53
3.6.3.3	Färbung von Exosomen.....	54
3.7	Klonierungsstrategien	55
3.7.1	Plasmid #230.....	56
3.7.2	Plasmid #231.....	57
3.7.3	Plasmid #232.....	57
3.7.4	Plasmid #233.....	57
3.7.5	Plasmid #234.....	58
3.7.6	Plasmid #235.....	58
3.7.7	Plasmide #2944 + #3005.....	59
3.8	Fluoreszenzaufnahmen	59
3.9	Nanopartikel Tracking Analyse	59
3.9.1	NanoSight.....	59
3.9.2	ZetaView	60
3.10	Zellmigrationsanalyse	61
3.11	Datenauswertung	62

D Ergebnisse	63
4 Vergleich zweier Kits zur Aufreinigung von Exosomen aus dem Zellkulturüberstand.....	63
4.1 Quantitativer Vergleich von Exosomen mittels Western Blot	65
5 Analyse aufgereinigter Partikel aus dem Zellkulturüberstand.....	67
5.1 Nanopartikel Tracking-Analyse.....	67
5.2 Nachweis von Komplexen mit exosomalen Markern	68
5.3 Nachweis aufkonzentrierter exosomaler Marker	71
6 Exosomen zur Übertragung zytosolischer Proteine.....	72
6.1 Charakterisierung der Donorzellen	72
6.2 Nachweis und Charakterisierung der Exosomen.....	74
6.3 Analyse des exosomalen Transports.....	77
7 Exosomen zur Übertragung membrangebundener Proteine.....	78
7.1 Charakterisierung der Donorzellen	78
7.2 Nachweis und Charakterisierung der Exosomen.....	80
7.3 Analyse des exosomalen Transports.....	83
8 Erhöhte Integration von <i>mRNA</i> in Exosomen.....	84
8.1 Vergleich der Konstrukte #168 (<i>GFP</i>) und #230 (<i>GFP_ZIP</i>)	85
8.1.1 Charakterisierung der Donorzellen	85
8.1.2 Nachweis und Charakterisierung der Exosomen.....	86
8.1.3 Analyse der in Exosomen enthaltenen <i>mRNA</i> mittels <i>qRT-PCR</i>	89
8.1.4 Analyse des exosomalen Transports.....	92
8.2 Vergleich der Konstrukte #233 (<i>TIMP-1_GPI</i>) und #234 (<i>TIMP-1_GPI_ZIP</i>)	93
8.2.1 Charakterisierung der Donorzellen	93
8.2.2 Nachweis und Charakterisierung der Exosomen.....	95
8.2.3 Analyse des exosomalen Transports.....	98

9	Wahl eines geeigneten Lipidankers zur Übertragung membrangebundener Proteine.....	99
9.1	Vergleich der Konstrukte #233 (<i>TIMP-1_GPI</i>) und #235 (<i>TIMP-1_MSD</i>)...	100
9.1.1	Charakterisierung der Donorzellen	100
9.1.2	Nachweis und Charakterisierung der Exosomen.....	101
9.1.3	Analyse des exosomalen Transports.....	104
10	Überprüfung der Wirksamkeit von <i>TIMP-1_GPI</i>.....	106
11	Zielgerichteter exosomaler Transfer.....	108
11.1	Charakterisierung der Donorzellen	109
11.2	Nachweis und Charakterisierung der Exosomen.....	111
11.3	Analyse einer geeigneten Empfängerzelle.....	113
11.4	Analyse des exosomalen Transports.....	113
E	Diskussion	115
12	Aufreinigung von Exosomen aus dem Überstand einer Zellkultur.....	115
13	Charakterisierung von Exosomen.....	116
14	Exosomen als Transportsystem zur Übertragung zytosolischer Proteine	118
15	Exosomen als Transportsystem zur Übertragung membrangebundener Proteine.....	120
16	Aufnahme zusätzlicher <i>mRNA</i> in Exosomen.....	125
17	Vergleich zweier Lipidanker zur Übertragung von <i>TIMP-1</i>.....	128
18	Gezielter Transfer von Exosomen.....	129
F	Literaturliste	133
G	Abkürzungsverzeichnis	161
H	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	167
19	Abbildungsverzeichnis.....	167
20	Tabellenverzeichnis.....	170

I Anhang	173
1.1 Plasmide in HT1080-Zellen	173
1.2 Plasmide in L87/4-Zellen	183
1.3 Gamma-retrovirale Helfer-Plasmide.....	184
Danksagungen	185
Eidesstattliche Versicherung	186

A Zusammenfassung

Exosomen sind kleine membranhaltige Vesikel, welche im endosomalen System ihren Ursprung haben und über die Fusion von multivesikulären Körpern mit der Zellmembran in den extrazellulären Raum sekretiert werden. Dabei übernehmen sie vielerlei Aufgaben im Organismus, zu welchen die Modulation von Immunantworten, die interzelluläre Kommunikation und der Transport bioaktiver Stoffe zählen.

Darüber hinaus ist heute bekannt, dass Exosomen einen Einfluss auf viele verschiedene Krankheitsbilder haben, so dass ihr allgemeines Potential als Biomarker und Therapeutika derzeit untersucht wird. Zu diesem Zweck gelten Exosomen als geeignetes Transportsystem zur Übertragung hochspezialisierter lokaler und systemischer Signale, die für die Therapie einer Erkrankung relevant sind.

Diese Doktorarbeit konzentriert sich auf verschiedene Aspekte von Exosomen, insbesondere deren Isolierung und *Engineering* unter Verwendung molekularer Strategien, um ihr Potential zur Behandlung von Krankheiten zu erweitern. Daher wurden Exosomen aus Zellkulturüberschüssen von nativen und modifizierten humanen Fibrosarkomzellen (HT1080) und humanen Stromazellen (L87/4) aufgereinigt und charakterisiert.

Die isolierten Partikel zeigten dabei typische exosomale Marker und befanden sich in der Größenordnung von Exosomen. Zudem konnte eine intakte Lipidmembran der Vesikel nachgewiesen werden.

Um zu prüfen, ob die aufgereinigten Exosomen in der Lage waren, zytosolische und membrangebundene Proteine auf Zellen zu übertragen, wurden Exosomen hergestellt, welche zum einen *GFP* beinhalten bzw. *TIMP-1* (*Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1*) über einen *GPI*-Anker (*TIMP-1_GPI*) auf ihren Oberflächen trugen.

Es wurde bereits früher gezeigt, dass *GPI*-Anker effizient Proteine in Exosomen während deren Biogenese integrieren. Das Fusionsprotein *TIMP-1_GPI* hat erweiterte und neuartige Bioaktivitäten, die sowohl in der Krebstherapie als auch in der Exzisionswundheilung Entwicklungspotential aufweisen.

TIMP-1 besitzt die Fähigkeit das Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau der extrazellulären Matrix zu regulieren und ist ein für zahlreiche Indikationen einsetzbares Therapeutikum.

Bei der Charakterisierung von Exosomen aus *TIMP-1_GPI*- und *GFP*-transduzierten Zellen stellte sich heraus, dass es zu einer Aufkonzentrierung von membrangebundenem *TIMP-1* an der gesamten Proteinmenge kam. Zytosolisch vorliegendes *GFP* wurde im Gegensatz dazu abgereichert.

Auf Grund des geringen Gehalts in den verwendeten Exosomen konnte nur bedingt die vermehrte Integration von *mRNA* in Exosomen nach Verwendung einer „Zipcode“-like-Sequenz bestätigt werden.

Da infolge der Wahl eines geeigneten Ankers der Transport membrangebundener Proteine via Exosomen möglicherweise verbessert werden kann, wurde *TIMP-1* zum einen mit einem *GPI*-Anker und zum anderen mit der Transmembrandomäne (*MSD*) aus dem Antigen CD34 modifiziert. Obwohl die Menge des therapeutischen Proteins in *TIMP-1_MSD*-positiven Exosomen deutlich geringer ausfiel, kam es zu keinem signifikanten Unterschied zwischen beiden Exosomenpopulationen bezüglich der Übertragungsrate.

Des Weiteren konnte bei Versuchen zum gezielten Transfer auf Basis einer Chemokin-Chemokinrezeptor-Bindung gezeigt werden, dass die Effizienz des Transports eines zytosolischen Proteins von *CXCL10*-positiven Exosomen auf T-Zellen tatsächlich im Vergleich zu nicht Chemokin-tragenden Exosomen erhöht war. Jedoch sind weitere Versuche nötig, um dieses Ergebnis zu verifizieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Exosomen auf viele unterschiedliche Weisen modifiziert werden können. So ist es möglich, die exosomale Oberfläche mit einem therapeutischen Protein als auch einem Liganden für einen gerichteten Transport zu verändern und parallel dazu den Inhalt mit einem weiteren Wirkstoff zu beladen.

Daher sind Exosomen für zahlreiche Anwendungen geeignet und können unterstützend wie auch als eigenständiges Therapeutikum bei der Bekämpfung von Krankheiten eingesetzt werden.

Abstract

Exosomes are small membrane-containing vesicles that originate in the endosomal system and are secreted into the extracellular space via the fusion of multivesicular bodies with the cell membrane. They perform many tasks in the organism, including the modulation of immune responses, intercellular communication and the transport of bioactive substances.

Furthermore exosomes are recognized as contribution factors in many different disease settings these days, in consequence their general potential as biomarkers and therapeutics is currently under investigation. To this end, exosomes have now emerged as a suitable transport system for the delivery of highly specialized local and distant signals relevant for disease therapy.

This doctoral thesis focuses on various facets of exosomes, specifically their isolation and engineering using molecular strategies to expand their potential application for disease treatment. Hence, cell culture exosomes from the supernatants of native and modified human fibrosarcoma cell lines (HT1080) and human stromal cell lines (L87/4) were purified and characterized.

The isolated particles showed typical exosomal markers and were on the scale of exosomes. In addition, an intact lipid membrane of the vesicles could be detected.

To analyse the ability of purified exosomes to transfer cytosolic and membrane-bound proteins to cells, exosomes were produced containing GFP or carrying GPI-anchored TIMP-1 (*TIMP-1_GPI*) on their surfaces.

GPI anchors have been previously shown to efficiently target proteins to exosomes during their biogenesis. *TIMP-1_GPI* has enhanced and novel bioactivities that have potential for development in both cancer treatment and excisional wound healing.

By characterising exosomes from *TIMP-1_GPI*- and *GFP*-engineered cells it was found that there was a concentration of membrane-bound TIMP-1 in the total amount of protein. As opposed to this cytosolic GFP was depleted.

Due to the low mRNA content in the exosomes used, the increased integration of template RNA in exosomes could only be confirmed to a limited extent after using a "Zipcode"-like sequence.

To examine whether the transport of membrane-bound proteins via exosomes can be improved as a result of the choice of a suitable anchor, TIMP-1 was fused with a GPI anchor and with the membrane-spanning domain (MSD) of antigen CD34, respectively. Although the amount of therapeutic protein was substantially lower in *TIMP-1_MSD*-positive exosomes there was no significant difference between the two exosome populations in terms of transfer rate.

Furthermore, studies respecting a chemokine/chemokine-receptor based targeted transfer have shown that the efficiency of transporting a cytosolic protein from CXCL10-positive exosomes to T lymphocytes was actually increased compared to non-chemokine bearing exosomes. However further attempts are needed to manifest verification in this regard.

In summary, exosomes can be modified in many different ways. On the one hand it is possible to alter the exosomal surface by adding a therapeutic protein or/and a ligand for targeted delivery as well. On the other hand the content can be loaded with another active substance in parallel. Therefore exosomes are suitable for numerous applications and can be used both as a supportive and as an independent therapeutic agent in the control of diseases.

B Einleitung

1 Exosomen

1.1 Anfänge

Schon 1967 machte Wolf die Entdeckung von winzigen phospholipidhaltigen Partikeln im Plasma von Blutplättchen und bezeichnete diese als „Blutplättchen-Staub“. Kurz darauf wurden Vesikel in der murinen Knorpelmatrix mit einer geschätzten Größenordnung von 30 nm – 1 µm identifiziert (Anderson, 1969).

In einer Veröffentlichung von 1975 kam es zum Vergleich von Mikrovesikeln (MV) aus fetalem Kälberserum (FBS) mit Vesikeln aus multivesikulären Körpern (MVVs) und welchen, die in der Suspensionskultur von Epithel- und Lymphoblastzellen gefunden wurden (Dalton, 1975).

Wenige Jahre später beschrieb die Arbeitsgruppe um Trams die Beobachtung von Vesikeln mit einem Durchmesser von 40 nm, welche von neoplastischen Zelllinien sekretiert wurden und Teile der elterlichen Plasmamembran aufwiesen. Sie schlugen vor, diese Vesikel als Exosomen zu bezeichnen (Trams *et al.*, 1981).

Während der Reifung von Retikulozyten konnten weitere Arbeitsgruppen feststellen, dass Transferrin-Rezeptoren endozytiert und nicht lysosomal abgebaut, sondern als Transferrin-rezeptorhaltige Vesikel von der Zelle exozytiert wurden (Pan und Johnstone, 1983; Harding *et al.*, 1983; Harding *et al.*, 1984). Diese Vesikel wurden von Johnstone und Kollegen 1987 bei einer 90-minütigen Zentrifugation bei 100.000 x g sedimentiert. Seitdem ist das Wissen über Exosomen stetig gestiegen.

1.2 Biogenese

1.2.1 Endosomales System

Exosomen sind 30 – 150 nm große Vesikel (Conde-Vancells *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2014; Zeringer *et al.*, 2015), welche im endosomalen System entstehen (Urbanelli *et al.*, 2013; Roma-Rodrigues *et al.*, 2014) (Abbildung 1) und dieselbe Membranorientierung wie ihre

Donorzellen besitzen (Ge *et al.*, 2012). Zudem reichern sich Exosomen in einem Dichtegradienten von 1,13 – 1,19 g/mL an (Bobrie *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2014; Szatanek *et al.*, 2015).

Der Ursprung von Exosomen befindet sich im pleomorphen endosomalen System, welches aus primären endozytotischen Vesikeln, frühen Endosomen (*EEs*), späten Endosomen (*LEs*) und Lysosomen besteht (Denzer *et al.*, 2000).

Die Bildung der endozytotischen Vesikel setzt eine ins Zellinnere gerichtete Invagination der Plasmamembran voraus. Neben der hauptsächlich beschriebenen Clathrin-vermittelten Endozytose (Kalani *et al.*, 2014) gibt es Clathrin-unabhängige Möglichkeiten der Internalisierung, welche sich zum einen in einen Caveolae-vermittelten und zum anderen in einen Caveolae-freien Weg einteilen lassen (Pelkmans und Helenius, 2002; Pelkmans, 2005).

Bei der Clathrin-vermittelten Endozytose, welche u. a. an der Rezeptorinternalisierung beteiligt ist (Liu *et al.*, 2010), sind Adaptorproteine für die Auswahl und die Umsetzung der Verpackung der zu transportierenden Membranproteine verantwortlich (Maldonado-Báez und Wendland, 2006). Die anschließende Abschnürung der Vesikel erfolgt mit Hilfe der GTPase Dynamin und deren Bindungspartner (Sundborger und Hinshaw, 2014).

Bei der Clathrin-unabhängigen Endozytose spielen dagegen *lipid rafts* (Simons und Ikonen, 1997) eine entscheidende Rolle. Hier scheint die Initialisierung der Vesikelbildung auf Grund einer Einbuchtung der Membran durch *lipid rafts* an sich oder über die Anhäufung von Caveolin zu erfolgen (Pelkmans, 2005). Die Arbeitsgruppe um Sadir vermutet zudem, dass bei der Internalisierung von IFN- γ und dessen Rezeptor sowohl eine Clathrin-vermittelte als auch eine über Caveolin initiierte Vesikulation möglich ist, welche im Transport der Moleküle in verschiedene Zellkompartimente resultiert (Sadir *et al.*, 2001).

Nach deren Abschnürung gelangen die endozytotischen Vesikel in *EEs* (Gruenberg *et al.*, 1989), welche neben den Molekülen von der Plasmamembran auch Material vom Golgi-Apparat beziehen und für deren weitere Verarbeitung und Koordination zuständig sind (Scott *et al.*, 2014). Dabei scheint die Ansäuerung des endosomalen Inhalts und eine beispielsweise damit verbundene Abspaltung eines Liganden von seinem Rezeptor ein wichtiges Ereignis für die darauffolgende Sortierung der Moleküle zu sein (Yamashiro und Maxfield,

1984; Yamashiro und Maxfield, 1987). Darunter fallen das Recyclen an die Membran (Jopling *et al.*, 2014), der lysosomale Abbau oder der retrograde Transport zum trans-Golgi-Netzwerk (Jovic *et al.*, 2010).

Das Recyclen an die Membran kann entweder direkt oder über *recycling endosomes* im perinukleären Raum erfolgen (Huotari und Helenius, 2011). Beim direkten Recyclen sind die *EEs* im peripheren Zytoplasma lokalisiert (Hoepfner *et al.*, 2005) und können an ihren dünnen röhrenförmigen Ausläufen und großen Vesikeln erkannt werden (Jovic *et al.*, 2010). Mit ihrem Einzug in die Zellmitte verlieren sie jedoch ihre recycelnden Eigenschaften und übernehmen abbauende Funktionen (Hoepfner *et al.*, 2005). Dabei kommt es zu einer Reifung der *EEs* zu *LEs* (Stoorvogel *et al.*, 1991) und angesichts von Invaginationen der limitierenden Membran (Babst, 2011) und dem damit einhergehenden Anstieg intraluminärer Vesikel (ILV) zur Bildung von *MVBs* (Hu *et al.*, 2015).

Während der Reifung werden Proteine und Lipide über tubulo-vesikuläre Elemente zurück an die Membran bzw. das trans-Golgi-Netzwerk geführt. Danach fusionieren *MVBs* in der Regel mit Lysosomen, was zum Abbau der nicht-recyclten Inhalte führt (Piper und Katzmann, 2007).

Neben den Mechanismen des Recyclens und lysosomalen Abbaus existiert jedoch noch ein weiterer, bei welchem *MVBs* mit der Zelloberfläche fusionieren und schließlich die Vesikel als Exosomen in den extrazellulären Raum freigelassen werden (Vlassov *et al.*, 2012; Sato *et al.*, 2016; Sarko und McKinney, 2017). Dabei scheinen zum einen Rab11 und ein intrazellulärer Anstieg von Calcium für die Exozytose verantwortlich zu sein (Savina *et al.*, 2003). Daneben gibt es noch Hinweise auf eine Beteiligung von Rab35 (Hsu *et al.*, 2010) bzw. Rab27a und Rab27b (Ostrowski *et al.*, 2010).

Ein erhöhter Exosomenausstoß kann zudem durch unterschiedliche Stressfaktoren wie Hypoxie, Veränderungen von Temperatur und pH-Wert, Strahlung, oxidativer Stress, Scherbeanspruchung und die Stimulation der Sphingomyelinase bzw. die Aktivierung des Tumorsuppressorproteins p53 erreicht werden (Roma-Rodrigues *et al.*, 2014).

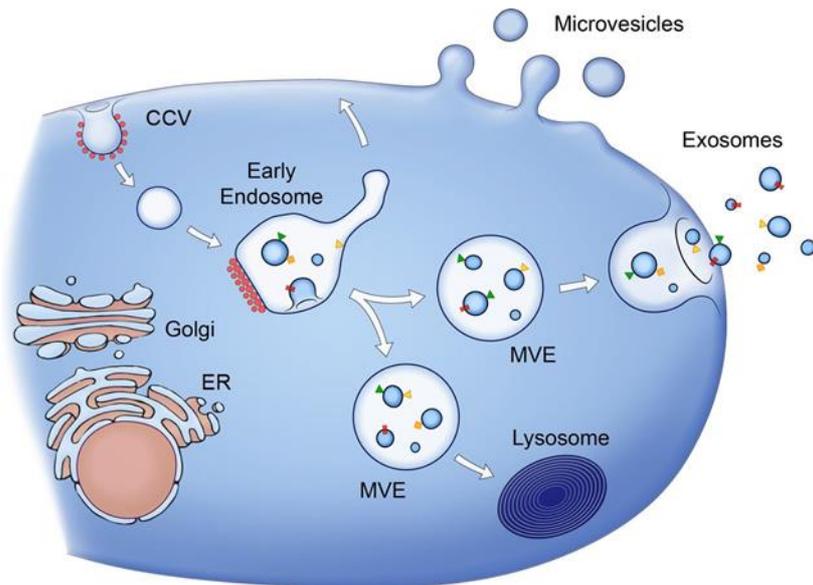


Abbildung 1: Graphische Darstellung der Biogenese von Exosomen. Nach Einstülpung der Zellmembran an Clathrin-überzogenen Vertiefungen bilden sich endozytierte Vesikel (CCV), welche daraufhin mit frühen Endosomen fusionieren. Durch Invaginationen der limitierenden Membran kommt es zu einem Anstieg intraluminaler Vesikel und zur Bildung multivesikulärer Körper (MVE). Anschließend fusionieren MVE entweder mit Lysosomen zum Abbau nicht mehr benötigten Materials oder mit der Plasmamembran und setzen so ihren Inhalt in die extrazelluläre Matrix frei. Die roten Punkte stellen Clathrin dar, wobei die farbigen Dreiecke und Rechtecke transmembrane bzw. membranassoziierte Proteine symbolisieren. (Schema aus Raposo und Stoorvogel, 2013)

1.2.2 Sortierungssignal und Beladung von *MVBs*

Unter den vielen Mechanismen zur Beladung von Vesikeln ist die bekannteste und am häufigsten untersuchte Variante die Monoubiquitinierung als Signal zur Sortierung und den Transport von löslichen (Cheng und Schorey, 2016) und membrangebundenen Proteinen (Michelet *et al.*, 2010) in Exosomen.

Hierbei bindet Ubiquitin an den Lysinrest des Zielproteins, welches daraufhin von einer Gruppe von Proteinkomplexen namens *ESCRTs* (*endosomal sorting complexes required for transport*) in ILV sortiert wird (Babst, 2011).

Insgesamt gibt es vier unterschiedliche *ESCRTs* (*ESCRT-0, -I, -II, -III*) (Hurley, 2010; Hurley und Hanson, 2010).

In einem ersten Schritt erkennt dabei *ESCRT-0* die ubiquitinierte Fracht und wird zur Endosomenmembran geleitet. Anschließend erfolgt eine Kaskade an Rekrutierungen von

ESCRT-I bis *ESCRT-III*, wobei jeder Komplex für die Mobilisierung der nachfolgenden Einheit zuständig ist (Villarroya-Beltri *et al.*, 2014). Infolgedessen kommt es zur Formierung von *MVBs* (Luzio *et al.*, 2010; Michelet *et al.*, 2010) mit der entsprechenden Fracht (Katzmann *et al.*, 2001). In einem letzten Schritt dissoziiert die ATPase Vps4 den *ESCRT-III*-Komplex und beendet die weitere Genese von ILV (Lata *et al.*, 2008; Davies *et al.*, 2009).

1.3 Aufnahme

Abhängig vom Aufbau können Exosomen über den Kontakt, etwa mittels eines membran-gebundenen Liganden oder nach deren Internalisierung, eine Reaktion in einer Zelle auslösen (McKelvey *et al.*, 2015).

Dabei können Exosomen auf verschiedene Arten und Weisen aufgenommen werden.

So erfolgte die zelluläre Aufnahme von Exosomen aus Ratten-Phäochromozytomzellen u. a. anhand einer Rezeptor-vermittelten Endozytose via Clathrin (Tian *et al.*, 2014). Feng *et al.* beschreiben die von Aktin-Zytoskelett, Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) und Dynamin-2 abhängige Phagozytose von Exosomen bei phagozytären Zellen (Feng *et al.*, 2010).

Ein weiterer Mechanismus zur exosomalen Internalisierung konnte bei Mikrogliazellen registriert werden. Diese betreiben Makropinozytose (Fitzner *et al.*, 2011), was durch die Inhibierung von PI3K bzw. des Na⁺/H⁺-Ionenauschers in der Plasmamembran blockiert werden konnte (Khalil *et al.*, 2006).

Die Arbeitsgruppe um Svensson postuliert dagegen, dass die Aufnahme von Glioblastom-Exosomen vom ERK1/2-HSP27-Signalweg abhängig ist und über *lipid raft*-vermittelte Endozytose geschieht (Svensson *et al.*, 2013).

Auch eine Aufnahme von Exosomen über die Fusion mit der Zellmembran ist möglich, wie im Falle von Exosomen aus Melanomzellen mit Melanomzellen gezeigt werden konnte (Parolini *et al.*, 2009). Dabei scheinen Tetraspanine auf der Empfängerzelle einen Einfluss auf diesen Mechanismus zu haben (McKelvey *et al.*, 2015).

1.4 Molekulare Zusammensetzung

Exosomen sind mit einer Phospholipid-Doppelmembran umgebene Vesikel (Laulagnier *et al.*, 2004; Yuana *et al.*, 2013) und besitzen auf Grund ihres endosomalen Ursprungs Membrantransport- und Fusionsproteine (GTPasen, Flotillin-Proteine, Annexine), Tetraspanine (CD9, CD63, CD81, CD82) und Hitzeschockproteine (Hsc70, Hsp90) sowie Proteine, welche bei der Entstehung von *MVBs* beteiligt sind (Alix und TSG101) (Szatanek *et al.*, 2015).

Des Weiteren sind Exosomen reich an Lipiden (Cholesterin, Biphosphate, Sphingo- und Phospholipide) (Lin *et al.*, 2015) und verfügen über zytoskelettale (Aktin, Cofilin Tubulin, Profilin) als auch die Signaltransduktion (Syntenin, β -Catenin) und Translation (eEF1a1) betreffende Proteine (Gutiérrez-Vázquez *et al.*, 2013).

Häufig sind außerdem am Metabolismus involvierte Enzyme in Exosomen zu finden (GAPDH, ENO1) (Urbanelli *et al.*, 2013).

Je nach Herkunft können in Exosomen außerdem eine Vielzahl an unterschiedlichen spezifischen Proteinen, Lipiden und Ribonukleinsäuren detektiert werden, welche in den Internet-Datenbanken „ExoCarta“, (Mathivanan und Simpson, 2009; Mathivanan *et al.*, 2012; Keerthikumar *et al.*, 2016), „Vesiclepedia“ (Kalra *et al.*, 2012) und „EVpedia“ (Kim *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2015a; Kim *et al.*, 2015b) katalogisiert werden.

Auch kann die Zusammensetzung der Vesikel innerhalb einer Zelle variieren. So können Zellen gleichzeitig Exosomen mit unterschiedlichen Inhalten sekretieren (Gutiérrez-Vázquez *et al.*, 2013).

Zudem tragen Zustand und Art der Parentalzelle maßgeblich zur exosomalen Komposition bei (Shenoda und Ajit, 2016; Sarko und McKinney, 2017).

Zu beachten ist auch, dass kein Marker ausschließlich für Exosomen existiert (Yáñez-Mó *et al.*, 2015). Alle exosomalen Proteine sind auch im Zytosol bzw. in der Membran der Donorzelle zu finden (Keller *et al.*, 2006).

Hinsichtlich ihres endosomalen Ursprungs sind in Exosomen weder nukleare noch endoplasmatische (Keller *et al.*, 2006) oder mitochondriale (Mears *et al.*, 2004) Proteine vorhanden.

1.5 Vorkommen

Exosomen werden von fast allen Zelltypen sekretiert (Roma-Rodrigues *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015). Dazu zählen neben hämatopoetischen Zellen wie Retikulozyten (Géminard *et al.*, 2002) auch dendritische Zellen (Pitt *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2016), Mastzellen (Skokos *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2016; Veerappan *et al.*, 2016), B-Lymphozyten (Escola *et al.*, 1998; Sanderson *et al.*, 2008; Lundy *et al.*, 2015), T-Lymphozyten (Wahlgren *et al.*, 2012; Agarwal *et al.*, 2014), Makrophagen (McDonald *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015), Fibroblasten (Hu *et al.*, 2015; Haj-Salem *et al.*, 2017) und Adipozyten (Ferrante *et al.*, 2015). Aber auch Zellen des Nervensystems wie Neuronen (Chivet *et al.*, 2012; Janas *et al.*, 2016), Astrozyten (Guescini *et al.*, 2010; Verkhatsky *et al.*, 2016), Oligodendrozyten (Krämer-Albers *et al.*, 2007) und Mikroglia (Asai *et al.*, 2015) sekretieren Exosomen.

Schließlich nutzen Krebszellen Exosomen, um eine Progression des Tumors zu begünstigen (Wang *et al.*, 2016) und sich vor einer Immunantwort zu schützen (Sun und Liu, 2014; Liu *et al.*, 2015) sowie über längere Distanzen zu interagieren (Whiteside, 2016).

Folglich sind Exosomen nicht nur auf das Recyclen der Rezeptoren von der Zelloberfläche beschränkt, sondern auch bei zahlreichen physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt (Feng *et al.*, 2010).

1.6 Funktionen und Anwendungen

Großes Interesse weckte die Entdeckung von RNS in Exosomen und damit die Möglichkeit des genetischen Austauschs zwischen Zellen (Valadi *et al.*, 2007). Heute weiß man, dass Exosomen durch den molekularen Transfer von Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren (Raposo und Stoorvogel, 2013; Batagov und Kurochkin, 2013; Ung *et al.*, 2014; Greening *et al.*, 2015) u. a. der interzellularen Kommunikation dienen (Bang und Thum, 2012; Costa-Silva *et al.*, 2015; Ratajczak *et al.*, 2016; Ciardiello *et al.*, 2016; Takahashi *et al.*, 2017). Dafür spricht auch, dass Exosomen in den meisten Körperflüssigkeiten zu finden sind (Ha *et al.*, 2016).

Hierunter fallen Blut (Baranyai *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2017), Speichel (Michael *et al.*, 2010; Zlotogorski-Hurvitz *et al.*, 2015; Zheng *et al.*, 2017), Urin (Dear *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014; Alvarez, 2014; Musante *et al.*, 2014), Muttermilch (Admyre *et al.*, 2007; Qin *et al.*, 2016; Hock *et al.*, 2017), Fruchtwasser (Asea *et al.*, 2008; Balbi *et al.*, 2017), Sperma (Vojtech *et al.*, 2014; Du *et al.*, 2016), Aszites (Peng *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2016) und Zerebrospinalflüssigkeit (Street *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2017).

Zudem kamen Valadi und seine Kollegen zu der Erkenntnis, dass *mRNA* nach exosomaler Übertragung nicht nur ihre Funktion beibehält, sondern auch von einer anderen Spezies translatiert werden konnte und somit ein genetischer Austausch unter Arten verschiedener Abstammungen möglich wäre (Valadi *et al.*, 2007).

Des Weiteren bewahren Exosomen die zelluläre Homöostase, indem sie schädliche zytoplasmatische DNS (Takahashi *et al.*, 2017), RNS und Proteine (Baixauli *et al.*, 2014) aus der Zelle schleusen.

Exosomen aus mesenchymalen Stammzellen (*MSCs*) besitzen außerdem regenerierende und schützende Eigenschaften (Armstrong *et al.*, 2017).

In einem murinen Tiermodell für myokardiale Ischämie/Reperfusionsschäden reduzierten *MSCs*-Exosomen das Infarktausmaß und zeigten kardioprotektive und wundheilende Effekte (Lai *et al.*, 2010). Ebenfalls konnten *MSCs*-Exosomen in fibrotischen Lebern (Li *et al.*, 2013) und bei kutanen Verletzungen (Zhang *et al.*, 2015) zur Genesung beitragen.

Das Interesse von Immunologen an Exosomen wurde 1996 mit der Entdeckung geweckt, dass Exosomen scheinbar bei der Antigenpräsentation involviert sind (Bobrie *et al.*, 2011).

So fand die Arbeitsgruppe um Raposo heraus, dass von B-Lymphozyten sekretierte Exosomen die Fähigkeit besaßen, eine antigenspezifische Immunantwort in T-Zellen auszulösen (Raposo *et al.*, 1996).

Heute weiß man, dass Exosomen Immunantworten modulieren können (Wahlgren *et al.*, 2012; Shenoda und Ajit, 2016) und je nach Herkunft sowohl immunstimulierend (Quah und O'Neill, 2005) als auch immunsuppressiv (Liu *et al.*, 2015) wirken.

Bei einer Allotransplantation ist die Reaktion des Immunsystems von hoher Relevanz, da es hier für gewöhnlich zu einer Abstoßung des körperfremden Transplantats kommt. In diesem Zusammenhang konnten Exosomen vom Spender durch die Induzierung von regulatorischen T-Zellen (T_{Reg} -Zellen) beim Empfänger eine Inflammation unterdrücken (Song *et al.*, 2016).

Anders als bei einer Verpflanzung von Organen und Geweben ist jedoch eine akute inflammatorische Immunantwort im Krankheitsfall wünschenswert.

Dendritische Zellen (*DCs*) sind Zellen des Immunsystems, welche in der Lage sind, pathogene Antigene zu prozessieren und über ihre Haupthistokompatibilitätskomplex (*MHC*)-Klasse I- und II-Moleküle zu präsentieren (Villadangos und Schnorrer, 2007).

In Veröffentlichungen von 2009 wurde beschrieben, dass *DCs* *MHC*-Klasse II-Moleküle nicht nur untereinander via Exosomen austauschen, sondern diese auch exosomal an CD4-positive ($CD4^+$) T-Zellen transferieren, um eine Immunantwort auszulösen (Nolte-'t Hoen *et al.*, 2009; Buschow *et al.*, 2009).

Bereits zuvor brachten Zitvogel und Kollegen in Erfahrung, dass Exosomen aus *DCs* spezifische zytotoxische T-Zellen (*CTLs*) aktivieren und so das Wachstum von etablierten Tumoren in Mäusen inhibieren (Zitvogel *et al.*, 1998). Die T-Zell-vermittelte Immunantwort kann dabei selber von Exosomen initiiert werden, indem die entsprechenden Tumorantigene in Exosomen verpackt aus Tumorzellen sekretiert und von *DCs* prozessiert werden (Wolfers *et al.*, 2001).

Diese Art der Tumorbekämpfung führte zu der Konzeption, Exosomen möglicherweise als Impfstoff für klinische Anwendungen nutzen zu können (Chaput *et al.*, 2003).

Hinzu kommt, dass auch natürliche Killerzellen (NK-Zellen) Exosomen freisetzen, welche sowohl den Fas-Liganden (FasL) als auch Perforin enthalten (Fais, 2013). Diese Exosomen kontrollieren zum einen das Immunsystem und erhalten die Homöostase, können aber auch ihre zytotoxische Wirkung gegen Krebszellen einsetzen (Lugini *et al.*, 2012). So konnten Zhu und Kollegen mit Exosomen aus NK-Zellen Melanomzellen bekämpfen (Zhu *et al.*, 2017).

Der Tumor hingegen versucht seinerseits mit der ausgiebigen Freisetzung von Exosomen dem Immunsystem zu entkommen. So führte der Ausstoß von Mikrovesikeln aus humanen Melanom- und Kolorektal-Karzinomzellen zur Differenzierung von Monozyten zu myeloiden

Suppressorzellen (*MDSCs*) und damit zu einer begünstigten Tumorprogression (Valenti *et al.*, 2007), da diese Zellen eine T-Zell-vermittelte Immunantwort verhindern (Srivastava *et al.*, 2010).

Die Induktion von *MDSCs* resultiert aus den in tumorösen Exosomen enthaltenen Prostaglandin E2 (PGE2) und TGF- β , wobei *MDSCs* ihrerseits im Anschluss an die Exosomenaufnahme Zytokine wie IL-6 und VEGF produzieren (Xiang *et al.*, 2009).

Während VEGF als der Hauptvermittler von Angiogenese gilt (Carmeliet, 2005), ist die Studienlage von IL-6 nicht eindeutig. War man lange Zeit der Ansicht, dass IL-6 ebenfalls die Progression des Tumors vorantreibt, geben andere Untersuchungen auch Hinweise auf eine antitumorale Immunantwort (Fisher *et al.*, 2014). In einer zu Xiang *et al.*, 2009 ähnlichen Studie, konnte gezeigt werden, dass tumoröse Exosomen die Differenzierung von myeloiden Vorläuferzellen zu *DCs* verhinderten (Yu *et al.*, 2007). IL-6 hatte dabei einen entscheidenden Einfluss auf die Differenzierung und korrelierte positiv mit der Effektivität der Inhibierung (Yu *et al.*, 2007).

Clayton und seine Mitarbeiter stellten zudem fest, dass humane tumoröse Exosomen TGF- β 1 wie auch Liganden für NKG2D beinhalten (Clayton *et al.*, 2008). NKG2D ist ein Rezeptor, welcher u. a. NK-Zellen wie auch CD8-positive (CD8⁺) T-Zellen aktiviert (Bauer *et al.*, 1999; Ogasawara und Lanier, 2005). Nach Inkubation mit diesen Vesikeln kam es bei NK-Zellen als auch (CD8⁺) T-Zellen zu einer spezifischen, oberflächlichen Herunterregulierung der NKG2D-Expression und infolgedessen zu einer Reduzierung der Effektorfunktionen (Clayton *et al.*, 2008). In einer anderen Veröffentlichung zeigte dieselbe Arbeitsgruppe, dass Exosomen aus humanen Tumoren überdies die Suppressor-Eigenschaften von T_{Reg}-Zellen verstärken (Clayton *et al.*, 2007).

Dass Exosomen aus Tumoren nicht nur die Entwicklung von Immunzellen modulieren können, wurde von einer anderen Arbeitsgruppe demonstriert.

Aus Prostatakrebszellen sekretierte Exosomen waren in der Lage, die Apoptose von aktivierten (CD8⁺) T-Zellen mittels FasL zu induzieren (Abusamra *et al.*, 2005). Der apoptotische Zelltod wird dabei durch die Caspase-Aktivierung vermittelt und ist u. a. für die zelluläre

Homöostase und der Erhaltung immunprivilegierter Organe von großer Bedeutung (Waring und Müllbacher, 1999). Neben der pathologischen Form ist dieser Mechanismus bei einer Schwangerschaft essentiell, um eine Immuntoleranz gegenüber dem Fetus zu gewährleisten. In diesem Fall beinhalten Exosomen der mütterlichen Plazenta FasL und TRAIL, um die Apoptose von aktivierten Immunzellen einzuleiten (Stenqvist *et al.*, 2013).

In diesem Zusammenhang kann die natürliche Regulierung der Zelleliminierung auch zur therapeutischen Anwendung bei Tumorerkrankungen eingesetzt werden (Lemke *et al.*, 2014). Mit TRAIL beladene Exosomen wurden in einem Modell der Arbeitsgruppe um Rivoltini genutzt, um Krebszellen zu töten und damit die Tumorprogression zu kontrollieren (Rivoltini *et al.*, 2016).

Tumorzellen ihrerseits versuchen via Exosomen den Zelltod zu unterbinden (Khan *et al.*, 2011; Valenzuela *et al.*, 2015).

So konnte u. a. bei der Untersuchung zur Bedeutung von Exosomen bezüglich der Regulierung von Zellviabilität und Apoptose im Falle von Blasenkrebs demonstriert werden, dass Exosomen durch die Genaktivierung der ERK- und Akt-Signalwege die Apoptose der eigenen Tumorzellen verhindern (Yang *et al.*, 2013).

Neben der Manipulation von Immunzellen tragen tumoröse Exosomen auch anhand ihres proteomischen Profils unmittelbar zur Tumorprogression bei.

In einer Studie zu fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen identifizierte die Arbeitsgruppe um Yi in den entsprechenden Exosomen angiogenesefördernde Proteine wie MTA1, den Transkriptionsfaktor ATF2 und die Serin-Threonin-Kinasen ROCK1 und ROCK2 (Yi *et al.*, 2015).

Dies lässt den Schluss zu, Exosomen als Biomarker zur klinischen Diagnose von Krankheiten, insbesondere Krebs, nutzen zu können (Khan *et al.*, 2012; Melo *et al.*, 2015; Sandfeld-Paulsen *et al.*, 2016).

Dass Exosomen auch bei Neugeborenen von Bedeutung sind, zeigt eine Studie von Zhou und Kollegen aus dem Jahr 2012. Die Arbeitsgruppe wies eine Vielzahl an in Exosomen verpackten, sehr stabilen *microRNAs* (*miRNAs*) in der Muttermilch nach, was die Vermutung nahelegt, dass diese über den Verdauungstrakt des Säuglings absorbiert werden und zur Entwicklung des Immunsystems beitragen (Zhou *et al.*, 2012).

Auch im Nervensystem können Exosomen, abhängig vom Status, unterschiedliche Rollen einnehmen. So besitzen sie neuroprotektive Eigenschaften (Wang *et al.*, 2011) und werden für regulatorische Funktionen an den Synapsen und den interzellulären Austausch von Membranproteinen im Gehirn benötigt (Fauré *et al.*, 2006).

Auf Grund ihres Potentials, Proteine zu übertragen, sind Exosomen allerdings auch an neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson und Prionenerkrankungen beteiligt (Gangoda *et al.*, 2015). Im Falle von Alzheimer kommt es zu einer extrazellulären Akkumulation von phosphorylierten Tau-Proteinen, welche von den entsprechenden pathogenen Zellen via Exosomen sekretiert werden (Saman *et al.*, 2012).

Grundsätzlich lässt sich sagen, dass das Verständnis über die systemische Wirkungsweise von Exosomen und deren Zusammenwirken im Krankheitsfall in naher Zukunft für die medizinische Entwicklung essentiell sein wird.

Wie gezeigt, können je nach Herkunft Exosomen verschiedene Funktionen im Immunsystem einnehmen. Deshalb haben bei einer therapeutischen Behandlung nicht nur die intrinsischen, sondern auch die oberflächlichen Komponenten von Exosomen einen großen Einfluss auf den kurativen Erfolg.

Bei wachsenden Inzidenzraten von Tumorerkrankungen angesichts steigender Lebenserwartungen, ergeben sich hier vielversprechende therapeutische Einsatzgebiete für Exosomen.

Um das Potential der Exosomen ausschöpfen zu können, ist es jedoch wichtig deren Biogenese und Zusammensetzung zu verstehen (Abbildung 2).

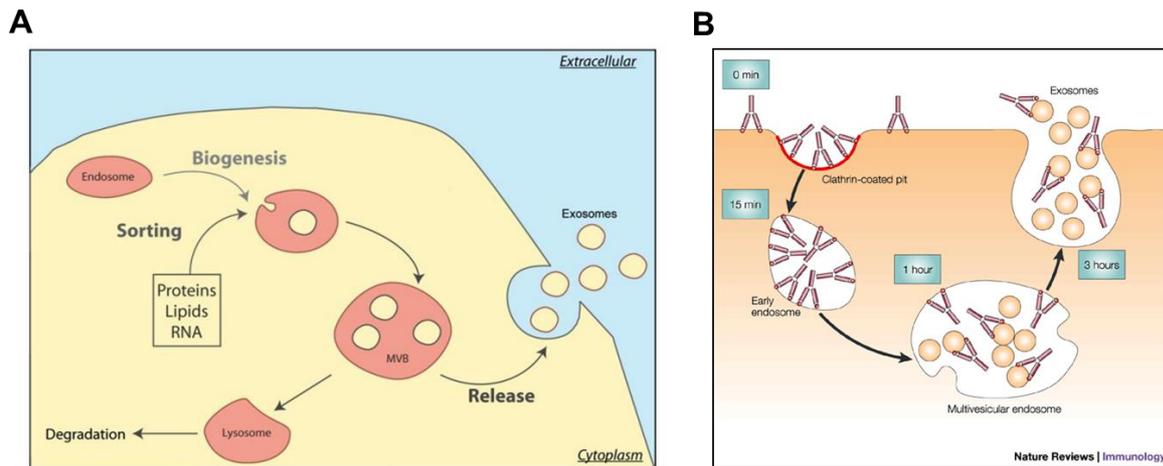


Abbildung 2: Graphische Darstellungen zur Beladung von Exosomen. Die Abbildungen zeigen beispielhaft wie sich Inhalt und Oberfläche von Exosomen während ihrer Generierung zusammensetzen.

A Für die Rekrutierung von Proteinen, Lipiden und RNS sind unterschiedliche Mechanismen verantwortlich. So kann über eine gezielte Manipulation bzw. durch das zu Nutze machen dieser Wege ein vermehrter Einbau eines gewünschten Produkts in Exosomen erzielt werden. (Schema aus Schekman, 2015)

B Die bei der Einstülpung der Zellmembran an Clathrin-überzogenen Vertiefungen membran-gebundenen Oberflächenproteine werden auf die Exosomenoberfläche unter Beibehaltung ihrer ursprünglichen Ausrichtung integriert. So können u. a. Proteine mit therapeutischer Wirksamkeit auf die Oberfläche von Exosomen transferiert werden. (Schema aus Théry *et al.*, 2015)

Durch die methodische Manipulation der entsprechenden Mechanismen (Abbildung 2) und der damit systematischen Modifizierung von Exosomen zur Nutzung dieser als potentielle Transportsysteme, ergeben sich für zahlreiche Indikationen Therapiemöglichkeiten.

So konnte bereits ein Mechanismus zum vermehrten Einbau von *mRNA* in Mikrovesikel (MV) entschlüsselt werden (Bolukbasi *et al.*, 2012). Eine denkbare Weiterführung hierzu wäre, die exosomale Übertragungsrate von Wirkstoffen zu optimieren.

Um eine zielgerichtete Wirkung zu ermöglichen, könnte die Integrierung eines Chemokin-Liganden auf der exosomalenen Oberfläche dazu genutzt werden, dass Exosomen auf die korrespondierenden Rezeptoren der entsprechenden Zellen treffen. Oder um den Liganden auf die Membran der Zielzelle zu konzentrieren und eine Chemotaxis von Immunzellen auszulösen.

Gepaart mit einer aktiven Substanz, die sowohl äußerlich als auch intrinsisch vorhanden sein kann, können Exosomen so effektiv auch zur Bekämpfung von Krebszellen eingesetzt werden.

Ein möglicher Wirkstoff in diesem Zusammenhang wäre *TIMP-1* (*Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1*) mit seinen vielseitigen therapeutischen Einsatzmöglichkeiten, da es die Aktivität von Matrix-Metalloproteasen (MMP) inhibiert (Murphy, 2011; Lindsey *et al.*, 2015), welche zum einen bei der Tumorprogression (Himmelstein *et al.*, 1994-1995; Gialeli *et al.*, 2011) und zum anderen bei chronischen Wunden (Caley *et al.*, 2015) eine wichtige Rolle spielen.

Da anscheinend *GPI*-Anker vermehrt in Exosomen integriert werden (López-Cobo *et al.*, 2016), könnten diese genutzt werden, um eine potentielle Menge an therapeutischen Proteinen auf die exosomale Oberfläche zu rekrutieren.

Ein Fusionsprotein bestehend aus *TIMP-1* und einem *GPI*-Anker, welches mittels Exosomen direkt an spezifischen Stellen der Haut appliziert werden würde, könnte dort Wundheilungseffekte hervorrufen, insbesondere dann, wenn die entsprechenden Exosomen ihren Ursprung aus mesenchymalen Stammzellen mit immunmodulatorischen bzw. kurativen Eigenschaften (Phinney und Pittenger, 2017) aufweisen.

Die Möglichkeit, Exosomen sowohl in- als auch extrinsisch zu modifizieren, um unter anderem deren Bioaktivität zu verstärken, hebt diese als vielfältige Therapeutika mit großem Potential hervor. Auch, weil Exosomen nach ihrer Aufreinigung lange Zeit kryokonserviert werden können, ohne dabei ihre Funktionen zu verlieren (Zhou *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2016).

1.7 Ziele

Exosomen rücken aktuell immer mehr in den Fokus der Medizin und stellen eine Möglichkeit zur zellfreien Therapie von Krebsleiden dar.

Eine entscheidende Rolle spielt dabei der Kontakt zwischen Exosomen und Empfängerzellen. Aus diesem Grund war es Ziel dieser Arbeit, Exosomen zu charakterisieren und so zu modifizieren, dass sie als zielgerichtetes Transportsystem zur verbesserten Übertragung eines therapeutischen Gens bzw. Proteins genutzt werden können.

In dieser Arbeit galt es somit, Exosomen als Transportsystem von cytosolischen Proteinen zu verifizieren und folgende Fragestellungen zu beantworten:

- Kann ein Lipidanker genutzt werden, um ein membrangebundenes Protein exosomal zu transferieren?
- Welcher Lipidanker eignet sich zur exosomal Übertragung eines membrangebundenen Proteins?
- Ist eine Anreicherung der *mRNA* in Exosomen über eine „Zipcode“-like-Sequenz validierbar?
- Kann eine Verbesserung des exosomal Transportes durch zielgerichteten Transfer auf Basis einer Chemokin-Chemokinrezeptor-Bindung erreicht werden?

C Material und Methoden

2 Material

2.1 Zellen

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
293T-Zellen	Adhärente humane embryonale Nierenzellen (HEK-Zellen) mit "SV40 large T-Antigen"	ATTC
hMSCs	Adhärente humane mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark	apceth
HT1080-Zellen	Adhärente humane Fibrosarkom-Zelllinie	ATCC
Jurkat-Zellen	Humane T-Lymphozyten-Suspensionszelllinie	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Hinrich Abken, Uniklinik Köln
L87/4-Zellen	Adhärente humane Fibroblasten-ähnliche Stromazelllinie aus dem Knochenmark	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Peter J. Nelson, LMU

2.2 Bakterien

Stamm	Genotyp	Firma
One Shot Stbl3 Chemically Competent E. coli	F ⁻ mcrB mrrhsdS20(r _B ⁻ , m _B ⁻) recA13 supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Str ^R) xyl-5 λ ⁻ leumtl-1	Thermo Fisher Scientific
Stellar Competent Cells	F ⁻ , endA1, supE44, thi-1, recA1, relA1, gyrA96, phoA, Φ80d lacZΔ M15, Δ (lacZYA - argF) U169, Δ (mrr - hsdRMS - mcrBC), ΔmcrA, λ ⁻	Clontech

2.3 Medien

2.3.1 Kultivierung von Bakterien

Bezeichnung	Firma
Circlegrow Medium	MP Biomedicals
LB-Agar-Medium	Genaxxon bioscience
SOC Outgrowth Medium	New England Biolabs

2.3.2 Herstellung retroviraler Überstände

Bezeichnung	Medium	Supplemente
Chloroquin-Medium	DMEM high glucose	+ 10 % FBS + 25 µM Chloroquin

2.3.3 Kultivierung von Zellen

Bezeichnung	Medium	Supplemente
293T-Medium	DMEM high glucose/EMEM	+ 10 % FBS
Bio-1-Medium	apceth firmeneigenes Zellkulturmedium für hMSCs	
HT1080-Medium	EMEM	+ 10 % FBS
Jurkat-Medium	RPMI 1640	+ 10 % FBS + 1% GlutaMAX-I
Kryokonservierung Einfriermedium	FBS	+ 10 % DMSO
L87/4-Medium	RPMI 1640	+ 10 % FBS + 1% GlutaMAX-I

2.4 Plasmide

Nummer		Bezeichnung
#39		M620 (Galv Env)
#70		pcDNA3-MLV-gagpol
#123		pSERS11_pSFFV_d2GFP_IRES_pac_pre
#168		pSERS11_pEFS_luc2_P2A_eGFP_IRES_pac
#229		pEF_TIMP-1_myc_GPI
#230		pSERS11_pEFS_luc2_P2A_eGFP_IRES_pac_ZIP
#231		pSERS11_pEFS_TIMP-1_myc_GPI_IRES_pac
#232		pSERS11_pEFS_TIMP-1_myc_GPI_IRES_pac_ZIP
#233		pSERS11_pEFS_TIMP-1_myc_GPI_IRES_pac_P2A_eGFP
#234		pSERS11_pEFS_TIMP-1_myc_GPI_IRES_pac_P2A_eGFP_ZIP
#235		pSERS11_pEFS_TIMP-1_myc_MSD_IRES_pac_P2A_eGFP
#238		pMA-RQ_TIMP-1_myc_MSD_IRES
#110	#2944	pcDNA6/TR_ITR_IP-10_FramycPi
	#3005	pcDNA6.2_ITR_hygro_CAG_sGFP_ZIP

2.5 Restriktionsenzyme

Enzym	Verdünnung	Puffer	Firma
BamHI-HF	1:20 – 1:100	CutSmart	New England Biolabs
BspEI	1:20	3.1	New England Biolabs
DrdI	1:100	CutSmart	New England Biolabs
HindIII-HF	1:20 – 1:100	CutSmart	New England Biolabs
NcoI	1:20 – 1:100	3.1 + CutSmart	New England Biolabs
NotI-HF	1:10 – 1:20	CutSmart	New England Biolabs
PacI	1:20 – 1:100	CutSmart	New England Biolabs
SacI-HF	1:100	CutSmart	New England Biolabs
XhoI	1:100	CutSmart	New England Biolabs

2.6 Primer

Nummer	Bezeichnung	Sequenz	Anwendung	Firma
#91	human_FVII_for (forward)	5'- GCC AAG CAA GGC ACT ATC TC -3'	VCN	Metabion
#92	human_FVII_rev (reverse)	5'- GGC TGT GCC GAA GTA GAT TC -3'	VCN	Metabion
#142	WPRE (Roche) rev (reverse)	5'- AAA GAG ACA GCA ACC AGG ATT T -3'	VCN	Metabion
#218	puro_NN_for (forward)	5'- ATG ACC GAG TAC AAG CCC AC -3'	Sequenzierung #230, #233, #234	Microsynth
#244	pac_f_2 (forward)	5'- AAC CTG CCC TTC TAC GAG C -3'	Sequenzierung #230, #233, #234	Microsynth
#275	oPRE_wPRE_VCN_fw (forward)	5'- GCT ATT GCT TCC CGT ACG -3'	VCN	Metabion
#288	EFS_Defensin_f (forward)	5'- GTC TTG TCT GCT GCA GCA TCG -3'	Sequenzierung #230, #233, #234	Microsynth
#290	IRES_pac_f (forward)	5'- CCG TCT TTT GGC AAT GTG AGG -3'	Sequenzierung #234	Microsynth
#300	#168 eGFP_f (forward)	5'- AAC CAC TAC CTG AGC ACC CAG T -3'	Sequenzierung #230, #233, #234	Microsynth
#325	Seq_EFS (forward)	5'- CCC CCG TCT GAA TTT TTG C -3'	Sequenzierung #234, #235	Microsynth

#326	Zipcode forward #168	5'- ACC GTC CGG ATT AAT TAA AAT TCC TGC AGT GCC CCT CTC C -3'	Klonierung	Metabion
#327	Zipcode reverse #168	5'- GCT CGA ATT CGG ATC ACA GGC GGA GTC CAG GCG GCA GGG TCG CGG CCG CGT CAT CAG G -3'	Klonierung	Metabion
#329	Primer B (F1_FW) (forward)	5'- GGT AAA GCC ACC ATG GCC CCC TTT GAG CCC CTG G -3'	Klonierung	Metabion
#329	Primer B (F1_FW) (forward)	5'- GGT AAA GCC ACC ATG GCC CCC TTT GAG CCC CTG G -3'	Sequenzierung #233, #234, #235	Metabion
#330	Primer B (F1_RV) (reverse)	5'- TTT TAA TTA ATC CGG ACT ATA ATA CAT TCA TAT ACA GC -3'	Klonierung	Metabion
#331	Primer C (F1_FW) (forward)	5'- TGT ATT ATA GTC CGG GCC CCT CTC CCT CCC CCC -3'	Klonierung	Metabion
#331	Primer C (F1_FW) (forward)	5'- TGT ATT ATA GTC CGG GCC CCT CTC CCT CCC CCC -3'	Sequenzierung #233, #235	Metabion
#332	Primer C (F1_RV) (reverse)	5'- AGT AGC TCC GCT TCC GGC GCC AGG CTT TCT GGT -3'	Klonierung	Metabion
#334	#233Primer C (F2_RV) (reverse)	5'- TTC GGA TCC GCG GCC TTA CTT GTA CAG CTC GTC C -3'	Klonierung	Metabion
#335	#234Primer C (F2_RV) (reverse)	5'- GGC AGG GTC GCG GCC TTA CTT GTA CAG CTC GTC C -3'	Klonierung	Metabion
#341	230_FW_luc2 (forward)	5'- GCC TTT ACC GAC GCA CAT AT -3'	Sequenzierung #230	Microsynth
#342	230_FW_luc2_2 (forward)	5'- TCC CCG ACA CCG CTA TCC TC -3'	Sequenzierung #230	Microsynth
#343	Primer C (F2_FW)_2 (forward)	5'- GGA AGC GGA GCT ACT AAC TTC A -3'	Klonierung	Metabion
#344	230_FW_luc2_3 (forward)	5'- GGC TTC CAA AGC ATG TAC AC -3'	Sequenzierung #230	Microsynth
#345	230_FW_luc2_4 (forward)	5'- ACA AGT ACG ACC TAA GCA AC -3'	Sequenzierung #230	Microsynth

#346	FW_TIMP-1 (forward)	5'- CCT GGA ACA GCC TGA GCT TA -3'	Sequenzierung #233, #234, #235	Microsynth
#347	FW_eGFP (forward)	5'- GTC CAG GAG CGC ACC ATC TT -3'	Sequenzierung #230, #233, #234	Microsynth
#391	GAPDH-forward	5'- GAA GGT GAA GGT CGG AGT -3'	RT-qPCR	Metabion
#392	GAPDH-reverse	5'- GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC -3'	RT-qPCR	Metabion
#393	EGFP-forward	5'- CCT GAA GTT CAT CTG CAC CA -3'	RT-qPCR	Metabion
#394	EGFP-reverse	5'- GGT CTT GTA GTT GCC GTC GT -3'	RT-qPCR	Metabion
LightCycler-Sonden				
Nummer	Bezeichnung	Sequenz	Anwendung	Firma
#63	UPL	firmeneigen	VCN	Roche
#187	FVII Probe	5'- Yakima Yellow – AGG ACC TCC GCC AGG GTT CA-BHQ-1 -3'	VCN	Metabion

2.7 Puffer

2.7.1 Western Blot

Bezeichnung	Puffer	Supplemente
Blockpuffer	PBST-Waschpuffer	+ 5 % Blotting-Grade Blocker
Laufpuffer	Tris/Glycin-Puffer	+ 0,1 % SDS
PBST-Waschpuffer	PBS	+ 0,1 % Tween
Probenpuffer 2x	2x Laemmli-Probenpuffer	-
Probenpuffer 10x	Tris/HCl, pH 6,8	+ 20 % SDS + 10 % Glycerin + 1 % Bromphenolblau + 10 % 2-Mercaptoethanol (reduzierend)
Transferpuffer	Tris/Glycin-Puffer	+ 20 % Methanol

2.7.2 Gelelektrophorese

Bezeichnung	Firma
TAE-Puffer	Genaxxon bioscience

2.8 Antikörper

Primäre Antikörper				
Bezeichnung	Anwendung	Verdünnung	Klon	Firma
Mouse Anti-Human c-Myc PE	FACS	1:10	9E10	R&D Systems
Mouse Anti-Human TIMP-1 Alexa Fluor 647	FACS	1:40	63515	Novus Biologicals
Mouse Anti-Human CD63 FITC	FACS	1:5	H5C6	BD Pharmingen
Mouse Anti-Human CD63	WB	1:250	Ts63	Thermo Fisher
Mouse Anti-Human CD63 APC	FACS	1:20	H5C6	BioLegend
Mouse Anti-Human CD81 APC	FACS	1:5	JS-81	BD Pharmingen
Mouse Anti-Human CD81	WB	1:250	M38	Thermo Fisher
Mouse Anti-Human CD9	WB	1:500	Ts9	Thermo Fisher
Mouse Anti-Human CD9 APC	FACS	1:20	M-L13	BD Biosciences
Mouse Anti-Human c-Myc Alexa Fluor 647	FACS	1:20	9E10	R&D Systems
Mouse Anti-Human CXCL10	Blockade	1:50	33036	R&D Systems
Mouse Anti-Human CXCR3 PE	FACS	1:10	49801	R&D Systems
Mouse Anti-Human TIMP-1 PE	FACS	1:10	63515	R&D Systems
Mouse IgG1 Isotype APC	FACS	1:5	MOPC-21	BD Pharmingen
Mouse IgG1 Isotype Alexa Fluor 647	FACS	1:20	MOPC-21	BioLegend
Mouse IgG1 Isotype PE	FACS	1:20	MOPC-21	BioLegend
Mouse-Anti-TIMP-1 Ab 2	WB	1:500	102D1	Thermo Scientific
Rabbit Anti-Actin	WB	1:1000	Polyklonal	Sigma-Aldrich
Rabbit Anti-GFP	WB	1:1000	Polyklonal	Abcam

Sekundäre Antikörper				
Bezeichnung	Anwendung	Verdünnung	Klon	Firma
Goat Anti-Rabbit IgG Peroxidase	WB	1:10.000	Polyklonal	Sigma-Aldrich
Rabbit Anti-Mouse IgG Peroxidase	WB	1:10.000	Polyklonal	Sigma-Aldrich

2.9 Reagenzien

Bezeichnung	Firma
1 kb O'GeneRuler	Thermo Scientific
100 bp O'GeneRuler	Fermentas
2-Mercaptoethanol 99 %	Roth
50x TAE Buffer	Genaxxon bioscience
6x Orange DNA Loading Dye	Fermentas
6x Purple Gel Loading Dye	New England Biolabs
Agarose SeaKem LE	Lonza
Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal (CIP)	New England Biolabs
Ampicillin [100 mg/mL]	Genaxxon bioscience
BD Cytotfix/Cytoperm	BD Biosciences
BD Perm/Wash	BD Biosciences
Blasticidin S HCl	Gibco
Blotting-Grade Blocker	Bio-Rad
Bromphenolblau	Roth
Chloroquine diphosphate salt ≥98 %	Sigma-Aldrich
Circlegrow Powder	MP Biomedicals
Clarity Western ECL Substrate	Bio-Rad
CloneAmp HiFi PCR Premix	Clontech
Coomassie Bio-Safe G-250 Stain	Bio-Rad
DMSO	WAK-Chemie

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) high glucose	Biochrom
Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)	ATCC
Ethanol $\geq 99,8$ %	Roth
Ethanol 70 % vergällt	Roth
FBS	Biochrom
GlutaMAX-I (100X)	Gibco
Glycerin ROTIPURAN $\geq 99,5$ %	Roth
Halt Protease & Phosphatase Inhibitor Cocktail (100X)	Thermo Scientific
HEPES Buffer Solution [1 M]	Gibco
Human Genomic DNA	Promega
Hygromycin B	Roche
Laemmli Sample Buffer 2x	Bio-Rad
LB-Agar Powder [40 g/L]	Genaxxon bioscience
LB-Medium Powder [40 g/L]	Genaxxon bioscience
LightCycler 480 Probes Master	Roche
LightCycler 480 SYBR Green I Master	Roche
Methanol ROTIPURAN $\geq 99,9$ %	Roth
M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent	Thermo Fisher
Oligo d(T) ₁₆ [50 μ M]	Invitrogen
PBS 10x	Bio-Rad
PCR Clean	Minerva Biolabs
peqGREEN	peqLab
Phosphate buffered saline (PBS)	Biochrom
Poly-L-lysine solution 0,01%	Sigma-Aldrich
Ponceau S solution	Sigma-Aldrich
Precision Plus Protein Dual Color Standard	Bio Rad
Puromycin dihydrochloride (<i>Streptomyces alboniger</i>) [10 mg/mL]	Sigma-Aldrich
RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor	Invitrogen

SDS 20 % Roti-Stock	Roth
SOC Outgrowth Medium	BioLabs
Tris	Bio-Rad
Tris/Glycine buffer 10x	Bio-Rad
Trypan Blue Solution 0,4 %	Sigma-Aldrich
TrypLE Select 1x	Gibco
Tween 20 Solution 10 %	Bio-Rad
Vybrant Dil Cell-Labeling Solution	Thermo Fisher
Wasser ROTIPURAN low organic	Roth

2.10 Kits

Bezeichnung	Firma
Calcium Phosphate Transfection Kit	Sigma-Aldrich
Clarity Western ECL Substrate	Bio-Rad
CompactPrep Plasmid Midi Kit	Qiagen
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen
Exo-Flow Capture Kit	System Biosciences
Exo-spin Exosome Purification Kit	Cell Guidance Systems
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific
In-Fusion HD Cloning Kit	Clontech
MultiSite Gateway Pro Kit	Invitrogen
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	Clontech
Omniscript RT Kit	Qiagen
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific
Plasmid Plus Midi Kit	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Quick Ligation Kit	New England Biolabs

Total Exosome Isolation Reagent (from cell culture media)	Invitrogen
Total Exosome RNA & Protein Isolation Kit	Invitrogen
TURBO DNA-free Kit	Thermo Fisher Scientific

2.11 Verbrauchsmaterial

Material	Firma
12% Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Protein Gels, 10 well, 50 µl	Bio-Rad
Aufbewahrungsflaschen 500 mL	Corning
Combitips advanced 10 mL	Eppendorf
Einmalspritze 20 mL	B. Braun
Einmalspritze 50 mL	Ecoject
Einwegzählkammer C-Chip	Digital Bio
FACS-Röhrchen	Corning
Kimtech Science Precision Wipes	Kimberly-Clark
Kryoröhrchen 2 mL	Corning
LightCycler 480 Multiwell Plate 96, white	Roche
Mikrozentrifugenreaktionsgefäße 1,5 mL, 2 mL	Eppendorf
Parafilm	Bemis
Petrischalen 10 cm	Corning
Pipettenspitzen 10 µL OneTouch Barrier	Sorenson BioScience
Pipettenspitzen für Multistepper-Pipette 10 mL	Eppendorf
Pipettenspitzen mit Filter 10 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL	Greiner Bio-One
Precision Plus Protein Dual Color Standards	Bio-Rad
Prot/Elec Tips	Bio-Rad
PVDF Immun-Blot membrane for protein blotting	Bio-Rad
Reaktionsgefäße 1,5 mL, 2 mL	Eppendorf
Reaktionsgefäße für PCR 0,2 mL	Kisker Biotech
Spritzenfiltervorsätze, Sterilfilter 0,2 µm	Sartorius

Spritzenfiltervorsätze, Sterilfilter 0,45 µm	Sartorius
Spritzenfiltervorsätze, Sterilfilter 0,45 µm	Millex-HP
Stripetten 2 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL, 50 mL	Corning
Trans-Blot Mini Filter Paper	Bio-Rad
Vakuumpumpenfilter, Sterilfilter 0,2 µm	Sartorius
Zählkammer C-Chip	NanoEnTek
Zellinkubationsröhrchen 14 mL	Greiner Bio-One
Zellkulturflaschen T-25, T-75, T-175, T-225	Corning
Zellkulturplatten 6-Well, 24-Well, 96-Well	Corning
Zentrifugenröhrchen 15 mL, 50 mL	Corning
Zentrifugenröhrchen 50 mL (geeignet für 20.000 x g)	Loboglob

2.12 Geräteliste

Gerätetyp	Bezeichnung	Firma
Analysenwaage	ALS-160-4A	Kern & Sohn
CO ₂ -Inkubator	MCO-20AIC	Sanyo
CO ₂ -Inkubator	Heraeus BBD6220	Thermo Scientific
DNS-/RNS-UV-Reinigungsbox	UVC/T-M-AR	Biosan
Durchflusszytometer	Cytomics FC 500	Beckman Coulter
Einfriercontainer	Mr. Frosty	Thermo Scientific
Eismaschine	ZBE 30-10	Ziegra
Elektroporator	Neon Transfection System	Thermo Scientific
Fluoreszenzmikroskop	DMI6000 B	Leica Microsystems
Geldokumentationsanlage	UviproChemi	Biometra
Gelelektrophoresekammer	Sub-Cell GT	Bio-Rad
Gelelektrophoresekammer	Mini-Sub-Cell GT	Bio-Rad
Gelelektrophoresekammer	Mini-PROTEAN Tetra System	Bio-Rad
Gelgießanlage	Gel Caster	Bio-Rad

Gelschale	Sub-Cell GT UV-Transparent Gel Tray	Bio-Rad
Inverses Mikroskop	DM IL	Leica Microsystems
Kamera Fluoreszenzmikroskop	DFC340 FX	Leica Microsystems
Kleinschüttler	MS2	IKA
Lichtquelle Fluoreszenzmikroskop	EL6000	Leica Microsystems
Magnetrührer	MR Hei-Standard	Heidolph
Magnetständer	Exo-Flow Multifunctional Magnetic Stand	System Biosciences
Membranpumpe	Laboport N811KN.18	KNF
Multistepper-Pipette	Multipette plus	Eppendorf
Nanopartikel Tracking-Analysator	ZetaView PMX 110	Particle Metrix
Nanopartikel Tracking-Analysator	NanoSight NS300	Malvern Instruments
Nanophotometer	NanoPhotometer Pearl	Implen
Objektiv Fluoreszenzmikroskop	HCX PL Fluotar 10x/0.30 PH1 (506507)	Leica Microsystems
Objektiv Inverses Mikroskop	10x/0.22 HI PLAN I (506263)	Leica Microsystems
Objektiv Inverses Mikroskop	20x/0.30 HI PLAN I (506264)	Leica Microsystems
Pipetten	Pipetman	Gilson
Pipetten	Reference	Eppendorf
Pipetten	Research plus	Eppendorf
Pipettierhilfe	Pipetboy acu	Integra
Platten-Photometer	Reader Infinite 200 PRO	Tecan
Platten-Photometer	Spark 10M	Tecan
Plattformschüttler	Duomax 1030	Heidolph
Präzisionswaage	EW 600 2M	Kern & Sohn
qPCR-Gerät	LightCycler 480 II	Roche
Schüttelinkubator + Inkubatorhaube	KS-15 Control + TH 15	Edmund Bühler
Spannungsgerät Gelelektrophorese	PowerPac Basic	Bio-Rad
Standautoklav (vertikal)	Systec VX-65	Systec

Sterile Werkbank	Herasafe HS12 Heraeus	Kendro
Sterile Werkbank	Herasafe HS15 Heraeus	Kendro
Taumelschüttler	GyroMini	Labnet
Thermomixer	Compact 5350	Eppendorf
Thermomixer	BioShake iQ	Q.Instruments
Thermozykler	TProfessional Basic	Biometra
Tischabzug	Systemkanal 165/93	Wesemann
Transferkammer Western Blot	Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad
Vakuumpollektor	QIAvac 24 Plus	Qiagen
Vortexmischer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Vortexmischer	Bio Vortex V1	Kisker Biotech
Wärmeschrank	Heraeus Function Line	Thermo Scientific
Wasserbad	WNB 14	Memmert
Zentrifuge	Heraeus Fresco 21	Thermo Scientific
Zentrifuge	5810R	Eppendorf
Zentrifuge	Heraeus Megafuge 11R	Thermo Scientific
Zentrifuge	Quick Spin Minifuge	Labnet

2.13 Software

Bezeichnung	Firma
ImageJ	Wayne Rasband (NIH)
In-Fusion Tool	Clontech (Website)
Kaluza Analysis 1.3	Beckman Coulter
Leica Application Suite X (LAS X)	Leica Microsystems
LightCycler 480 Software, Version 1.5	Roche
NTA 3.2 Dev Build 3.2.16	Malvern Instruments
Oligonucleotide Properties Calculator	Metabion (Website)
SeqBuilder Lasergene 12	DNASTAR
Snipping Tool Plus 3.4.1.0	René Zeidler

3 Methoden

3.1 Kultivierung von Bakterien

3.1.1 Herstellung von Selektionsagarplatten

Es wurden 40 g *LB-Agar Powder* in eine 1 L Laborglasflasche eingewogen und mit 1 L VE-Wasser vermischt. Anschließend wurde die Flasche autoklaviert. Nachdem die Flasche auf unter 50 °C abgekühlt war, wurde dem LB-Agar Ampicillin zugefügt und auf eine Endkonzentration von 100 µg/mL eingestellt.

Pro Petrischale mit einem Durchmesser von 10 cm wurden ca. 20 mL Selektionsagar eingefüllt. Nachdem die gegossenen Selektionsplatten erkaltet waren, wurden diese bei 4 °C in einem Plastikbeutel bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

3.1.2 Herstellung von Selektionsmedium

Es wurden 40 g *LB-Medium Powder* bzw. *Circlegrow Powder* in eine 1 L Laborglasflasche eingewogen, mit 1 L VE-Wasser gemischt und anschließend autoklaviert. Vor Selektion einer *E. coli*-Kultur wurde die benötigte Menge an Medium mit Ampicillin auf eine finale Konzentration von 100 µg/mL eingestellt.

3.1.3 Inokulation und Mini-Kultivierung

Zur Inokulation einer *E. coli*-Mini-Kultur wurde ein Klon mittels 10 µL-Pipettenspitze von der Selektionsagarplatte gepickt und die Pipettenspitze in ein Zellinkubationsröhrchen mit 1 mL bis 3 mL *LB*- bzw. reichhaltigerem *Circlegrow*-Selektionsmedium transferiert.

Die Kultivierung des Klons erfolgte im Schüttelinkubator bei 225 rpm und 37 °C, bis eine milchige Trübung auf Grund des Bakterienwachstums im Medium auftrat.

3.1.4 Inokulation und Midi-Kultivierung

Zur Inokulation einer *E. coli*-Midi-Kultur wurden 100 µL einer Mini-Kultur in 50 mL *LB*-Selektionsmedium mit einer Ampicillinkonzentration von 100 µg/mL injiziert. Die Inkubation der Kultur erfolgte im Schüttelinkubator für 16 h bei 225 rpm und 37 °C.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung von Zellen

Zellen wurden in Zellkulturflaschen bzw. -platten bei einer Temperatur von 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und einer Atmosphäre von 5 % Kohlenstoffdioxid in für die Zellen entsprechenden Medien kultiviert. Bei einer maximalen Konfluenz von 90 % wurden die Zellen gesplittet. Alle verwendeten Zellkulturen waren frei von Mykoplasmen.

3.2.2 Passagieren von Zellen

Beim Passagieren von Suspensionszellen wurden die Zellen für 5 min bei max. 600 x g und 18 °C zentrifugiert, das Zellpellet im entsprechenden Medium resuspendiert und in einem neuen Kulturgefäß ausgesät.

Handelte es sich um adhärente Zellen, so wurde zunächst der Überstand der Zellkultur abgenommen und der Zellrasen mit *PBS* gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit vorgewärmten *TrypLE Select 1x* im Brutschrank solange inkubiert, bis diese sich durch leichtes Klopfen gegen das Zellkulturgefäß ablösen. Die erhaltene Zellsuspension wurde mit mindestens dem gleichen Volumen an serumhaltigem Medium zur Neutralisierung des *TrypLE Select 1x* vermischt und mittels Stripette resuspendiert, um Zellverklumpungen aufzuschließen. Anschließend wurden die Zellen analog zu Suspensionszellen sedimentiert und mit dem geeigneten Medium ausgesät.

3.2.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Anzahl an Zellen wurde mit Hilfe von *C-Chip* Einweg-Zählkammern festgestellt. Um die Zellviabilität zu bestimmen, wurden die Zellen vor dem Zählen mit einer Trypanblau-Lösung verdünnt.

3.2.4 Antibiotika-Selektion

3.2.4.1 Selektion transduzierter HT1080-Zellen

Die Selektion der transduzierten HT1080-Zellen erfolgte drei Tage nach deren Transduktion. Dazu wurde HT1080-Medium mit Puromycin Dihydrochlorid auf eine Konzentration von 5 µg/mL eingestellt und die entsprechenden Zellen darin selektiert.

3.2.4.2 Selektion transfizierter L87/4 -Zellen

L87/4_IP-10_FramycPi_sGFP_ZIP-Zellen wurden vor dem Einfrieren mit L87/4-Medium, welches mit Blasticidin S HCl und Hygromycin B versetzt wurde, kultiviert.

3.2.5 Herstellung eines Zell-Batches

Zur Herstellung eines Zell-Batches wurden die entsprechenden Zellen in Zellkulturflaschen in CO₂-Inkubatoren unter den beschriebenen Zellkulturbedingungen (s. 3.2.1) expandiert. Bei einer ausreichend hohen Zelldichte wurden die Zellen gesplittet und zu 5 x 10⁶ Zellen je 1 mL Einfriermedium aliquotiert und kryokonserviert.

Bei der Generierung einer Population transduzierter Zellen fand die Expansion der Zellen im Selektionsmedium statt. Die Expression des Transgens wurde dabei während der Expansion als auch vor dem Einfrieren der Zellen mittels Durchflusszytometer gemessen.

3.2.6 Kryokonservierung von Zelllinien

Zelllinien wurden in einem Gemisch aus 90 % *FBS* und 10 % *DMSO* resuspendiert und in Kryoröhrchen für mindestens vier Stunden bei -80 °C in einem Einfriercontainer gelagert, bevor sie in einem Stickstofftank bei -196 °C kryokonserviert wurden.

3.2.7 Auftauen von Zellen

Eingefrorene Zellen wurden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, resuspendiert und in ein mit entsprechendem Medium vorgelegtes Zentrifugenröhrchen überführt. Nach 5-minütiger Zentrifugation der Zellsuspension bei 300 x g und 18 °C wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in einer geeigneten Menge Medium resuspendiert und ausgesät.

3.2.8 Inkubation von Zellen mit Exosomen

5×10^4 Suspensionszellen pro Kavität einer 24-Well-Zellkulturplatte wurden mit 300 µL einer auf 500 µg/mL Proteinkonzentration verdünnten, in *RPMI 1640* gelösten Exosomensuspension für 6 h kultiviert.

Bei adhärierenden Zellen wurden dieselbe Anzahl an Zellen zunächst in 500 µL *EMEM* + 10 % *FBS* pro Kavität einer 24-Well-Zellkulturplatte über Nacht im Brutschrank inkubiert und nach Abnahme des Mediums entsprechend den Suspensionszellen mit in *EMEM* gelösten Exosomen kultiviert.

3.2.9 Blockieren des Liganden *CXCL10*

Zur Neutralisierung des *IP-10*-Liganden von L87/4_TF#110-Exosomen wurden vor Durchführung der Versuche zur Übertragung von Exosomen auf Jurkat-Zellen 3 µg anti-*CXCL10*-Antikörper mit 150 µg Exosomen in 300 µL *RPMI 1640* vermischt.

3.3 Gewinnung von Exosomen

3.3.1 Aussaat der Zellen

Vor Aufreinigung von Exosomen aus Zellkulturüberständen wurden 5×10^6 Zellen aus einem angelegten Batch in vier T225-Zellkulturflaschen mit jeweils 50 mL Medium ausgesät. Bei einer maximalen Konfluenz von 90 % wurde das Zellkulturmedium abgenommen und nach zweimaligem Waschen der Zellen mit *PBS* durch 15 mL serumfreies Medium pro Flasche ersetzt. Anschließend wurden die Zellen für weitere zwei bzw. drei Tage inkubiert und die Überstände danach gepoolt.

3.3.2 Aufreinigung von Exosomen aus dem Zellkulturüberstand

Um abgelöste Zellen aus dem Überstand zu entfernen, wurde dieser zunächst für 10 min bei 4 °C und 300 x g zentrifugiert und durch einen Filter mit einer Porengröße von 0,45 µm gedrückt.

Die Entfernung von Zelltrümmern erfolgte durch eine 30-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 20.000 x g und eine darauffolgende Filtration des Überstandes durch eine Membran mit einer Porengröße von 0,2 µm.

Anschließend wurde der Überstand mit *Total Exosome Isolation Reagent* vermengt und auf einem Schüttler bei 4 °C über Nacht gemischt. Die Menge an zugesetztem *Total Exosome Isolation Reagent* entsprach dabei der Hälfte des Überstandsvolumens.

Nach einer 90-minütigen Zentrifugation bei 4 °C und 10.000 x g konnte das Exosomenpellet in *PBS* für die weiteren Analysen bzw. im serumfreien Medium für Transfer-Versuche resuspendiert und in 1,5 mL bzw. 2 mL Reaktionsgefäße aliquotiert werden.

Die Exosomensuspensionen wurden bis zur weiteren Verwendung ohne Zusätze bei -80 °C eingefroren.

3.4 Biochemische Methoden

3.4.1 Herstellung von Zelllysaten

Nach Ernte von Exosomen wurden die Zellen mit *PBS* gewaschen und für 5 min bei 500 x g und 4 °C zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen und das Zellpellet in *PBS* resuspendiert wurde, wurden die Zellen für 10 min bei 2500 x g und 4 °C erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wurde daraufhin in ein mit Protease- und Phosphataseinhibitor versetztes Lyse-Reagenz aufgenommen und für 10 min bei RT sanft geschüttelt. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation bei 4 °C und 14.000 x g wurde der Proteingehalt des Überstandes mittels Nanophotometer bestimmt und das Zelllysate bei -80 °C eingefroren.

3.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels *BCA*

Die quantitative Proteinbestimmung mittels *Pierce BCA Protein Assay Kit* wurde gemäß den Anweisungen des Herstellers in einer 96-Well-Zellkulturplatte durchgeführt. Die Messung der Proben erfolgte mit Hilfe eines Plattenphotometers bei 562 nm.

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 Klonierungsarbeiten

Die Klonierungsarbeiten bei der Generierung der Plasmide #230, #231, #232, #233, #234 und #235 wurden mittels *In-Fusion HD Cloning Kit* durchgeführt. Dabei können linearisierte DNS-Fragmente über homologe Rekombination in einen Vektor eingefügt werden.

Wichtig hierzu ist, dass das entsprechende *Insert* zu beiden Seiten Überhänge von jeweils 15 bp aufweist, welche mit den Enden des linearisierten Ziel-Vektors übereinstimmen. Diese Überhänge können über Vorwärts- und Rückwärts-*Primer* in einer *PCR*-Amplifikation generiert werden. Um mehrere DNS-Sequenzen von Interesse in einen Vektor zu klonieren, können diese davor fusioniert werden.

3.5.1.1 Klonierung der Konstrukte #230, #231 und #232

Die Klonierungsarbeiten wurden mittels *In-Fusion HD Cloning Kit* durchgeführt. Die Zusammensetzung der Klonierungsreaktionen für die Konstrukte #230, #231 und #232 ist in Tabelle 1 aufgeführt. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend für 15 min bei 50 °C in einem Thermomixer inkubiert.

Reagenz	Volumen [μL]	Konzentration
5x <i>In-Fusion HD Enzyme Premix</i>	2	1x
Linearisierter Vektor	entsprechend	50 ng
Aufgereinigtes <i>PCR</i> -Fragment	entsprechend	50 ng
H ₂ O (<i>PCR</i> -geeignet)	auf 10 μL auffüllen	
Reaktionsvolumen	10	

Tabelle 1: Reagenzien für die Klonierungsreaktionen der Konstrukte #230, #231 und #232 mittels *In-Fusion HD Cloning Kit*.

3.5.1.2 Klonierung der Konstrukte #233 und #234

Die für die *In-Fusion*-Klonierung der Konstrukte #233 und #234 benötigten Mengen an aufgereinigten *PCR*-Fragmenten und dazugehöriger Vektor-DNS wurden mittels *In-Fusion Molar Ratio Calculator* berechnet. Bei der Berechnung wurden zum einen die Längen der *PCR*-Produkte sowie der Vektoren berücksichtigt und zum anderen das molare Verhältnis von *PCR*-Fragment zu Vektor mit 2:1 angegeben.

Die Zusammensetzung der Klonierungskomponenten für die Konstrukte #233 und #234 ist in Tabelle 2 aufgeführt.

Da das gemeinsame Volumen von linearisiertem Vektor und aufgereinigtem *PCR*-Fragment in beiden Fällen über 7 μL betrug, wurde hier das Gesamtreaktionsvolumen auf 20 μL erhöht und dementsprechend die doppelte Menge an *5x In-Fusion HD Enzyme Premix* eingesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend für 15 min bei 50 °C in einem Thermomixer inkubiert.

Reagenz	Volumen [μL]	Konzentration
5x <i>In-Fusion HD Enzyme Premix</i>	4	1x
Linearisierter Vektor	entsprechend	<i>In-Fusion Molar Ratio Calculator</i>
Aufgereinigtes <i>PCR-Fragment</i>	entsprechend	<i>In-Fusion Molar Ratio Calculator</i>
H_2O (<i>PCR-g geeignet</i>)	auf 20 μL auffüllen	
Reaktionsvolumen	20	

Tabelle 2: Reagenzien für die Klonierungsreaktionen der Konstrukte #233 und #234 mittels *In-Fusion HD Cloning Kit*.

3.5.2 Dephosphorylierung von 5'-DNS-Fragmentenden

Vor der Ligationsreaktion erfolgte die Dephosphorylierung von 5'-DNS-Fragmentenden mittels *Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal (CIP)*.

3.5.3 Ligation

Die Ligation von DNS-Segmenten wurde mit Hilfe des *Quick Ligation Kits* durchgeführt. Dabei wurden 50 ng an Vektor eingesetzt und ein 5-facher molarer Überschuss des Inserts im Verhältnis zum Vektor festgelegt. Die dabei für die Ligation verwendete Menge an Insert ergab sich aus folgender Formel:

$$m_I = \frac{l_I * m_V * F_{I/V}}{l_V}$$

m_I = Menge an einzusetzenden Insert [ng]

l_I = Länge des Inserts [bp]

m_V = Menge an eingesetzten Vektor [ng]

$F_{I/V}$ = Faktor an molarem Überschuss des Inserts im Verhältnis zum Vektor

l_V = Länge des Vektors [bp]

3.5.4 Transformation

Die Transformation der DNS in Bakterienzellen wurde mit Hilfe von *Stellar Competent Cells* durchgeführt. Dazu wurden diese in einem Eisbad aufgetaut und 50 µL der kompetenten Zellen mit 2,5 µL (aus Rekombinationsansatz) bzw. 5 µL (aus Ligationsansatz) der zu transformierenden DNS vermischt. Das Gemisch wurde für 30 min auf Eis gelegt und anschließend für 60 s bei 42 °C im Thermomixer hitzegeschockt. Nach 2-minütiger Abkühlung auf Eis wurde das Gemisch mit *SOC Outgrowth Medium* auf ein finales Volumen von 500 µL aufgefüllt und im Schüttelinkubator für 1 h bei 225 rpm und 37 °C inkubiert. Schließlich wurden unterschiedliche Mengen der Kultur mittels sterilem Drigalskispatel auf Selektionsagarplatten ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht im Wärmeschrank inkubiert.

3.5.5 Retransformation

5 µL der aus *E. coli* präparierten Plasmide wurden zur Sicherung bei -20 °C eingefroren. Bei einer Retransformation wurden 10 ng der Plasmid-DNS mit 50 µL *One Shot Stbl3 Chemically Competent E. Coli* für 30 min auf Eis inkubiert. Das Gemisch wurde daraufhin für 45 s bei 42 °C im Thermomixer hitzegeschockt und anschließend für 2 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 250 µL *SOC Outgrowth Medium* wurde die Kultur im Schüttelinkubator für 1 h bei 37 °C und 225 rpm bebrütet und anschließend in unterschiedlichen Mengen mittels sterilem Drigalskispatel auf Selektionsagarplatten ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht im Wärmeschrank inkubiert.

3.5.6 Isolierung von Plasmid-DNS

3.5.6.1 Mini-Präparation

Die Mini-Präparation einer *E. coli*-Kultur wurde mittels *QIAprep Spin Miniprep Kit* oder *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* nach Herstellerangaben mit einer Zentrifuge durchgeführt. Die Konzentration der DNS wurde anschließend mittels Nanophotometer gemessen.

3.5.6.2 Midi-Präparation

Die verwendete Bakterienkultur wurde zunächst für 20 min bei 2100 x g und 4 °C zentrifugiert, bevor die Plasmidpräparation mittels *CompactPrep Plasmid Midi Kit* bzw. *Plasmid Plus Midi Kit* nach Herstellerangaben mit einem *QIAvac 24 Plus*-Vakuumkollektor durchgeführt wurde. Die Konzentration der eluierten DNS wurde schließlich mittels Nanophotometer gemessen.

3.5.6.3 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau von DNS erfolgte unter Verwendung verschiedener Restriktionsenzyme (s. 2.5) im dafür geeigneten Puffer bei 37 °C für 1,5 h bis 3 h. Dabei wurde zwischen analytischem und präparativem Verdau differenziert.

Für den analytischen Verdau wurden 200 ng bis 500 ng DNS, beim präparativen Verdau dagegen 2 µg bis 5 µg DNS eingesetzt.

3.5.6.4 Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurden Agarose-Gele mit einer Konzentration von 1 % und 2 % verwendet. Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose mit 1x *TAE*-Puffer aufgekocht und das Volumen an verdampfter Flüssigkeit mit *VE*-Wasser ausgeglichen. Nach Abkühlung des Gels auf ca. 50 °C wurden 5 µL *peqGREEN* mit 100 mL Agarose-Gel vermischt und das Gel anschließend in eine Gelschale mit Kamm gegossen. Nachdem das Gel erhärtet war, konnte der Kamm entfernt und das Gel in eine mit *TAE*-Puffer befüllte Gelelektrophoresekammer justiert werden. Vor Beladen des Gels wurde die Probe mit Ladefarbstoff gemischt. Zur Größenbestimmung der DNS-Fragmente diente je nach zu erwartenden Elementlängen eine 100 bp oder 1 kb DNS-Leiter.

Abhängig von der Größe des Gels lief die Elektrophorese bei einer Spannung von 90 V bzw. 130 V, bis die gewünschte Auftrennung der Banden erzielt war. Die Analyse und Bearbeitung des Gels erfolgten unter der UV-Strahlung einer Geldokumentationsanlage.

3.5.6.5 Gelextraktion

Das DNS-Fragment von Interesse wurde unter Verwendung eines Skalpells aus dem Agarose-Gel geschnitten. Im Anschluss daran erfolgte die Extraktion der DNS mittels *QIAquick Gel Extraction Kit* bzw. *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up*. Die Konzentration der isolierten DNS wurde daraufhin mit dem Nanophotometer gemessen.

3.5.7 Herstellung gamma-retroviraler Überstände

3.5.7.1 Aussaat von 293T-Zellen

Bei der Generierung gamma-retroviralen Überstandes wurden zunächst in 2 - 4 Petrischalen mit einem Durchmesser von 10 cm jeweils 5×10^6 293T-Zellen in 8 mL *DMEM high glucose + 10 % FBS* ausgesät und bei 37 °C über Nacht im Brutschrank kultiviert. Anschließend wurde das Medium abgenommen und durch 5 mL Chloroquin-Medium mit einer Konzentration von 25 µM für mindestens 1 h ersetzt.

3.5.7.2 Transfektion der 293T-Zellen zur Virusproduktion

Die Transfektion der 293T-Zellen erfolgte mittels *Calcium Phosphate Transfection Kit*. Dazu wurden pro Ansatz 12,5 µg *pcDNA3-MLV-gagpol* mit 2 µg *M620 (Galv Env)* und 7,5 µg des Transfervektors gemischt und mit dem im Kit enthaltenen Wasser auf ein Volumen von 450 µL aufgefüllt. Anschließend werden 50 µL CaCl_2 hinzugefügt.

Der Transfektionsansatz wurde unter Schütteln tröpfchenweise in ein weiteres Zentrifugenröhrchen mit 500 µL *2x HEPES Buffered Saline* zugegeben. Die Lösung wurde für 20 min bei RT inkubiert, bevor sie gleichmäßig unter Schwenken der Petrischale auf das Zellkulturmedium getropft wurde. Nach 6- bis 8-stündiger Kultivierung des Ansatzes im CO_2 -Inkubator wurde der Überstand der Zellen verworfen und durch 6 mL Medium ohne Chloroquin ersetzt.

3.5.7.3 Ernte der Virusüberstände

Nach einer weiteren Inkubation der transfizierten 293T-Zellen für 48 h wurde der Virusüberstand gesammelt, durch einen 0,45 µm-Sterilfilter gedrückt und bei 4 °C aufbewahrt.

Die Zellen wurden anschließend mit 6 mL frischem Medium nochmalig 24 h im Brutschrank für eine zusätzliche Ernte des Virusüberstandes kultiviert. Beide Überstände wurden schließlich gepoolt, zu je 2 mL aliquotiert und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

3.5.8 Titration gamma-retroviraler Überstände auf HT1080-Zellen

Zur Analyse des Titers der Virusüberstände wurden die Kavitäten einer 6-Well-Zellkulturplatte mit 2 mL einer 0,01%igen Poly-L-Lysin-Lösung (PLL-Lösung), welche mit PBS im Verhältnis 1:10 verdünnt wurde, für 2 h bei RT beschichtet und anschließend mit 2 mL PBS gewaschen. Danach wurden 2 mL des Virusüberstandes in unterschiedlichen Verdünnungsstufen in Duplikaten für 30 min bei 4 °C und 2000 x g auf die mit PLL-Lösung behandelten Platten zentrifugiert. Als Negativkontrolle wurde 293T-Medium verwendet.

Nach der Zentrifugation wurden die Überstände abgenommen, die Kavitäten mit jeweils 2 mL PBS gewaschen und $4,5 \times 10^4$ HT1080-Zellen je Vertiefung mit 3 mL Zellkulturmedium ausgesät. Die Zellen wurden für mindestens 48 h im Brutschrank kultiviert und dann im Durchflusszytometer hinsichtlich GFP-positiver Zellen analysiert.

Zur Berechnung des Titers wurden die Proben mit der jeweiligen Verdünnung herangezogen, bei welchen die Transduktionseffizienz zwischen 5 % und 20 % lag.

Der Titer lies sich wie folgt berechnen:

$$T_V = \frac{n\%_{GFP} * N(Z) * F_{Vd}}{100 * V_{VÜ}}$$

$$T_V = \text{Titer des Vektors} \left[\frac{TU}{mL} \right]$$

$$n\%_{GFP} = \text{GFP-positiv e Zellen} [\%]$$

$$N(Z) = \text{Anzahl an ausgesäten Zellen}$$

$$F_{Vd} = \text{Verdünnungsfaktor}$$

$$V_{VÜ} = \text{Volumen des viralen Überstandes} [mL]$$

3.5.9 Transduktion von HT1080-Zellen mit viralem Überstand

Die Transduktion von $1,125 \times 10^6$ HT1080-Zellen erfolgte in einer T225-Zellkulturflasche mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 1.

Dazu wurden die zu transduzierenden Zellen in *PBS* auf eine Konzentration von $1,125 \times 10^6$ Zellen/mL eingestellt.

Das für die Transduktion benötigte Vektorvolumen wurde nach folgender Formel berechnet:

$$V_{VÜ} = \frac{N(Z) * MOI}{T_V}$$

$V_{VÜ}$ = Volumen des viralen Überstandes [mL]

$N(Z)$ = Anzahl der zu transduzierenden Zellen

MOI = *multiplicity of infection*

T_V = Titer des Vektors [$\frac{TU}{mL}$]

Dem Virusüberstand $V_{VÜ}$ wurde im Verhältnis 1:100 eine 0,01%ige PLL-Lösung zugesetzt und das Gemisch anschließend mit 1 mL der zu transduzierenden Zellsuspension vermischt.

Das bei einer Aussaatkonzentration c_A von $0,10 \text{ mL/cm}^2$ für die Inkubation der Zellen in einer T225-Zellkulturflasche fehlende Restvolumen wurde mit *PBS* ausgeglichen und richtete sich nach folgender Formel:

$$V_{PBS} = A_A * c_A - V_{ZVP}$$

V_{PBS} = Volumen an *PBS* [mL]

A_A = Aussaatfläche [cm^2]

c_A = Aussaatkonzentration [mL/cm^2]

V_{ZVP} = Volumen des Zellen-Vektor-PLL-Gemisches [mL]

Nach 3-stündiger Inkubation im Brutschrank wurden 45 mL HT1080-Medium dem Transduktionsansatz beigemischt. Weitere drei Tage später wurde die Transduktionseffizienz anhand der *GFP*-Expression der Zellen durchflusszytometrisch erfasst.

3.5.10 DNS-Sequenzierung

Nach Fertigstellung der Plasmidkonstrukte #230, #233, #234 und #235 wurde die jeweilige DNS zur Verifizierung neben einem analytischen Restriktionsverdau zusätzlich von der Firma Microsynth AG mittels geeigneter *Primer* sequenziert.

3.5.11 Aufreinigung der RNS

Die RNS aus Exosomen wurde mittels *Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit*, wie in der Anweisung des Herstellers beschrieben, isoliert.

Dazu wurden die entsprechenden Exosomen denaturiert und die RNS mit Hilfe einer Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert. Nachdem die RNS in einer Filterkartusche gebunden und gewaschen wurde, wurde die Konzentration der eluierten RNS per Nanophotometer gemessen. Die Probe wurde dann mit der Eluierungslösung auf die gewünschte Konzentration verdünnt.

3.5.12 Verdau von DNS

Die aus den Exosomen isolierte RNS wurde mit dem *TURBO DNA-free Kit* nach Protokoll des Herstellers behandelt, um mögliche DNS-Kontaminationen zu entfernen.

Dazu wurde die RNS enthaltene Probe mit einem Zehntel ihres Volumens mit *10x TURBO DNase Buffer* und 1 μL *TURBO DNase* für 25 min im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Nachdem die DNase inaktiviert wurde, konnte die *DNase Inactivation Reagent* über eine eineinhalbminütige Zentrifugation bei 10.000 x g sedimentiert und der RNS enthaltende Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden.

3.5.13 Synthese der *cDNA*

Die Umschreibung der RNS in *cDNA* erfolgte mittels *Omniscript RT Kit*. Als Kontrolle dienten Proben ohne RT. Das dabei offene Volumen wurde mit RNase-freiem Wasser ausgeglichen. Die Zusammensetzung der Reaktionskomponenten für eine Reaktion ist in Tabelle 3 gelistet.

Komponenten	Volumen/Reaktion [μL]	Konzentration
<i>10x Buffer RT</i>	2	1x
<i>dNTP Mix</i> [0,5 mM/dNTP]	2	0,5 mM/dNTP
<i>Oligo d(T)₁₆ primer</i> [50 μM]	0,4	1 μM
RNase Inhibitor [40 Einheiten/ μL]	0,25	10 Einheiten
<i>Omniscript Reverse Transcriptase</i>	1	4 Einheiten
H ₂ O (RNase-frei)	optional	
RNS-Templat	optional	bis zu 2 μg
Reaktionsvolumen	20	

Tabelle 3: Reagenzien für die Synthese von *cDNA* aus RNS mittels *Omniscript RT Kit*.

Alle Reaktionskomponenten wurden auf Eis gehalten. Die Bestandteile wurden in einem 200 μL -Reaktionsgefäß für maximal 5 s gevortext und nach kurzer Zentrifugation bei 37 °C für 1 h in einem Thermozykler inkubiert. Anschließend wurde die Probe auf Eis gekühlt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

3.5.14 Amplifizierung der *cDNA* mittels *qRT-PCR*

Zur Durchführung der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (*qRT-PCR*) wurden sowohl für die zu amplifizierende Zielsequenz als auch für das Haushaltsgen *GAPDH* Mastermixe angefertigt.

Die Amplifizierung der *cDNA* fand unter Verwendung von *LightCycler 480 SYBR Green I Master* statt. Die zur jeweiligen DNS-Vervielfältigung benötigten Reagenzien sind in Tabelle 4 bzw. Tabelle 5 aufgeführt.

Komponenten - <i>eGFP</i>	Volumen/Reaktion [μL]	Konzentration
H ₂ O (<i>PCR-geeignet</i>)	optional	
2x <i>LightCycler 480 SYBR Green I Master</i>	10	1x
Primer #393 (<i>EGFP-forward</i>) [100 μM]	0,04	200 nM
Primer #394 (<i>EGFP-reverse</i>) [100 μM]	0,04	200 nM
<i>cDNA</i> -Templat	optional	
Reaktionsvolumen	20	

Tabelle 4: Komponenten für die Amplifizierung von *eGFP-cDNA* mittels *qRT-PCR*.

Komponenten - <i>GAPDH</i>	Volumen/Reaktion [μL]	Konzentration
H ₂ O (<i>PCR-geeignet</i>)	optional	
2x <i>LightCycler 480 SYBR Green I Master</i>	10	1x
Primer #391 (<i>GAPDH-forward</i>) [100 μM]	0,04	200 nM
Primer #392 (<i>GAPDH-reverse</i>) [100 μM]	0,04	200 nM
<i>cDNA</i> -Templat	optional	
Reaktionsvolumen	20	

Tabelle 5: Komponenten für die Amplifizierung von *GAPDH-cDNA* mittels *qRT-PCR*.

Anschließend wurde die entsprechende *cDNA* nach dem nachfolgenden Protokoll (Tabelle 6) amplifiziert. Als Kontrolle wurden Proben ohne *Reverse Transkriptase (RT)* verwendet.

Programm	Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Anstieg [°C/s]	Aufnahmemodus	Erfassungen [pro °C]
Präinkubation	1	95	5	4,4	-	
Amplifikation	45	95	10	4,4	-	
		56	15	2,2	-	
		72	15	4,4	einfach	
Schmelzkurve	1	95	5	4,4	-	
		58	60	2,2	-	
		97		0,11	permanent	5
Kühlung	1	40	30	2,2	-	

Tabelle 6: Protokoll zur Amplifizierung der *cDNA* mittels *qRT-PCR*.

3.5.15 Bestimmung der RNS- und DNS-Konzentration

Die Messung der RNS- und DNS-Konzentration wurde mittels Nanophotometer nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Es wurden zunächst 4 µL der Referenzprobe als *Blank* gemessen und anschließend die gleiche Menge einer Probe zur Konzentrationsbestimmung eingesetzt. Nach jeder Analyse wurde das Messfenster mittels Präzisionstuch gereinigt.

3.5.16 Amplifizierung von DNS

Die Amplifikation der DNS erfolgte mittels *CloneAmp Hifi PCR Premix* mit den in der Tabelle 7 aufgelisteten Reagenzien im Thermozykler unter entsprechenden Bedingungen (Tabelle 8).

Reagenz	Volumen [μL]	Konzentration
<i>CloneAmp Hifi PCR Premix</i>	12,5	1x
Vorwärts-Primer [50 μM]	1,25	2,5 μM
Rückwärts-Primer [50 μM]	1,25	2,5 μM
DNS-Templat	entsprechend	50 ng
H ₂ O (PCR-geeignet)	auf 25 mL auffüllen	
Reaktionsvolumen	25	

Tabelle 7: Reagenzien zur Amplifizierung der DNS mittels *PCR*.

Programm	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Zeit [s]	Zyklen
Amplifikation	98	10	35

Tabelle 8: Protokoll des Thermozyklers zur Vervielfältigung der DNS.

3.5.17 Plasmidkopienzahl

Die für die Plasmidkopienzahl (*VCN*) bestimmten Zellen wurden pelletiert und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

Zur Isolierung der DNS aus transduzierten und nativen HT1080-Zellen wurde das *DNeasy Blood & Tissue Kit* verwendet. Die Messung der DNS-Konzentration erfolgte mittels Nanophotometer.

Um die durchschnittliche in das Genom integrierte Kopienzahl des Vektors der einzelnen Konstrukte bestimmen zu können, wurden für jede isolierte DNS-Probe einer Zellpopulation zwei unterschiedliche *qPCR*-Ansätze durchgeführt.

Zum einen wurde das in der viralen DNS positionierte *optimized posttranscriptional regulatory element (oPRE)*, welches bei der Transduktion in das Genom der Zellen integriert, als auch der humane Gerinnungsfaktor VII (FVII) bestimmt.

FVII hat die Eigenschaft mit nur ausschließlich einer Kopie im Genom aufzutreten (*single-copy-Gen*) und kann somit als Referenz genutzt werden.

Die für die *qPCR*-Ansätze verwendeten Komponenten sind in Tabelle 9 bzw. Tabelle 10 gelistet.

5 μL einer DNS-Probe wurden mit 15 μL des jeweiligen vorgelegten Mastermixes in der Kavität einer *LightCycler 480 Multiwell Plate 96* vermischt und für 1 min bei 1000 x g zentrifugiert.

Als Positivkontrolle wurde DNS aus einem HT1080-Zellklon verwendet, welche nur eine Vektorkopie (*oPRE*-Integration) im Genom trägt. Als Negativkontrollen kamen sowohl genomische DNS als auch *PCR*-geeignetes Wasser zum Einsatz.

Von jeder Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Amplifikation der Proben fand nach folgendem Protokoll statt (Tabelle 11).

Die *VCN* ergab sich dann aus der relativen Quantifizierung der Mengen an *oPRE* zu FVII, wobei die *VCN* der Positivkontrolle als $VCN = 1$ gesetzt wurde.

Alle in der Arbeit verwendeten transduzierten Zellen wiesen eine $VCN = 1$ bezüglich des jeweiligen Plasmids auf.

Komponenten (<i>oPRE</i>)	Volumen/Reaktion [μL]	Konzentration
H ₂ O (<i>PCR</i> -geeignet)	4,1	
Primer #275 (<i>oPRE_wPRE_VCN_fw</i>) [20 μM]	0,3	0,3 μM
Primer #142 (<i>WPRE (Roche) rev</i>) [20 μM]	0,3	0,3 μM
Sonde #63 <i>UPL</i> [10 μM]	0,3	0,15 μM
2x <i>LightCycler 480 Probes Master</i>	10	1x
DNS-Templat	5	
Reaktionsvolumen	20	

Tabelle 9: Komponenten zur Amplifizierung von *oPRE* mittels *qPCR* zur Bestimmung der *VCN*.

Komponenten (FVII)	Volumen/Reaktion [μL]	Konzentration
H ₂ O (PCR-geeignet)	4,25	
Primer #91 (<i>human_FVII_for</i>) [20 μM]	0,3	0,3 μM
Primer #92 (<i>human_FVII_rev</i>) [20 μM]	0,3	0,3 μM
Sonde #187 <i>FVII Probe</i> [20 μM]	0,15	0,15 μM
2x <i>LightCycler 480 Probes Master</i>	10	1x
DNS-Templat	5	
Reaktionsvolumen	20	

Tabelle 10: Komponenten zur Amplifizierung von FVII mittels *qPCR* zur Bestimmung der VCN.

Programm	Zyklen	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Zeit [min:s]
Präinkubation	1	95	10:00
Amplifikation	45	95	00:10
		60	00:30
Kühlung	1	40	00:30

Tabelle 11: Programmverlauf zur Vervielfältigung von *oPRE* und FVII mittels *qPCR* zur Bestimmung der integrierten Vektorkopien.

3.6 Proteinanalytische Methoden

3.6.1 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Nanophotometer

Die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Nanophotometer wurde gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden jeweils 4 μL der Referenzprobe als auch der zu messenden Probe eingesetzt. Nach jeder Analyse wurde das Messfenster mittels Präzisionstuch gereinigt.

Die weiteren Messungen zur Ermittlung der Proteinkonzentrationen von Exosomensuspensionen in dieser Arbeit erfolgten mittels Nanophotometer, nachdem sich vergleichbare Werte angesichts dieser Methode und der Proteinbestimmung mittels *BCA* ergaben (Abbildung 3). Die durchschnittliche Abweichung lag bei $6,75 \% \pm 5,42 \%$.

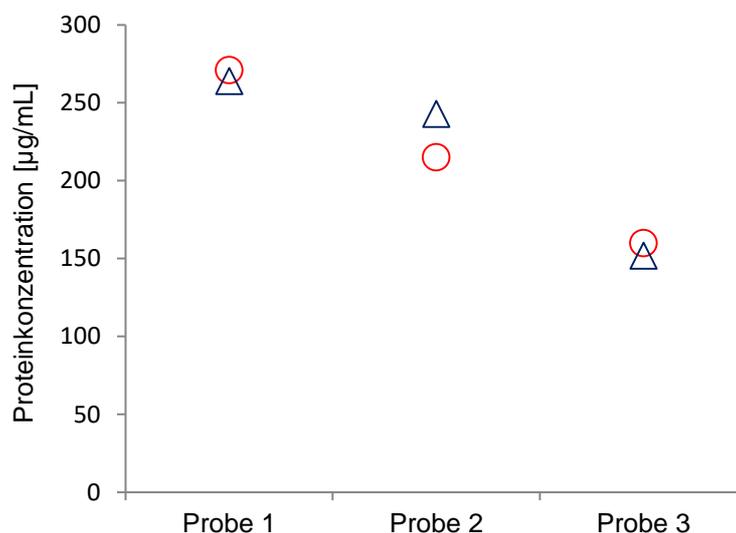


Abbildung 3: Vergleich zwischen *BCA* und Nanophotometer zur Messung der Proteinkonzentrationen. Es sind die Proteinkonzentrationen dreier unterschiedlicher Exosomenproben gemessen worden. Die blauen Dreiecke entsprechen den Analysen mittels *BCA*, wobei die roten Kreise die Messungen mittels Nanophotometer zeigen.

3.6.2 Western Blot

3.6.2.1 SDS-PAGE

45 µL einer auf die gewünschte Proteinkonzentration mit *PBS* verdünnten Probe wurde mit 5 µL reduzierenden 10-fachen Probenpuffer vermengt. Eine Ausnahme bildete die Detektion der Oberflächenmarker CD9, CD63 und CD81, hier wurde kein mit 2-Mercaptoethanol versetzter Probenpuffer verwendet. Anschließend wurde die Probe für 5 min bei 95 °C denaturiert und danach auf Eis gekühlt. 40 µL der denaturierten Probe wurden in eine Tasche eines 12 % Protein-Gels, welches in einer mit Laufpuffer befüllten Gelkammer eingespannt war, geladen. Die Gelelektrophorese lief bei einer Spannung von 100 V, bis Probe und Protein-Marker die am Ende des Gels aufgeführte Grenzmarkierung erreichten.

3.6.2.2 Proteintransfer

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine im Gel wurden diese auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) übertragen. Die Membran wurde dabei mit Methanol aktiviert und für drei Minuten in Transferpuffer äquilibriert. PVDF-Membran und Gel wurden gemeinsam zwischen zwei in Transferpuffer getränkten Filterpapieren und Schwämmen in einer Kassette zusammengeschlossen und in eine mit Transferpuffer gefüllte Transferkammer justiert. Die bei einer Transferzeit von 75 min und einer Spannung von 100 V erzeugte Hitze wurde durch einen sich im Transfertank befindenden -20 °C kalten Kühlakku absorbiert.

3.6.2.3 Immundetektion

Unspezifische Bindungsstellen auf der PVDF-Membran wurden für 1 h bei RT auf einem Schüttler mit Blockpuffer blockiert. Die Membran wurde daraufhin auf einem Schüttler bei 4 °C über Nacht mit einem Primär- und anschließend für 2 h bei RT mit dem entsprechenden Enzym-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert. Die Antikörper wurden dazu in Blockpuffer dissoziiert. Vor Detektion des Proteins mit Hilfe einer Geldokumentationsanlage wurde die PVDF-Membran für 5 min bei RT mit einem Chemilumineszenz-Substrat nach Angaben des Herstellers beaufschlagt. Zwischen den einzelnen Schritten wurde die Membran je dreimal für jeweils 5 min bei RT mit *PBST*-Waschpuffer gewaschen.

3.6.2.4 Coomassie-Färbung des Gels

Nach dreimaligem Waschen für jeweils 5 min mit Wasser wurde das Gel in Coomassie-Lösung auf einem Plattformschüttler bei RT für 1 h inkubiert. Anschließend wurde das Gel nochmals für 30 min mit Wasser gespült.

3.6.2.5 Ponceau S-Färbung der Membran

Bei der Ponceau S-Färbung wurde die Membran kurze Zeit in Methanol gelegt und dann für 5 min bei RT auf einem Schüttler mit Ponceau S-Lösung inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal bei RT für jeweils 2 min mit VE-Wasser gewaschen.

3.6.3 Durchflusszytometrie

3.6.3.1 Oberflächenfärbung von Zellen

Die zu färbenden Zellen wurden in 100 μL *PBS* resuspendiert und für 25 min bei RT im Dunkeln mit dem jeweiligen Antikörper inkubiert. Nachdem die Zellen zweimal mit 1 mL *PBS* gewaschen und jeweils bei 300 x g und 4 °C für 5 min zentrifugiert wurden, wurde das Zellpellet schließlich in 500 μL *PBS* aufgenommen und mittels Durchflusszytometer analysiert.

3.6.3.2 Intrazelluläre Färbung

0,5 x 10⁶ Zellen wurden in 250 μL *BD Cytfix/Cytoperm*-Lösung resuspendiert und für 20 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin zweimal mit 1 mL *1x BD Perm/Wash*-Puffer gewaschen und stets bei 600 x g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 100 μL *1x BD Perm/Wash*-Puffer resuspendiert und mit dem entsprechenden Antikörper für 25 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit *1x BD Perm/Wash*-Puffer, bevor die Zellen in 400 μL *PBS* aufgenommen und im Durchflusszytometer analysiert wurden.

3.6.3.3 Färbung von Exosomen

3.6.3.3.1 Bindung der Exosomen an *Beads*

Die Vorbereitungen zur Oberflächenfärbung von Exosomen erfolgten mittels *Exo-Flow Capture Kit* und dem dazugehörigen *Exo-Flow Multifunctional Magnetic Stand*.

Um Exosomen im Durchflusszytometer sichtbar machen zu können, mussten diese zunächst an *Beads* gekoppelt werden, wobei für jede gemessene Probe an Exosomen $3,2 \times 10^5$ magnetische Streptavidin-*Beads* mit einem Durchmesser von $9,1 \mu\text{m}$ verwendet wurden.

40 μL der *Bead*-Suspension wurde zunächst mit 10 μL des jeweiligen biotinylierten Antikörpers (Ak) inkubiert, an welchem in einem späteren Schritt die Exosomen gebunden werden sollten. Anschließend wurden die mit Ak konjugierten *Beads* zusammen mit 100 μL einer auf 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mit *PBS* verdünnten Exosomensuspension bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ über Nacht sanft geschüttelt. Für eine Messung reichte es aus, lediglich die Hälfte der Probe einzusetzen.

Je nach Versuch konnten nun die an die *Beads* gebundenen Exosomen über einen membrangängigen Farbstoff und/oder einen weiteren fluoreszierenden Ak sichtbar gemacht werden.

3.6.3.3.2 Färbung der Oberfläche

Nach Bindung der Exosomen an die entsprechenden *Beads* erfolgte die Färbung von exosomalen Oberflächenmarkern in 100 μL *PBS* für 25 min bei RT im Dunkeln mit dem jeweiligen Ak. Anschließend wurde die Probe dreimal mit jeweils 500 μL *Bead Wash buffer* gewaschen und für die Analyse mittels Durchflusszytometer in 300 μL *PBS* resuspendiert.

3.6.3.3.3 Färbung der Oberfläche und membrangebundener Proteinmodifikationen

Die Anfärbung membrangebundener Proteinmodifikationen wie u.a. Glykosylierungen, welche sehr häufig auf Oberflächen von Exosomen zu finden sind, erfolgte mittels *Exo-FITC*-Farbstoff, welcher Bestandteil des *Exo-Flow Capture Kits* war.

Nach Bindung der Exosomen an den auf den *Beads* gekoppelten Ak, wurde die Probe in 100 μL *PBS* + 140 μL *Exosome Stain Buffer* aufgenommen und mit 10 μL *Exo-FITC* für 2 h

auf Eis gefärbt. Die Probe wurde dabei alle 30 min zur Durchmischung angeschnippt, wobei in der letzten halben Stunde der gewünschte fluoreszierende Ak zugefügt wurde. Anschließend wurde die Probe nach Anleitung des Herstellers gewaschen und für die weitere durchflusszytometrische Messung in 300 μ L *PBS* aufgenommen.

3.6.3.3.4 Färbung der Oberfläche und Membran

Die Färbung der Exosomenmembran erfolgte mittels *Dil*-Farbstoff, der an die intakte Lipid-Doppelmembran bindet.

Zunächst wurde der Exosomen-*Beads*-Komplex in 100 μ L *PBS* aufgenommen und mit dem gewünschten Ak für 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Probe wurde dann mit *PBS* auf 1 mL aufgefüllt und für weitere 15 min mit 5 μ L *Dil* gefärbt. Anschließend wurde die Probe nach Anleitung des Herstellers gewaschen, in 300 μ L *PBS* resuspendiert und durchflusszytometrisch analysiert.

3.7 Klonierungsstrategien

apceth Biopharma interne Plasmide und *Primer* werden der Einfachheit halber mit fortlaufenden Nummern gekennzeichnet.

Alle in dieser Arbeit für die Transduktion in humane Fibrosarkom-Zellen bestimmten Plasmide gehen aus dem firmeninternen Plasmid #168 hervor. Die entsprechenden Plasmide sind in Abbildung 4 dargestellt.

Als gamma-retrovirales *Backbone* der Plasmide wurde das *pSERS11* (EP2019134 A1, Stein S., Grez M., Schambach A.) verwendet.

Die 5'-*Long terminal repeat*-Einheit (5'-*LTR*) impliziert zur Erzeugung retroviraler RNS einen Simian-Virus 40 (SV40) *Enhancer*, einen Rous-Sarkom-Virus-Promotor (pRSV) sowie eine aus dem Milzfokus-formenden-Polyzythämie-induzierender Virusstamm (*SFFVp*) gewonnene *redundant*-Region (*R*-Region) und *unique* 5'-Region (*U5*-Region).

Die Expression der Transgene erfolgte über einen humanen *elongation factor-1 alpha short promoter* (*pEFS*). Für die Spaltung zweier Proteine wurde das Peptid 2A (*P2A*) aus dem

porcinen Teschovirus-1 eingesetzt. Die interne ribosomale Eintrittsstelle zur Co-Expression zweier Gene stammte aus dem Encephalomyocarditis-Virus (EMCV).

Die 3'-LTR beinhaltet eine aus dem SFFVp stammende U3-Region mit einer Deletion, welche replikationsinkompetente Viren zur Folge hat. Zudem sind ein Polyadenylierungssignal (poly(A)-Signal) und zur Bildung retroviraler RNS eine R- und U5-Region aus dem SFFV enthalten.

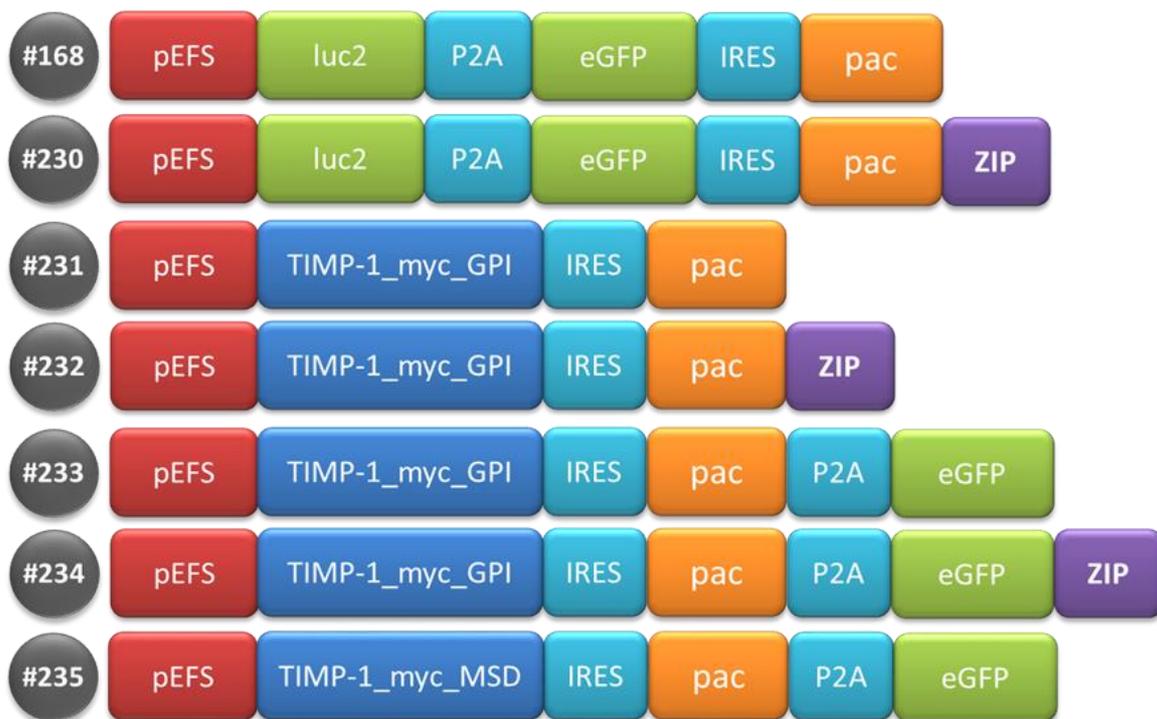


Abbildung 4: Schematische Darstellung der sequenziellen Abfolgen der Plasmide #168, #230, #231; #232; #233, #234 und #235. pEFS: *Elongation factor 1-alpha short promoter*; luc2: *Firefly luciferase 2*; P2A: *Peptid 2A*; eGFP: *Enhanced green fluorescent protein*; IRES: *Interne ribosomale Eintrittsstelle*; pac: *Puromycin N-Acetyltransferase*; TIMP-1: *Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1*; myc: *Myelocytomatose-Onkogen*; GPI: *Glycosylphosphatidylinositol*; ZIP: „*Zipcode*“-like-Sequenz; MSD: *Membrane-spanning domain*

3.7.1 Plasmid #230

Von dem Plasmid #168 *pSERS11_pEFS_luc2_P2A_eGFP_IRES_pac* ausgehend, konnte das Konstrukt #230 *pSERS11_pEFS_luc2_P2A_eGFP_IRES_pac_ZIP* generiert werden.

Dazu wurde das *IRES_pac*-Fragment aus Plasmid #168 mit Hilfe der Restriktionsenzyme *BamHI-HF* und *PacI* isoliert und unter Verwendung der *Primer #326* und *#327* mit der *ZIP*

versehen und amplifiziert. Das *PCR*-Produkt wurde im Anschluss daran in das *Backbone* von #168 rekombiniert.

Zur Überprüfung der Richtigkeit des fertigen Konstrukts wurden sowohl *HindIII*-HF + *BamHI*-HF als auch *DrdI* + *BamHI*-HF im jeweiligen Testverdau eingesetzt.

3.7.2 Plasmid #231

Um das Konstrukt #231 *pSERS11_pEFS_TIMP-1_myc_GPI_IRES_pac* zu generieren, wurde das Fragment *luc2_P2A_eGFP* mit *NcoI* und *BspEI* enzymatisch aus dem Konstrukt #168 *pSERS11_pEFS_luc2_P2A_eGFP_IRES_pac* entfernt.

Anschließend wurde die *TIMP-1_myc_GPI*-Sequenz aus dem Plasmid #229 *pEF_TIMP-1_myc_GPI*, welches von der Arbeitsgruppe Klinische Biochemie des Klinikums der Universität München zur Nutzung überlassen wurde, mit Hilfe der *Primer* #329 und #330 amplifiziert und in das *Backbone* von #168 transferiert.

Der Testverdau erfolgte mittels *DrdI*.

3.7.3 Plasmid #232

Das Plasmid #232 *pSERS11_pEFS_TIMP-1_myc_GPI_IRES_pac_ZIP* resultierte aus dem Konstrukt #230 *pSERS11_pEFS_luc2_P2A_eGFP_IRES_pac_ZIP*.

Dazu wurde die *luc2_P2A_eGFP*-Sequenz aus Plasmid #230 mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *BspEI* herausgeschnitten und durch die mit den *Primern* #329 und #330 amplifizierte *TIMP1_myc_GPI*-Sequenz aus Konstrukt #229 *pEF_TIMP-1_myc_GPI* ersetzt.

Das Konstrukt #232 wurde im Verdau mit *DrdI* auf Richtigkeit überprüft.

3.7.4 Plasmid #233

Zur Bildung des Plasmids #233 *pSERS11_pEFS_TIMP-1_myc_GPI_IRES_pac_P2A_eGFP* wurde die *IRES_pac*-Komponente mittels *BspEI* und *NotI*-HF enzymatisch aus Plasmid #231 *pSERS11_pEFS_TIMP-1_myc_GPI_IRES_pac* entfernt. In das daraus resultierte restliche Plasmid wurden die mit den *Primern* #343 und #334 bzw. #331 und #332

amplifizierten Abschnitte *P2A_eGFP* und *IRES_pac* aus Plasmid #168 *pSERS11_pEFS_luc2_P2A_eGFP_IRES_pac* transferiert.

Testverdau beim fertigen Plasmid erfolgten auf der einen Seite mit *DrdI* als auch mit *DrdI* + *PacI* und auf der anderen Seite mit *HindIII-HF* + *XhoI*.

3.7.5 Plasmid #234

Um das Plasmid #234 *pSERS11_pEFS_TIMP-1_myc_GPI_IRES_pac_P2A_eGFP_ZIP* herzustellen, wurde das *IRES_pac*-Segment mit Hilfe der Restriktionsenzyme *BspEI* und *NotI-HF* aus dem Konstrukt #232 *pSERS11_pEFS_TIMP-1_myc_GPI_IRES_pac_ZIP* entfernt.

Die Primer #343 und #335 bzw. #331 und #332 wurden zur Amplifikation der Komponenten *P2A_eGFP* und *IRES_pac* aus Plasmid #168 *pSERS11_pEFS_luc2_P2A_eGFP_IRES_pac* verwendet. Beide PCR-Produkte wurden in das *Backbone* des Plasmids #232 rekombiniert.

Der Testverdau des Konstrukts #234 erfolgte sowohl mit *DrdI* + *PacI* als auch mit *HindIII-HF* + *XhoI*.

3.7.6 Plasmid #235

Bei der Generierung des Plasmids #235 *pSERS11_pEFS_TIMP-1_myc_MSD_IRES_pac_P2A_eGFP* wurde zunächst die *TIMP-1_myc_GPI_IRES*-Sequenz aus Konstrukt #233 *pSERS11_pEFS_TIMP-1_myc_GPI_IRES_pac_P2A_eGFP* mit Hilfe des Restriktionsenzym *HindIII-HF* entfernt und das restliche Plasmid dephosphoryliert.

Das dephosphorylierte Teilstück wurde dann mit der *TIMP-1_myc_MSD*-Komponente, welche aus Plasmid #238 *pMA-RQ_TIMP-1_myc_MSD_IRES* ebenfalls mit *HindIII-HF* enzymatisch herausgeschnitten wurde, ligiert.

Die Richtigkeit des Konstrukts wurde über den Verdau mittels *NcoI* + *SacI-HF* ermittelt.

3.7.7 Plasmide #2944 + #3005

L87/4_IP-10_FramycPi_sGFP_ZIP-Zellen (L87/4_TF#110) wurden von Prof. Dr. Peter Nelson (Medizinische Klinik und Poliklinik IV der LMU München) zur Verfügung gestellt. Dabei wurden die Plasmidkonstrukte #2944 und #3005 (Abbildung 5) mittels *Gateway*-Klonierung generiert und durch Elektroporation in L87/4-Zellen transferiert.

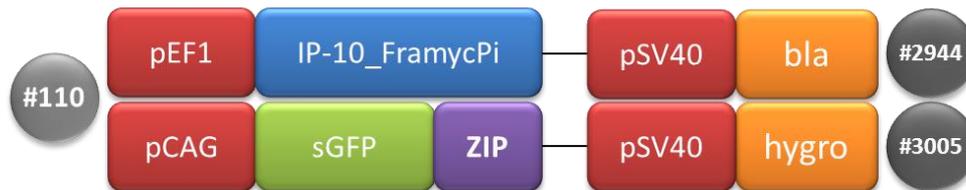


Abbildung 5: Schematische Darstellung der sequenziellen Abfolgen der Plasmide #2944 und #3005. p: Promotor; IP-10: Interferon- γ -induziertes Protein 10; FramycPi: *Fraktalkin-MYC-GPI*; sGFP: *Superfolder green fluorescent protein*; ZIP: „Zipcode“-like-Sequenz; bla: Blasticidin-Resistenzgen; hygromycin: Hygromycin-Resistenzgen

3.8 Fluoreszenzaufnahmen

Fluoreszenzaufnahmen der Zellen wurden mittels Fluoreszenzmikroskop bei 100-facher Vergrößerung, einem Anregungsfilter von 490/15 nm und einem Emissionsfilter von 535/35 nm durchgeführt.

3.9 Nanopartikel Tracking Analyse

3.9.1 NanoSight

Der Nachweis und die Bestimmung der Größenverteilung der aufgereinigten Partikel aus nativen HT1080-Zellen erfolgten mit Hilfe eines Nanopartikel Tracking-Analysators der Firma Malvern Instruments. Die in *PBS* dissoziierten Exosomen wurden zunächst im Verhältnis 1:500 verdünnt und mittels Spritze in die Messkammer injiziert. Die Analyse beinhaltete drei Durchgänge mit einer Messdauer von jeweils 60 s.

In Tabelle 12 sind die bei der Messung verwendeten Einstellungen aufgelistet.

Aufnahme-Einstellungen	
<i>Camera Type</i>	sCMOS
<i>Laser Type</i>	Blue488
<i>Camera Level</i>	16
<i>Slider Shutter</i>	1300
<i>Slider Gain</i>	512
<i>FPS</i>	25.0
<i>Number of Frames</i>	1498
<i>Temperature</i>	25.0 – 25.0 °C
Analyse-Einstellungen	
<i>Detect Threshold</i>	6
<i>Blur Size</i>	Auto
<i>Max Jump Distance</i>	Auto: 12.0 – 12.1 pix

Tabelle 12: Einstellungen des *NanoSight NS300* Nanopartikel Tracking-Analysators zur Aufnahme und Analyse von Exosomen.

3.9.2 ZetaView

Um einen Nachweis an Mikrovesikeln und deren Größenverteilung zu erhalten, wurden die aus verschiedenen Zellkulturüberständen isolierten Exosomen mit Hilfe eines Nanopartikel Tracking-Analysators der Firma ParticleMetrix analysiert. Die Messungen der in *PBS* resuspendierten Vesikel wurden nach Protollangaben des Herstellers durchgeführt.

Bei jeder Messung wurden drei Zyklen mit jeweils elf Positionen analysiert, wobei vom Programm, unter Verwendung des Ausreißertests nach Grubbs, erkannte Fehlermessungen, welche die mittlere Intensität, die Homogenität und den Modalwert der Probe betrafen, aus der Auswertung entfernt wurden.

Die in Tabelle 13 aufgelisteten Einstellungen des Analysators sind laut Hersteller ideal zur Erfassung von Exosomen.

Proben-Parameter	
<i>Sensitivity</i>	75
<i>Shutter</i>	50
<i>Electrolyte</i>	<i>PBS</i>
<i>Concentration</i>	0,000 N
Mess-Parameter	
<i>Cell S/N</i>	CA0075-0132b
Analyse-Parameter	
<i>Max Size</i>	1000
<i>Min Size</i>	5
<i>Min Brightness</i>	20

Tabelle 13 Proben-, Mess- und Analyse-Parameter des ZetaView PMX 110 Nanopartikel Tracking-Analysators zur Aufnahme und Analyse von Exosomen.

3.10 Zellmigrationsanalyse

Um zu überprüfen, ob sich ein unterschiedliches Verhalten zwischen nativen HT1080- und HT1080_TD#234-Zellen bezüglich des Überwachsens einer zellfreien Stelle ergibt, wurden diese einem *scratch assay* unterzogen.

Dabei wurden je Kavität einer 6-Well Zellkulturplatte $0,525 \times 10^6$ der entsprechenden Zellen mit HT1080-Medium über Nacht im Brutschrank inkubiert, so dass am darauffolgenden Tag die Zellen konfluent waren. In jeder Kavität wurde dann der Zellrasen mit einer 200 μ L-Pipettenspitze halbiert und die Migration der Zellen im Fluoreszenzmikroskop stündlich beobachtet und fotografiert. Zur Auswertung des Versuchs wurden die fotodokumentierten freien Flächen mittels *ImageJ* eingerahmt und ausgewertet.

3.11 Datenauswertung

Tabellarische Berechnungen und die dazugehörigen Standardabweichungen und Statistiken wurden mit *Microsoft Excel* durchgeführt.

Unterschiedliche Stufen an signifikanten Differenzen wurden mit Hilfe des *t*-Tests ermittelt und sind mit * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$) gekennzeichnet.

D Ergebnisse

4 Vergleich zweier Kits zur Aufreinigung von Exosomen aus dem Zellkulturüberstand

Das hohe Potential von Exosomen im medizinischen Sektor führt dazu, dass immer wieder neue Methoden zur Aufreinigung der Vesikel entwickelt werden. So können diese u. a. mittels Differentialzentrifugation (Livshits *et al.*, 2015) oder nach dem Größenausschlussprinzip mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) (Chen *et al.*, 2011) aus dem Zellkulturüberstand isoliert werden.

Tang und Kollegen kamen zu dem Schluss, dass es bei den diversen Vorgehensweisen der Aufreinigung zu Variationen bezüglich der Konzentration, Reinheit und Größe der Vesikel und exosomalen RNS kommt (Tang *et al.*, 2017). Unterschiedliche Größenverteilungen von Exosomen können möglicherweise zur Beeinflussung der exosomalen Aufnahme und biologischen Funktionen führen (Sarko und McKinney, 2017).

Beim Vergleich von Exosomenpräparaten, welche mittels Ultrazentrifugation, Dichtegradienten und einer Immunaффinitätsmethode isoliert wurden, stellte sich heraus, dass sich letztere Technik am effektivsten zur Aufreinigung eignete (Greening *et al.*, 2015). Nichtsdestotrotz scheinen Kits eine praktische Alternative zu den oben genannten Methoden darzustellen. Deshalb wurden vor Durchführung der Experimente zur Aufklärung der einzelnen Fragestellungen in dieser Arbeit zunächst zwei kommerziell erhältliche Kits zur Isolierung von Exosomen miteinander verglichen.

Ziel war es, dasjenige Kit zu ermitteln, welches in der Lage war, höhere Konzentrationen an funktionellen Exosomen aus Zellkulturüberständen aufzureinigen.

Zum Vergleich standen das *Exo-spin Exosome Purification Kit* und die *Total Exosome Isolation Reagent (from cell culture media)*.

Nach Aussaat und Expansion der jeweiligen Zellen in T225-Zellkulturflaschen wurde bei einer Konfluenz von ca. 80 % der Überstand abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, um Rückstände von im Kulturmedium enthaltenen Exosomen zu entfernen.

Vergleich zweier Kits zur Aufreinigung von Exosomen aus dem Zellkulturüberstand⁶⁴

Nach 24-stündiger Inkubation mit serumfreien Medium wurde der Überstand der Zellkultur gesammelt, bei 300 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert und im Anschluss daran mit einem 0,45 µm-Filter filtriert, um abgelöste Zellen zu beseitigen. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 4 °C und 20.000 x g für 30 min zur Entfernung von Zellrückständen, erfolgte die Zugabe des im jeweiligen Kit enthaltenen Präzipitationspuffers zu je einer Hälfte des Überstandes. Anschließend fanden die weiteren Aufreinigungen nach Anweisungen der Hersteller statt. Die isolierten Exosomen wurden schließlich in jeweils 200 µL *PBS* aufgenommen (Abbildung 6).

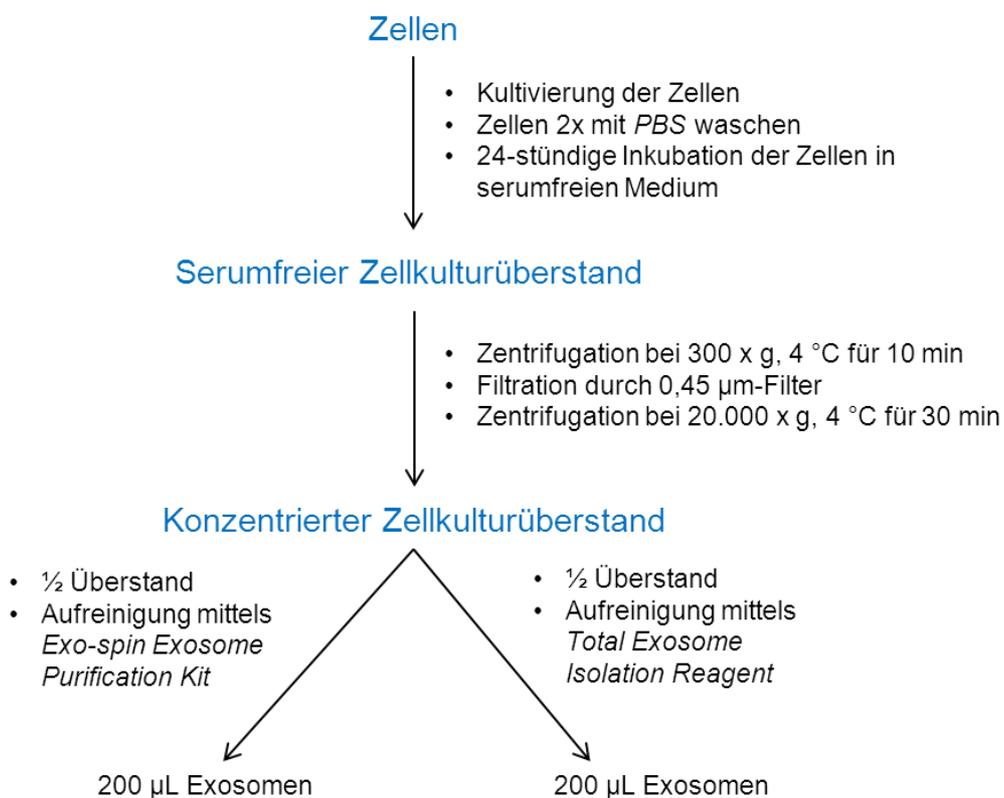


Abbildung 6: Modifiziertes Protokoll zum Vergleich zweier Kits zur Aufreinigung von Exosomen aus dem Zellkulturüberstand. Nach Isolierung aus dem Überstand wurden die Exosomen in 200 µL *PBS* resuspendiert.

4.1 Quantitativer Vergleich von Exosomen mittels Western Blot

Für den quantitativen Vergleich der von beiden Kits aufgereinigten Exosomen wurden die jeweiligen Mengen an exosomalen Oberflächenmarkern, welche zur Familie der Tetraspanine gehören, der isolierten Partikel bestimmt.

Es wurden die Mengen an CD9-, CD63- und CD81 von aus HT1080- und 293T-Zellen gewonnenen Exosomen untersucht.

Die Analysen bezogen sich dabei auf den relativen Unterschied der mittels beider Kits isolierten Exosomenmengen durch Gegenüberstellung der gleichen Proteinmengen sowie den jeweiligen absoluten Gehalt an isolierten Exosomen durch Vergleich der gleichen Volumina an Exosomensuspensionen.

Beim Einsatz der gleichen Proteinmengen zeigte sich, dass die von beiden Kits aufgereinigten Exosomen aus beiden Zelltypen vergleichbare Konzentrationen bezüglich der oben genannten Oberflächenmarker lieferten.

Dagegen war die absolute Menge an Exosomen nach Isolierung aus dem Zellkulturüberstand mittels *Total Exosome Isolation Reagent* deutlich höher als die vom *Exo-spin Exosome Purification Kit* erzielte Exosomendichte.

Abbildung 7 stellt repräsentativ die Ergebnisse anhand der mittels Western Blot detektierten Mengen an CD63 von Exosomen dar, welche mittels beider Kits aus HT1080- und 293T-Zellen aufgereinigt wurden.

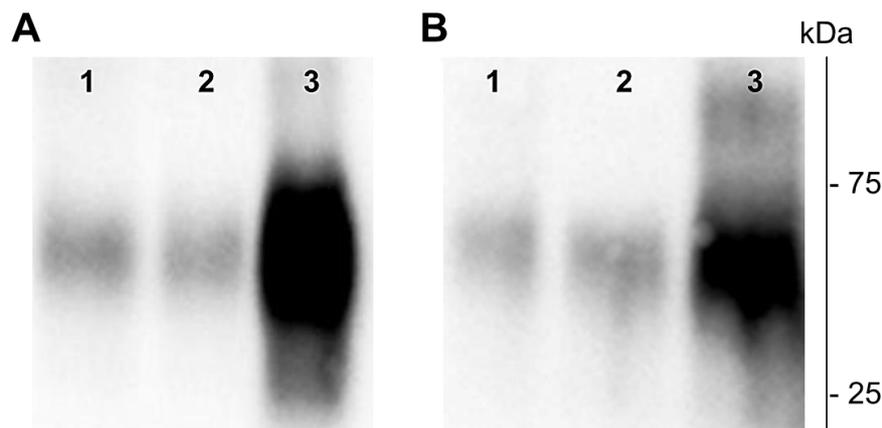


Abbildung 7: Quantitativer Vergleich der mit Hilfe zweier Kits aufgereinigten Exosomen aus Zellkulturüberständen mittels Western Blot. Verglichen wurden die mittels *Exo-spin Exosome Purification Kit* (1) und *Total Exosome Isolation Reagent* (2 + 3) isolierten Exosomenmengen aus HT1080-Zellen (A) und 293T-Zellen (B) anhand des Gehalts an CD63.

Für jede Messung wurden 20 µL Exosomen mit der gleichen Menge eines 2-fachen Probenpuffers bei 95 °C für 5 min denaturiert und die Proteinanteile mittels Gelelektrophorese aufgetrennt.

Nach Inkubation der PVDF-Membran mit dem spezifischen Primärantikörper und entsprechenden Enzym-konjugierten Sekundärantikörper erfolgte die Visualisierung des exosomalen Markers in einer Geldokumentationsanlage.

Betrachtet wurden zum einen der relative Gehalt an Exosomen in der Präparation durch Gegenüberstellung der gleichen Proteinmengen (1 vs. 2) sowie die absolute Exosomenmenge durch Auftragung der gleichen Volumina an Exosomensuspensionen (1 vs. 3).

In einem weiteren Versuch zur quantitativen Bewertung der mittels zweier Kits aufgereinigten Exosomen wurde ein Farbstoff verwendet, welcher an die exosomale Membran bindet und durchflusszytometrisch detektiert werden kann. Die dabei notwendige Bindung der Exosomen an *Beads* und die Anfärbung der Membran erfolgte mittels *Exo-Flow Capture Kit* nach Anweisungen des Herstellers.

6,0 % der mittels *Exosome Purification Kit* isolierten Partikel banden den *Exo-FITC*-Farbstoff, wohingegen 88,6 % der mittels *Total Exosome Isolation Reagent* aufgereinigten Partikel für diesen Farbstoff positiv waren.

Die unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten der mittels beider Kits aufgereinigten Exosomen sind in Abbildung 8 dargestellt.

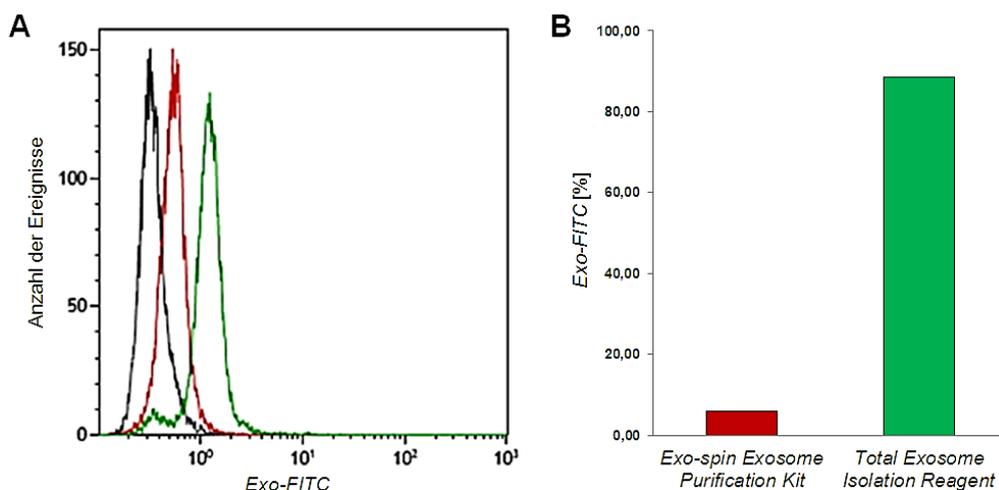


Abbildung 8: Quantitativer Vergleich zweier Kits zur Aufreinigung von Exosomen aus dem Zellkulturüberstand mittels Durchflusszytometrie. Aus *hMSCs* isolierte Exosomen wurden über den exosomalen Oberflächenmarker CD63 an *Beads* gebunden und mittels membranfärbenden *Exo-FITC*-Farbstoff durchflusszytometrisch analysiert. Bei jeder Messung wurden mindestens 9.000 Ereignisse zur Auswertung herangezogen.

A Der graue Graph entspricht der Kontrolle, bei welcher keine Exosomen eingesetzt wurden. Der rote Graph zeigt die *Exo-FITC*-Fluoreszenzintensität der mittels *Exo-spin Exosome Purification Kit* isolierten Partikel, der grüne Graph von Partikeln, die mit Hilfe der *Total Exosome Isolation Reagent* aufgereinigt wurden.

B Gegenüberstellung der jeweiligen *Exo-FITC*-Fluoreszenzintensitäten aus **A** abzüglich der Kontrolle.

5 Analyse aufgereinigter Partikel aus dem Zellkulturüberstand

5.1 Nanopartikel Tracking-Analyse

Um eine Bewertung der mittels *Total Exosome Isolation Reagent* aufgereinigten Partikel zu erhalten, wurden die aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigten Teilchen mittels Nanopartikel Tracking-Analyse (*NTA*) untersucht.

Laut Analyse des *NanoSight NS300* Nanopartikel Tracking-Analysators hatten die aus nativen HT1080-Zellen gewonnenen Partikel eine durchschnittliche Größe von $(150,7 \pm 53,1)$ nm, wobei der Modalwert bei 136,0 nm lag (Abbildung 9A).

Die Auswertung mittels *ZetaView PMX 110* ergab eine durchschnittliche Größenverteilung der Teilchen von $(124,7 \pm 46,7)$ nm mit einem Modalwert von 127,2 nm (Abbildung 9B).

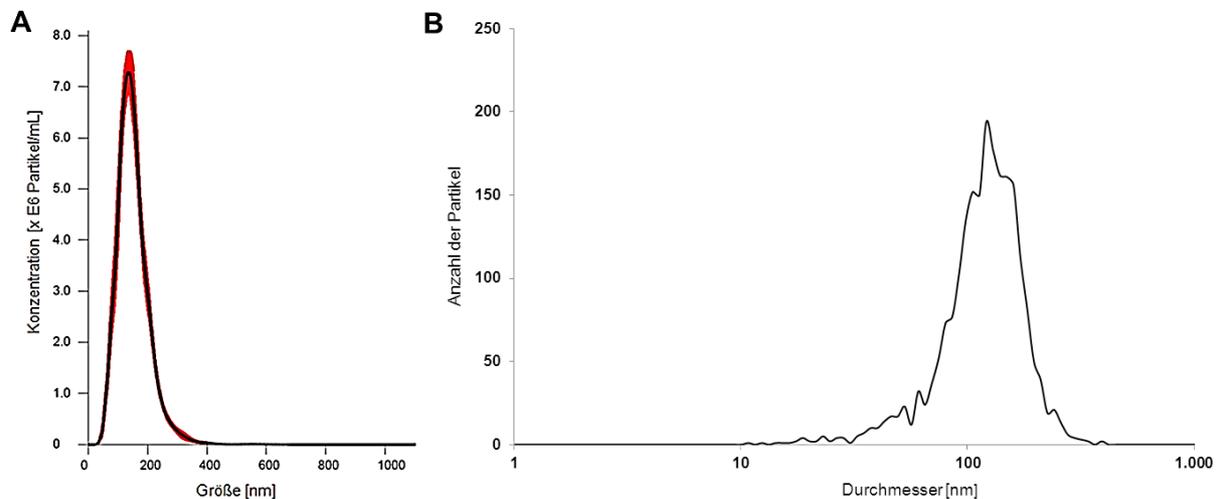


Abbildung 9: Nachweis und Analyse der mittels *Total Exosome Isolation Reagent* aufgereinigten Partikel aus dem serumfreien Zellkulturüberstand nativer HT1080-Zellen mittels Nanopartikel Tracking-Analyse (NTA).

A Dargestellt ist die durchschnittliche Größenverteilung der mit Hilfe des *NanoSight NS300* gemessenen Partikel. Vor der Analyse wurde die Exosomensuspension mit *PBS* im Verhältnis 1:500 verdünnt. Der bei den drei Messungen etablierte einfache Standardfehler ist durch die rote Markierung kenntlich gemacht.

B Durchschnittliche Größenverteilung der isolierten Partikel, welche unter Verwendung des *ZetaView PMX 110* analysiert wurden. Bei jeder Messung wurden drei Zyklen mit jeweils elf Positionen untersucht.

5.2 Nachweis von Komplexen mit exosomalen Markern

Um zu zeigen, dass es sich bei den isolierten Partikeln um Komplexe mit exosomalen Markern handelte, wurden diese durchflusszytometrisch analysiert.

Exosomen liegen wegen ihrer geringen Größe unterhalb der Nachweisgrenze eines Durchflusszytometers, weshalb diese vor der Messung an $9,1 \mu\text{m}$ \varnothing -Beads gebunden wurden. Hierzu wurden $40 \mu\text{L}$ Bead-Suspension mit $10 \mu\text{L}$ eines biotinylierten Antikörpers, welcher gegen einen für Exosomen charakteristischen Marker gerichtet war, inkubiert und anschließend mit $100 \mu\text{L}$ einer auf $250 \mu\text{g/mL}$ mit *PBS* verdünnten Exosomensuspension vermischt. Die Hälfte der Probe wurde dann mit einem weiteren fluoreszierenden Ak gegen einen exosomalen Oberflächenmarker gefärbt.

Zur Kontrolle wurde anstelle von Exosomen *PBS* eingesetzt (Abbildung 10A).

Um zu überprüfen, ob die Komplexe zudem eine intakte Lipiddoppelmembran besitzen, wurden in einem ergänzenden Experiment bei gleichem Versuchsaufbau die Partikel mit membrangängigen Farbstoffen inkubiert (Abbildung 10B). Bei jeder Messung wurden mindestens 22.500 Ereignisse zur Auswertung herangezogen.

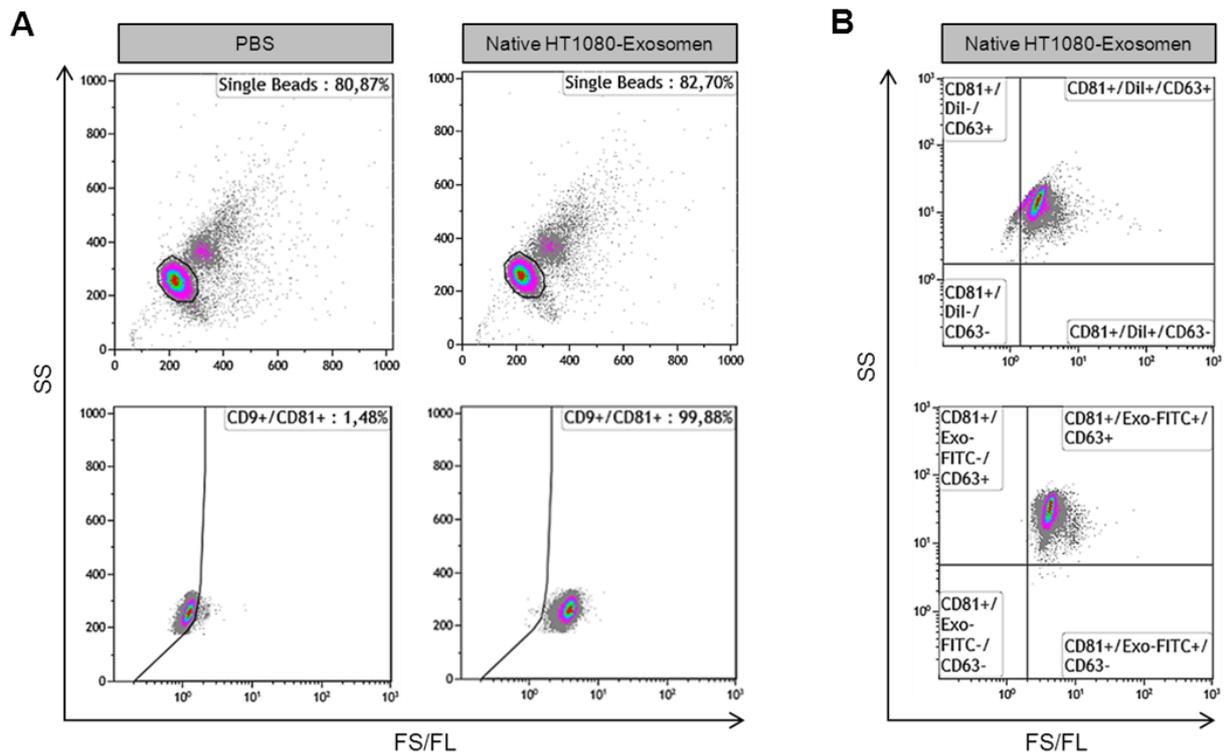


Abbildung 10: Nachweis von Komplexen mit exosomalern Markern im Durchflusszytometer.

A Aufgeführt sind die Anteile an Partikeln bezüglich zweier exosomalern Marker, welche mittels *Total Exosome Isolation Reagent* aus dem Überstand von nativen HT1080-Zellen isoliert wurden.

Die Partikel wurden zur durchflusszytometrischen Visualisierung über den exosomalern Marker CD9 an 9,1 μm \varnothing -Beads gebunden und gegen den weiteren exosomalern Marker CD81 gefärbt.

B Analog zum Versuchsaufbau von **A** wurde zudem die Partikelmembran über die Farbstoffe *DiI* und *Exo-FITC* (EF) detektiert. Zu sehen sind die Anteile der über CD81 an Beads gebundenen Partikel, welche sowohl den Farbstoff als auch den exosomalern Marker CD63 aufwiesen.

In Tabelle 14 sind die Anteile der durchflusszytometrisch erfassten Partikel dargestellt, welche exosomale Marker aufwiesen.

Komplex	Native HT1080-Exosomen
<i>Beads</i> (CD9) / CD81	97,3 %
<i>Beads</i> (CD63) / CD81	96,8 %
<i>Beads</i> (CD81) / CD63	96,8 %

Tabelle 14: Nachweis von Komplexen mit exosomalen Markern im Durchflusszytometer. Die Partikel wurden zur durchflusszytometrischen Visualisierung über einen exosomalen Marker an 9,1 µm Ø-*Beads* gebunden und gegen einen weiteren exosomalen Marker gefärbt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei Messungen.

Anhand der Farbstoffe *Dil* und *Exo-FITC* konnte zudem gezeigt werden, dass die Komplexe eine Membran besaßen (Tabelle 15).

Komplex	Native HT1080-Exosomen
<i>Beads</i> (CD81) / <i>Dil</i> / CD63	76,3 %
<i>Beads</i> (CD81) / <i>EF</i> / CD63	83,3 %

Tabelle 15: Nachweis von membranhaltigen Komplexen mit exosomalen Markern im Durchflusszytometer. Zu sehen sind die Anteile der über CD81 an 9,1 µm Ø-*Beads* gebundenen Partikel, welche sowohl den membrangängigen Farbstoff *Dil* bzw. *Exo-FITC* (*EF*) als auch den exosomalen Marker CD63 aufwiesen.

5.3 Nachweis aufkonzentrierter exosomaler Marker

Ein weiteres Merkmal von Exosomen ist der höhere Proteinanteil von Tetraspaninen an der Gesamtproteinmenge (Escola *et al.*, 1998), welche u. a. CD9, CD63 und CD81 einschließen (Kowal *et al.*, 2016). Daher wurden mittels Western Blot die Mengen der o. g. Oberflächenproteine von nativen HT1080-Zellen mit aus dem serumfreien Überstand dieser Zellen isolierten Partikeln verglichen (Abbildung 11).

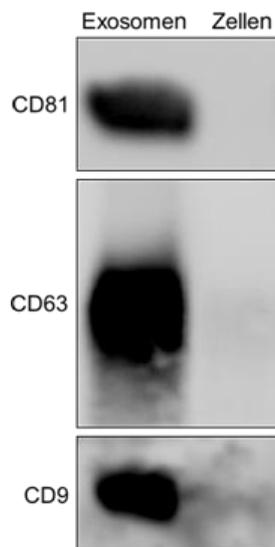


Abbildung 11: Vergleich der Mengen an exosomalen Markern von nativen HT1080-Zellen mit aus diesen gewonnenen Exosomen. Für jede Messung wurden 9 µg Protein zur gelelektrophoretischen Auftrennung eingesetzt. Nach Inkubation der PVDF-Membran mit dem jeweiligen spezifischen Primärantikörper und entsprechenden Enzym-konjugierten Sekundärantikörper erfolgte die Visualisierung der Proteinmengen in einer Geldokumentationsanlage.

6 Exosomen zur Übertragung zytosolischer Proteine

Zunächst sollte gezeigt werden, dass die mittels *Total Exosome Isolation Reagent* aus Zellkulturen aufgereinigten Exosomen geeignet sind, zytosolische Proteine auf Zellen desgleichen und unterschiedlichen Typs zu übertragen.

Dazu wurden 5×10^6 HT1080-Zellen, welche mit dem Plasmid #168 (Abbildung 12) transduziert wurden und *GFP* exprimierten, in insgesamt vier T225-Zellkulturflaschen mit dem entsprechenden Medium ausgesät. Nach 3-tägiger Expansion wurde das Zellkulturmedium abgenommen und durch serumfreies Medium ersetzt. Nach weiteren zwei Tagen Inkubation wurden die aus den Zellen freigesetzten Exosomen isoliert und standen nun für die nachfolgenden Experimente zur Verfügung.



Abbildung 12: Schematische Darstellung der sequenziellen Abfolge des in HT1080-Zellen transduzierten Plasmids #168. pEFS: *Elongation factor 1-alpha short promoter*; luc2: *Firefly luciferase 2*; P2A: Peptid 2A; eGFP: *Enhanced green fluorescent protein*; IRES: Interne ribosomale Eintrittsstelle; pac: Puromycin N-Acetyltransferase

6.1 Charakterisierung der Donorzellen

Im Gegensatz zu nativen HT1080-Zellen zeigten HT1080_TD#168-Zellen eine deutliche *GFP*-Fluoreszenz im Fluoreszenzmikroskop (Abbildung 13A). Des Weiteren wurden durchflusszytometrische Analysen bezüglich der Expression exosomaler Oberflächenmarker sowie von *GFP* durchgeführt (Abbildungen 13B-D).

Für jede Messung wurden dabei $0,5 \times 10^6$ native HT1080-Zellen bzw. HT1080_TD#168-Zellen in jeweils 100 μL *PBS* resuspendiert und mit APC-konjugierten Antikörpern gegen die Oberflächenmarker CD9, CD63 und CD81 gefärbt. Als Kontrollen dienten die gleichen Zellen, welche mit dem Isotyp-Antikörper inkubiert wurden. Bei der Überprüfung der *GFP*-Expression wurden keine Antikörper eingesetzt. Bei jeder Messung wurden mindestens $4,3 \times 10^4$ Ereignisse ausgewertet.

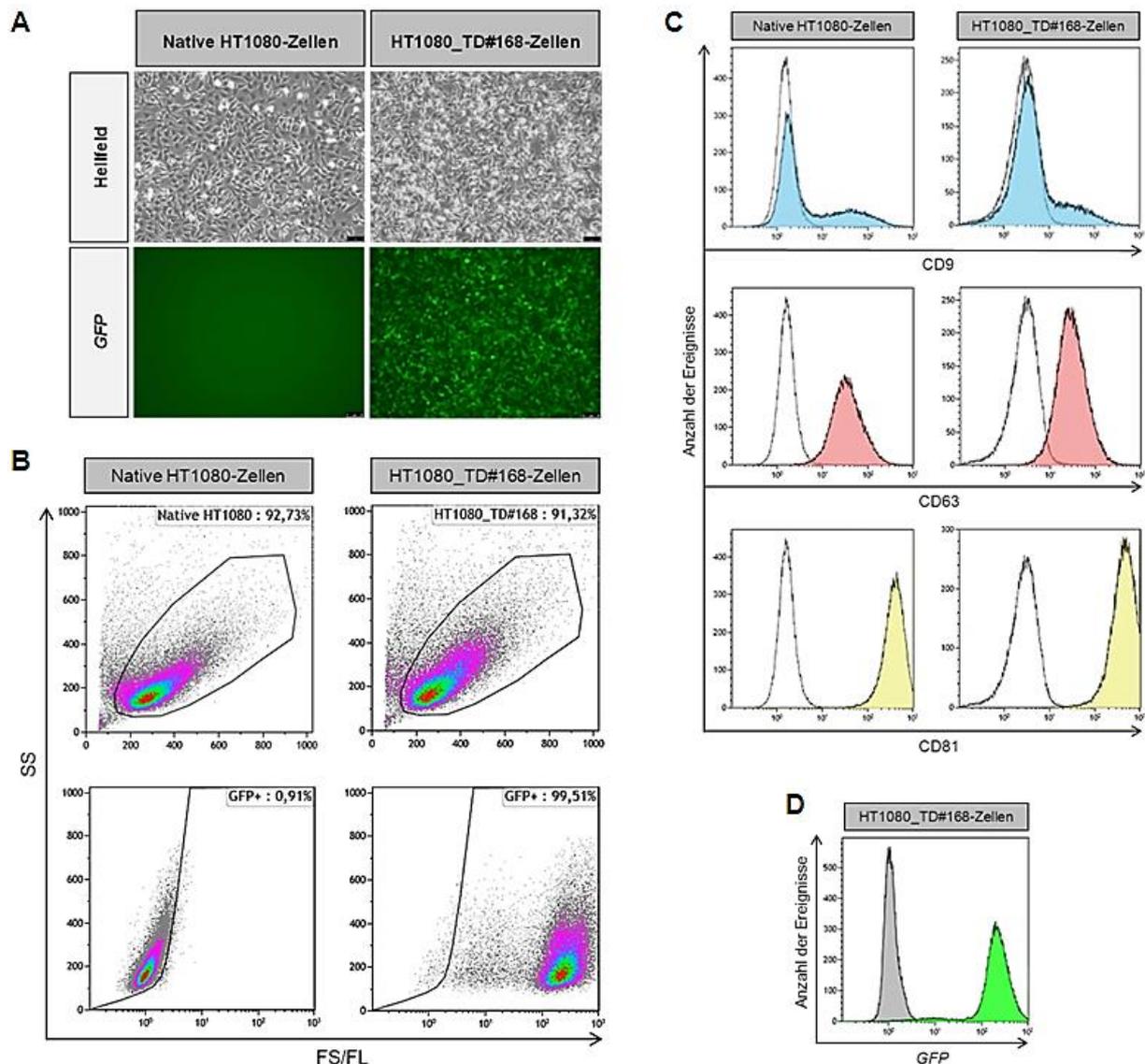


Abbildung 13: Charakterisierung der mit Plasmid #168 transduzierten HT1080-Zellen (HT1080_TD#168) im Vergleich zu nativen HT1080-Zellen.

A Hellfeld- und Fluoreszenzaufnahmen von *GFP*-positiven HT1080_TD#168-Zellen verglichen mit nativen HT1080-Zellen. Der sich am rechten unteren Bildrand befindende Balken entspricht einer Länge von 25 μm .

B Repräsentative durchflusszytometrische Messung von nativen HT1080-Zellen und HT1080_TD#168-Zellen zur Detektion von *GFP*.

C Für die durchflusszytometrische Analyse der Expression exosomaler Oberflächenmarker wurden jeweils $0,5 \times 10^6$ Zellen in 100 μL PBS mit dem entsprechenden spezifischen APC-konjugierten Antikörper gefärbt (s. farbige Graphen). Die schwarzen Kurven verdeutlichen die jeweiligen Isotyp-Kontrollen.

D HT1080_TD#168-Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie auf ihre *GFP*-Expression analysiert (grüner Graph). Als Kontrolle dienten native HT1080-Zellen (grauer Graph).

Tabelle 16 zeigt die zusammengefassten durchflusszytometrischen Daten in Hinsicht auf die Expression von exosomalen Oberflächenmarkern und *GFP* der HT1080_TD#168-Zellen gegenüber nativen HT1080-Zellen.

Expression	Native HT1080	HT1080_TD#168
CD9	34,9 % ± 1,8 % (n = 6)	17,5 % ± 1,4 % (n = 3)
CD63	99,2 % ± 0,3 % (n = 6)	96,4 % ± 0,4 % (n = 3)
CD81	99,4 % ± 0,3 % (n = 6)	99,1 % ± 0,4 % (n = 3)
GFP	- (n = 3)	98,55 % ± 0,04 % (n = 3)

Tabelle 16: Expressionslevel von exosomalen Oberflächenmarkern und *GFP* der mit Plasmid #168 transduzierten HT1080-Zellen (HT1080_TD#168) gegenüber nativen HT1080-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und dazugehörigen Standardabweichungen. In Klammern ist die jeweilige Anzahl der durchgeführten Versuche angezeigt.

6.2 Nachweis und Charakterisierung der Exosomen

Die aus den Zellkulturüberständen von HT1080_TD#168-Zellen isolierten Partikel entsprachen Komplexen mit exosomalen Markern. In Tabelle 17 sind die gemittelten Werte aus jeweils zwei Analysen dargestellt. Zum Vergleich sind die Ergebnisse der aus nativen HT1080-Zellen analysierten Partikel aufgelistet.

Komplex	Native HT1080-Exosomen	HT1080_TD#168-Exosomen
<i>Beads</i>(CD9) / CD81	97,3 %	95,8 %
<i>Beads</i>(CD63) / CD81	96,8 %	97,0 %
<i>Beads</i>(CD81) / CD63	96,8 %	96,3 %

Tabelle 17: Nachweis von Komplexen mit exosomalen Markern im Durchflusszytometer. Aufgeführt sind die Anteile von Partikeln bezüglich zweier exosomaler Marker, welche mittels *Total Exosome Isolation Reagent* aus dem Überstand der jeweiligen Zellen isoliert wurden. Die Partikel wurden zur durchflusszytometrischen Visualisierung über einen exosomalen Marker an 9,1 µm Ø-*Beads* gebunden und gegen einen weiteren exosomalen Marker gefärbt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei Messungen.

Tabelle 18 zeigt die Anteile der Komplexe, welche zum einen exosomale Marker als auch eine Doppellipidmembran implizierten.

Komplex	Native HT1080-Exosomen	HT1080_TD#168-Exosomen
<i>Beads</i> (CD81) / <i>Dil</i> / CD63	76,3 %	85,2 %
<i>Beads</i> (CD81) / <i>EF</i> / CD63	83,3 %	91,3 %

Tabelle 18: Nachweis von membranhaltigen Komplexen mit exosomalen Markern im Durchflusszytometer. Mittels *Total Exosome Isolation Reagent* aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigte Partikel wurden zur durchflusszytometrischen Visualisierung über den exosomalen Marker CD81 an 9,1 µm Ø-*Beads* gebunden und gegen einen weiteren exosomalen Marker gefärbt. Zudem wurde die Membran über die Farbstoffe *Dil* und *Exo-FITC* (*EF*) detektiert. Zu sehen sind die Anteile der an *Beads* gebunden Partikel, welche sowohl den Farbstoff als auch den exosomalen Marker CD63 aufwiesen.

Zudem zeigten die Teilchen einen höheren Anteil der exosomalen Marker CD9, CD63 und CD81 an der gesamten Proteinmenge, wohingegen *GFP* und Aktin abgereichert wurden (Abbildung 14A).

Die Auswertung mittels *NTA* ergab eine durchschnittliche Größe der Teilchen von (133,1 ± 48,7) nm mit einem Modalwert von 131,0 nm. Im Vergleich dazu hatten die aus nativen HT1080-Zellen isolierten Partikel einen Durchmesser von (124,7 ± 46,7) nm, wobei der Modalwert bei 127,2 nm lag (Abbildung 14C).

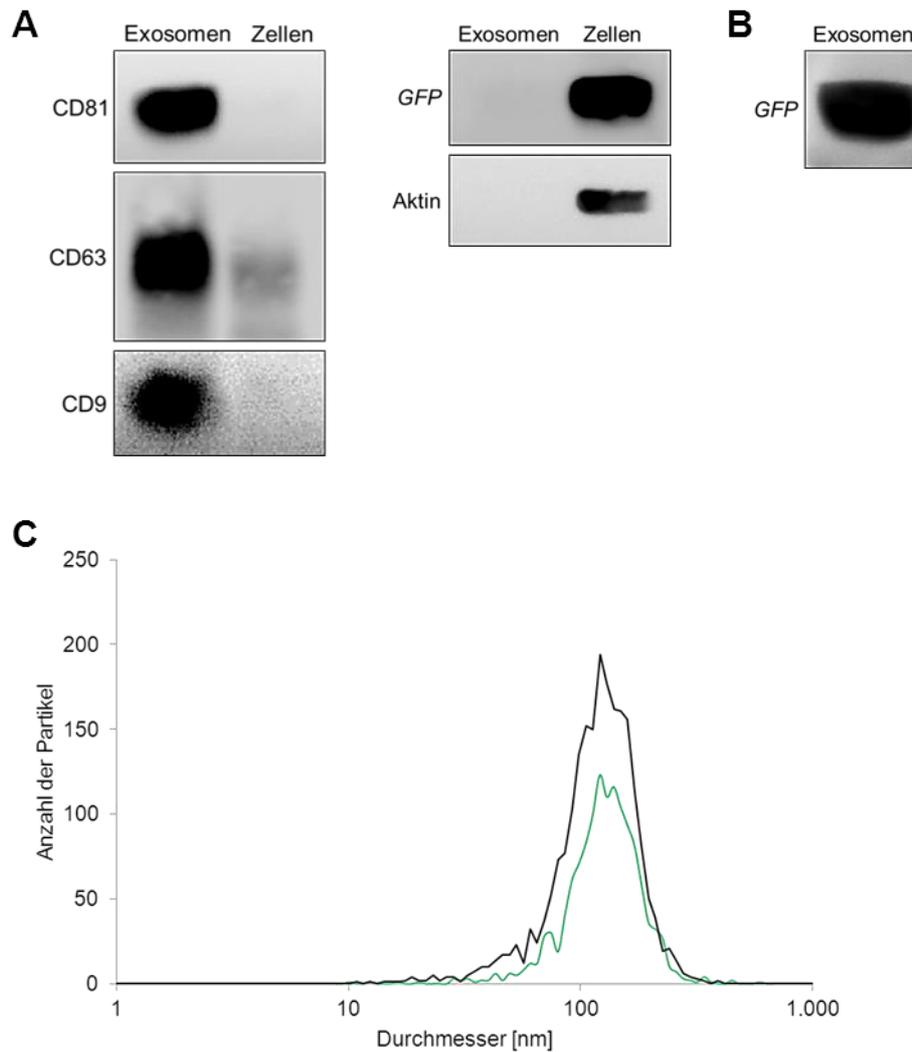


Abbildung 14: Nachweis und Charakterisierung von HT1080_TD#168-Exosomen mittels Western Blot und NTA.

A Für den Vergleich der Mengen an exosomalern Markern und zytosolischen Proteinen zwischen HT1080_TD#168-Exosomen und deren Donorzellen wurden jeweils 9 µg Protein zur gelelektrophoretischen Auftrennung eingesetzt. Nach Inkubation der PVDF-Membran mit dem entsprechenden spezifischen Primärantikörper und dazugehörigen Enzym-konjugierten Sekundärantikörper erfolgte die Visualisierung der Proteinmengen in einer Geldokumentationsanlage.

B Nachweis von *GFP* in HT1080_TD#168-Exosomen. Die Analyse erfolgte analog zu **A** mit einer eingesetzten Proteinmenge von 36 µg.

C Dargestellt ist die durchschnittliche Größenverteilung der aus HT1080_TD#168-Zellen isolierten Partikel (grüner Graph) im Vergleich zu aus nativen HT1080-Zellen gewonnenen Teilchen (schwarzer Graph). Bei den mittels *ZetaView PMX 110* durchgeführten Analysen wurden jeweils drei Zyklen mit je elf Positionen gemessen.

6.3 Analyse des exosomalen Transports

Bei der Analyse des exosomalen Transports von *GFP* wurden 5×10^4 native HT1080- bzw. 293T-Zellen pro Kavität einer 24-Well-Zellkulturplatte über Nacht im Brutschrank kultiviert. Nach Abnahme des Mediums wurden jeweils 150 μg HT1080_TD#168-Exosomen mit den adhären Zellen in 300 μL *EMEM* für 6 h inkubiert.

Die durchflusszytometrischen Messungen ergaben, dass $(55,4 \pm 7,4) \%$ der HT1080-Zellen, aber nur lediglich $(4,3 \pm 1,9) \%$ der 293T-Zellen nach der Inkubation mit HT1080_TD#168-Exosomen *GFP*-positiv waren (Abbildung 15A). Der Unterschied war mit $p = 0,0003$ im *t*-Test höchst signifikant (Abbildung 15B).

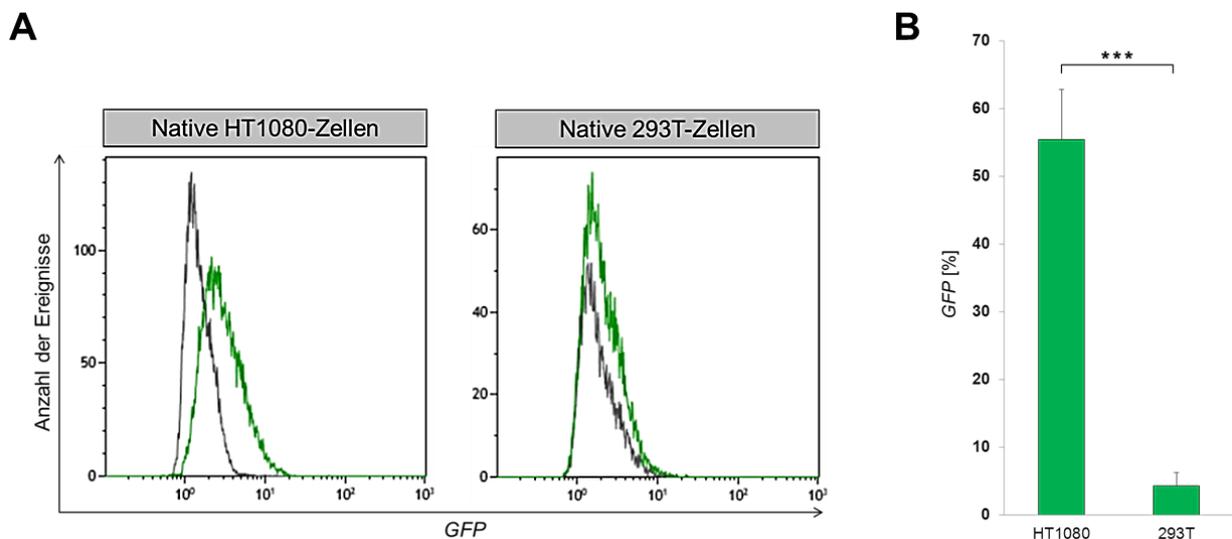


Abbildung 15: Anteile *GFP*-positiver HT1080- und 293T-Zellen nach 6-stündiger Inkubation mit HT1080_TD#168-Exosomen.

A 5×10^4 native HT1080- bzw. 293T-Zellen wurden pro Kavität einer 24-Well-Zellkulturplatte über Nacht kultiviert. Nach Abnahme des Mediums wurden jeweils 150 μg der Exosomen mit den adhären Zellen in 300 μL *EMEM* für 6 h inkubiert. Die Zellen wurden anschließend im Durchflusszytometer auf ihre *GFP*-Positivität analysiert (grüner Graph). Als Kontrolle dienten die jeweiligen Zellen, welche mit nativen HT1080-Exosomen inkubiert wurden (grauer Graph).

B Graphische Zusammenfassung der mittels Durchflusszytometrie erfassten Daten bezüglich der *GFP*-Positivität von HT1080-Zellen ($n = 3$) gegenüber 293T-Zellen ($n = 3$) nach Inkubation mit HT1080_TD#168-Exosomen, *** ($p \leq 0,001$) im *t*-Test.

7 Exosomen zur Übertragung membrangebundener Proteine

Um zu testen, ob Exosomen zur Übertragung membrangebundener Proteine fähig sind, wurden humane Fibrosarkom-Zellen mit dem Plasmid #233 (Abbildung 16) transduziert. Die selektierten Zellen sollten die Eigenschaft besitzen, das humane *tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1* (*TIMP-1*) als therapeutisches Protein über einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker (*GPI*-Anker) aus dem Lymphozytenfunktionsantigen 3 (*LFA-3*) an ihrer Oberfläche zu exprimieren.

GPI-Anker werden im Laufe einer posttranslationalen Modifikation an Proteine gebunden und können in eine Lipiddoppelschicht integrieren (Heider *et al.*, 2016).

Zudem sollten die Zellen *GFP*-positiv sein, um gegebenenfalls die Übertragung eines zytosolischen Proteins als Positivkontrolle zu gewährleisten.



Abbildung 16: Schematische Darstellung der sequenziellen Abfolge des in HT1080-Zellen transduzierten Plasmids #233. pEFS: *Elongation factor 1-alpha short promoter*; TIMP-1: *Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1*; myc: Myelocytomatose-Onkogen; GPI: Glycosylphosphatidylinositol; IRES: Interne ribosomale Eintrittsstelle; pac: Puromycin N-Acetyltransferase; P2A: Peptid 2A; eGFP: *Enhanced green fluorescent protein*

7.1 Charakterisierung der Donorzellen

Zur Prüfung der Expression von *TIMP-1* auf HT1080_TD#233-Zellen wurde ein spezifischer Primärantikörper eingesetzt, wobei als Negativkontrolle native Zellen dienten, welche mit demselben Ak gefärbt wurden (Abbildungen 17A-B). Außerdem wurden die HT1080_TD#233-Zellen gegen die Oberflächenmarker CD9, CD63 und CD81 gefärbt, während als Kontrollen die gleichen Zellen mit dem Isotyp-Ak inkubiert wurden (Abbildung 17C).

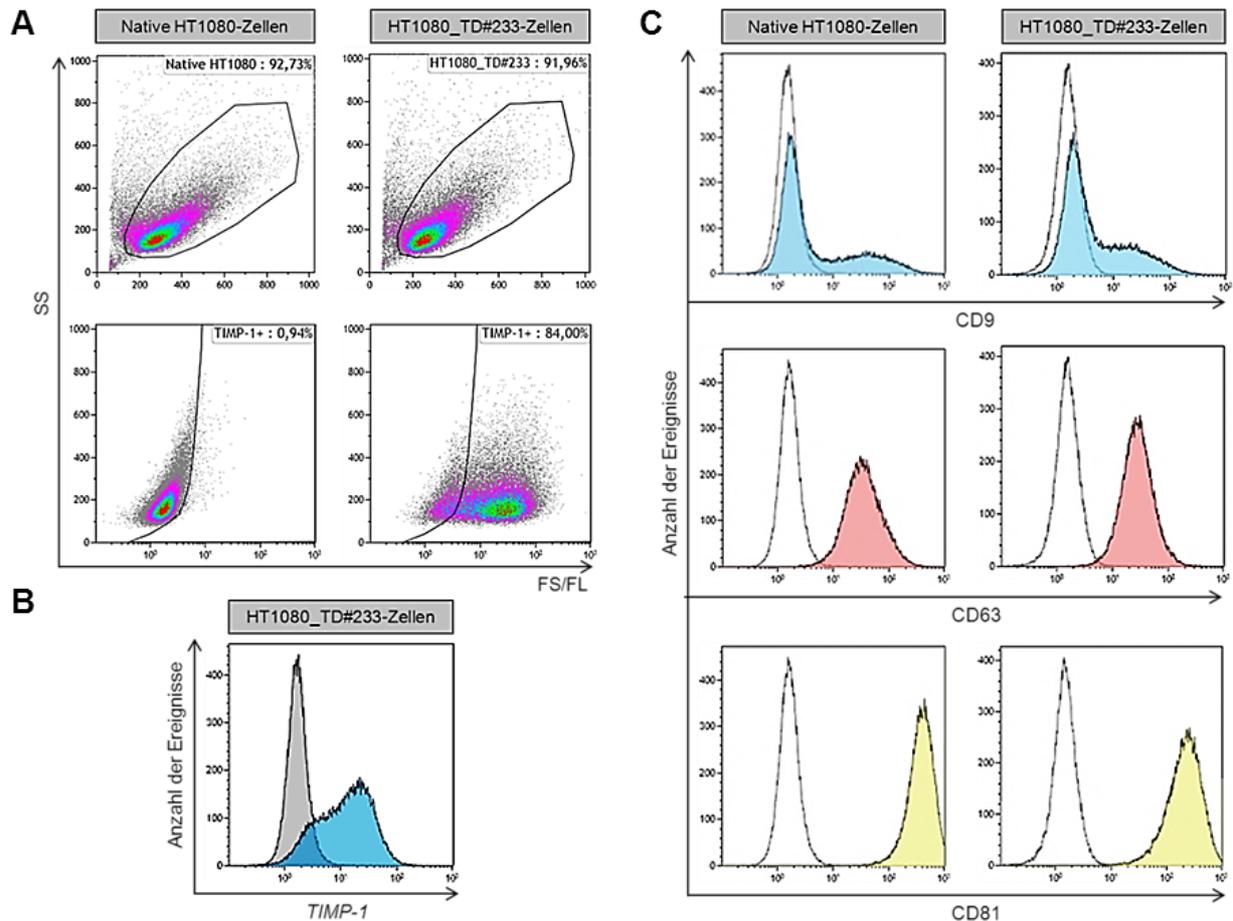


Abbildung 17: Charakterisierung der mit Plasmid #233 transduzierten HT1080-Zellen (HT1080_TD#233-Zellen) im Vergleich zu nativen HT1080-Zellen.

A zeigt repräsentativ die durchflusszytometrische Messung von nativen HT1080-Zellen und HT1080_TD#233-Zellen zur Detektion von *TIMP-1*.

B HT1080_TD#233-Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie auf ihre *TIMP-1*-Expression analysiert (blauer Graph). Dazu wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen in $100 \mu\text{L}$ PBS mit dem entsprechenden spezifischen APC-konjugierten Antikörper inkubiert. Als Kontrolle dienten native HT1080-Zellen, welche mit demselben Primärantikörper gefärbt wurden (grauer Graph).

C Für die durchflusszytometrische Analyse der Expression exosomaler Oberflächenmarker wurden jeweils $0,5 \times 10^6$ Zellen in $100 \mu\text{L}$ PBS mit dem entsprechenden spezifischen APC-konjugierten Antikörper gefärbt (farbige Graphen). Die schwarzen Kurven verdeutlichen die jeweiligen Isotyp-Kontrollen.

In Tabelle 19 sind die mittels Durchflusszytometer erfassten Daten von HT1080_TD#233-Zellen im Vergleich zu nativen HT1080-Zellen dargestellt.

Expression	Native HT1080	HT1080_TD#233
CD9	34,9 % ± 1,8 % (n = 6)	34,2 % ± 1,2 % (n = 4)
CD63	99,2 % ± 0,3 % (n = 6)	99,3 % ± 0,2 % (n = 4)
CD81	99,4 % ± 0,3 % (n = 6)	99,4 % ± 0,3 % (n = 4)
TIMP-1	- (n = 4)	82,7 % ± 0,5 % (n = 3)

Tabelle 19: Expressionslevel von exosomalen Oberflächenmarkern und *TIMP-1* der mit Plasmid #233 transduzierten HT1080-Zellen (HT1080_TD#233). Dargestellt sind die Mittelwerte und jeweiligen Standardabweichungen. In Klammern ist die jeweilige Anzahl der durchgeführten Versuche angezeigt.

7.2 Nachweis und Charakterisierung der Exosomen

Es konnte mittels Durchflusszytometrie gezeigt werden, dass es sich bei den aus dem serumfreien Überstand von HT1080_TD#233-Zellen isolierten Partikeln um Komplexe mit exosomalen Markern handelte, welche zudem eine intakte Lipiddoppelmembran aufwiesen. Die jeweiligen Ergebnisse sind in den Tabellen 20-21 aufgelistet.

Komplex	Native HT1080-Exosomen	HT1080_TD#233-Exosomen
Beads(CD9) / CD81	97,3 %	94,9 %
Beads(CD63) / CD81	96,8 %	94,4 %
Beads(CD81) / CD63	96,8 %	96,0 %

Tabelle 20: Nachweis von Komplexen mit exosomalen Markern im Durchflusszytometer. Aufgeführt sind die Anteile von Partikeln bezüglich zweier exosomaler Marker, welche mittels *Total Exosome Isolation Reagent* aus dem Überstand nativer und HT1080_TD#233-Zellen isoliert wurden. Die Partikel wurden zur durchflusszytometrischen Visualisierung über einen exosomalen Marker an 9,1 µm Ø-Beads gebunden und gegen einen weiteren exosomalen Marker gefärbt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei Messungen.

Komplex	Native HT1080-Exosomen	HT1080_TD#233-Exosomen
<i>Beads</i>(CD81) / <i>Dil</i> / CD63	76,3 %	77,2 %
<i>Beads</i>(CD81) / <i>EF</i> / CD63	83,3 %	80,8 %

Tabelle 21: Nachweis von membranhaltigen Komplexen mit exosomalen Markern im Durchflusszytometer. Die aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigte Partikel wurden zur durchflusszytometrischen Visualisierung über den exosomalen Marker CD81 an 9,1 μm \varnothing -*Beads* gebunden und gegen einen weiteren exosomalen Marker gefärbt. Zudem wurde die Membran über die Farbstoffe *Dil* und *Exo-FITC* (*EF*) detektiert. Zu sehen sind die Anteile der an *Beads* gebunden Partikel, welche sowohl den Farbstoff als auch den exosomalen Marker CD63 aufwiesen.

HT1080_TD#233-Exosomen besaßen in Bezug auf den Gesamtproteinanteil einen größeren Anteil an den exosomalen Markern CD9, CD63 und CD81 als auch an membrangebundenem *TIMP-1*, welches nicht in Exosomen aus nativen HT1080-Zellen detektiert werden konnte. Aktin war dagegen in Exosomen abgereichert (Abbildungen 18A-B).

Im Vergleich zu nativen HT1080-Exosomen mit einer durchschnittlichen Größe von $(124,7 \pm 46,7)$ nm und einem Modalwert von 127,2 nm unterschieden sich HT1080_TD#233-Exosomen mit einem Durchmesser von $(124,7 \pm 51,6)$ nm und einem Modalwert von 122,7 nm (Abbildung 18C) wahrscheinlich nicht.

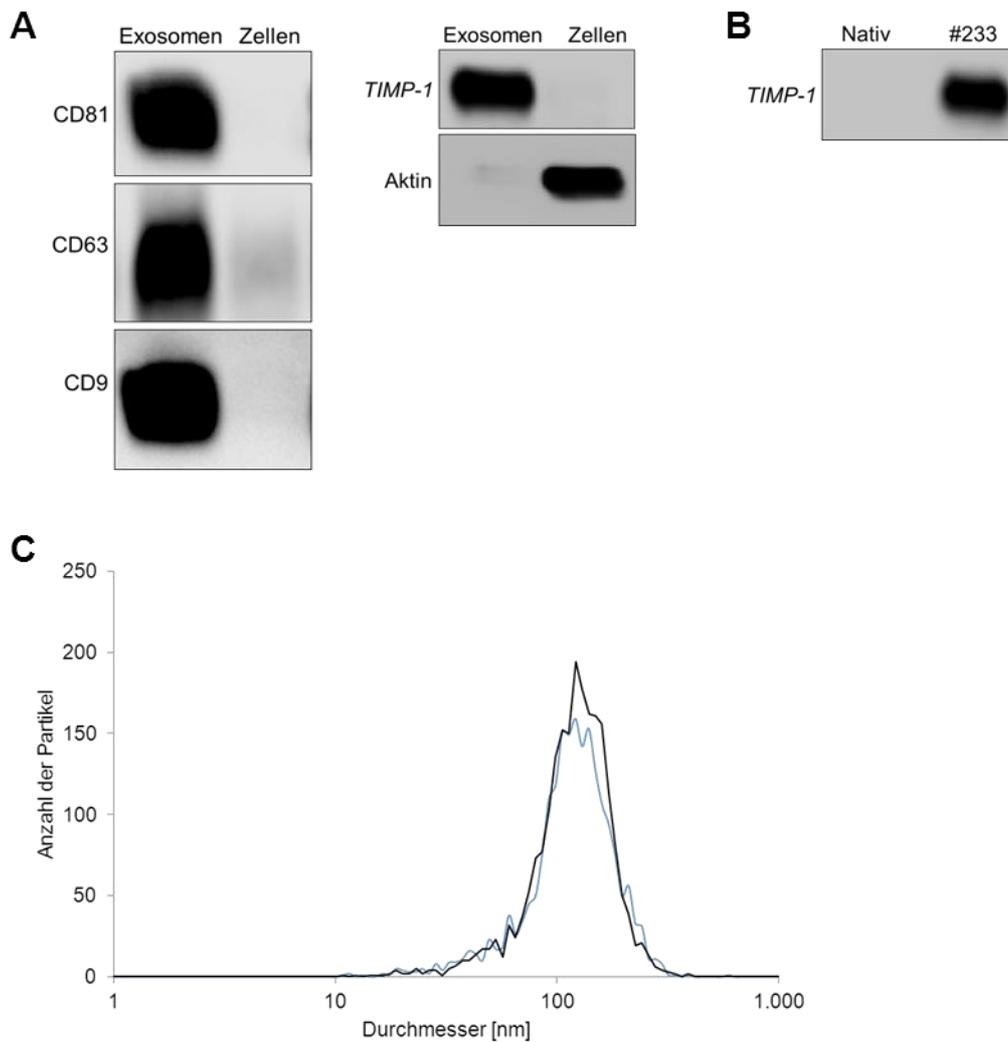


Abbildung 18: Nachweis und Charakterisierung von HT1080_TD#233-Exosomen mittels Western Blot und NTA.

A Für den Vergleich der Mengen an exosomalern Markern und zytosolischem Protein zwischen HT1080_TD#233-Exosomen und deren Donorzellen wurden jeweils 9 µg Protein zur gelelektrophoretischen Auftrennung eingesetzt. Nach Inkubation der PVDF-Membran mit dem entsprechenden spezifischen Primärantikörper und dazugehörigen Enzym-konjugierten Sekundärantikörper erfolgte die Visualisierung der Proteinmengen in einer Geldokumentationsanlage.

B Im Gegensatz zu HT1080_TD#233-Exosomen konnte kein *TIMP-1* in nativen HT1080-Exosomen detektiert werden. Die Analyse erfolgte analog zu **A**.

C Dargestellt ist die durchschnittliche Größenverteilung der aus HT1080_TD#233-Zellen isolierten Partikel (blauer Graph) verglichen mit aus nativen HT1080-Zellen gewonnenen Teilchen (schwarzer Graph). Bei den mittels *ZetaView PMX 110* durchgeführten Analysen wurden jeweils drei Zyklen mit je elf Positionen gemessen.

7.3 Analyse des exosomalen Transports

Bei der Analyse des exosomalen Transports von *TIMP-1_GPI* wurden 5×10^4 native HT1080- bzw. 293T-Zellen pro Kavität einer 24-Well-Zellkulturplatte über Nacht kultiviert. Nach Abnahme des Mediums wurden jeweils 150 μg der in 300 μL *EMEM* resuspendierten Exosomen mit den adhärirten Zellen für 6 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem APC-konjugierten Antikörper gefärbt. Als Negativkontrolle dienten native Zellen, welche mit nativen HT1080-Exosomen inkubiert und mit demselben spezifischen Primärantikörper gefärbt wurden.

Die durchflusszytometrischen Analysen zeigten, dass $(62,4 \pm 11,9) \%$ der HT1080-Zellen und $(28,0 \pm 5,6) \%$ der 293T-Zellen nach der Inkubation mit HT1080_TD#233-Exosomen *TIMP-1*-positiv waren (Abbildung 19A). Die Differenz war mit $p = 0,004$ im *t*-Test hoch signifikant (Abbildung 19B).

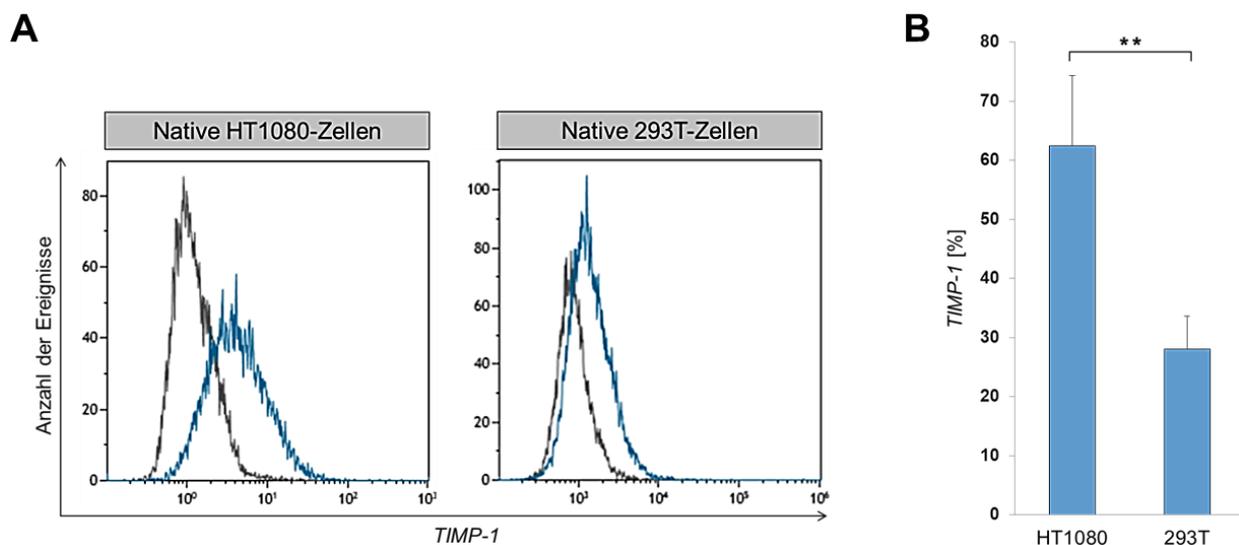


Abbildung 19: Anteile *TIMP-1*-positiver HT1080- und 293T-Zellen nach 6-stündiger Inkubation mit HT1080_TD#233-Exosomen.

A 5×10^4 native HT1080- bzw. 293T-Zellen wurden pro Kavität einer 24-Well-Zellkulturplatte über Nacht kultiviert. Nach Abnahme des Mediums wurden jeweils 150 μg Exosomen mit den adhärirten Zellen in 300 μL *EMEM* für 6 h inkubiert. Die Zellen wurden anschließend im Durchflusszytometer mittels spezifischem Primärantikörper auf ihre *TIMP-1*-Positivität analysiert (blauer Graph). Als Kontrolle dienten die jeweiligen Zellen, welche mit nativen HT1080-Exosomen inkubiert und demselben Antikörper gefärbt wurden (grauer Graph).

B Graphische Zusammenfassung der mittels Durchflusszytometrie erfassten Daten bezüglich der *TIMP-1*-Positivität von HT1080-Zellen ($n = 3$) gegenüber 293T-Zellen ($n = 4$) nach Inkubation mit HT1080_TD#233-Exosomen, ** ($p \leq 0,01$) im *t*-Test.

8 Erhöhte Integration von *mRNA* in Exosomen

In einem weiteren Schritt wurde der Versuch unternommen, die Expression eines via Exosomen übertragenen Transgens in der Empfängerzelle zu erhöhen.

Bolukbasi und Mitarbeiter verglichen 2012 mittels *DNS-Microarrays* die Mengen an RNS von Zellen aus zwei humanen primären Glioblastomen und zwei primären Melanomen mit aus diesen isolierten Mikrovesikeln (MV).

Die gegenüber ihren Donorzellen 20 am häufigsten in MV vorkommenden *mRNAs* wurden mit Hilfe der multiplen Sequenzalignierung auf Gemeinsamkeiten in der *3'-untranslated region* (*3'-UTR*) analysiert. Die aus den 20 Transkripten natürlich vorkommende Sequenz, welche der gebildeten Konsensussequenz am ähnlichsten war, entsprach der aus 25 Nukleotiden (nt) aufgebauten *3'-UTR* von *Galanin-Rezeptor-3-mRNA* und wurde als „*Zipcode*“-like-Sequenz (*ZIP*) deklariert.

In dieser Arbeit wurde die *ZIP* zum vermehrten Einbau der *mRNA* in Exosomen nach der Sequenz des jeweiligen Transgens integriert (Abbildung 20).

Die erhöhte Expression sollte sowohl ein zytosolisches (*GFP*) als auch ein membrangebundenes Protein (*TIMP-1*) einbeziehen.



Abbildung 20: Vergleich der Konstrukte mit und ohne „*Zipcode*“-like-Sequenz. Schematisch dargestellt sind die sequenziellen Abfolgen der in HT1080-Zellen transduzierten Plasmide #168 und #230. pEFS: *Elongation factor 1-alpha short promoter*; luc2: *Firefly luciferase 2*; P2A: *Peptid 2A*; eGFP: *Enhanced green fluorescent protein*; IRES: *Interne ribosomale Eintrittsstelle*; pac: *Puromycin N-Acetyltransferase*; ZIP: „*Zipcode*“-like-Sequenz

8.1 Vergleich der Konstrukte #168 (*GFP*) und #230 (*GFP_ZIP*)

8.1.1 Charakterisierung der Donorzellen

Abbildung 21 veranschaulicht die mittels Durchflusszytometrie durchgeführten Analysen zur Charakterisierung der HT1080_TD#230-Zellen, welche mit einem um *ZIP* erweitertem, *GFP*-kodierendem Plasmid transduziert wurden, verglichen mit HT1080_TD#168-Zellen.

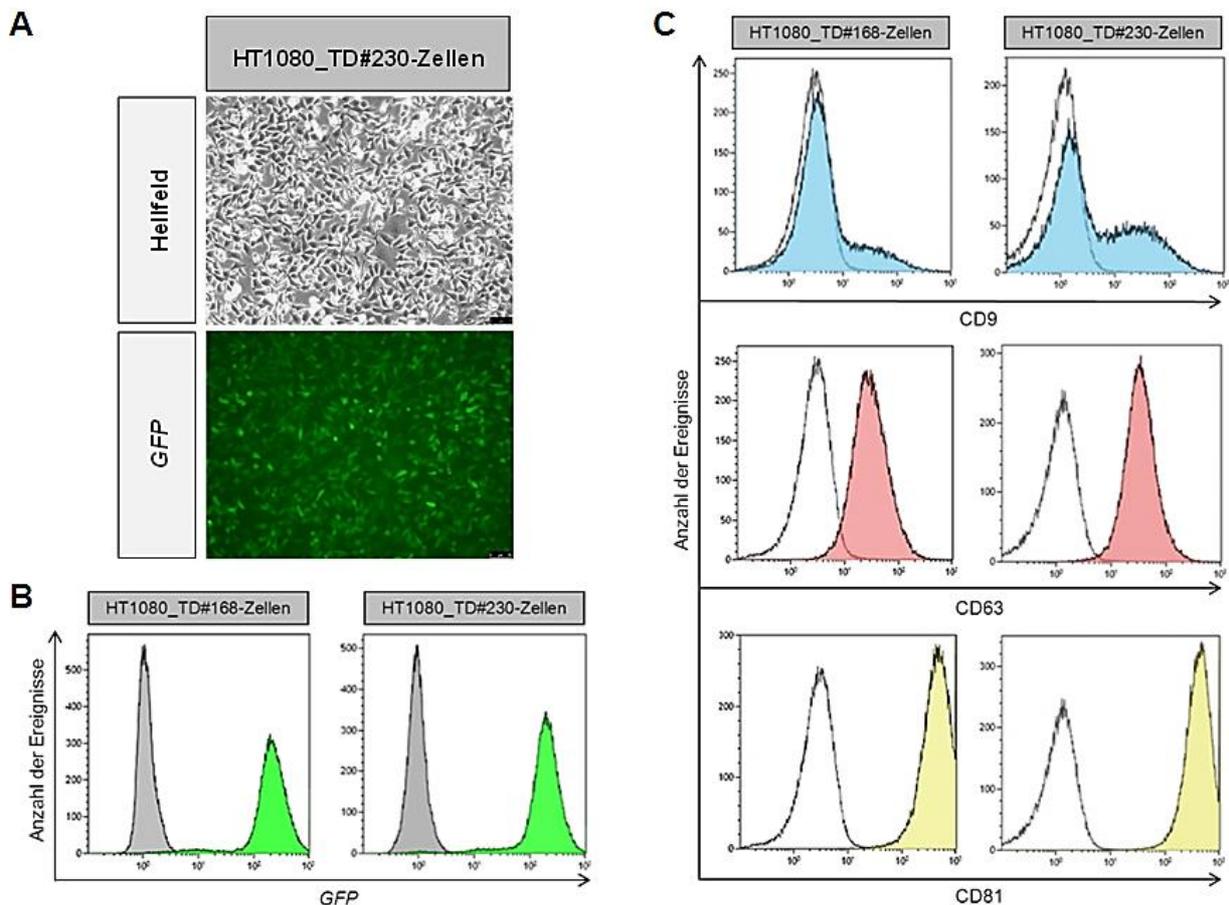


Abbildung 21: Charakterisierung der mit Plasmid #230 transduzierten HT1080-Zellen (HT1080_TD#230) im Vergleich zu HT1080_TD#168-Zellen.

A Hellfeld- und Fluoreszenzaufnahme von *GFP*-positiven HT1080_TD#230-Zellen. Der sich am rechten unteren Bildrand befindende Balken entspricht einer Länge von 25 µm.

B HT1080_TD#230-Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie auf ihre *GFP*-Expression analysiert (grüner Graph). Als Kontrolle dienten native HT1080-Zellen (grauer Graph). Zum Vergleich ist zusätzlich die *GFP*-Expression von HT1080_TD#168-Zellen dargestellt.

C Für die durchflusszytometrische Analyse der Expression exosomaler Oberflächenmarker wurden jeweils $0,5 \times 10^6$ HT1080_TD#230-Zellen in 100 µL *PBS* mit dem entsprechenden spezifischen APC-konjugierten Antikörper gefärbt (farbige Graphen). Die schwarzen Kurven verdeutlichen die jeweiligen Isotyp-Kontrollen. Daneben sind die entsprechenden Histogramme von HT1080_TD#168-Zellen zum Vergleich dargestellt.

Tabelle 22 zeigt die mittels Durchflusszytometrie erfassten Daten zur Charakterisierung von HT1080_TD#230-Zellen gegenüber HT1080_TD#168-Zellen.

Expression	HT1080_TD#168	HT1080_TD#230
CD9	17,5 % ± 1,4 % (n = 3)	38,0 % ± 1,2 % (n = 6)
CD63	96,4 % ± 0,4 % (n = 3)	99,2 % ± 0,1 % (n = 6)
CD81	99,1 % ± 0,4 % (n = 3)	99,4 % ± 0,1 % (n = 6)
GFP	98,55 % ± 0,04 % (n = 3)	98,2 % ± 0,2 % (n = 3)

Tabelle 22: Expressionslevel von exosomalen Oberflächenmarkern sowie GFP der HT1080_TD#233-Zellen gegenüber HT1080_TD#168-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und jeweiligen Standardabweichungen. In Klammern ist die jeweilige Anzahl der durchgeführten Versuche angezeigt.

8.1.2 Nachweis und Charakterisierung der Exosomen

Bei den aus den Zellkulturüberständen isolierten Partikeln handelte es sich um lipidmembranhaltige Komplexe mit exosomalen Markern (Tabellen 23-24).

Komplex	HT1080_TD#168-Exosomen	HT1080_TD#230-Exosomen
Beads(CD9) / CD81	95,8 %	92,9 %
Beads(CD63) / CD81	97,0 %	94,6 %
Beads(CD81) / CD63	96,3 %	96,3 %

Tabelle 23: Nachweis von Komplexen mit exosomalen Markern im Durchflusszytometer. Aufgeführt sind die Anteile von Partikeln bezüglich zweier exosomaler Marker, welche mittels *Total Exosome Isolation Reagent* aus dem Überstand von HT1080_TD#168-Zellen und HT1080_TD#233-Zellen isoliert wurden. Die Partikel wurden zur durchflusszytometrischen Visualisierung über einen exosomalen Marker an 9,1 µm Ø-Beads gebunden und gegen einen weiteren exosomalen Marker gefärbt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei Messungen.

Komplex	HT1080_TD#168-Exosomen	HT1080_TD#230-Exosomen
<i>Beads</i>(CD81) / <i>Dil</i> / CD63	85,2 %	77,5 %
<i>Beads</i>(CD81) / <i>EF</i> / CD63	91,3 %	79,8 %

Tabelle 24: Nachweis von membranhaltigen Komplexen mit exosomalen Markern im Durchflusszytometer. Mittels *Total Exosome Isolation Reagent* aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigte Partikel wurden zur durchflusszytometrischen Visualisierung über den exosomalen Marker CD81 an 9,1 µm Ø-*Beads* gebunden und gegen einen weiteren exosomalen Marker gefärbt. Zudem wurde die Membran über die Farbstoffe *Dil* und *Exo-FITC* (*EF*) detektiert. Zu sehen sind die Anteile der an *Beads* gebundenen Partikel, welche sowohl den Farbstoff als auch den exosomalen Marker CD63 aufwiesen.

Zudem zeigten die aus HT1080_TD#230-Zellen gewonnenen Exosomen einen höheren Anteil an den Oberflächenmarkern CD9, CD63 und CD81 sowie des membrangebundenen Proteins *TIMP-1* am gesamten Proteingehalt, wohingegen Aktin gegenüber den Parentalzellen abgereichert war (Abbildung 22A).

Obwohl HT1080_TD#230-Zellen und HT1080_TD#168-Zellen vergleichbare Fluoreszenzintensitäten zeigten (keine Abbildung), war die Menge an *GFP* in HT1080_TD#230-Exosomen geringer als in HT1080_TD#168-Exosomen (Abbildung 22B).

Die aus HT1080_TD#230-Zellen gewonnenen Exosomen hatten eine durchschnittliche Größe von $(126,6 \pm 43,6)$ nm und einen Modalwert von 125,8 nm. Im Vergleich dazu hatten HT1080_TD#168-Exosomen einen Durchmesser von $(133,1 \pm 48,7)$ nm, wobei der Modalwert bei 131,0 nm lag (Abbildung 22C).

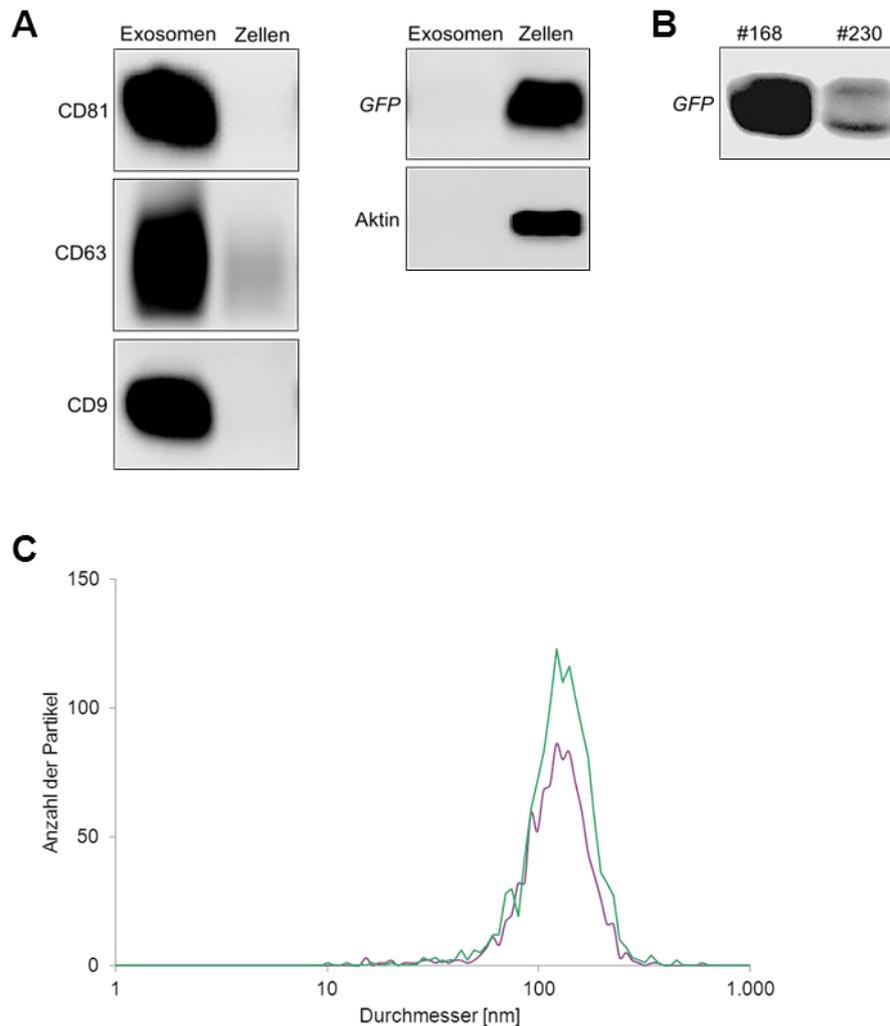


Abbildung 22: Nachweis und Charakterisierung von HT1080_TD#230-Exosomen mittels Western Blot und NTA.

A Für den Vergleich der Mengen an exosomalern Markern und zytosolischen Proteinen zwischen HT1080_TD#230-Exosomen und deren Parentalzellen wurden jeweils 9 µg Protein zur gelelektrophoretischen Auftrennung eingesetzt. Nach Inkubation der PVDF-Membran mit dem entsprechenden spezifischen Primärantikörper und dazugehörigen Enzym-konjugierten Sekundärantikörper erfolgte die Visualisierung der Proteinmengen in einer Geldokumentationsanlage.

B Verglichen mit HT1080_TD#168-Exosomen beinhalteten HT1080_TD#230-Exosomen geringere Mengen an *GFP*. Die Analyse erfolgte analog zu **A**.

C Dargestellt ist die durchschnittliche Größenverteilung der aus HT1080_TD#230-Zellen isolierten Partikel (lila Graph) verglichen mit HT1080_TD#168-Exosomen (grüner Graph). Bei den mittels *ZetaView PMX 110* durchgeführten Analysen wurden jeweils drei Zyklen mit je elf Positionen gemessen.

8.1.3 Analyse der in Exosomen enthaltenen mRNA mittels qRT-PCR

Mit Hilfe der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (*qRT-PCR*) wurden die *GFP-mRNA*-Gehälter von Exosomen verglichen, welche aus HT1080-Zellen aufgereinigt wurden, die mit Plasmid #168 (*GFP*) bzw. #230 (*GFP_ZIP*) transduziert waren.

Dazu wurde zunächst die RNS aus HT1080_TD#168- und HT1080_TD#230-Exosomen mittels *Total Exosome RNA & Protein Isolation Kit* isoliert und anschließend auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Zur Entfernung von DNS wurden die Proben mit dem *TURBO DNA-free Kit* behandelt.

In einem weiteren Schritt wurde mittels *Omniscript RT Kit* aus der jeweiligen RNS die *cDNA* synthetisiert, mit welcher schließlich *GFP* und *GAPDH* per *qRT-PCR* amplifiziert wurden. Als Kontrolle wurde analog die RNS sowohl aus nativen HT1080-Exosomen als auch aus HT1080_TD#168-Zellen analysiert. Die entsprechenden *C_p*-Werte sind in Tabelle 25 aufgeführt.

Exosomen	<i>C_p</i> -Wert <i>GFP</i> [Zyklus]	<i>C_p</i> -Wert <i>GAPDH</i> [Zyklus]
Native HT1080	28,4 ± 0,1	25,7 ± 0,1
HT1080_TD#168	27,5 ± 0,1	27,5 ± 0,2
HT1080_TD#230	27,6 ± 0,2	25,9 ± 0,3
Zellen	<i>C_p</i> -Wert <i>GFP</i> [Zyklus]	<i>C_p</i> -Wert <i>GAPDH</i> [Zyklus]
HT1080_TD#168	20,1 ± 0,3	16,1 ± 0,2

Tabelle 25: Darstellung der *C_p*-Werte von *GFP* und *GAPDH* aus den aufgelisteten Exosomen und Zellen nach Durchführung einer *qRT-PCR*. Es wurden jeweils 3 ng Gesamt-RNS für die Synthese der *cDNA* von *GFP* bzw. *GAPDH* verwendet. Angegeben sind die aus Triplikaten gebildeten Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Da sich die C_p -Werte der untersuchten Exosomen am Rande des Detektionsbereichs befanden und somit die Aussagekraft gering war, wurden die Schmelzkurven der Proben zur Analyse herangezogen (Abbildung 23). In Bezug auf *GFP* (Schmelztemperatur $T_m = 90,43$ °C) zeigte sich, dass der *Peak* der amplifizierten DNS aus HT1080_TD#230-Exosomen über dem von HT1080_TD#168-Exosomen lag. Im Gegensatz dazu war kein *Peak* bei nativen HT1080-Exosomen zu erkennen. Zum Vergleich ist diesbezüglich der Kurvenverlauf von aus HT1080_TD#168-Zellen amplifizierter DNS der gleichen Ausgangsmenge abgebildet. Die zu den jeweiligen Proben korrespondierenden Schmelzkurven von *GAPDH* ($T_m = 83,69$ °C) zeigten dagegen vergleichbare Maxima (Abbildung 23).

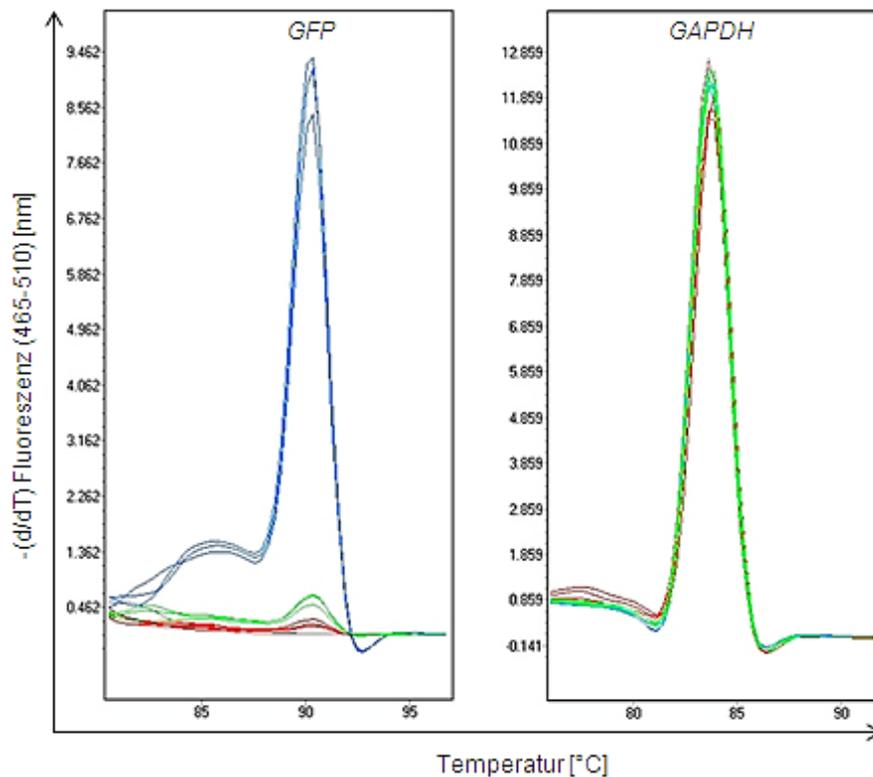


Abbildung 23: Darstellung der Schmelzkurven von *GFP* und *GAPDH* nach Durchführung einer *qRT-PCR*. Es wurden jeweils 3 ng Gesamt-RNS für die Synthese von *GFP*- und *GAPDH*-cDNA verwendet. Zu sehen sind die gemessenen Triplikate der Schmelzkurven von *GFP* und *GAPDH* von Exosomen aus nativen HT1080-Zellen (grau), HT1080_TD#168-Zellen (rot) und HT1080_TD#230-Zellen (grün) sowie von HT1080_TD#168-Zellen (blau) zum Vergleich.

Dass es sich bei den amplifizierten Produkten tatsächlich um *GFP* bzw. *GAPDH* handelte, konnte mittels Gelelektrophorese gezeigt werden (Abbildung 24).

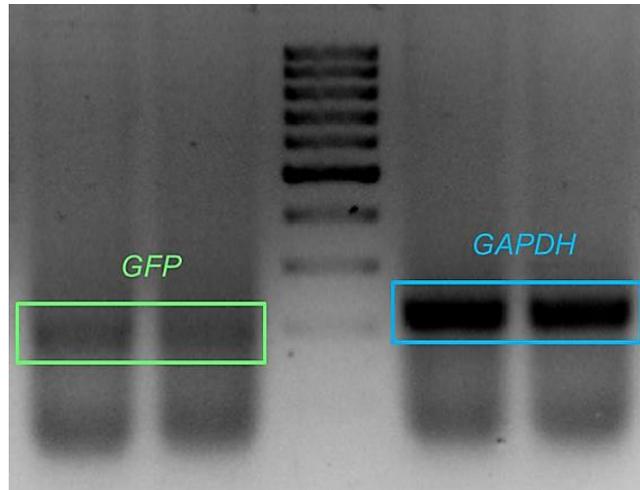


Abbildung 24: Detektion der mittels *qRT-PCR* amplifizierten *GFP*- und *GAPDH*-*cDNA* von aus HT1080_TD#168-Zellen isolierten Exosomen mittels Gelelektrophorese. Für die Synthese der *cDNA* von *GFP* und *GAPDH* wurden jeweils 11 ng Gesamt-RNS eingesetzt. 20 μ L der jeweiligen amplifizierten DNS wurden mit 4 μ L Ladebuffer vermengt und 20 μ L der Mischung pro Tasche eines 2%igen, mit *peqGreen* angefärbten Agarose-Gels appliziert. Die Visualisierung der Banden erfolgte in einer Geldokumentationsanlage.

8.1.4 Analyse des exosomalen Transports

150 µg HT1080_TD#230-Exosomen wurden mit jeweils 5×10^4 nativen HT1080- bzw. 293T-Zellen pro Kavität einer 24-Well-Zellkulturplatte für 6 h in *EMEM* inkubiert. Die Zellen wurden im Anschluss daran mittels Durchflusszytometer auf ihre *GFP*-Positivität gemessen (Abbildung 25).

Mit $p = 0,0009$ im *t*-Test ist die Differenz bezüglich des *GFP*-Transfers auf native HT1080-Zellen zwischen HT1080_TD#168-Exosomen und Exosomen aus HT1080_TD#230-Zellen höchst signifikant (Abbildung 25B).

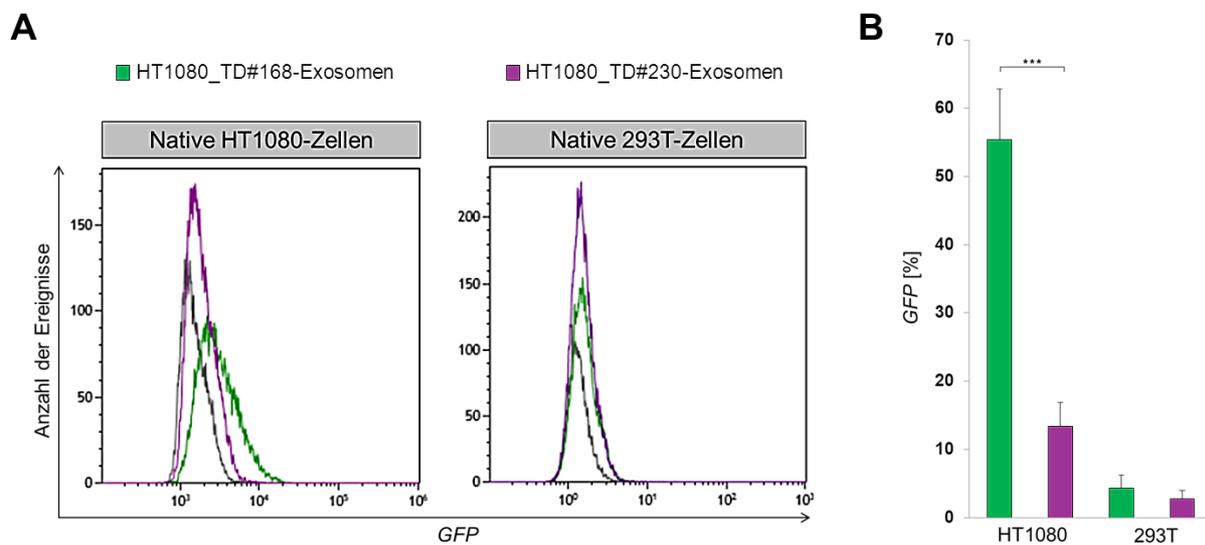


Abbildung 25: Anteile *GFP*-positiver HT1080- und 293T-Zellen nach 6-stündiger Inkubation mit HT1080_TD#230-Exosomen im Vergleich zu HT1080_TD#168-Exosomen.

A 5×10^4 native HT1080- bzw. 293T-Zellen wurden pro Kavität einer 24-Well-Zellkulturplatte über Nacht kultiviert. Nach Abnahme des Mediums wurden jeweils 150 µg der in 300 µL *EMEM* resuspendierten Exosomen mit den adhärenierten Zellen für 6 h inkubiert. Die Zellen wurden anschließend im Durchflusszytometer auf ihre *GFP*-Positivität analysiert (lila Graph). Als Kontrolle dienten die jeweiligen Zellen, welche mit nativen HT1080-Exosomen inkubiert wurden (grauer Graph). Zum Vergleich ist die *GFP*-Positivität der Zellen nach Inkubation mit HT1080_TD#168-Exosomen zu sehen (grüner Graph).

B Graphische Zusammenfassung der mittels Durchflusszytometrie erfassten Daten bezüglich der *GFP*-Positivität von HT1080-Zellen ($n = 3$) und 293T-Zellen ($n = 3$) nach Inkubation mit HT1080_TD#233-Exosomen (lila Balken) gegenüber HT1080_TD#168-Exosomen (grüne Balken), *** ($p \leq 0,001$) im *t*-Test.

Tabelle 26 zeigt die zusammengefassten durchflusszytometrischen Daten bezüglich der GFP-Positivität von HT1080- bzw. 293T-Zellen, welche mit HT1080_TD#230-Exosomen inkubiert wurden. Im Vergleich dazu sind die aus vorherigen Versuchen erfassten Ergebnisse von Zellen nach Inkubation mit HT1080_TD#168-Exosomen aufgelistet.

Fokus	Zellen	Exosomen	Ergebnis
GFP	Native HT1080	HT1080_TD#168	55,4 % ± 7,4 % (n = 3)
		HT1080_TD#230	13,4 % ± 3,5 % (n = 3)
	Native 293T	HT1080_TD#168	4,3 % ± 1,9 % (n = 3)
		HT1080_TD#230	2,8 % ± 1,3 % (n = 3)

Tabelle 26: Anteile GFP-positiver HT1080- und 293T-Zellen nach Inkubation mit HT1080_TD#230-Exosomen gegenüber HT1080_TD#168-Exosomen. Dargestellt sind die Mittelwerte und jeweiligen Standardabweichungen. In Klammern sind die Anzahlen der durchgeführten Versuche angezeigt.

8.2 Vergleich der Konstrukte #233 (*TIMP-1_GPI*) und #234 (*TIMP-1_GPI_ZIP*)

8.2.1 Charakterisierung der Donorzellen

Abbildung 27 zeigt die durchflusszytometrischen Daten hinsichtlich der Charakterisierung von HT1080_TD#233-Zellen verglichen mit HT1080_TD#234-Zellen, welche mit einem um ZIP ergänztem, *TIMP-1_GP*-kodierenden Plasmid (Abbildung 26) transduziert wurden.



Abbildung 26: Vergleich der Konstrukte mit und ohne „Zipcode“-like-Sequenz. Schematisch dargestellt sind die sequenziellen Abfolgen der in HT1080-Zellen transduzierten Plasmide #233 und #234. pEFS: *Elongation factor 1-alpha short promoter*; TIMP-1: *Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1*; myc: Myelocytomatose-Onkogen; GPI: Glycosylphosphatidylinositol; IRES: Interne ribosomale Eintrittsstelle; pac: Puromycin N-Acetyltransferase; P2A: Peptid 2A; eGFP: *Enhanced green fluorescent protein*; ZIP: „Zipcode“-like-Sequenz

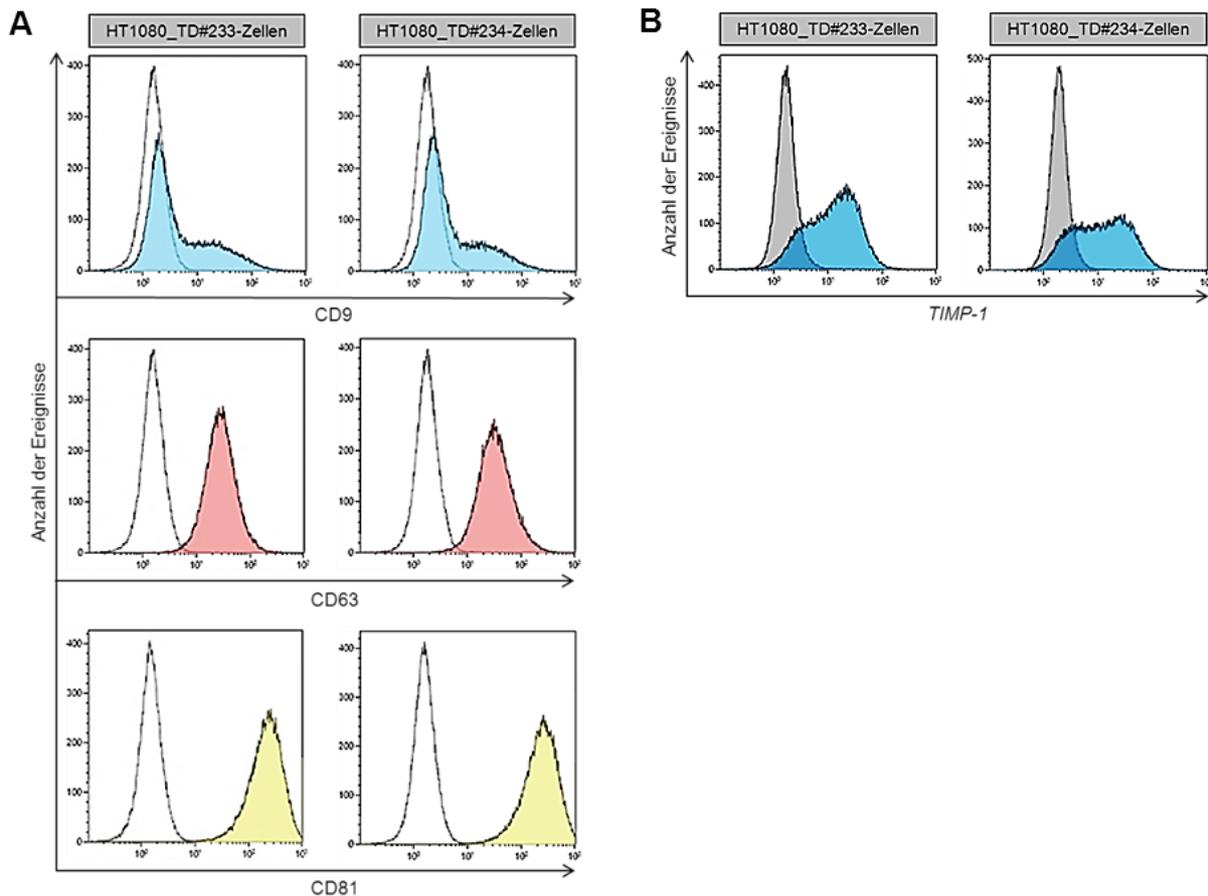


Abbildung 27: Charakterisierung der mit Plasmid #234 transduzierten HT1080-Zellen (HT1080_TD#234) im Vergleich zu HT1080_TD#233-Zellen.

A Für die durchflusszytometrische Analyse der Expression exosomaler Oberflächenmarker wurden jeweils $0,5 \times 10^6$ Zellen in $100 \mu\text{L}$ PBS mit dem entsprechenden spezifischen APC-konjugierten Antikörper gefärbt (farbige Graphen). Die schwarzen Kurven verdeutlichen die jeweiligen Isotyp-Kontrollen. Daneben sind die entsprechenden Histogramme von HT1080_TD#233-Zellen zum Vergleich dargestellt.

B HT1080_TD#234-Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie auf ihre *TIMP-1*-Expression analysiert (blauer Graph). Dazu wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen in $100 \mu\text{L}$ PBS mit dem entsprechenden spezifischen APC-konjugierten Antikörper inkubiert. Als Kontrolle dienten native HT1080-Zellen, welche mit demselben Primärantikörper gefärbt wurden (grauer Graph). Zum Vergleich sind überdies die Histogramme von HT1080_TD#233-Zellen aufgeführt.

In Tabelle 27 sind die zusammengefassten durchflusszytometrischen Daten zur Charakterisierung von HT1080_TD#234-Zellen im Vergleich zu HT1080_TD#233-Zellen aufgelistet.

Expression	HT1080_TD#233	HT1080_TD#234
CD9	34,2 % ± 1,2 % (n = 4)	34,4 % ± 1,3 % (n = 4)
CD63	99,3 % ± 0,2 % (n = 4)	99,0 % ± 0,3 % (n = 4)
CD81	99,4 % ± 0,3 % (n = 4)	99,2 % ± 0,2 % (n = 4)
TIMP-1	82,7 % ± 0,5 % (n = 3)	71,9 % ± 1,7 % (n = 3)

Tabelle 27: Expressionslevel von exosomalen Oberflächenmarkern sowie TIMP-1 der mit Plasmid #234 transduzierten HT1080-Zellen (HT1080_TD#234) verglichen mit HT1080_TD#233-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und jeweiligen Standardabweichungen aus den durchflusszytometrischen Analysen. In Klammern ist die jeweilige Anzahl der durchgeführten Versuche angezeigt.

8.2.2 Nachweis und Charakterisierung der Exosomen

Bei den aus HT1080_TD#234-Zellen aufgereinigten Partikeln handelte es sich um Komplexe mit exosomalen Markern (Tabelle 28), welche zudem eine intakte Lipiddoppelmembran besaßen (Tabelle 29).

Komplex	HT1080_TD#233-Exosomen	HT1080_TD#234-Exosomen
Beads(CD9) / CD81	94,9 %	95,7 %
Beads(CD63) / CD81	94,4 %	94,9 %
Beads(CD81) / CD63	96,0 %	96,4 %

Tabelle 28: Nachweis von Komplexen mit exosomalen Markern im Durchflusszytometer. Aufgeführt sind die Anteile von Partikeln bezüglich zweier exosomaler Marker, welche mittels *Total Exosome Isolation Reagent* aus dem Überstand von HT1080_TD#233-Zellen und HT1080_TD#234-Zellen isoliert wurden. Die Partikel wurden zur durchflusszytometrischen Visualisierung über einen exosomalen Marker an 9,1 µm Ø-Beads gebunden und gegen einen weiteren exosomalen Marker gefärbt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei Messungen.

Komplex	HT1080_TD#233-Exosomen	HT1080_TD#234-Exosomen
<i>Beads</i>(CD81) / <i>Dil</i> / CD63	77,2 %	79,1 %
<i>Beads</i>(CD81) / <i>EF</i> / CD63	80,8 %	83,1 %

Tabelle 29: Nachweis von membranhaltigen Komplexen mit exosomalen Markern im Durchflusszytometer. Mittels *Total Exosome Isolation Reagent* aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigte Partikel wurden zur durchflusszytometrischen Visualisierung über den exosomalen Marker CD81 an 9,1 µm Ø-*Beads* gebunden und gegen einen weiteren exosomalen Marker gefärbt. Zudem wurde die Membran über die Farbstoffe *Dil* und *Exo-FITC* (*EF*) detektiert. Zu sehen sind die Anteile der an *Beads* gebunden Partikel, welche sowohl den Farbstoff als auch den exosomalen Marker CD63 aufwiesen.

Darüber hinaus war bei HT1080_TD#234-Exosomen der Anteil der Marker CD9, CD63 und CD81 als auch des membrangebundenen Proteins *TIMP-1* hinsichtlich der Gesamtproteinmenge höher, wohingegen Aktin in Exosomen abgereichert wurde (Abbildung 28A).

Zudem war der Gehalt an *TIMP-1* von HT1080_TD#234-Exosomen geringer als von HT1080_TD#233-Exosomen (Abbildung 28B).

Die aus HT1080_TD#234-Zellen gewonnenen Exosomen hatten einen Durchmesser von $(129,3 \pm 49,3)$ nm und einen Modalwert von 133,3 nm. Im Vergleich dazu lag die durchschnittliche Größe von HT1080_TD#233-Exosomen bei $(124,7 \pm 51,6)$ nm mit einem Modalwert von 122,7 nm (Abbildung 28C).

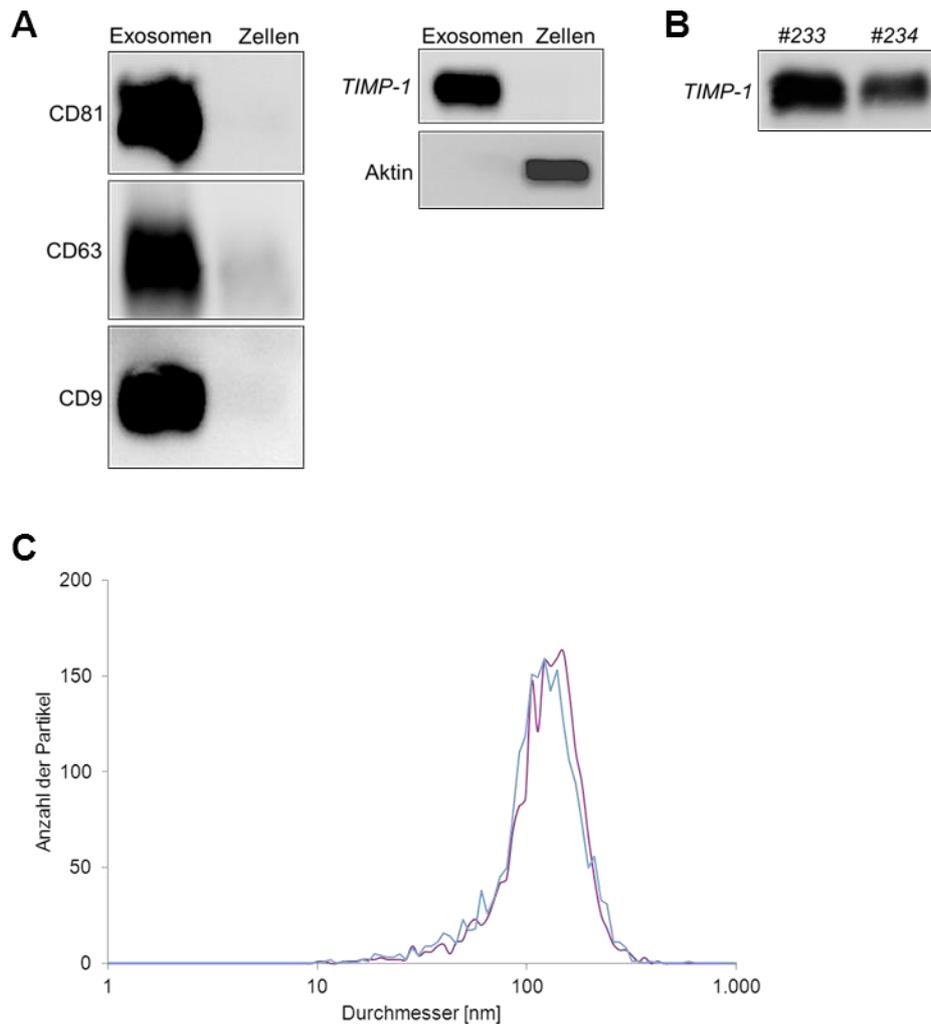


Abbildung 28: Nachweis und Charakterisierung von HT1080_TD#234-Exosomen mittels Western Blot und NTA.

A Für den Vergleich der Mengen an exosomalen Markern und zytosolischen Proteinen zwischen HT1080_TD#234-Exosomen und deren Donorzellen wurden jeweils 9 µg Protein zur gelelektrophoretischen Auftrennung eingesetzt. Nach Inkubation der PVDF-Membran mit dem entsprechenden spezifischen Primärantikörper und dazugehörigen Enzym-konjugierten Sekundärantikörper erfolgte die Visualisierung der Proteinmengen in einer Geldokumentationsanlage.

B Verglichen mit HT1080_TD#233-Exosomen war die Menge an *TIMP-1* von HT1080_TD#234-Exosomen geringer. Die Analyse erfolgte analog zu **A**.

C Dargestellt ist die durchschnittliche Größenverteilung der aus HT1080_TD#234-Zellen isolierten Partikel (lila Graph) verglichen mit HT1080_TD#233-Exosomen (blauer Graph). Bei den mittels *ZetaView PMX 110* durchgeführten Analysen wurden jeweils drei Zyklen mit je elf Positionen gemessen.

8.2.3 Analyse des exosomalen Transports

Abbildung 29 zeigt die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analysen von HT1080- und 293T-Zellen nach Inkubation mit HT1080_TD#234-Exosomen verglichen mit HT1080_TD#233-Exosomen.

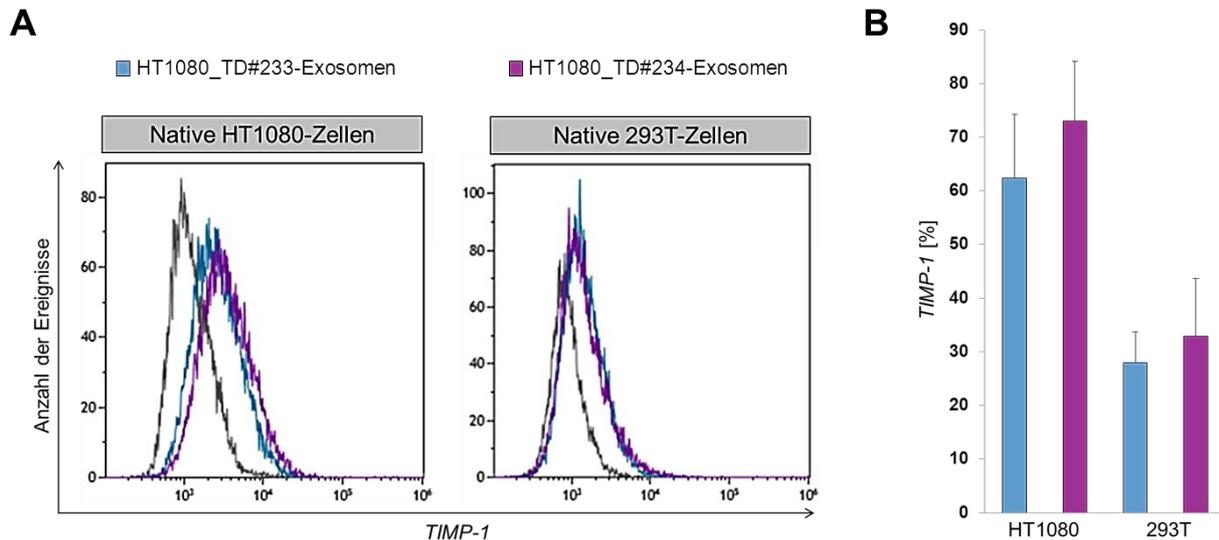


Abbildung 29: Anteile *TIMP-1*-positiver HT1080- und 293T-Zellen nach 6-stündiger Inkubation mit HT1080_TD#234-Exosomen im Vergleich zu HT1080_TD#233-Exosomen.

A 5×10^4 native HT1080- bzw. 293T-Zellen wurden pro Kavität einer 24-Well-Zellkulturplatte über Nacht kultiviert. Nach Abnahme des Mediums wurden jeweils $150 \mu\text{g}$ der in $300 \mu\text{L}$ *EMEM* resuspendierten Exosomen mit den adhärenierten Zellen für 6 h inkubiert. Die Zellen wurden anschließend im Durchflusszytometer mittels spezifischem Antikörper auf ihre *TIMP-1*-Positivität analysiert (lila Graph). Als Kontrolle dienten Zellen, welche mit nativen HT1080-Exosomen inkubiert und demselben Antikörper gefärbt wurden (grauer Graph). Zum Vergleich ist die *TIMP-1*-Positivität der Zellen nach Inkubation mit HT1080_TD#233-Exosomen zu sehen (blauer Graph).

B Graphische Zusammenfassung der mittels Durchflusszytometrie erfassten Daten bezüglich der *TIMP-1*-Positivität von HT1080-Zellen ($n = 3$) und 293T-Zellen ($n = 3$) nach Inkubation mit HT1080_TD#233-Exosomen (lila Balken) gegenüber HT1080_TD#233-Exosomen (blaue Balken).

Tabelle 30 zeigt die mittels Durchflusszytometrie zusammengefassten Resultate im Hinblick auf *TIMP-1*-positive HT1080- und 293T-Zellen nach Inkubation mit HT1080_TD#234-Exosomen. Dem gegenüber sind die aus vorherigen Versuchen erfassten Ergebnisse der Zellen, welche mit HT1080_TD#233-Exosomen inkubiert wurden, aufgeführt.

Fokus	Zellen	Exosomen	Ergebnis
<i>TIMP-1</i>	Native HT1080	HT1080_TD#233	62,4 % ± 11,9 % (n = 3)
		HT1080_TD#234	73,0 % ± 11,2 % (n = 3)
	Native 293T	HT1080_TD#233	28,0 % ± 5,6 % (n = 4)
		HT1080_TD#234	32,9 % ± 10,8 % (n = 3)

Tabelle 30: Anteile *TIMP-1*-positiver HT1080- und 293T-Zellen nach Inkubation mit HT1080_TD#234-Exosomen gegenüber HT1080_TD#233-Exosomen. Dargestellt sind die Mittelwerte und jeweiligen Standardabweichungen. In Klammern sind die Anzahlen der durchgeführten Versuche angezeigt.

9 Wahl eines geeigneten Lipidankers zur Übertragung membrangebundener Proteine

TIMP-1 besitzt die Fähigkeit Matrix-Metalloproteasen (MMP) zu inhibieren und somit das Wachstum eines Tumors zu behindern (Alameddine und Morgan, 2016). Da frühere Versuche zeigten, dass Exosomen in der Lage waren, *TIMP-1_GPI* auf Zielzellen zu transferieren, wurde mit der Transmembrandomäne aus dem humanen hämatopoetischen Vorläuferzellen-Antigen CD34 eine Alternative gegenüber dem *GPI*-Anker zur Übertragung des therapeutischen Proteins analysiert (Abbildung 30).



Abbildung 30: Vergleich der Konstrukte mit unterschiedlichen Membranankern zur Bindung von *TIMP-1*. Schematisch dargestellt sind die sequenziellen Abfolgen der in HT1080-Zellen transduzierten Plasmide #233 und #235. pEFS: *Elongation factor 1-alpha short promoter*; *TIMP-1*: *Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1*; myc: Myelocytomatose-Onkogen; GPI: Glycosylphosphatidylinositol; MSD: *Membrane-spanning domain*; IRES: Interne ribosomale Eintrittsstelle; pac: Puromycin N-Acetyltransferase; P2A: Peptid 2A; eGFP: *Enhanced green fluorescent protein*

9.1 Vergleich der Konstrukte #233 (*TIMP-1_GPI*) und #235 (*TIMP-1_MSD*)

9.1.1 Charakterisierung der Donorzellen

Die durchflusszytometrisch erfassten Analysen der HT1080_TD#235-Zellen betrafen die Expression von exosomalen Oberflächenmarkern und *TIMP-1*. Zum Vergleich sind die zur Charakterisierung der HT1080_TD#233-Zellen erhobenen Daten dargestellt (Abbildung 31).

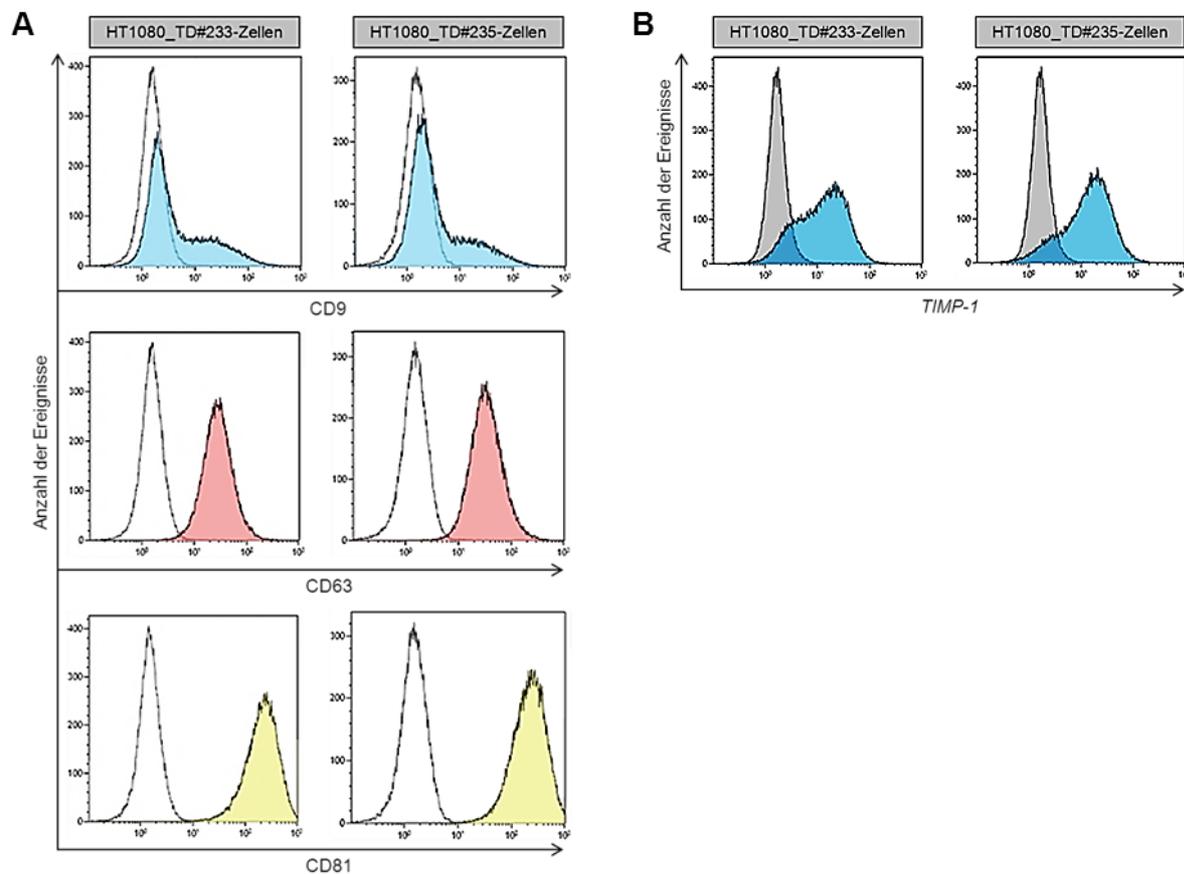


Abbildung 31: Charakterisierung der mit Plasmid #235 transduzierten HT1080-Zellen (HT1080_TD#235-Zellen) im Vergleich zu HT1080_TD#233-Zellen.

A Für die durchflusszytometrische Analyse der Expression exosomaler Oberflächenmarker wurden jeweils $0,5 \times 10^6$ Zellen in $100 \mu\text{L}$ PBS mit dem entsprechenden spezifischen APC-konjugierten Antikörper gefärbt (farbige Graphen). Die schwarzen Kurven verdeutlichen die jeweiligen Isotyp-Kontrollen. Daneben sind die entsprechenden Histogramme von HT1080_TD#233-Zellen zum Vergleich dargestellt.

B HT1080_TD#235-Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie auf ihre *TIMP-1*-Expression analysiert (blauer Graph). Dazu wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen in $100 \mu\text{L}$ PBS mit dem entsprechenden spezifischen APC-konjugierten Antikörper inkubiert. Als Kontrolle dienten native HT1080-Zellen, welche mit demselben Primärantikörper gefärbt wurden (grauer Graph). Zum Vergleich sind die entsprechenden Histogramme von HT1080_TD#233-Zellen aufgeführt.

Tabelle 31 zeigt die durchflusszytometrischen Daten zur Charakterisierung von HT1080_TD#235-Zellen gegenüber HT1080_TD#233-Zellen.

Expression	HT1080_TD#233	HT1080_TD#235
CD9	34,2 % ± 1,2 % (n = 4)	31,28 % ± 0,7 % (n = 6)
CD63	99,3 % ± 0,2 % (n = 4)	99,33 % ± 0,3 % (n = 6)
CD81	99,4 % ± 0,3 % (n = 4)	99,45 % ± 0,3 % (n = 6)
TIMP-1	82,7 % ± 0,5 % (n = 3)	85,42 % ± 0,8 % (n = 4)

Tabelle 31: Expressionslevel von exosomalen Oberflächenmarkern und GFP sowie TIMP-1 der mit Plasmid #235 transduzierten HT1080-Zellen (HT1080_TD#235) im Vergleich zu HT1080_TD#233-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und jeweiligen Standardabweichungen. In Klammern ist die jeweilige Anzahl der durchgeführten Versuche angezeigt.

9.1.2 Nachweis und Charakterisierung der Exosomen

Bei den aus den HT1080_TD#235-Zellkulturüberständen isolierten Partikeln handelte es sich um Komplexe mit exosomalen Markern, die über eine intakte Doppellipidmembran verfügten. Die jeweiligen Ergebnisse sind in den Tabellen 32-33 aufgelistet.

Komplex	HT1080_TD#233-Exosomen	HT1080_TD#235-Exosomen
Beads(CD9) / CD81	94,9 %	97,2 %
Beads(CD63) / CD81	94,4 %	95,9 %
Beads(CD81) / CD63	96,0 %	97,1 %

Tabelle 32: Nachweis von Komplexen mit exosomalen Markern im Durchflusszytometer. Aufgeführt sind die Anteile von Partikeln bezüglich zweier exosomaler Marker, welche mittels *Total Exosome Isolation Reagent* aus dem Überstand von HT1080_TD#233-Zellen und HT1080_TD#234-Zellen isoliert wurden. Die Partikel wurden zur durchflusszytometrischen Visualisierung über einen exosomalen Marker an 9,1 µm Ø-Beads gebunden und gegen einen weiteren exosomalen Marker gefärbt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei Messungen.

Komplex	HT1080_TD#233-Exosomen	HT1080_TD#235-Exosomen
<i>Beads</i>(CD81) / <i>Dil</i> / CD63	77,2 %	79,9 %
<i>Beads</i>(CD81) / <i>EF</i> / CD63	80,8 %	73,0 %

Tabelle 33: Nachweis von membranhaltigen Komplexen mit exosomalen Markern im Durchflusszytometer. Mittels *Total Exosome Isolation Reagent* aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigte Partikel wurden zur durchflusszytometrischen Visualisierung über den exosomalen Marker CD81 an 9,1 µm Ø-*Beads* gebunden und gegen einen weiteren exosomalen Marker gefärbt. Zudem wurde die Membran über die Farbstoffe *Dil* und *Exo-FITC* (*EF*) detektiert. Zu sehen sind die Anteile der an *Beads* gebunden Partikel, welche sowohl den Farbstoff als auch den exosomalen Marker CD63 aufwiesen.

Des Weiteren wiesen HT1080_TD#235-Exosomen einen höheren Anteil an den Oberflächenmarkern CD9, CD63 und CD81 in Relation zur gesamten Proteinmenge auf und besaßen zudem größere Mengen des membrangebundenen Proteins *TIMP-1*. Aktin war dagegen in Exosomen abgereichert (Abbildung 32A).

Gegenüber HT1080_TD#233-Exosomen besaßen HT1080_TD#235-Exosomen geringere Mengen an *TIMP-1* (Abbildung 32B).

Mit einer durchschnittlichen Größe von $(127,5 \pm 48,2)$ nm und einem Modalwert von 127,1 nm waren HT1080_TD#235-Exosomen zudem mit HT1080_TD#233-Exosomen vergleichbar (Abbildung 32C).

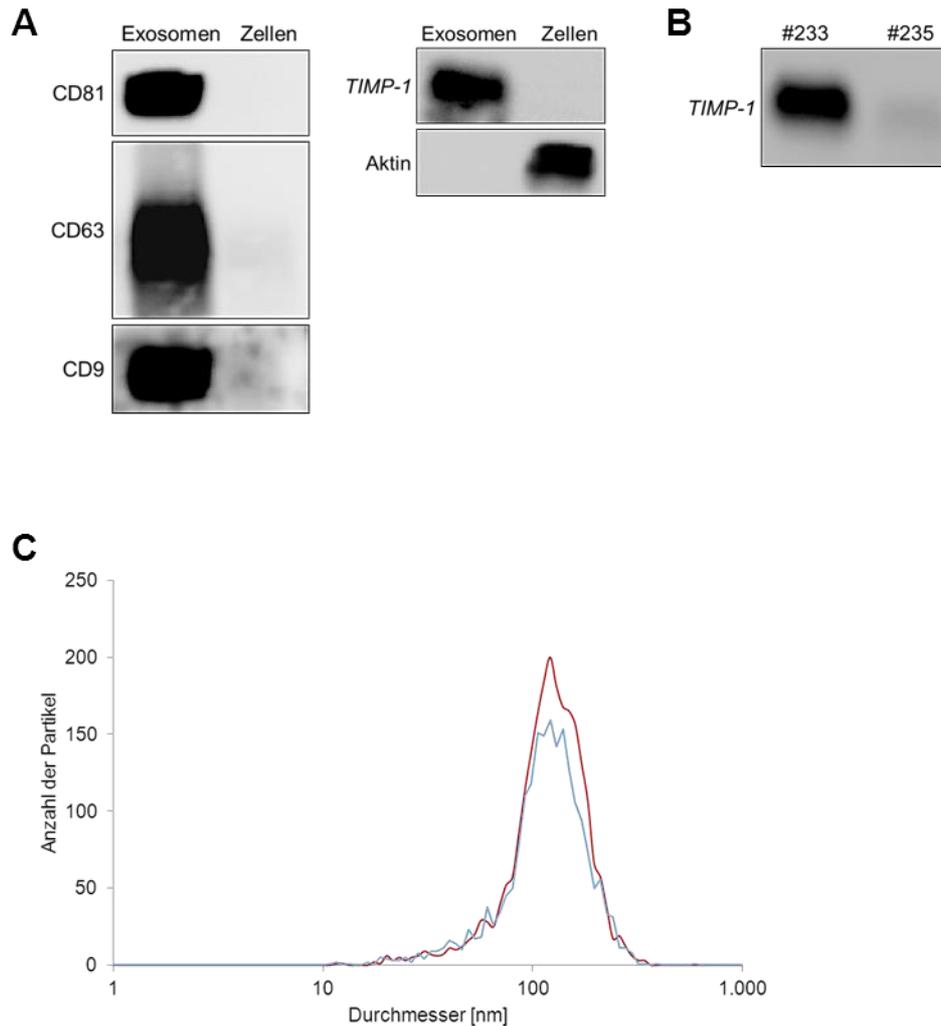


Abbildung 32: Nachweis und Charakterisierung von HT1080_TD#235-Exosomen mittels Western Blot und NTA.

A Für den Vergleich der Mengen an exosomalern Markern und zytosolischen Proteinen zwischen HT1080_TD#235-Exosomen und deren Donorzellen wurden jeweils 9 µg Protein zur gelelektrophoretischen Auftrennung eingesetzt. Nach Inkubation der PVDF-Membran mit dem entsprechenden spezifischen Primärantikörper und dazugehörigen Enzym-konjugierten Sekundärantikörper erfolgte die Visualisierung der Proteinmengen in einer Geldokumentationsanlage.

B Verglichen mit HT1080_TD#233-Exosomen war die Menge an *TIMP-1* von HT1080_TD#235-Exosomen geringer. Die Analyse erfolgte analog zu **A**.

C Dargestellt ist die durchschnittliche Größenverteilung der aus HT1080_TD#235-Zellen isolierten Partikel (roter Graph) verglichen mit HT1080_TD#233-Exosomen (blauer Graph). Bei den mittels *ZetaView PMX 110* durchgeführten Analysen wurden jeweils drei Zyklen mit je elf Positionen gemessen.

9.1.3 Analyse des exosomalen Transports

Nach 6-stündiger Inkubation von HT1080_TD#235-Exosomen mit nativen HT1080- bzw. 293T-Zellen wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert (Abbildung 33).

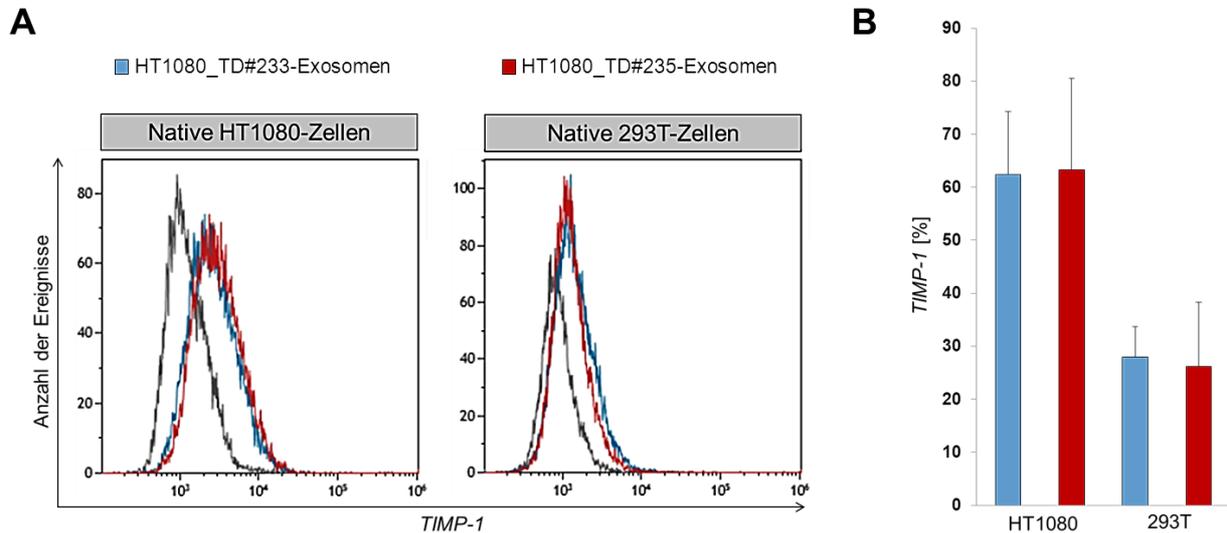


Abbildung 33: Anteile *TIMP-1*-positiver HT1080- und 293T-Zellen nach 6-stündiger Inkubation mit HT1080_TD#235-Exosomen bzw. HT1080_TD#233-Exosomen.

A 5×10^4 native HT1080- bzw. 293T-Zellen wurden pro Kavität einer 24-Well-Zellkulturplatte über Nacht kultiviert. Nach Abnahme des Mediums wurden jeweils 150 μg der in 300 μL *EMEM* resuspendierten Exosomen mit den adhärirten Zellen für 6 h inkubiert. Die Zellen wurden anschließend im Durchflusszytometer auf ihre *TIMP-1*-Positivität analysiert (roter Graph). Als Kontrolle dienten die jeweiligen Zellen, welche mit nativen HT1080-Exosomen inkubiert wurden (grauer Graph). Zum Vergleich ist die *TIMP-1*-Positivität der Zellen nach Inkubation mit HT1080_TD#233-Exosomen zu sehen (blauer Graph).

B Graphische Zusammenfassung der mittels Durchflusszytometrie erfassten Daten bezüglich der *TIMP-1*-Positivität von HT1080-Zellen ($n = 3$) und 293T-Zellen ($n = 3$) nach Inkubation mit HT1080_TD#235-Exosomen (rote Balken) gegenüber HT1080_TD#233-Exosomen (blaue Balken).

Die nach Inkubation mit HT1080_TD#235-Exosomen durchflusszytometrisch erfassten Daten bezüglich *TIMP-1*-positiver HT1080- und 293T-Zellen sind in Tabelle 34 veranschaulicht. Gegenübergestellt sind die aus weiteren Versuchen erfassten Ergebnisse der Zellen nach Inkubation mit HT1080_TD#233-Exosomen.

Fokus	Zellen	Exosomen	Ergebnis
<i>TIMP-1</i>	Native HT1080	HT1080_TD#233	62,4 % ± 11,9 % (n = 3)
		HT1080_TD#235	63,3 % ± 17,2 % (n = 3)
	Native 293T	HT1080_TD#233	28,0 % ± 5,6 % (n = 4)
		HT1080_TD#235	26,2 % ± 12,1 % (n = 4)

Tabelle 34: Anteile *TIMP-1*-positiver HT1080- und 293T-Zellen nach Inkubation mit HT1080_TD#235-Exosomen gegenüber HT1080_TD#233-Exosomen. Dargestellt sind die Mittelwerte und jeweiligen Standardabweichungen. In Klammern sind die Anzahlen der durchgeführten Versuche angezeigt.

10 Überprüfung der Wirksamkeit von *TIMP-1_GPI*

Um die Wirksamkeit von *TIMP-1_GPI* als therapeutisches Protein zu prüfen, wurde ein *Scratch-Assay* durchgeführt, bei welchem native HT1080-Zellen und *TIMP-1_GPI*-positive HT1080_TD#234-Zellen in Bezug auf ihr Migrationsverhalten miteinander verglichen wurden (Abbildungen 34B-C). Beide Populationen zeigten in früheren Versuchen vergleichbare Zellteilungsraten (Abbildung 34A).

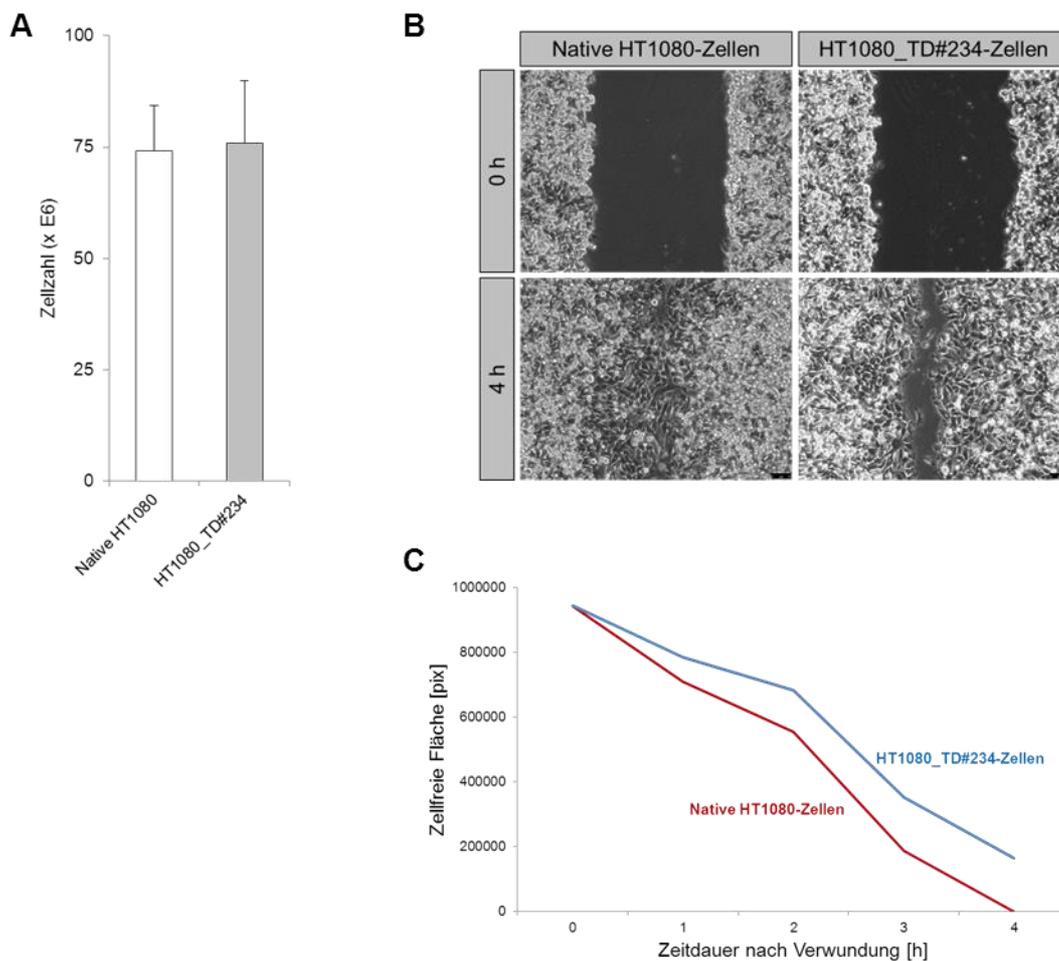


Abbildung 34: Vergleich zweier Zellpopulationen bezüglich ihres Migrationsverhaltens.

A Native bzw. mit Plasmid #234 transduzierte HT1080-Zellen zeigten vergleichbare Zellteilungsraten. Es wurden jeweils 5×10^6 Zellen in Zellkulturflaschen ausgesät und nach der Exosomenernte gezählt.

B Abbildungen der Zellen zu Beginn der Verwundung ($t = 0$ h) und 4 h danach.

C Größe der jeweiligen zellfreien Flächen zu den verschiedenen Zeitpunkten nach Verwundung der Zellkulturen.

Tabelle 35 gibt die zu den einzelnen Zeitpunkten nach Verwundung mittels *ImageJ* berechneten zellfreien Flächen wieder.

Zeitdauer nach Verwundung [h]	Größe an freier Fläche [pix]	
	Native HT1080-Zellen	HT1080_TD#234-Zellen
0	942628 (100 %)	945430 (100 %)
1	710454 (75 %)	786034 (83 %)
2	555195 (59 %)	682576 (72 %)
3	187874 (20 %)	352976 (37 %)
4	0 (0 %)	163770 (17 %)

Tabelle 35: Größe der zellfreien Flächen bei der Migration nativer HT1080-Zellen verglichen mit HT1080_TD#234-Zellen zu den verschiedenen Zeitpunkten nach Verwundung.

11 Zielgerichteter exosomaler Transfer

Chemokine sind chemotaktische Zytokine, welche die Migration von Immunzellen kontrollieren (Griffith *et al.*, 2014; Kufareva *et al.*, 2015). Darüber hinaus bindet ein Chemokin nur an eine bestimmte Familie an Rezeptoren (Kufareva *et al.*, 2015).

Unter diesen Voraussetzungen sollte ein System zum zielgerichteten exosomalen Transport auf Grundlage einer Chemokin-Chemokinrezeptor-Bindung etabliert werden.

Infolgedessen wurden Exosomen aus L87/4-Zellen isoliert, welche das Interferon- γ -induzierte Protein 10 (*IP-10* bzw. *CXCL10*) über einen *GPI*-Anker an der Zelloberfläche exprimierten. Um die Effizienz der exosomalen Übertragung feststellen zu können, waren die Zellen darüber hinaus mit einem Plasmid transfiziert, welches mit einer *ZIP* ergänzten *GFP*-Sequenz kodiert war (Abbildung 35). Als Kontrollen wurden Exosomen sowohl aus nativen L87/4-Zellen als auch L87/4-Zellen verwendet, die zwar *GFP*, jedoch kein Chemokin exprimierten (L87/4_TD#168-Zellen).

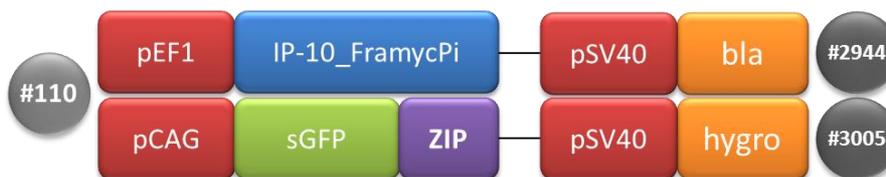


Abbildung 35 Schematische Darstellung der sequenziellen Abfolgen der in L87/4-Zellen transfizierten Plasmide #2944 und #3005. p: Promotor; IP-10: Interferon- γ -induziertes Protein 10; FramycPi: *Fraktalkin-MYC-GPI*; sGFP: *Superfolder green fluorescent protein*; ZIP: „*Zipcode*“-like-Sequenz; bla: Blastizidin-Resistenzgen; hygro: Hygromycin-Resistenzgen

11.1 Charakterisierung der Donorzellen

Zum einen wurden native L87/4-Zellen als auch L87/4_TD#168-Zellen bzw. L87/4_TF#110-Zellen fluoreszenzmikroskopisch auf ihre *GFP*-Expression untersucht. Zum anderen wurden durchflusszytometrische Analysen bezüglich der Expression exosomaler Oberflächenmarker sowie von *GFP* durchgeführt, dabei wurden bei jeder Messung mindestens 44×10^3 Ereignisse zur Auswertung herangezogen (Abbildung 36).

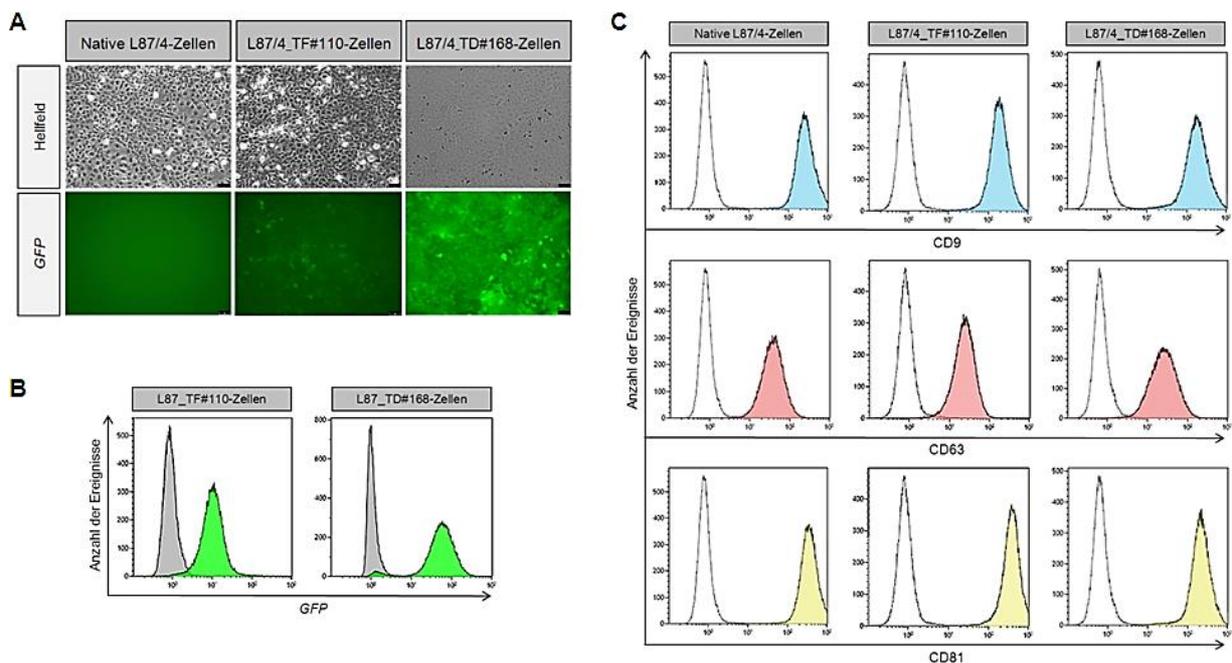


Abbildung 36: Charakterisierung von L87/4_TF#110-Zellen und L87/4_TD#168-Zellen.

A Hellfeld- und Fluoreszenzaufnahmen von *GFP*-positiven L87_TD#168-Zellen und L87_TF#110 im Vergleich zu nativen L87/4-Zellen. Der sich am rechten unteren Bildrand befindende Balken entspricht einer Länge von 25 μ m.

B L87/4_TF#110-Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie auf ihre *GFP*-Expression analysiert (grüner Graph). Als Kontrolle dienten native L87/4-Zellen (grauer Graph). Zum Vergleich ist zusätzlich die *GFP*-Expression von L87/4_TD#168-Zellen dargestellt.

C Für die durchflusszytometrische Analyse der Expression exosomaler Oberflächenmarker wurden jeweils $0,5 \times 10^6$ Zellen in 100 μ L *PBS* mit dem entsprechenden spezifischen APC-konjugierten Antikörper gefärbt (farbige Graphen). Die schwarzen Kurven verdeutlichen die jeweiligen Isotyp-Kontrollen. Zum Vergleich sind die entsprechenden Histogramme von nativen L87/4-Zellen dargestellt.

Die durchflusszytometrischen Ergebnisse hinsichtlich der Expression exosomaler Oberflächenmarker und *GFP* der einzelnen Zellpopulationen sind in Tabelle 36 dargestellt.

Expression	Native L87/4	L87/4_TD#168	L87/4_TF#110
CD9	98,7 % ± 0,3% (n = 3)	98,3 % ± 0,2% (n = 3)	98,1 % ± 0,7 % (n = 5)
CD63	98,5 % ± 0,4 % (n = 3)	98,1 % ± 0,2 % (n = 3)	97, % ± 1,3 % (n = 6)
CD81	98,7 % ± 0,3 % (n = 3)	98,3 % ± 0,2 % (n = 3)	98,1 % ± 0,6 % (n = 5)
GFP	- (n = 4)	94,3 % ± 0,3 % (n = 3)	94,6 % ± 1,4 % (n = 6)

Tabelle 36: Expressionslevel von exosomalen Oberflächenmarkern sowie *GFP* von nativen L87/-Zellen, L87/4_TD#168-Zellen und L87/4_TF#110-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und jeweiligen Standardabweichungen. In Klammern ist die jeweilige Anzahl der durchgeführten Versuche angezeigt.

Vor dem Einfrieren zum Anlegen eines Zell-Batches wurden die L87/4_TF#110-Zellen auf ihre *IP-10*-Expression durchflusszytometrisch analysiert.

Gemessen am *Myc-Tag* waren dabei 70,83 % der Zellen *IP-10* positiv. Als Kontrolle wurden native L87/4-Zellen mit demselben Ak inkubiert.

11.2 Nachweis und Charakterisierung der Exosomen

Die aus den Zellkulturüberständen von nativen als auch L87/4_TF#110-Zellen isolierten Partikel entsprachen membranhaltigen Komplexen mit exosomalen Markern. Die mittels Durchflusszytometer erfassten Daten sind in Tabelle 37 aufgelistet.

Komplex	Native L87/4-Exosomen	L87/4_TF#110-Exosomen
Beads(CD81) / Dil / CD63	71,4 %	71,2 %
Beads(CD81) / EF / CD9	76,3 %	72,3 %

Tabelle 37: Nachweis von membranhaltigen Komplexen mit exosomalen Markern im Durchflusszytometer. Mittels *Total Exosome Isolation Reagent* aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigte Partikel wurden zur durchflusszytometrischen Visualisierung über den exosomalen Marker CD81 an 9,1 µm Ø-Beads gebunden und gegen einen weiteren exosomalen Marker gefärbt. Zudem wurde die Membran über die Farbstoffe *Dil* und *Exo-FITC (EF)* detektiert. Zu sehen sind die Anteile der an *Beads* gebundenen Partikel, welche sowohl einen membrangängigen Farbstoff als auch den exosomalen Marker CD63 bzw. CD9 aufwiesen

Des Weiteren zeigten sowohl native L87/4-Exosomen als auch L87/4_TF#110- und L87/4_TD#168-Exosomen einen erhöhten Anteil der Oberflächenmarker CD9 und CD81 an der Gesamtproteinmenge. Dagegen waren zum einen bei diesen Exosomen sowohl CD63 als auch Aktin und in L87/4_TF#110- und L87/4_TD#168-Exosomen *GFP* abgereichert (Abbildungen 37A-D).

Außerdem war die Proteinmenge an *GFP* in L87/4_TD#168-Zellen im Vergleich zu L87/4_TF#110-Zellen höher, was auch auf den entsprechenden *GFP*-Gehalt der aus diesen Zellen gewonnenen Exosomen zutraf (Abbildung 37D).

Mit einer durchschnittlichen Größe von $(145,1 \pm 61,9)$ nm und einem Modalwert von 146,9 nm waren native L87/4-Exosomen mit L87/4_TF#110-Exosomen $[(139,0 \pm 52,4)$ nm, Modalwert: 143,7 nm] und L87/4_TD#168-Exosomen $[(143,0 \pm 57,3)$ nm, Modalwert: 142,1 nm] vergleichbar (Abbildung 37E).

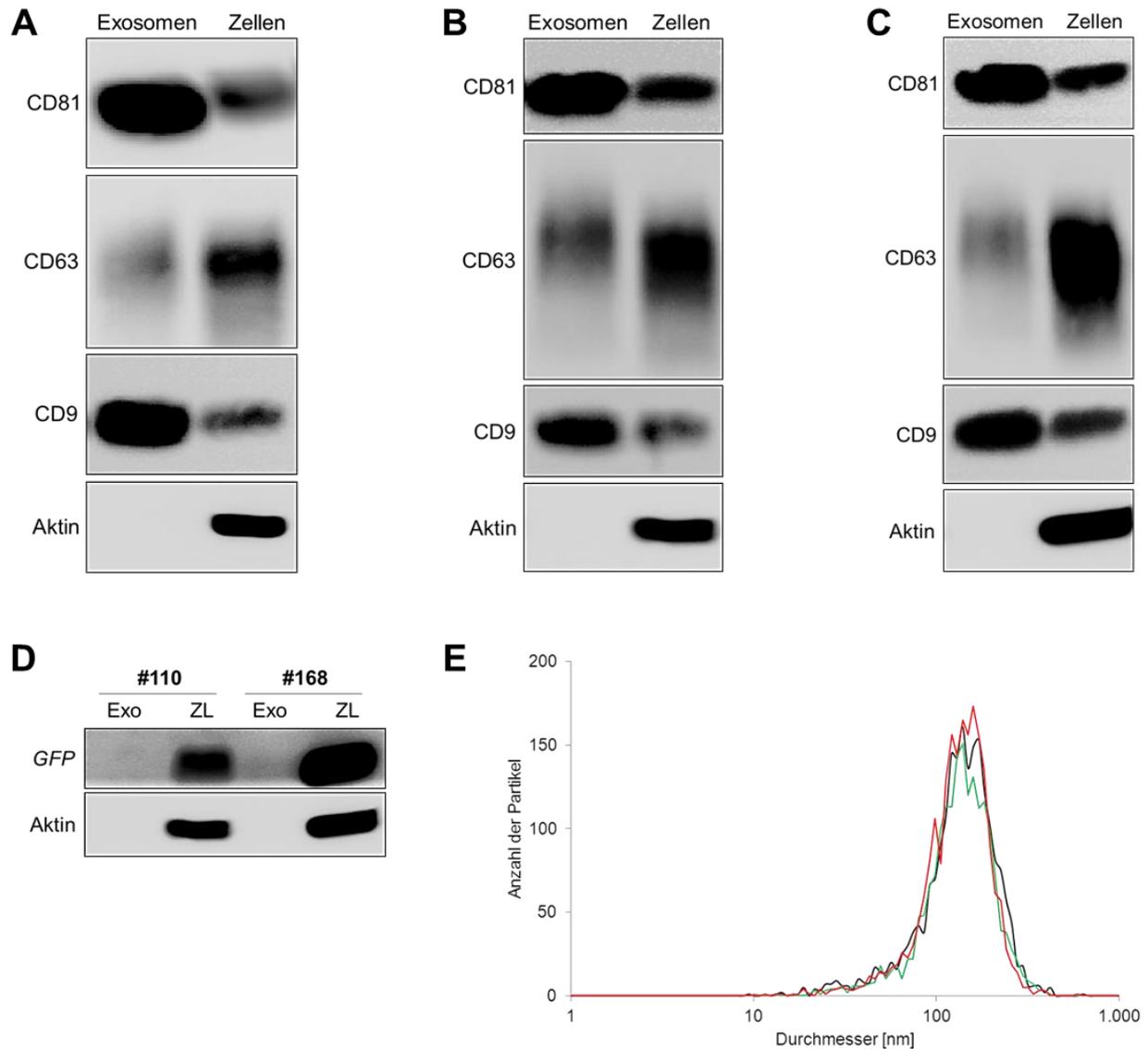


Abbildung 37: Nachweis und Charakterisierung von nativen L87/4-, L87/4_TF#110- und L87/4_TD#168-Exosomen mittels Western Blot und NTA.

Für den Vergleich der Mengen an exosomalen Markern zwischen nativen L87/4- (A), L87/4_TF#110- (B) sowie L87/4_TD#168-Exosomen (C) und deren Parentalzellen wurden jeweils 9 µg Protein zur gelelektrophoretischen Auftrennung eingesetzt. Dagegen wurden zur Detektion von Aktin 18 µg Protein verwendet. Nach Inkubation der PVDF-Membran mit dem entsprechenden spezifischen Primärantikörper und dazugehörigen Enzym-konjugierten Sekundärantikörper erfolgte die Visualisierung der Proteinmengen in einer Geldokumentationsanlage.

D Verglichen mit ihren Donorzellen (ZL) war der GFP-Gehalt von L87/4_TF#110- und L87/4_TD#168-Exosomen (Exo) geringer. Zudem war die Menge an GFP in L87/4_TD#168-Zellen höher als in L87/4_TF#110-Zellen. Bei der Analyse wurden jeweils 18 µg Protein eingesetzt.

E Dargestellt ist die durchschnittliche Größenverteilung der aus nativen L87/4-Zellen isolierten Partikel (schwarzer Graph) verglichen mit L87/4_TF#110-Exosomen (roter Graph) und Exosomen aus L87/4_TD#168-Zellen (grüner Graph). Bei den mittels *ZetaView PMX 110* durchgeführten Analysen wurden jeweils drei Zyklen mit je elf Positionen gemessen.

11.3 Analyse einer geeigneten Empfängerzelle

Für die Experimente zur zielgerichteten Übertragung von Exosomen aus *CXCL10*-positiven L87/4-Zellen wurden Jurkat-Zellen, welche den zum *IP-10*-Liganden entsprechenden *CXCR3*-Rezeptor exprimieren, als Empfängerzellen verwendet.

In intrazellulären durchflusszytometrischen Analysen dieser T-Lymphozyten-Zelllinie zeigte sich, dass 99,2 % der Zellpopulation *CXCR3* positiv waren. Als Kontrollen dienten jeweils die gleichen Zellen, welche mit dem Isotyp-Ak inkubiert wurden.

11.4 Analyse des exosomalen Transports

Zunächst wurde in einem Vorversuch die Frage geklärt, welchen Einfluss Exosomen aus nativen L87/4-Zellen auf das *GFP*-Signal bei der durchflusszytometrischen Analyse nach Inkubation mit nativen Jurkat-Zellen haben.

Dazu wurden 5×10^4 der Zellen pro Kavität einer 24-Well-Zellkulturplatte mit 300 μg nativen L87/4-Exosomen, welche in 300 μL *RPMI 1640* gelöst waren, für 6 h inkubiert. Als Kontrolle wurden 300 μL reines *RPMI 1640* eingesetzt. Mit einer Signaldifferenz von 0,31 % zwischen den beiden Proben ist die Wirkung nativer L87/4-Exosomen auf die *GFP*-Detektion der T-Zelllinie zu vernachlässigen.

In einem weiteren Experiment wurden jeweils 150 μg Exosomen aus L87/4_TF#110 mit 5×10^4 Jurkat-Zellen pro Kavität einer 24-Well-Zellkulturplatte für 6 h kultiviert. Als Kontrolle dienten L87/4_TD#168-Exosomen.

Obwohl der Gehalt an *GFP* in L87/4_TF#110-Exosomen niedriger war als in L87/4_TD#168-Exosomen, war der Anteil *GFP*-positiver T-Zellen nach Inkubation mit L87/4_TF#110-Exosomen verglichen mit L87/4_TD#168-Exosomen höher.

Um eine mögliche Chemokin-Chemokinrezeptor-Bindung für dieses Ergebnis zu überprüfen, wurde nach Neutralisierung des *IP-10*-Liganden auf L87/4_TF#110-Exosomen mit Hilfe eines anti-*CXCL10*-Antikörpers der *GFP*-Transfer analysiert.

Es stellte sich heraus, dass der exosomale Übertrag mit als auch ohne Blockierung des *IP-10*-Liganden kongruierte und somit der zielgerichtete Exosomentransport nicht verifiziert werden konnte.

Die Expression des *CXCR3*-Rezeptors war bei allen Zellpopulationen vergleichbar hoch. Die Ergebnisse des Experiments sind in Tabelle 38 zu finden.

Jurkat-Zellen	GFP [%]	CXCR3 [%]
+ RPMI 1640 (Kontrolle)	1,9	82,2
+ L87/4_TD#168-Exosomen	5,7	86,7
+ L87/4_TD#168-Exosomen + CXCL10-Blockierung	5,0	83,7
+ L87/4_TF#110-Exosomen	9,0	81,0
+ L87/4_TF#110-Exosomen + CXCL10-Blockierung	9,3	82,9

Tabelle 38: Anteile GFP-positiver Jurkat-Zellen und deren CXCR3-Expressionen nach 6-stündiger Inkubation mit L87/4_TF#110-Exosomen bzw. L87/4_TD#168-Exosomen mit und ohne Blockierung des *IP-10*-Liganden. 5×10^4 native Jurkat-Zellen wurden pro Kavität einer 24-Well-Zellkulturplatte mit 150 µg Exosomen in 300 µL RPMI 1640 für 6 h kultiviert. Neben der reinen Inkubation der Zellen mit Exosomen wurde in einem parallelen Versuch mit gleichem Aufbau während der Inkubation der *IP-10*-Ligand (*CXCL10*) mit 3 µg anti-*CXCL10*-Ak blockiert. Anschließend wurden die Zellen im Durchflusszytometer auf ihre GFP-Positivität und *CXCR3*-Expression analysiert.

E Diskussion

Seit einigen Jahren erfahren Exosomen eine besondere Beachtung, da sie sowohl als diagnostische Biomarker für Krankheiten (Szajnik *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2015; Lea *et al.*, 2017) und zugleich als Transportsystem zur Übertragung therapeutischer Wirkstoffe geeignet sind (Prado *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2010; Wahlgren *et al.*, 2012; Lai *et al.*, 2013; Tian *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2017).

Selbst Anwendungsgebiete im Gehirn sind möglich, da Exosomen die Fähigkeit besitzen die Blut-Hirn-Schranke zu kreuzen (Alvarez-Erviti *et al.*, 2011; Zhuang *et al.*, 2011; Pusic *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2015; Haney *et al.*, 2015), wozu 98 % der niedermolekularen Arzneimittel nicht imstande sind (Pardridge, 2005).

Zudem sind Exosomen stabile Vesikel (Ge *et al.*, 2014; Jin *et al.*, 2017), deren Inhalt vor Chemikalien und Enzymen durch die Lipidmembran geschützt wird (Tan *et al.*, 2014).

Außerdem scheinen die Vesikel auf Grund ihres biologischen Ursprungs weder toxisch noch immunogen zu sein (Alvarez-Erviti *et al.*, 2011; Ha *et al.*, 2016).

Dennoch ist die Forschung an Exosomen noch lange nicht abgeschlossen und wird auch in Zukunft weiter im Fokus stehen.

Im Visier dieser Arbeit standen zum einen die Charakterisierung von Exosomen als auch deren Modifizierung zum Zwecke eines zellfreien Therapeutikums.

12 Aufreinigung von Exosomen aus dem Überstand einer Zellkultur

Derzeit sind viele Methoden zur Isolierung von Exosomen aus Flüssigkeiten bekannt. Zu ihnen zählen u. a. die Immunaффinitäts-basierende Aufreinigung, die Ultrafiltration und die sequentielle Ultrazentrifugation mit und ohne Dichtegradienten (Zeringer *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2017). Eine Alternative zu diesen Anwendungen stellt in jüngster Zeit die Isolierung der Vesikel mit Hilfe kommerziell erhältlicher Kits dar.

Durch Zugabe eines Präzipitationspuffers aus Polyethylenglycol (PEG) oder einer ähnlichen Substanz zum Zellkulturüberstand können Exosomen schon ab Zentrifugationsgeschwindigkeiten von $1 \times 10^4 \times g$ aus diesem sedimentiert werden (Lane *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2017). Eine Methode, welche schon in früherer Zeit zur Gewinnung von Viren genutzt wurde (Lewis und Metcalf, 1988).

Je nach Aufreinigungsverfahren ergeben sich unterschiedlich hohe Ausbeuten an reinen Exosomen (Tauro *et al.*, 2012). Im Vergleich zum Ultrazentrifugationspräparat konnten mittels *Total Exosome Isolation Reagent (TEI)* mehr Partikel aus einem serumfreien Kulturmedium aufgereinigt werden, welche mit der Größenverteilung von Exosomen übereinstimmten (Lane *et al.*, 2015). Jedoch vermutet die Arbeitsgruppe, dass es sich hierbei auch um co-isolierte, nicht-exosomale Partikel handeln könnte (Lane *et al.*, 2015). So stellten Deun und Kollegen ebenfalls fest, dass sowohl die Reinheit als auch die Ausbeute an Exosomen, welche mittels Ultrazentrifugation isoliert wurden, gegenüber *TEI*-Präparationen deutlich höher waren (Van Deun *et al.*, 2014). Nichtsdestotrotz bilden Kits zur Aufreinigung von Exosomen eine Alternative zu teuren Laboranschaffungen, da deren Anwendung keine spezielle Ausrüstung benötigt.

13 Charakterisierung von Exosomen

Wie in bisherigen Analysen belegt, sind Exosomen mit sogenannten Tetraspaninen angereichert (Escola *et al.*, 1998; Andreu und Yáñez-Mó, 2014). Dabei handelt es sich um integrale Membranproteine, welche aus vier Transmembrandomänen aufgebaut sind (Yang *et al.*, 2016). Tetraspanine sind an der Zellaktivierung (Pols und Klumperman, 2009), Zelladhäsion, Proliferation sowie Differenzierung und Migration (Jiang *et al.*, 2015) beteiligt.

Daneben werden sie auch als Proteinmarker für Exosomen genutzt (Perez-Hernandez *et al.*, 2013), zu welchen u. a. CD9, CD63 und CD81 zählen (Théry *et al.*, 1999; Kowal *et al.*, 2016; Ciardiello *et al.*, 2016).

CD9 spielt eine wichtige Rolle bei der Fusion von Exosomen mit der Zielzellmembran, indem es mit membranständigen Glykoproteinen interagiert (van den Boorn *et al.*, 2011). Ein Mangel an CD9 kann allerdings durch das Vorhandensein von CD81 kompensiert werden (Parthasarathy *et al.*, 2009).

Die in der Arbeit aus HT1080- und L87/4-Zellen aufgereinigten Partikel entsprachen membranhaltigen Komplexen, welche die getesteten exosomalen Marker CD9, CD63 und CD81 aufwiesen. Des Weiteren zeigten aus HT1080-Zellen isolierte Partikel einen erhöhten Gehalt an diesen Markern an der gesamten Proteinmenge, wohingegen aus L87/4-Zellen aufgereinigte Partikel zwar ebenfalls im Vergleich zu ihren Donorzellen die exosomalen Marker CD9 und CD81 aufkonzentriert hatten, CD63 hier dagegen abgereichert war. Diese Eigenschaft zeigten auch Exosomen, welche aus dem Blutplasma isoliert wurden (Jørgensen *et al.*, 2013), weshalb CD63 als universeller exosomaler Marker unter Umständen obsolet ist. Die Arbeitsgruppe um Yoshioka macht ebenfalls den Vorschlag CD9 und CD81 als Exosomenmarker zu verwenden, da CD63 nur bedingt auf extrazellulären Vesikeln zu finden ist (Yoshioka *et al.*, 2013).

Da Exosomen ursprünglich aus der Zellmembran generiert werden (Ribeiro *et al.*, 2013), konnten die oben genannten Oberflächenmarker auch auf den jeweiligen Parentalzellen detektiert werden.

Neben der Analyse von membranständigen Proteinen wurde der jeweilige Aktin-Gehalt der aus HT1080- und L87/4-Zellen isolierten Partikel untersucht. Hier zeigte sich, dass Aktin gegenüber den Donorzellen abgereichert war. Auch die Arbeitsgruppe um Xiao kam bei der Charakterisierung von Exosomen bezüglich β -Aktin zu demselben Ergebnis (Xiao *et al.*, 2014).

In einem weiteren Schritt wurde die Größe der aus HT1080- und L87/4-Zellen aufgereinigten Teilchen mittels *NTA* bestimmt. Exosomen werden als 50 – 150 nm große Vesikel beschrieben (Van Deun *et al.*, 2014; Fonseca *et al.*, 2016), obgleich je nach Zustand (Colombo

et al., 2014) und angewandter Messmethode es zu unterschiedlichen Größenbestimmungen bei der Betrachtung von ein und derselben Vesikel-Probe kommen kann (van der Pol *et al.*, 2014).

Mit einer durchschnittlichen Größe von $(127,7 \pm 3,2)$ nm (aus HT1080-Zellen) und $(142,4 \pm 3,1)$ nm (aus L87/4-Zellen) fallen die in der Arbeit aufgereinigten Partikel in den von den anderen Arbeitsgruppen postulierten Größenbereich von Exosomen.

Somit lassen die unter Berücksichtigung aller zur Charakterisierung von Exosomen erhobenen Messdaten darauf schließen, dass es sich bei den aus den jeweiligen Zellkulturüberständen mittels *Total Exosome Isolation Reagent* aufgereinigten Partikeln um Exosomen handelt.

14 Exosomen als Transportsystem zur Übertragung zytosolischer Proteine

Um Vesikel als Transportsystem nutzen zu können, sollte zunächst geklärt werden, ob die in der Arbeit verwendeten Exosomen in der Lage sind, zytosolische Proteine auf Empfängerzellen zu übertragen. So wurden in einem ersten Schritt Exosomen hergestellt werden, welche *GFP* als Reporterprotein beinhalteten.

Aktuell wird eine Vielzahl an unterschiedlichen Möglichkeiten zur direkten Beladung von Exosomen angewendet. Diese Methoden können in zwei Kategorien eingeteilt werden.

Bei der aktiven Variante werden u. a. mittels Beschallung, Extrusion, Einfrier- und Auftauzyklen oder Elektroporation Wirkstoffe in Exosomen internalisiert. Ein Beispiel für eine passive Beladungsmethode ist die Inkubation einer Arznei mit Exosomen, so dass diese in die Vesikel diffundieren kann (Luan *et al.*, 2017). Neben der Beladung von Exosomen per se besteht die Möglichkeit, durch Manipulation von Zellen, modifizierte Exosomen aus diesen zu gewinnen. Hierzu zählt die zelluläre Aufnahme von exogen angebotenen Material oder das *metabolic labeling* von Zellen, bei welcher die im Kulturmedium vorhandenen Metaboliten von Zellen aufgenommen und anschließend u. a. in Exosomen verpackt werden (Armstrong *et al.*, 2017).

Charakterisierung Zytosol-modifizierter Exosomen und Analyse des exosomalen Transfers

Da ebenfalls bekannt ist, dass die exosomale Proteinzusammensetzung von der jeweiligen Donorzelle abhängt (Stoorvogel *et al.*, 2002; Mizrak *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2015; Ha *et al.*, 2016), wurden in dieser Arbeit Exosomen aus dem Kulturüberstand von HT1080-Zellen (Rasheed *et al.*, 1974) aufgereinigt, welche mit einem *GFP*-kodierenden Plasmid (#168) transduziert waren.

Krebszelllinien sind für ihre hohe Exosomensekretion bekannt (Green *et al.*, 2015). Zudem zeigten die transduzierten HT1080-Zellen schnelle Proliferationsraten und eine starke *GFP*-Expression (Abbildungen 13A-B, 13D)

Die Inkubationszeit für den Transfer von Exosomen auf Zielzellen betrug in dieser Arbeit 6 h. So demonstrierten Heusermann und Kollegen, dass nach 2 h etwa 80 % und nach weiteren 6 h ca. 90 % der verabreichten Exosomen von den Empfängerzellen aufgenommen wurden (Heusermann *et al.*, 2016).

Bei der Charakterisierung stellte sich heraus, dass der *GFP*-Anteil in Exosomen an der gesamten Proteinmenge geringer ausfiel (Abbildung 14A). Dennoch konnte bei $(55,4 \pm 7,4) \%$ der HT1080-Empfängerzellen nach Inkubationsversuchen mit diesen Exosomen *GFP* nachgewiesen werden (Abbildung 15). Im Vergleich dazu war die exosomale Übertragung auf 293T-Zellen (Pear *et al.*, 1993) signifikant verringert, was damit zusammenhängen kann, dass der Metabolismus bzw. die Oberflächenzusammensetzung von HT1080-Zellen eine Aufnahme von exogenen Partikeln, insbesondere Exosomen, bevorzugt. Da die exosomale Oberfläche aus der Mutterzelle etabliert wird (Ribeiro *et al.*, 2013), begünstigt möglicherweise hier eine ähnliche Zusammensetzung die zelluläre Aufnahme.

15 Exosomen als Transportsystem zur Übertragung membrangebundener Proteine

Nachdem gezeigt werden konnte, dass es möglich war, zytosolisches Protein über Exosomen auf Empfängerzellen zu transferieren, wurde nun der Versuch übernommen ein membran-gebundenes Protein zu übertragen.

Membranmodifizierte Exosomen mit therapeutischer Wirkung

Aus dem Kenntnisstand, dass die exosomale Membran durch *inward budding* aus der Membran der Parentalzelle generiert wird (Ribeiro *et al.*, 2013), wurden HT1080-Zellen mit einem Plasmid transduziert, welches die Zellen befähigte, humanes *tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1* (*TIMP-1*) über einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker (*GPI*-Anker) (Djafarzadeh *et al.*, 2004) an der Oberfläche zu exprimieren.

GPI-Anker sind Lipid-Anker, welche typischerweise in Membran-Mikrodomänen wie *lipid rafts* vorkommen und als posttranslationale Modifikation kovalent an die C-terminale Domäne des entsprechenden Proteins binden (Kinoshita, 2016).

Nach der Fusion an *GPI*-Anker lassen sich exogen verabreichte Proteine in eine Plasmamembran integrieren (Brown *et al.*, 2000). So konnte im Gegensatz zu löslichem nativem *TIMP-1* *GPI*-verankertes *TIMP-1* gezielt auf die Oberfläche von Zellen transferiert werden (Djafarzadeh *et al.*, 2006; Djafarzadeh *et al.*, 2012; Bao *et al.*, 2013).

Auf diese Weise war es möglich, mittels der aus den transduzierten Zellen gewonnenen Exosomen den exosomalen Transfer eines auf der Membranoberfläche gebundenen Proteins zu analysieren.

Zusätzlich gehört *TIMP-1* zu einer aus insgesamt vier Mitgliedern bestehenden Familie, welche die Eigenschaft besitzt, die Aktivität von Matrix-Metalloproteasen (MMP) zu hemmen (Bode und Maskos, 2003; Brew und Nagase, 2010; Alameddine und Morgan, 2016) und dementsprechend für therapeutische Zwecke eingesetzt werden kann.

Wirkungsweise und Anwendungsmöglichkeiten von *TIMP-1*

MMP sind zink- und calciumabhängige Proteasen, von welchen insgesamt 23 bekannt sind (Espino Y Sosa *et al.*, 2017). Sie gelten als Hauptverursacher für die enzymatische Zersetzung von Proteinen in der extrazellulären Matrix (EZM) (Jabłońska-Trypuć *et al.*, 2016), einer 3-dimensionalen, nicht-zellulären Struktur, die in allen Geweben vorkommt (Bonnans *et al.*, 2014).

Die Degradation betrifft insbesondere Kollagen, welches hier für die Entwicklung, Morphogenese, Gewebsumbau und -reparatur zuständig ist (Jabłońska-Trypuć *et al.*, 2016). Diese Faktoren sind bei der Tumorentwicklung von maßgeblicher Relevanz (Nagase *et al.*, 2006). So kann eine Verschiebung der Gewebemöostase zu unkontrolliertem Tumorwachstum und Metastasen führen (Kessenbrock *et al.*, 2010).

MMP sind bei der Karzinomprogression zu jeder Zeit hochreguliert (Isaacson *et al.*, 2017), wobei zu unterschiedlichen Zeiten MMP verschiedene Rollen spielen (Gialeli *et al.*, 2011). Bei der Bekämpfung von Krebsleiden sind deshalb MMP-Inhibitoren von großer Bedeutung (Zucker und Cao, 2009).

Das 29 kDa schwere Glykoprotein *TIMP-1*, welches von Myozyten und Fibroblasten sezerniert wird (Ma *et al.*, 2014), inhibiert die Aktivität von MMP über eine nicht kovalente 1:1 stöchiometrische Bindung (Murphy, 2011; Lindsey *et al.*, 2015). Zudem besteht *TIMP-1* aus zwei Domänen, wobei die N-terminale Domäne für die katalytische Spaltung von Metalloproteasen verantwortlich ist (Duan *et al.*, 2015), während der kleinere C-Terminus in der Bildung von Komplexen mit Proenzymen (*proMMPs*) involviert zu sein scheint (Lambert *et al.*, 2004).

Wie bereits erwähnt, kann *TIMP-1* eine Vielzahl von MMP inhibieren (Tejima *et al.*, 2009).

Im Gegensatz zu rekombinantem *TIMP-1* war *GPI*-verankertes *TIMP-1* in der Lage, sich in die Membran von Nierenkarzinomzellen zu integrieren und MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-12, MMP-13, MMP-15 und MMP-16 auf der Zelloberfläche zu binden. Außerdem verloren die behandelten Zellen die Fähigkeit die EZM zu invadieren (Djafarzadeh *et al.*, 2006).

Zusätzlich konnten Djafarzadeh und Kollegen 2004 zeigen, dass gegenüber nativem *TIMP-1* *GPI*-verankertes *TIMP-1* die Freisetzung von MMP-2 und MMP-9 aus Osteosarcoma-Zellen effektiv blockiert.

Die Expression von MMP-2 und MMP-9 ist auch bei Patienten mit Kehlkopfkrebs signifikant erhöht, wobei der Grad der Erhöhung mit dem Fortschritt der Krankheit korreliert und eine höhere Expression von MMP-9 mit einer kürzeren Überlebensdauer in Verbindung gebracht wird (Gou *et al.*, 2010).

Eine weitere Studie von McQuibban demonstriert, dass MMP die Fähigkeit besitzen, Chemokine zu spalten, was zur Folge hat, dass Zellen des Immunsystems inaktiviert bleiben (McQuibban *et al.*, 2001).

Die Funktion von *TIMP-1* ist jedoch nicht nur auf die Inhibierung von Proteasen beschränkt. *TIMP-1* gilt als multifunktionales Protein (Ikenaka *et al.*, 2003) und kann auch als Zytokin fungieren (Ries, 2014).

Da Exosomen überdies die Blut-Hirn-Schranke passieren können (Alvarez-Erviti *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2015; Aryani und Denecke, 2016), ergeben sich darüber hinaus weitere Anwendungsgebiete im Gehirn. So konnten neuroprotektive Eigenschaften von an magnetischen Nanopartikeln gebundenem *TIMP-1* bei HIV-infizierten Patienten festgestellt werden (Atluri *et al.*, 2016).

Nachweis der Wirksamkeit von *TIMP-1_GPI*

Zur Beurteilung der Wirksamkeit von *GPI*-verankertem *TIMP-1*, wurde ein *in vitro* Wundheilungstest durchgeführt, welcher Aufschluss über Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Interaktionen gibt (Rodriguez *et al.*, 2005). Hierbei konnte beobachtet werden, dass native HT1080-Zellen schneller in eine zellfreie Fläche einwandern als *TIMP-1_GPI*-positive Zellen (Abbildungen 34B-C). Auch die Arbeitsgruppe um Bao zeigte 2014, dass mit *GPI*-verankertem *TIMP-1* behandelte HT1080-Zellen in ihrer Migrationsfähigkeit inhibiert wurden, was eventuell damit erklärt werden kann, dass das therapeutische Protein einen negativen Einfluss auf die Adhäsion der Zellen nimmt. So weiß man, dass *TIMP-1* die Zellverankerung an ein Substrat durch

eine MMP-unabhängige Dephosphorylierung der Adhäsionskinase und Paxillin reduziert (Akahane *et al.*, 2004).

Dass jedoch *GPI*-verankertes *TIMP-1* nicht immer dieses Verhalten bei Zellen hervorruft, konnte von anderen Arbeitsgruppen beobachtet werden. So demonstrierten Djafarzadeh und Kollegen 2012, dass peritoneale Mesothelzellen nach der Behandlung mit dem Fusionsprotein pro-migratorisches Verhalten zeigten, wohingegen mikrovaskuläre Endothelzellen (Djafarzadeh *et al.*, 2004) und Nierenkarzinomzellen in ihrer Bewegung gehemmt wurden (Djafarzadeh *et al.*, 2006).

Ein potentielles Therapeutikum zur Wundheilung der Haut bzw. zur Bekämpfung von Krebszellen könnten in diesem Zusammenhang Exosomen darstellen, welche aus *TIMP-1_GPI*-exprimierenden *MSCs* isoliert werden, da es hier möglicherweise zu synergistischen Effekten der kurativen Eigenschaften kommt.

Charakterisierung der Membran-modifizierten Exosomen und Analyse des exosomalens Transfers

Um die Effizienz der Übertragung von *TIMP-1_GPI* per Exosomen auf Zielzellen analysieren zu können, wurden zunächst HT1080-Zellen mit dem entsprechenden Plasmid transduziert und die Exosomen aus deren Überstand isoliert.

Es stellte sich heraus, dass es bei den aufgereinigten Exosomen neben den Oberflächenmarkern CD9, CD63 und CD81 zu einem erhöhten Anteil von *GPI*-verankertem *TIMP-1* an der Gesamtproteinmenge kam (Abbildung 18A). In einer 2014 erschienenen Publikation wird darauf hingewiesen, dass eine Reihe von Clathrin-unabhängigen Wegen bei der Invagination von membrangebundenen Molekülen existieren (Mayor *et al.*, 2014). So reichern sich *GPI*-verankerte Proteine in *lipid rafts* an (Sangiorgio *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2013), welche wiederum bei der Endozytose eine wichtige Rolle spielen (Reeves *et al.*, 2012; Sharonov *et al.*, 2016) und somit bei der Sortierung von Proteinen in Exosomen beteiligt zu sein scheinen (de Gassart *et al.*, 2003). So wird vermutet, dass der *GPI*-Anker bei der Bildung von Exosomen ausgewählt wird (Rabesandratana *et al.*, 1998), weshalb viele *GPI*-verankerte Proteine bevorzugt in Exosomen rekrutiert werden (López-Cobo *et al.*, 2016). Auch Kooijmans *et al.*

zeigten 2016, dass *GPI*-verankerte *Nanobodies* in Relation zu ihren Parentalzellen in extrazellulären Vesikeln angereichert werden.

Eine weitere Erklärung für den gesteigerten Gehalt von exosomalem *TIMP-1* an der gesamten Proteinmenge könnte zudem sein, dass sich während der Exosomenbildung die Oberfläche der Vesikel im Verhältnis zu deren Volumen aufkonzentriert. Exosomen sind endosomalen Ursprungs und werden zunächst aus der Plasmamembran der Zelle generiert und in einem weiteren Schritt, bei der Entstehung multivesikulärer Körper (*MVBs*), aus der limitierenden Membran der späten Endosomen durch *inward budding* formiert (Ribeiro *et al.*, 2013). Schlussendlich spiegelte sich die exosomale Anreicherung von membrangebundenem *TIMP-1* auch in einem effizienten Transfer auf Empfängerzellen wider, weshalb es von Nutzen sein kann, das via Exosomen zu übertragende Agens von Interesse zunächst auf der Oberfläche der Parentalzelle zu verankern.

Da schon nach 6-stündiger Inkubation die Empfängerzellen das therapeutische Protein auf ihrer Oberfläche trugen (Abbildung 19), wird bei der zellulären Aufnahme exosomales *GPI*-verankertes *TIMP-1* offensichtlich direkt in die Membran integriert. Parolini und Kollegen postulieren, dass die Aufnahme von Exosomen über Membranfusion geschieht (Parolini *et al.*, 2009). Tatsächlich konnten auch andere Arbeitsgruppen demonstrieren, dass die exogene Verabreichung von *GPI*-verankertem *TIMP-1* sowohl auf Nierenkarzinomzellen (Djafarzadeh *et al.*, 2006) als auch Fibrosarkomzellen (Bao *et al.*, 2013) zu dessen Eingliederung in die Zellmembranen führte.

Wie auch bei der Übertragung von *GFP* war der exosomale Transfer von *TIMP-1_GPI* auf Zielzellen eines vom Donorzellen abweichenden Typs signifikant verringert (Abbildung 19B), was möglicherweise mit den dazu oben genannten Aspekten zu erklären ist.

16 Aufnahme zusätzlicher mRNA in Exosomen

In den letzten Jahren wurde vehement versucht, die verschiedenen Mechanismen zur selektiven Anreicherung von Biomolekülen in Vesikeln zu erforschen.

Exosomen beinhalten neben unterschiedlichen Erbgut-Formen wie genomische DNS (Kahlert *et al.*, 2014) und mitochondriale DNS (Guescini *et al.*, 2010) auch verschiedene Arten von Ribonukleinsäuren wie mRNA und miRNA (Valadi *et al.*, 2007; Skog *et al.*, 2008) sowie nicht-kodierende RNS (Ferguson und Nguyen, 2016).

Zusätzlich konnte eine Vielzahl an verschiedene Lipiden (Record *et al.*, 2014; Haraszi *et al.*, 2016) und Proteinen (Jia *et al.*, 2017) in Exosomen detektiert werden.

Der Arbeitsgruppe um Bolukbasi gelang es, mittels Integration einer 25 nt umfassenden „Zipcode“-like-Sequenz (ZIP) in die 3'-UTR einer mRNA eine Verdopplung des Gens in Mikrovesikel (MV) zu erzielen (Bolukbasi *et al.*, 2012).

Um den Gehalt der mRNA in Exosomen und somit die Expression des Transgens in Empfängerzellen zu erhöhen, wurde infolgedessen das GFP-kodierende Plasmid (#168) mit einer ZIP ergänzt. Anschließend wurden die Gehälter an GFP-mRNA von Exosomen aus transduzierten HT1080-Zellen mit und ohne ZIP erweitertem Konstrukt verglichen.

Wie 2012 in der Publikation von Bolukbasi beschrieben, wurde bei der Analyse mittels qRT-PCR auf den jeweiligen Gehalt an GAPDH-mRNA normiert. Weiter fanden bei der Amplifikation der GFP- und GAPDH-DNS zudem dieselben von der Arbeitsgruppe benannten spezifischen Vorwärts- und Rückwärts-Primer Verwendung (Bolukbasi *et al.*, 2012).

Es stellte sich heraus, dass der in den Exosomen vorkommende Betrag an mRNA so gering ausfiel und sich damit am Rande des Detektionsbereichs befand, dass die Aussagekraft anhand der Cp-Werte sehr gering war (Tabelle 25).

Bei Betrachtung der Schmelzkurven ließ sich jedoch ein höherer Peak bzgl. der aus HT1080_TD#230-Exosomen isolierten mRNA gegenüber der mRNA aus HT1080_TD#168-Exosomen erkennen, während die GAPDH-Schmelzkurven vergleichbare Maxima zeigten (Abbildung 23). Dies könnte darauf hinweisen, dass Sequenzen, welche mit einer ZIP ergänzt werden, vermehrt in Exosomen aufgenommen werden. Um jedoch eine klare Aussage in diesem Fall über den Mehrwert dieser Anwendung machen zu können,

müsste der *mRNA*-Gehalt in den hier analysierten Exosomen deutlich erhöht werden. So setzten Bolukbasi und Kollegen 100 ng Gesamt-RNS zur Synthese von *cDNA* ein, was über der 30-fachen der hier verwendeten Menge lag (Bolukbasi *et al.*, 2012).

Der geringe Gehalt an exosomaler *mRNA* in dieser Arbeit kann mehrere Ursachen haben. Die Aufreinigungsmethode könnte dahingehend relevant sein, da Bolukbasi *et al.* in der Arbeit von 2012 eine Ultrazentrifuge zur Isolierung ihrer MV verwendeten. So zeigte die Arbeitsgruppe um Van Deun, dass die Ausbeute an exosomaler RNS höher lag, wenn zur Exosomen-Isolierung an Stelle eines in dieser Arbeit genutzten Kits eine Ultrazentrifuge Verwendung fand (Van Deun *et al.*, 2014).

Eine andere Erklärung wäre, dass sich der von Bolukbasi *et al.* analysierte Gehalt an *mRNA* auf unterschiedliche MV verteilte (Bolukbasi *et al.*, 2012), welche nicht durch das verwendete Kit aus dem Zellkulturüberstand isoliert wurden. So beobachteten Kanada und seine Kollegen, dass die Beladung von *mRNA* als auch *siRNA* in Exosomen weniger effizient war als in MV (Kanada *et al.*, 2015).

Darüber hinaus handelt es sich bei Exosomen per se um eine heterogene Population, deren Beladung wiederum mit dem Zustand der Zelle variiert (Kucharzewska *et al.*, 2013). Dementsprechend vermuten Lotvall und Valadi, dass es mindestens zwei Typen von Exosomen gibt: Eine immunologisch aktive Population, die bei der Antigenpräsentation und Costimulation involviert ist sowie eine weitere, welche die genetische Kommunikation zwischen Zellen realisiert und somit RNS enthält (Lotvall und Valadi, 2007).

Ebenfalls könnte die Expressionseffizienz in den von Bolukbasi und Kollegen 2012 transfizierten 293T-Zellen in Relation zu den in dieser Arbeit benutzten HT1080-Zellen höher sein, weshalb mehr der entsprechenden *mRNA* in der Zelle vorlag und zum Einbau in Exosomen zur Verfügung stand.

Charakterisierung der *mRNA*-modifizierten Exosomen und Analyse des exosomalen Transfers

Exosomen aus HT1080_TD#168-Zellen (*GFP*) und HT1080_TD#230-Exosomen (*GFP_ZIP*) zeigten im Zuge der in dieser Arbeit vorgenommenen Charakterisierung vergleichbare Eigenschaften. Allerdings lag der Proteingehalt an *GFP* in HT1080_TD#168-Exosomen deutlich höher als in HT1080_TD#230-Exosomen (Abbildung 22B), was damit zusammenhängen könnte, dass einerseits angesichts der *ZIP* mehr *mRNA* innerhalb der Zelle in Mikrosvesikel verpackt wurde und somit nicht mehr translatiert werden konnte oder andererseits infolge der zusätzlichen Sequenz die *GFP*-Expression in den Zellen herabgesetzt wurde.

Eine via Exosomen übertragene größere Menge an *mRNA* würde möglicherweise erst zu einem späteren Zeitpunkt in der Empfängerzelle exprimiert werden. Dies hätte zur Folge, dass es nach der 6-stündigen Inkubation von Exosomen und Empfängerzellen zu einer verhältnismäßig niedrigeren Anzahl an *GFP*-positiven Zielzellen kam, da hier das übertragene *GFP*-Protein den ausschlaggebenden Anteil besitzt.

Um den Einfluss der *ZIP* bei einem weiteren Gen zu testen, wurde auch das *TIMP-1_GPI* tragende Plasmid (#233) mit der *ZIP* erweitert (#234).

Die aus HT1080_TD#233-Zellen isolierten Exosomen und Exosomen aus HT1080_TD#234-Zellen zeigten im Rahmen der durchgeführten Versuche keine nennenswerten charakteristischen Divergenzen mit der Ausnahme, dass in diesem Falle in HT1080_TD#233-Exosomen mehr *TIMP-1*-Protein als in HT1080_TD#234-Exosomen vorlag (Abbildung 28B). Betrachtet man hingegen den exosomalen Transfer von *TIMP-1_GPI* in diesem Zusammenhang, so war der Anteil an *TIMP-1*-positiven Empfängerzellen nach Inkubation mit HT1080_TD#234-Exosomen bzw. HT1080_TD#233-Exosomen nicht signifikant different (Abbildung 29). Eine mögliche Ursache hierfür wäre, dass infolge der *ZIP* ein erhöhter *mRNA*-Gehalt des Transgens in HT1080_TD#234-Exosomen vorlag, welcher neben der Membranintegration des therapeutischen Proteins zu einer zusätzlichen Expression in den Empfängerzellen führte.

In bereits veröffentlichten Studien führte die Behandlung von Nierenkarzinomzellen (Djafarzadehet *et al.*, 2006) und Fibrosarkomzellen (Bao *et al.*, 2013) mit *GPI*-verankertem *TIMP-1* bei beiden Zellpopulationen zu einer dosisabhängigen Inhibierung der Proliferation und bei HT1080-Zellen zu einer Erhöhung der Apoptoserate (Bao *et al.*, 2013). Bei einer höher verabreichten Konzentration an *TIMP-1_GPI* könnte somit die Zellteilung der Empfängerzellen soweit eingeschränkt sein, dass das therapeutische Protein auf weniger Tochterzellen verteilt wurde bzw. apoptotische Zellen nicht bei der durchflusszytometrischen Detektion miteinbezogen wurden.

17 Vergleich zweier Lipidanker zur Übertragung von *TIMP-1*

Um den *GPI*-Anker zur Übertragung von *TIMP-1* via Exosomen bewerten und gleichzeitig eine unter Umständen potentiell effizientere Übertragung des therapeutischen Proteins auf Zielzellen zu erreichen, wurde in diesem Zusammenhang die Transmembrandomäne (*MSD*) aus CD34 als weiterer Lipidanker geprüft.

CD34 ist ein transmembranes Phosphoglykoprotein, welches vorwiegend als Marker von hämatopoetischen Stammzellen und deren Vorläuferzellen etabliert ist, jedoch auch auf vielen anderen nicht hämatopoetischen Zellen vorkommt (Sidney *et al.*, 2014). Zudem werden CD34 je nach Zellart sowohl pro-adhäsive (Gangenhalli *et al.*, 2006) als auch anti-adhäsive (Drew *et al.*, 2005; Nielsen und McNagny, 2009; Ohnishi *et al.*, 2013) Eigenschaften zugeordnet (Nielsen und McNagny, 2008).

Wie bei *TIMP-1_GPI*-Exosomen kam es auch bei *TIMP-1_MSD*-Exosomen neben den Oberflächenmarkern CD9, CD63 und CD81 zu einem erhöhten Gehalt von *TIMP-1* an der Gesamtproteinmenge, was vermutlich aus der oben erwähnten Aufkonzentrierung der Membranbestandteile bei der Exosomenbildung resultiert. Im Gegensatz dazu besteht die Möglichkeit, dass akkumulierte membrangebundene Proteine eine Endozytose induzieren können (Mayor *et al.*, 2014). Vidal *et al.* vermuten, dass die Ansammlung von Proteinen und Lipiden auf der Membran als generelles Sortierungssignal dieser Moleküle in Exosomen gilt (Vidal *et*

al., 1997). Darüber hinaus scheinen viele Membrananker bei der Sortierung von Proteinen in Exosomen beteiligt zu sein (Shen *et al.*, 2011), was die These unterstützt, exosomal zu übertragende Proteine gegebenenfalls auf der Membran der Donorzelle zu verankern.

Auch wenn beide Zell- und Exosomenpopulationen im Zusammenhang mit den in der Arbeit erhobenen Daten vergleichbare charakteristische Merkmale aufwiesen, war die Proteinmenge an *TIMP-1* von *GPI*-positiven Exosomen (HT1080_TD#233-Exosomen) im Gegensatz zu *MSD*-positiven Exosomen (HT1080_TD#235-Exosomen) deutlich höher (Abbildung 32B). Dennoch stellte sich bei der Betrachtung des exosomal Transfer von *TIMP-1* heraus, dass es zu keinem signifikanten Unterschied zwischen beiden Populationen kam (Abbildung 33), was möglicherweise daran liegt, dass sich *MSD*-gebundenes *TIMP-1* gegenüber *GPI*-verankertem *TIMP-1* besser in die Membran der Empfängerzellen integrieren kann und somit auch geringere Mengen des therapeutischen Proteins für ein vergleichbares Ergebnis sorgen.

Wie bereits erwähnt, könnte hier ebenfalls eine höhere Konzentration an *TIMP-1* zu einer verstärkten Proliferationshemmung in den Empfängerzellen und daraus resultierenden geringeren Anzahl an detektierbaren *TIMP-1*-positiven Zellen führen.

18 Gezielter Transfer von Exosomen

In einem weiteren Schritt dieser Arbeit sollte die Frage geklärt werden, ob infolge einer Chemokin-Chemokinrezeptor-Bindung ein gezielter exosomal Transfer möglich ist und dadurch die Übertragungseffizienz eines zytosolischen Proteins intensiviert werden kann.

Schon in anderen Arbeitsgruppen konnte über die Modifikation der exosomal Oberfläche ein gerichteter Transport bewirkt werden, indem das Lysosom-assoziierte Membranglykoprotein (Lamp2b) auf der exosomal Membran mit einem die Zielzelle bindenden Peptid fusioniert wurde (Alvarez-Erviti *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2017; Bellavia *et al.*, 2017).

Chemokine sind kleine, 8 – 17 kDa schwere, chemoattraktive Zytokine, welche u. a. zur Homöostase und Wundheilung beitragen und die Migration von Leukozyten mittels Gradienten steuern (Thompson *et al.*, 2017). So können Zellen über ihre G-Protein-gekoppelten Rezeptoren direkt zum Ort der Verletzung geleitet werden (Kufareva *et al.*, 2015).

Der Mensch besitzt 50 Chemokine (Arimont *et al.*, 2017), welche nach Anzahl und Position der konservierten Cysteinreste in vier Klassen (C, CC, CXC und CX₃C) eingeteilt werden können (Scholten *et al.*, 2012). Neben Spleißvarianten und Isoformen gibt es weitere 22 Chemokinrezeptoren (Kufareva *et al.*, 2015).

Im Allgemeinen binden Chemokine an Rezeptoren ihrer Klasse, jedoch können innerhalb einer Klasse viele Chemokine an eine Reihe von Rezeptoren binden (Kufareva *et al.*, 2015).

Um den Effekt der sogenannten CXCR3/CXCL10-Achse auf den exosomal Transfer eines cytosolischen Proteins analysieren zu können, wurden L87/4-Zellen (Thalmeier *et al.*, 1994) verwendet, welche sowohl den Chemokin-Liganden CXCL10 über einen GPI-Anker an der Oberfläche trugen als auch das Reporterprotein GFP exprimierten (L87/4_TF#110-Zellen).

Im Vergleich dazu standen GFP-positive L87/4-Zellen, welche kein Chemokin in der Membran verankert hatten (L87/4_TD#168).

CXCL10 wird im Verlauf einer entzündlichen Erkrankung auf einen inflammatorischen Stimulus hochreguliert (Zhao *et al.*, 2017). Neben seiner chemotaktischen Wirkung auf T_H1-Lymphozyten und zytotoxischen T-Zellen (Altara *et al.*, 2016) induziert CXCL10 bei Monozyten die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (Zhao *et al.*, 2017).

Mit L87/4-Zellen besteht die Möglichkeit, je nach Indikation, die positiven Eigenschaften von mesenchymalen Stammzellen ergänzend zur therapeutischen Anwendung von Exosomen in Anspruch nehmen zu können (Phinney und Pittenger, 2017). So konnte die konstitutive Expression vieler immunmodulatorischer Zytokine wie u. a. GM-CSF, IL-1 β , IL-6, TGF- β und TNF- α in L87/4-Zellen nachgewiesen werden (Thalmeier *et al.*, 1996).

Angesichts der Tatsache, dass *CXCL10* chemotaktisch auf *CXCR3*-positive Zellen wirkt (Bondar *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2016), wurden bei Transferversuchen Jurkat-Zellen als Zielzellen verwendet, da diese natürlicherweise den *CXCR3*-Rezeptor exprimieren (11.3).

Obwohl Exosomen aus L87/4_TF#110-Zellen weniger *GFP* beinhalten als L87/4_TD#168-Exosomen (Abbildung 37D), konnte nach Transferversuchen mit beiden Populationen mehr *GFP* in Jurkat-Zellen detektiert werden, welche mit L87/4_TF#110-Exosomen inkubiert wurden (Tabelle 38).

Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass über eine Chemokin-Chemokinrezeptor-Bindung die Übertragung eines cytosolischen Proteins verbessert werden kann. Da sich das Resultat auch nach Blockierung des *CXCL10*-Liganden jedoch nicht änderte (Tabelle 38), konnte eine weitere Verifizierung diesbezüglich nicht bestätigt werden.

Weitere Versuche in diesem Zusammenhang sind nötig, um die hierfür relevanten Mechanismen aufzufindig machen zu können. So könnten *CXCL10/GFP*-positive Exosomen mit Empfängerzellen des gleichen Typs mit bzw. ohne *CXCR3*-Rezeptor inkubiert und anschließend eine quantitative Analyse der Zielzellen bezüglich des Reporterproteins durchgeführt werden. Der Versuchsaufbau könnte zudem mit einem Transwellsystem zur Untersuchung des Migrations- bzw. Invasionsverhaltens erweitert werden.

Dass grundsätzlich Chemokin-enthaltende Exosomen eine chemoattraktive Wirkung entfalten können, wurde von Chen *et al.* in einer Studie aus dem Jahr 2011 demonstriert. In diesem Fall enthielten Exosomen aus hitzebehandelten Tumorzellen Chemokine, welche chemoattraktiv auf dendritische Zellen und T-Zellen wirkten.

Wie die Arbeit zeigt, besitzen Exosomen neben ihren Funktionen Immunantworten zu modulieren und die Kommunikation bzw. den Transport zwischen den Zellen zu gewährleisten (Simpson *et al.*, 2009) auf Grund ihrer Modifikationsmöglichkeiten multilaterale Einsatzgebiete.

Im Vergleich zu anderen Transportsystemen haben Exosomen eine Vielzahl an Vorteilen.

So sind Viren und Lipid-Nanopartikel anfällig für die Abwehr durch Opsonine, Gerinnungsfaktoren und das Komplementsystem.

Insbesondere Viren können eine spezifische Antikörper-Reaktion auslösen und Onkogene angesichts der Gefahr von Insertionsmutagenese aktivieren.

Daneben sammeln sich Polyethylenimin-basierende Nanopartikel in der Leber, Lunge, Niere und der Milz an und können im Hinblick auf Immunreaktionen nicht langfristig eingesetzt werden. (van den Boorn *et al.*, 2011)

Deshalb stellen Exosomen für die Zukunft eine vielversprechende Perspektive für therapeutische und diagnostische Zwecke dar.

F Literaturliste

Abusamra A. J., Zhong Z., Zheng X., Li M., Ichim T. E., Chin J. L., Min W. P., Tumor exosomes expressing Fas ligand mediate CD8+ T-cell apoptosis. *Blood Cells Mol Dis.* 2005; 35(2): 169-173.

Admyre C., Johansson S. M., Qazi K. R., Filén J. J., Lahesmaa R., Norman M., Neve E. P., Scheynius A., Gabrielsson S., Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. *J Immunol.* 2007; 179(3): 1969-1978.

Agarwal A., Fanelli G., Letizia M., Tung S. L., Boardman D., Lechler R., Lombardi G., Smyth L. A., Regulatory T cell-derived exosomes: possible therapeutic and diagnostic tools in transplantation. *Front Immunol.* 2014; 5: 555.

Akahane T., Akahane M., Shah A., Connor C. M., Thorgeirsson U. P., TIMP-1 inhibits microvascular endothelial cell migration by MMP-dependent and MMP-independent mechanisms. *Exp Cell Res.* 2004; 301(2): 158-167.

Alameddine H. S., Morgan J. E., Matrix metalloproteinases and tissue Inhibitor of metalloproteinases in inflammation and fibrosis of skeletal muscles. *J Neuromuscul Dis.* 2016; 3(4): 455-473.

Altara R., Mallat Z., Booz G. W., Zouein F. A., The CXCL10/CXCR3 axis and cardiac inflammation: Implications for immunotherapy to treat infectious and noninfectious diseases of the heart. *J Immunol Res.* 2016; 2016: 4396368.

Alvarez M. L., Isolation of urinary exosomes for RNA biomarker discovery using a simple, fast, and highly scalable method. *Methods Mol Biol.* 2014; 1182: 145-170.

Alvarez-Erviti L., Seow Y., Yin H., Betts C., Lakhai S., Wood M. J., Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol.* 2011; 29(4): 341-345.

Anderson H. C., Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage. *J Cell Biol.* 1969; 41(1): 59-72.

Andreu Z., Yáñez-Mó M., Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Front Immunol.* 2014; 5: 442.

Arimont M., Sun S. L., Leurs R., Smit M., de Esch I. J. P., de Graaf C., Structural analysis of chemokine receptor-ligand interactions. *J Med Chem.* 2017; 60(12): 4735-4779.

Armstrong J. P., Holme M. N., Stevens M. M., Re-engineering extracellular vesicles as smart nanoscale therapeutics. *ACS Nano*. 2017; 11(1): 69-83.

Aryani A., Denecke B., Exosomes as a nanodelivery system: a key to the future of neuro-medicine? *Mol Neurobiol*. 2016; 53(2): 818-834.

Asai H., Ikezu S., Tsunoda S., Medalla M., Luebke J., Haydar T., Wolozin B., Butovsky O., Kügler S., Ikezu T., Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation. *Nat Neurosci*. 2015; 18(11): 1584-1593.

Asea A., Jean-Pierre C., Kaur P., Rao P., Linhares I. M., Skupski D., Witkin S. S., Heat shock protein-containing exosomes in mid-trimester amniotic fluids. *J Reprod Immunol*. 2008; 79(1): 12-17.

Atluri V. S., Jayant R. D., Pilakka-Kanthikeel S., Garcia G., Samikkannu T., Yndart A., Kaushik A., Nair M., Development of TIMP1 magnetic nanoformulation for regulation of synaptic plasticity in HIV-1 infection. *Int J Nanomedicine*. 2016; 11: 4287-4298.

Babst M., MVB vesicle formation: ESCRT-dependent, ESCRT-independent and everything in between. *Curr Opin Cell Biol*. 2011; 23(4): 452-457.

Baixauli F., López-Otín C., Mittelbrunn M., Exosomes and autophagy: coordinated mechanisms for the maintenance of cellular fitness. *Front Immunol*. 2014; 5: 403.

Balbi C., Piccoli M., Barile L., Papait A., Armirotti A., Principi E., Reverberi D., Pascucci L., Becherini P., Varesio L., Moggi M., Coviello D., Bandiera T., Pozzobon M., Cancedda R., Bollini S., First characterization of human amniotic fluid stem cell extracellular vesicles as a powerful paracrine tool endowed with regenerative potential. *Stem Cells Transl Med*. 2017; 6(5): 1340-1355.

Bang C., Thum T., Exosomes: New players in cell-cell communication. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012; 44(11): 2060-2064.

Bao Q., Niess H., Djafarzadeh R., Zhao Y., Schwarz B., Angele M. K., Jauch K.-W., Nelson P. J., Bruns C. J., Recombinant TIMP-1-GPI inhibits growth of fibrosarcoma and enhances tumor sensitivity to doxorubicin. *Target Oncol*. 2014; 9(3): 251-261.

Baranyai T., Herczeg K., Onódi Z., Voszka I., Módos K., Marton N., Nagy G., Mäger I., Wood M. J., El Andaloussi S., Pálincás Z., Kumar V., Nagy P., Kittel Á., Buzás E. I., Ferdinandy P., Giricz Z., Isolation of exosomes from blood plasma: Qualitative and quantitative comparison of ultracentrifugation and size exclusion chromatography methods. *PLoS One*. 2015; 10(12): e0145686.

Batagov A. O., Kurochkin I. V., Exosomes secreted by human cells transport largely mRNA fragments that are enriched in the 3'-untranslated regions. *Biol Direct*. 2013; 8: 12.

Bauer S., Groh V., Wu J., Steinle A., Phillips J. H., Lanier L. L., Spies T., Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*. 1999; 285(5428): 727-729.

Bellavia D., Raimondo S., Calabrese G., Forte S., Cristaldi M., Patinella A., Memeo L., Manno M., Raccosta S., Diana P., Cirrincione G., Giavaresi G., Monteleone F., Fontana S., De Leo G., Alessandro R., Interleukin 3- receptor targeted exosomes inhibit in vitro and in vivo Chronic Myelogenous Leukemia cell growth. *Theranostics*. 2017; 7(5): 1333-1345.

Bobrie A., Colombo M., Raposo G., Théry C., Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses. *Traffic*. 2011; 12(12): 1659-1668.

Bode W., Maskos K., Structural basis of the matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Biol Chem*. 2003; 384(6): 863-872.

Bolukbasi M. F., Mizrak A., Ozdener G. B., Madlener S., Ströbel T., Erkan E. P., Fan J.-B., Breakefield X. O., Saydam O., miR-1289 and "Zipcode"-like sequence enrich mRNAs in micro-vesicles. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2012; 1(2): e10.

Bonnans C., Chou J., Werb Z., Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014; 15(12): 786-801.

Brew K., Nagase H., The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1803(1): 55-71.

Brown O., Cowen R. L., Preston C. M., Castro M. G., Lowenstein P. R., Subcellular post-transcriptional targeting: delivery of an intracellular protein to the extracellular leaflet of the plasma membrane using a glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) membrane anchor in neurons and polarised epithelial cells. *Gene Ther*. 2000; 7(22): 1947-1953.

Buschow S. I., Nolte-'t Hoen E. N., van Niel G., Pols M. S., ten Broeke T., Lauwen M., Ossendorp F., Melief C. J., Raposo G., Wubbolts R., Wauben M. H., Stoorvogel W., MHC II in dendritic cells is targeted to lysosomes or T cell-induced exosomes via distinct multivesicular body pathways. *Traffic*. 2009; 10(10): 1528-1542.

Caley M. P., Martins V. L., O'Toole E. A., Metalloproteinases and Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2015; 4(4): 225-234.

Carmeliet P., VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology*. 2005; 69(Suppl 3): 4-10.

Chaput N., Scharz N. E., Andre F., Zitvogel L., Exosomes for immunotherapy of cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2003; 532: 215-221.

Chen T. S., Arslan F., Yin Y., Tan S. S., Lai R. C., Choo A. B., Padmanabhan J., Lee C. N., de Kleijn D. P., Lim S. K., Enabling a robust scalable manufacturing process for therapeutic exosomes through oncogenic immortalization of human ESC-derived MSCs. *J Transl Med.* 2011; 9: 47.

Chen T., Guo J., Yang M., Zhu X., Cao X., Chemokine-containing exosomes are released from heat-stressed tumor cells via lipid raft-dependent pathway and act as efficient tumor vaccine. *J Immunol.* 2011; 186(4): 2219-2228.

Cheng Y., Schorey J. S., Targeting soluble proteins to exosomes using a ubiquitin tag. *Biotechnol Bioeng.* 2016; 113(6): 1315-1324.

Chivet M., Hemming F., Pernet-Gallay K., Fraboulet S., Sadoul R., Emerging role of neuronal exosomes in the central nervous system. *Front Physiol.* 2012; 3: 145.

Ciardiello C., Cavallini L., Spinelli C., Yang J., Reis-Sobreiro M., de Candia P., Minciocchi V. R., Di Vizio D., Focus on extracellular vesicles: New frontiers of cell-to-cell communication in cancer. *Int J Mol Sci.* 2016; 17(2): 175.

Clayton A, Mitchell J. P., Court J., Mason M. D., Tabi Z., Human tumor-derived exosomes selectively impair lymphocyte responses to interleukin-2. *Cancer Res.* 2007; 67(15): 7458-7466.

Clayton A., Mitchell J. P., Court J., Linnane S., Mason M. D., Tabi Z., Human tumor-derived exosomes down-modulate NKG2D expression. *J Immunol.* 2008; 180(11): 7249-7258.

Colombo M., Raposo G., Théry C., Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2014; 30: 255-289.

Conde-Vancells J., Rodriguez-Suarez E., Embade N., Gil D., Matthiesen R., Valle M., Elortza F., Lu S. C., Mato J. M., Falcon-Perez J. M., Characterization and comprehensive proteome profiling of exosomes secreted by hepatocytes. *J Proteome Res.* 2008; 7(12): 5157-5166.

Costa-Silva B., Aiello N. M., Ocean A. J., Singh S., Zhang H., Thakur B. K., Becker A., Hoshino A., Mark M. T., Molina H., Xiang J., Zhang T., Theilen T. M., García-Santos G., Williams C., Ararso Y., Huang Y., Rodrigues G., Shen T. L., Labori K. J., Lothe I. M., Kure E. H., Hernandez J., Doussot A., Ebbesen S. H., Grandgenett P. M., Hollingsworth M. A., Jain M., Mallya K., Batra S. K., Jarnagin W. R., Schwartz R. E., Matei I., Peinado H., Stanger B. Z., Bromberg J., Lyden D., Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nat Cell Biol.* 2015; 17(6): 816-826.

Dalton A. J., Microvesicles and vesicles of multivesicular bodies versus "virus-like" particles. *J Natl Cancer Inst.* 1975; 54(5): 1137-1148.

Davies B. A., Azmi I. F., Katzmann D. J., Regulation of Vps4 ATPase activity by ESCRT-III. *Biochem Soc Trans.* 2009; 37(Pt 1): 143-145.

de Gassart A., Geminard C., Fevrier B., Raposo G., Vidal M., Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. *Blood.* 2003; 102(13): 4336-4344.

Dear J. W., Street J. M., Bailey M. A., Urinary exosomes: a reservoir for biomarker discovery and potential mediators of intrarenal signalling. *Proteomics.* 2013; 13(10-11): 1572-1580.

Denzer K., Kleijmeer M. J., Heijnen H. F., Stoorvogel W., Geuze H. J., Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *J Cell Sci.* 2000; 113: 3365-3374.

Djafarzadeh R., Mojaat A., Vicente A. B., von Lüttichau I., Nelson P. J., Exogenously added GPI-anchored tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) displays enhanced and novel biological activities. *Biol Chem.* 2004; 385(7): 655-663.

Djafarzadeh R., Noessner E., Engelmann H., Schendel D. J., Notohamiprodjo M., von Luettichau I., Nelson P. J., GPI-anchored TIMP-1 treatment renders renal cell carcinoma sensitive to FAS-mediated killing. *Oncogene.* 2006; 25(10): 1496-1508.

Djafarzadeh R., Sauter M., Notohamiprodjo S., Noessner E., Goyal P., Siess W., Wörnle M., Ribeiro A., Himmelein S., Sitter T., Nelson P. J., Recombinant GPI-anchored TIMP-1 stimulates growth and migration of peritoneal mesothelial cells. *PLoS One.* 2012; 7(4): e33963.

Drew E., Merzaban J. S., Seo W., Ziltener H. J., McNagny K. M., CD34 and CD43 inhibit mast cell adhesion and are required for optimal mast cell reconstitution. *Immunity.* 2005; 22(1): 43-57.

Du J., Shen J., Wang Y., Pan C., Pang W., Hua Diao H., Dong W., Boar seminal plasma exosomes maintain sperm function by infiltrating into the sperm membrane. *Oncotarget* 2016; 7(37): 58832-58847.

Duan J. X., Rapti M., Tsigkou A., Lee M. H., Expanding the activity of tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP)-1 against surface-anchored metalloproteinases by the replacement of its C-terminal domain: Implications for anti-cancer effects. *PLoS One*. 2015; 10(8): e0136384.

Escola J. M., Kleijmeer M. J., Stoorvogel W., Griffith J. M., Yoshie O., Geuze H. J., Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J Biol Chem*. 1998; 273(32): 20121-20127.

Espino Y Sosa S., Flores-Pliego A., Espejel-Nuñez A., Medina-Bastidas D., Vadillo-Ortega F., Zaga-Clavellina V., Estrada-Gutierrez G., New insights into the role of matrix metalloproteinases in preeclampsia. *Int J Mol Sci*. 2017; 18(7): 1448.

Fais S., NK cell-released exosomes: Natural nanobullets against tumors. *Oncoimmunology*. 2013; 2(1): e22337.

Fauré J., Lachenal G., Court M., Hirrlinger J., Chatellard-Causse C., Blot B., Grange J., Schoehn G., Goldberg Y., Boyer V., Kirchhoff F., Raposo G., Garin J., Sadoul R., Exosomes are released by cultured cortical neurones. *Mol Cell Neurosci*. 2006; 31(4): 642-648.

Feng D., Zhao W. L., Ye Y. Y., Bai X. C., Liu R. Q., Chang L. F., Zhou Q., Sui S. F., Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic*. 2010; 11(5): 675-687.

Ferguson S. W., Nguyen J., Exosomes as therapeutics: The implications of molecular composition and exosomal heterogeneity. *J Control Release*. 2016; 228: 179-190.

Ferrante S. C., Nadler E. P., Pillai D. K., Hubal M. J., Wang Z., Wang J. M., Gordish-Dressman H., Koeck E., Sevilla S., Wiles A. A., Freishtat R. J., Adipocyte-derived exosomal miRNAs: a novel mechanism for obesity-related disease. *Pediatr Res*. 2015; 77(3): 447-454.

Fisher D. T., Appenheimer M. M., Evans S. S., The two faces of IL-6 in the tumor microenvironment. *Semin Immunol*. 2014; 26(1): 38-47.

Fitzner D., Schnaars M., van Rossum D., Krishnamoorthy G., Dibaj P., Bakhti M., Regen T., Hanisch U. K., Simons M., Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis. *J Cell Sci*. 2011; 124(Pt 3): 447-458.

Fonseca P., Vardaki I., Occhionero A., Panaretakis T., Metabolic and signaling functions of cancer cell-derived extracellular vesicles. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2016; 326: 175-199.

Gangenahalli G. U., Singh V. K., Verma Y. K., Gupta P., Sharma R. K., Chandra R., Luthra P. M., Hematopoietic stem cell antigen CD34: role in adhesion or homing. *Stem Cells Dev.* 2006; 15(3): 305-313.

Gangoda L., Boukouris S., Liem M., Kalra H., Mathivanan S., Extracellular vesicles including exosomes are mediators of signal transduction: are they protective or pathogenic? *Proteomics.* 2015; 15(2-3): 260-271.

Ge Q., Zhou Y., Lu J., Bai Y., Xie X., Lu Z., miRNA in plasma exosome is stable under different storage conditions. *Molecules.* 2014; 19(2): 1568-1575.

Ge R., Tan E., Sharghi-Namini S., Asada H. H., Exosomes in cancer microenvironment and beyond: have we overlooked these extracellular messengers? *Cancer Microenviron.* 2012; 5(3): 323-332.

Géminard C., de Gassart A., Vidal M., Reticulocyte maturation: mitoptosis and exosome release. *Biocell.* 2002; 26(2): 205-215.

Gialeli C., Theocharis A. D., Karamanos N. K., Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS J.* 2011; 278(1): 16-27.

Gou X., Jin F., Chen H. X., Wu W. L., Chen L., Zeng Y., Expressions of CD147, MMP-2 and MMP-9 in laryngeal carcinoma and clinical significance. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2010; 90(18): 1264-1267.

Green T. M., Alpaugh M. L., Barsky S. H., Rappa G., Lorico A., Breast cancer-derived extracellular vesicles: Characterization and contribution to the metastatic phenotype. *Biomed Res Int.* 2015; 2015: 634865.

Greening D. W., Gopal S. K., Xu R., Simpson R. J., Chen W., Exosomes and their roles in immune regulation and cancer. *Semin Cell Dev Biol.* 2015; 40: 72-81.

Greening D. W., Xu R., Ji H., Tauro B. J., Simpson R. J., A protocol for exosome isolation and characterization: evaluation of ultracentrifugation, density-gradient separation, and immunoaffinity capture methods. *Methods Mol Biol.* 2015; 1295: 179-209.

Griffith J. W., Sokol C. L., Luster A. D., Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu Rev Immunol.* 2014; 32: 659-702.

Gruenberg J., Griffiths G., Howell K. E., Characterization of the early endosome and putative endocytic carrier vesicles in vivo and with an assay of vesicle fusion in vitro. *J Cell Biol.* 1989; 108(4): 1301-1316.

Guescini M., Genedani S., Stocchi V., Agnati L. F., Astrocytes and glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA. *J Neural Transm (Vienna).* 2010; 117(1): 1-4.

Gutiérrez-Vázquez C., Villarroya-Beltri C., Mittelbrunn M., Sánchez-Madrid F., Transfer of extracellular vesicles during immune cell-cell interactions. *Immunol Rev.* 2013; 251(1): 125-142.

Ha D., Ningning Yang N., Nadithe V., Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges. *Acta Pharm Sin B.* 2016; 6(4): 287-296.

Ha D., Yang N., Nadithe V., Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges. *Acta Pharm Sin B.* 2016; 6(4): 287-296.

Haj-Salem I., Plante S., Gounni A. S., Rouabhia M., Chakir J., Fibroblast-derived exosomes promote epithelial cell proliferation through TGF- β 2 signalling pathway in severe asthma. *Allergy.* 2017: 13234.

Haney M. J., Klyachko N. L., Zhao Y., Gupta R., Plotnikova E. G., He Z., Patel T., Piroyan A., Sokolsky M., Kabanov A. V., Batrakova E. V., Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson's disease therapy. *J Control Release.* 2015; 207: 18-30.

Haraszti R. A., Didiot M. C., Sapp E., Leszyk J., Shaffer S. A., Rockwell H. E., Gao F., Narain N. R., DiFiglia M., Kiebish M. A., Aronin N., Khvorova A., High-resolution proteomic and lipidomic analysis of exosomes and microvesicles from different cell sources. *J Extracell Vesicles.* 2016; 5: 32570.

Harding C., Heuser J., Stahl P., Endocytosis and intracellular processing of transferrin and colloidal gold-transferrin in rat reticulocytes: demonstration of a pathway for receptor shedding. *Eur J Cell Biol.* 1984; 35(2): 256-263.

Harding C., Heuser J., Stahl P., Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol.* 1983; 97(2): 329-339.

Heider S., Dangerfield J. A., Metzner C., Biomedical applications of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *J Lipid Res.* 2016; 57(10): 1778-1788.

Heusermann W., Hean J., Trojer D., Steib E., von Bueren S., Graff-Meyer A., Genoud C., Martin K., Pizzato N., Voshol J., Morrissey D. V., Andaloussi S. E., Wood M. J., Meisner-Kober N. C., Exosomes surf on filopodia to enter cells at endocytic hot spots, traffic within endosomes, and are targeted to the ER. *J Cell Biol.* 2016; 213(2): 173-184.

Himmelstein B. P., Canete-Soler R., Bernhard E. J., Dilks D.W., Muschel R. J., Metalloproteinases in tumor progression: the contribution of MMP-9. *Invasion Metastasis.* 1994-1995; 14(1-6): 246-258.

Hock A., Miyake H., Li B., Lee C., Ermini L., Koike Y., Chen Y., Määttänen P., Zani A., Pierro A., Breast milk-derived exosomes promote intestinal epithelial cell growth. *J Pediatr Surg.* 2017; 52(5): 755-759.

Hoepfner S., Severin F., Cabezas A., Habermann B., Runge A., Gillyooly D., Stenmark H., Zerial M., Modulation of receptor recycling and degradation by the endosomal kinesin KIF16B. *Cell.* 2005; 121(3): 437-450.

Hsu C., Morohashi Y., Yoshimura S., Manrique-Hoyos N., Jung S., Lauterbach M. A., Bakhti M., Grønberg M., Möbius W., Rhee J., Barr F. A., Simons M., *J Cell Biol.* 2010; 189(2): 223-232.

Hu Y. B., Dammer E. B., Ren R. J., Wang G., The endosomal-lysosomal system: from acidification and cargo sorting to neurodegeneration. *Transl Neurodegener.* 2015; 4: 18.

Hu Y., Yan C., Mu L., Huang K., Li X., Tao D., Wu Y., Qin J., Fibroblast-derived exosomes contribute to chemoresistance through priming cancer stem cells in colorectal cancer. *PLoS One.* 2015; 10(5): e0125625.

Huotari J., Helenius A., Endosome maturation. *EMBO J.* 2011; 30(17): 3481-3500.

Hurley J. H., Hanson P. I., Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010; 11(8): 556-566.

Hurley J. H., The ESCRT complexes. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2010; 45(6): 463-487.

Ikenaka Y., Yoshiji H., Kuriyama S., Yoshii J., Noguchi R., Tsujinoue H., Yanase K., Namisaki T., Imazu H., Masaki T., Fukui H., Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) inhibits tumor growth and angiogenesis in the TIMP-1 transgenic mouse model. *Int J Cancer.* 2003; 105(3): 340-346.

Isaacson K. J., Martin Jensen M., Subrahmanyam N. B., Ghandehari H., Matrix-metalloproteinases as targets for controlled delivery in cancer: An analysis of upregulation and expression. *J Control Release.* 2017; 259: 62-75.

Jabłońska-Trypuć A., Matejczyk M., Rosochacki S., Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2016; 31(1): 177-183.

Janas A. M., Sapoń K., Janas T., Stowell M. H., Janas T., Exosomes and other extracellular vesicles in neural cells and neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2016; 1858(6): 1139-1151.

Jia X., Chen J., Megger D. A., Zhang X., Kozłowski M., Zhang L., Fang Z., Li J., Chu Q., Wu M., Li Y., Sitek B., Yuan Z., Label-free proteomic analysis of exosomes derived from inducible hepatitis B virus-replicating HepAD38 cell line. *Mol Cell Proteomics.* 2017; 16(4 suppl 1): S144-S160.

Jiang X., Zhang J., Huang Y., Tetraspanins in cell migration. *Cell Adh Migr.* 2015; 9(5): 406-415.

Jin Y., Chen K., Wang Z., Wang Y., Liu J., Lin L., Shao Y., Gao L., Yin H., Cui C., Tan Z., Liu L., Zhao C., Zhang G., Jia R., Du L., Chen Y., Liu R., Xu J., Hu X., Wang Y., DNA in serum extracellular vesicles is stable under different storage conditions. *BMC Cancer.* 2016; 16(1): 753.

Johnstone R. M., Adam M., Hammond J. R., Orr L., Turbide C., Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem.* 1987; 262(19): 9412-9420.

Jopling H. M., Odell A. F., Pellet-Many C., Latham A. M., Frankel P., Sivaprasadarao A., Walker J. H., Zachary I. C., Ponnambalam S., Endosome-to-plasma membrane recycling of VEGFR2 receptor tyrosine kinase regulates endothelial function and blood vessel formation. *Cells.* 2014; 3(2): 363-385.

Jørgensen M., Bæk R., Pedersen S., Søndergaard E. K., Kristensen S. R., Varming K., Extracellular vesicle (EV) array: microarray capturing of exosomes and other extracellular vesicles for multiplexed phenotyping. *J Extracell Vesicles.* 2013; 2: 20920.

Jovic M., Sharma M., Rahajeng J., Caplan S., The early endosome: a busy sorting station for proteins at the crossroads. *Histol Histopathol.* 2010; 25(1): 99-112.

Kahlert C., Melo S. A., Protopopov A., Tang J., Seth S., Koch M., Zhang J., Weitz J., Chin L., Futreal A., Kalluri R., Identification of double-stranded genomic DNA spanning all chromosomes with mutated KRAS and p53 DNA in the serum exosomes of patients with pancreatic cancer. *J Biol Chem.* 2014; 289(7): 3869-3875.

Kalani A., Tyagi A., Tyagi N., Exosomes: mediators of neurodegeneration, neuroprotection and therapeutics. *Mol Neurobiol.* 2014; 49(1): 590-600.

Kalra H., Simpson R. J., Ji H., Aikawa E., Altevogt P., Askenase P., Bond V. C., Borràs F. E., Breakefield X., Budnik V., Buzas E., Camussi G., Clayton A., Cocucci E., Falcon-Perez J. M., Gabrielsson S., Gho Y. S., Gupta D., Harsha H. C., Hendrix A., Hill A. F., Inal J. M., Jenster G., Krämer-Albers E. M., Lim S. K., Llorente A., Lötvall J., Marcilla A., Mincheva-Nilsson L., Nazarenko I., Nieuwland R., Nolte-'t Hoen E. N., Pandey A., Patel T., Piper M. G., Pluchino S., Prasad T. S., Rajendran L., Raposo G., Record M., Reid G. E., Sánchez-Madrid F., Schiffelers R. M., Siljander P., Stensballe A., Stoorvogel W., Taylor D., Thery C., Valadi H., van Balkom B. W., Vázquez J., Vidal M., Wauben M. H., Yáñez-Mó M., Zoeller M., Mathivanan S., Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS Biol.* 2012; 10(12): e1001450.

Kanada M., Bachmann M. H., Hardy J. W., Frimannson D. O., Bronsart L., Wang A., Sylvester M. D., Schmidt T. L., Kaspar R. L., Butte M. J., Matin A. C., Contag C. H., Differential fates of biomolecules delivered to target cells via extracellular vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015; 112(12): E1433-E1442.

Katzmann D. J., Babst M., Emr S. D., Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell.* 2001; 106(2): 145-155.

Keerthikumar S., Chisanga D., Ariyaratne D., Al Saffar H., Anand S., Zhao K., Samuel M., Pathan M., Jois M., Chilamkurti N., Gangoda L., Mathivanan S., ExoCarta: A web-based compendium of exosomal cargo. *J Mol Biol.* 2016; 428(4): 688-692.

Keller S., Sanderson M. P., Stoeck A., Altevogt P., Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. *Immunol Lett.* 2006; 107(2): 102-108.

Kessenbrock K., Plaks V., Werb Z., Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell.* 2010; 141(1): 52-67.

Khalil I. A., Kogure K., Akita H., Harashima H., Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. *Pharmacol Rev.* 2006; 58(1): 32-45.

Khan S., Jutzy J. M., Aspe J. R., McGregor D. W., Neidigh J. W., Wall N. R., Survivin is released from cancer cells via exosomes. *Apoptosis.* 2011; 16(1): 1-12.

Khan S., Jutzy J. M., Valenzuela M. M., Turay D., Aspe J. R., Ashok A., Mirshahidi S., Mercola D., Lilly M. B., Wall N. R., Plasma-derived exosomal survivin, a plausible biomarker for early detection of prostate cancer. *PLoS One.* 2012; 7(10): e46737.

Kim D. K., Kang B., Kim O. Y., Choi D. S., Lee J., Kim S. R., Go G., Yoon Y. J., Kim J. H., Jang S. C., Park K. S., Choi E. J., Kim K. P., Desiderio D. M., Kim Y. K., Lötval J., Hwang D., Gho Y. S., EVpedia: an integrated database of high-throughput data for systemic analyses of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*. 2013; 2: 20384.

Kim D. K., Lee J., Kim S. R., Choi D. S., Yoon Y. J., Kim J. H., Go G., Nhung D., Hong K., Jang S. C., Kim S. H., Park K. S., Kim O. Y., Park H. T., Seo J. H., Aikawa E., Baj-Krzyworzeka M., van Balkom B. W., Belting M., Blanc L., Bond V., Bongiovanni A., Borràs F. E., Buée L., Buzás E. I., Cheng L., Clayton A., Cocucci E., Dela Cruz C. S., Desiderio D. M., Di Vizio D., Ekström K., Falcon-Perez J. M., Gardiner C., Giebel B., Greening D. W., Gross J. C., Gupta D., Hendrix A., Hill A. F., Hill M. M., Nolte-'t Hoen E., Hwang D. W., Inal J., Jagannadham M. V., Jayachandran M., Jee Y. K., Jørgensen M., Kim K. P., Kim Y. K., Kislinger T., Lässer C., Lee D. S., Lee H., van Leeuwen J., Lener T., Liu M. L., Lötval J., Marcilla A., Mathivanan S., Möller A., Morhayim J., Mullier F., Nazarenko I., Nieuwland R., Nunes D. N., Pang K., Park J., Patel T., Pocsfalvi G., Del Portillo H., Putz U., Ramirez M. I., Rodrigues M. L., Roh T. Y., Royo F., Sahoo S., Schiffelers R., Sharma S., Siljander P., Simpson R. J., Soekmadji C., Stahl P., Stensballe A., Stępień E., Tahara H., Trummer A., Valadi H., Vella L. J., Wai S. N., Witwer K., Yáñez-Mó M., Youn H., Zeidler R., Gho Y. S., EVpedia: a community web portal for extracellular vesicles research. *Bioinformatics*. 2015a; 31(6): 933-939.

Kim D. K., Lee J., Simpson R. J., Lötval J., Gho Y. S., EVpedia: A community web resource for prokaryotic and eukaryotic extracellular vesicles research. *Semin Cell Dev Biol*. 2015b; 40: 4-7.

Kim S., Kim B., Song Y. S., Ascites modulates cancer cell behavior, contributing to tumor heterogeneity in ovarian cancer. *Cancer Sci*. 2016; 107(9): 1173-1178.

Kinoshita T., Glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchors: Biochemistry and cell biology: Introduction to a thematic review series. *J Lipid Res*. 2016; 57(1): 4-5.

Kooijmans S. A., Aleza C. G., Roffler S. R., van Solinge W. W., Vader P., Schiffelers R. M., Display of GPI-anchored anti-EGFR nanobodies on extracellular vesicles promotes tumour cell targeting. *J Extracell Vesicles*. 2016; 5: 31053.

Kowal J., Arras G., Colombo M., Jouve M., Morath J. P., Primdal-Bengtson B., Dingli F., Loew D., Tkach M., Théry C., Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016; 113(8): E968-E977.

Krämer-Albers E. M., Bretz N., Tenzer S., Winterstein C., Möbius W., Berger H., Nave K. A., Schild H., Trotter J., Oligodendrocytes secrete exosomes containing major myelin and stress-protective proteins: Trophic support for axons? *Proteomics Clin Appl.* 2007; 1(11): 1446-1461.

Kucharzewska P., Christianson H. C., Welch J. E., Svensson K. J., Fredlund E., Ringnér M., Mörgelin M., Bourseau-Guilmain E., Bengzon J., Belting M., Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110(18): 7312-7317.

Kufareva I., Salanga C. L., Handel T. M., Chemokine and chemokine receptor structure and interactions: implications for therapeutic strategies. *Immunol Cell Biol.* 2015; 93(4): 372-383.

Lai R. C., Arslan F., Lee M. M., Sze N. S., Choo A., Chen T. S., Salto-Tellez M., Timmers L., Lee C. N., El Oakley R. M., Pasterkamp G., de Kleijn D. P., Lim S. K., Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res.* 2010; 4(3): 214-222.

Lai R. C., Yeo R. W., Tan K. H., Lim S. K., Exosomes for drug delivery - a novel application for the mesenchymal stem cell. *Biotechnol Adv.* 2013; 31(5): 543-551.

Lambert E., Dassé E., Haye B., Petitfrère E., TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2004; 49(3): 187-198.

Lane R. E., Korbie D., Anderson W., Vaidyanathan R., Trau M., Analysis of exosome purification methods using a model liposome system and tunable-resistive pulse sensing. *Sci Rep.* 2015; 5: 7639.

Lata S., Schoehn G., Jain A., Pires R., Piehler J., Gottlinger H. G., Weissenhorn W., Helical structures of ESCRT-III are disassembled by VPS4. *Science.* 2008; 321(5894): 1354-1357.

Laulagnier K., Motta C., Hamdi S., Roy S., Fauvelle F., Pageaux J. F., Kobayashi T., Salles J. P., Perret B., Bonnerot C., Record M., Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization. *Biochem J.* 2004; 380(Pt 1): 161-171.

Lea J., Sharma R., Yang F., Zhu H., Ward E. S., Schroit A. J., Detection of phosphatidylserine-positive exosomes as a diagnostic marker for ovarian malignancies: a proof of concept study. *Oncotarget.* 2017; 8(9): 14395-14407.

Lee M., Ban J.-J., Im W., Kim M., Influence of storage condition on exosome recovery. *Biotechnology and Bioprocess Engineering.* 2016; 21: 299-304.

Lemke J., von Karstedt S., Zinngrebe J., Walczak H., Getting TRAIL back on track for cancer therapy. *Cell Death Differ.* 2014; 21(9): 1350-1364.

Lewis G. D., Metcalf T. G., Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus, from oyster, water, and sediment samples. *Appl Environ Microbiol.* 1988; 54(8): 1983-1988.

Li C. X., Ling C. C., Shao Y., Xu A., Li X. C., Ng K. T., Liu X. B., Ma Y. Y., Qi X., Liu H., Liu J., Yeung O. W., Yang X. X., Liu Q. S., Lam Y. F., Zhai Y., Lo C. M., Man K., CXCL10/CXCR3 signaling mobilized-regulatory T cells promote liver tumor recurrence after transplantation. *J Hepatol.* 2016; 65(5): 944-952.

Li F., Wang Y., Lin L., Wang J., Xiao H., Li J., Peng X., Dai H., Li L., Mast cell-derived exosomes promote Th2 cell differentiation via OX40L-OX40 ligation. *J Immunol Res.* 2016; 2016: 3623898.

Li M., Zeringer E., Barta T., Schageman J., Cheng A., Vlassov A. V., Analysis of the RNA content of the exosomes derived from blood serum and urine and its potential as biomarkers. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2014; 369(1652): 20130502.

Li P., Kaslan M., Lee S. H., Yao J., Gao Z., Progress in exosome isolation techniques. *Theranostics.* 2017; 7(3): 789-804.

Li T., Yan Y., Wang B., Qian H., Zhang X., Shen L., Wang M., Zhou Y., Zhu W., Li W., Xu W., Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate liver fibrosis. *Stem Cells Dev.* 2013; 22(6): 845-854.

Lin J., Li J., Huang B., Liu J., Chen X., Chen X. M., Xu Y. M., Huang L. F., Wang X. Z., Exosomes: novel biomarkers for clinical diagnosis. *ScientificWorldJournal.* 2015; 2015: 657086.

Lindsey M. L., Yabluchanskiy A., Ma Y., Tissue inhibitor of metalloproteinase-1: actions beyond matrix metalloproteinase inhibition. *Cardiology.* 2015; 132(3): 147-150.

Liu A. P., Aguet F., Danuser G., Schmid S. L., Local clustering of transferrin receptors promotes clathrin-coated pit initiation. *J Cell Biol.* 2010; 191(7): 1381-1393.

Liu Q., Rojas-Canales D. M., Divito S. J., Shufesky W. J., Stolz D. B., Erdos G., Sullivan M. L., Gibson G. A., Watkins S. C., Larregina A. T., Morelli A. E., Donor dendritic cell-derived exosomes promote allograft-targeting immune response. *J Clin Invest.* 2016; 126(8): 2805-2820.

Liu Y., Gu Y., Cao X., The exosomes in tumor immunity. *Oncoimmunology.* 2015; 4(9): e1027472.

Livshits M. A., Khomyakova E., Evtushenko E. G., Lazarev V. N., Kulemin N. A., Semina S. E., Generozov E. V., Govorun V. M., Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol. *Sci Rep.* 2015; 5: 17319.

López-Cobo S., Campos-Silva C., Valés-Gómez M., Glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI)-anchors and metalloproteases: Their roles in the regulation of exosome composition and NKG2D-mediated immune recognition. *Front Cell Dev Biol.* 2016; 4: 97.

Lotvall J., Valadi H., Cell to cell signalling via exosomes through esRNA. *Cell Adh Migr.* 2007; 1(3): 156-158.

Luan X., Sansanaphongpricha K., Myers I., Chen H., Yuan H., Sun D., Engineering exosomes as refined biological nanoplatfoms for drug delivery. *Acta Pharmacol Sin.* 2017; 38(6): 754-763.

Lugini L., Cecchetti S., Huber V., Luciani F., Macchia G., Spadaro F., Paris L., Abalsamo L., Colone M., Molinari A., Podo F., Rivoltini L., Ramoni C., Fais S., Immune surveillance properties of human NK cell-derived exosomes. *J Immunol.* 2012; 189(6): 2833-2842.

Lundy S. K., Klinker M. W., Fox D. A., Killer B lymphocytes and their fas ligand positive exosomes as inducers of immune tolerance. *Front Immunol.* 2015; 6: 122.

Luzio J. P., Gray S. R., Bright N. A., Endosome-lysosome fusion. *Biochem Soc Trans.* 2010; 38(6): 1413-1416.

Ma Y., de Castro Brás L. E., Toba H., Lyer R. P., Hall M. E., Winniford M. D., Lange R. A., Tyagi S. C., Lindsey M. L., Myofibroblasts and the extracellular matrix network in post-myocardial infarction cardiac remodeling. *Pflugers Arch.* 2014; 466(6): 1113–1127.

Maldonado-Báez L., Wendland B., Endocytic adaptors: recruiters, coordinators and regulators. *Trends Cell Biol.* 2006; 16(10): 505-513.

Mathivanan S., Fahner C. J., Reid G. E., Simpson R. J., ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40(Database issue): D1241-D1244.

Mathivanan S., Simpson R. J., ExoCarta: A compendium of exosomal proteins and RNA. *Proteomics.* 2009; 9(21): 4997-5000.

Mayor S., Parton R. G., Donaldson J. G., Clathrin-independent pathways of endocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014; 6(6): a016758.

- McDonald M. K., Tian Y., Qureshi R. A., Gormley M., Ertel A., Gao R., Aradillas Lopez E., Alexander G. M., Sacan A., Fortina P., Ajit S. K., Functional significance of macrophage-derived exosomes in inflammation and pain. *Pain*. 2014; 155(8): 1527-1539.
- McKelvey K. J., Powell K. L., Ashton A. W., Morris J. M., McCracken S. A., Exosomes: Mechanisms of uptake. *J Circ Biomark*. 2015; 4: 7.
- McQuibban G. A., Butler G. S., Gong J. H., Bendall L., Power C., Clark-Lewis I., Overall C. M., Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1. *J Biol Chem*. 2001; 276(47): 43503-43508.
- Mears R., Craven R. A., Hanrahan S., Totty N., Upton C., Young S. L., Patel P., Selby P. J., Banks R. E., Proteomic analysis of melanoma-derived exosomes by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*. 2004; 4(12): 4019-4031.
- Melo S. A., Luecke L. B., Kahlert C., Fernandez A. F., Gammon S. T., Kaye J., LeBleu V. S., Mittendorf E. A., Weitz J., Rahbari N., Reissfelder C., Pilarsky C., Fraga M. F., Piwnica-Worms D., Kalluri R., Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature*. 2015; 523(7559): 177-182.
- Michael A., Bajracharya S. D., Yuen P. S., Zhou H., Star R. A., Illei G. G., Alevizos I., Exosomes from human saliva as a source of microRNA biomarkers. *Oral Dis*. 2010; 16(1): 34-38.
- Michelet X., Djeddi A., Legouis R., Developmental and cellular functions of the ESCRT machinery in pluricellular organisms. *Biol Cell*. 2010; 102(3): 191-202.
- Mizrak A., Bolukbasi M. F., Ozdener G. B., Brenner G. J., Madlener S., Erkan E. P., Ströbel T., Breakefield X. O., Saydam O., Genetically engineered microvesicles carrying suicide mRNA/protein inhibit schwannoma tumor growth. *Mol Ther*, 2013; 21(1): 101-108.
- Mulcahy L. A., Pink R. C., Carter D. R., Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles*. 2014; 3: 24641.
- Murphy G., Tissue inhibitors of metalloproteinases. *Genome Biol*. 2011; 12(11): 233.
- Musante L., Tataruch D. E., Holthofer H., Use and isolation of urinary exosomes as biomarkers for diabetic nephropathy. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014; 5: 149.
- Nagase, H., R. Visse, G. Murphy, Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res*. 2006; 69(3): 562-573.

- Nielsen J. S., McNagny K. M., CD34 is a key regulator of hematopoietic stem cell trafficking to bone marrow and mast cell progenitor trafficking in the periphery. *Microcirculation*. 2009; 16(6): 487-496.
- Nielsen J. S., McNagny K. M., Novel functions of the CD34 family. *J Cell Sci*. 2008; 121(22): 3683-3692.
- Nolte-'t Hoen E. N., Buschow S. I., Anderton S. M., Stoorvogel W., Wauben M. H., Activated T cells recruit exosomes secreted by dendritic cells via LFA-1. *Blood*. 2009; 113(9): 1977-1981.
- Ogasawara K., Lanier L. L., NKG2D in NK and T cell-mediated immunity. *J Clin Immunol*. 2005; 25(6): 534-540.
- Ohnishi H., Sasaki H., Nakamura Y., Kato S., Ando K., Narimatsu H., Tachibana K., Regulation of cell shape and adhesion by CD34. *Cell Adh Migr*. 2013; 7(5): 426-433.
- Ostrowski M., Carmo N. B., Krumeich S., Fanget I., Raposo G., Savina A., Moita C. F., Schauer K., Hume A. N., Freitas R. P., Goud B., Benaroch P., Hacohen N., Fukuda M., Desnos C., Seabra M. C., Darchen F., Amigorena S., Moita L. F., Thery C., Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol*. 2010; 12(1): 19-30.
- Pan B. T., Johnstone R. M., Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell*. 1983; 33(3): 967-978.
- Pardridge W. M., The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx*. 2005; 2(1): 3-14.
- Parolini I., Federici C., Raggi C., Lugini L., Palleschi S., De Milito A., Coscia C., Iessi E., Logozzi M., Molinari A., Colone M., Tatti M., Sargiacomo M., Fais S., Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *J Biol Chem*. 2009; 284(49): 34211-34222.
- Parthasarathy V., Martin F., Higginbottom A., Murray H., Moseley G. W., Read R. C., Mal G., Hulme R., Monk P. N., Partridge L. J., Distinct roles for tetraspanins CD9, CD63 and CD81 in the formation of multinucleated giant cells. *Immunology*. 2009; 127(2): 237-248.
- Pear W. S., Nolan G. P., Scott M. L., Baltimore D., Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90(18): 8392-8396.
- Pelkmans L., Helenius A., Endocytosis via caveolae. *Traffic*. 2002; 3(5): 311-320.

Pelkmans L., Secrets of caveolae- and lipid raft-mediated endocytosis revealed by mammalian viruses. *Biochim Biophys Acta*. 2005; 1746(3): 295-304.

Peng P., Yan Y., Keng S., Exosomes in the ascites of ovarian cancer patients: origin and effects on anti-tumor immunity. *Oncol Rep*. 2011; 25(3): 749-762.

Perez-Hernandez D., Gutiérrez-Vázquez C., Jorge I., López-Martín S., Ursa A., Sánchez-Madrid F., Vázquez J., Yáñez-Mó M., The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes. *J Biol Chem*. 2013; 288(17): 11649-11661.

Phinney D. G., Pittenger M. F., Concise review: MSC-derived exosomes for cell-free therapy. *Stem Cells*. 2017; 35(4): 851-858.

Piper R. C., Katzmann D. J., Biogenesis and function of multivesicular bodies. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2007; 23: 519-547.

Pitt J. M., André F., Amigorena S., Soria J. C., Eggermont A., Kroemer G., Zitvogel L., Dendritic cell-derived exosomes for cancer therapy. *J Clin Invest*. 2016; 126(4): 1224-1232.

Pols M. S., Klumperman J., Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Exp Cell Res*. 2009; 315(9): 1584-1592.

Prado N., Cañamero M., Villalba M., Rodríguez R., Batanero E., Bystander suppression to unrelated allergen sensitization through intranasal administration of tolerogenic exosomes in mouse. *Mol Immunol*. 2010; 47(11-12): 2148-2151.

Pusic A. D., Pusic K. M., Clayton B. L., Kraig R. P., IFN γ -stimulated dendritic cell exosomes as a potential therapeutic for remyelination. *J Neuroimmunol*. 2014; 266(1-2): 12-23.

Qin W., Tsukasaki Y., Dasgupta S., Mukhopadhyay N., Ikebe M., Sauter E. R., Exosomes in human breast milk promote EMT. *Clin Cancer Res*. 2016; 22(17): 4517-4524.

Quah B. J., O'Neill H. C., The immunogenicity of dendritic cell-derived exosomes. *Blood Cells Mol Dis*. 2005; 35(2): 94-110.

Rabesandratana H., Toutant J. P., Reggio H., Vidal M., Decay-accelerating factor (CD55) and membrane inhibitor of reactive lysis (CD59) are released within exosomes during *In vitro* maturation of reticulocytes. *Blood*. 1998; 91(7): 2573-2580.

Raposo G., Nijman H. W., Stoorvogel W., Liejendekker R., Harding C. V., Melief C. J., Geuze H. J., B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med*. 1996; 183(3): 1161-1172.

Raposo G., Stoorvogel W., Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol.* 2013; 200(4): 373-383.

Rasheed S., Nelson-Rees W. A., Toth E. M., Arnstein P., Gardner M. B., Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). *Cancer.* 1974; 33(4): 1027-1033.

Ratajczak M. Z., Ratajczak D., Pedziwiatr D., Extracellular microvesicles (ExMVs) in cell to cell communication: A role of telocytes. *Adv Exp Med Biol.* 2016; 913: 41-49.

Record M., Carayon K., Poirot M., Silvente-Poirot S., Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiologicals. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1841(1): 108-120.

Reeves V. L., Thomas C. M., Smart E. J., Lipid rafts, caveolae and GPI-linked proteins. *Adv Exp Med Biol.* 2012; 729: 3-13.

Ribeiro M. F., Zhu H., Millard R. W., Fan G.-C., Exosomes function in pro- and anti-angiogenesis. *Curr Angiogenes.* 2013; 2(1): 54-59.

Ries C., Cytokine functions of TIMP-1. *Cell Mol Life Sci.* 2014; 71(4): 659-672.

Rivoltini L., Chiodoni C., Squarcina P., Tortoreto M., Villa A., Vergani B., Bürdek M., Botti L., Arioli I., Cova A., Mauri G., Vergani E., Bianchi B., Della Mina P., Cantone L., Bollati V., Zaffaroni N., Gianni A. M., Colombo M. P., Huber V., TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL)-Armed Exosomes Deliver Proapoptotic Signals to Tumor Site. *Clin Cancer Res.* 2016; 22(14): 3499-3512.

Rodriguez L. G., Wu X., Guan J. L., Wound-healing assay. *Methods Mol Biol.* 2005; 294: 23-29.

Roma-Rodrigues C., Fernandes AR, Baptista P. V., Exosome in tumour microenvironment: overview of the crosstalk between normal and cancer cells. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 179486.

Sadir R., Lambert A., Lortat-Jacob H., Morel G., Caveolae and clathrin-coated vesicles: two possible internalization pathways for IFN-gamma and IFN-gamma receptor. *Cytokine.* 2001; 14(1): 19-26.

Saman S., Kim W., Raya M., Visnick Y., Miro S., Saman S., Jackson B., McKee A. C., Alvarez V. E., Lee N. C., Hall G. F., Exosome-associated tau is secreted in tauopathy models and is selectively phosphorylated in cerebrospinal fluid in early Alzheimer disease. *J Biol Chem.* 2012; 287(6): 3842-3849.

Sandfeld-Paulsen B., Aggerholm-Pedersen N., Bæk R., Jakobsen K. R., Meldgaard P., Folkersen B. H., Rasmussen T. R., Varming K., Jørgensen M. M., Sorensen B. S., Exosomal proteins as prognostic biomarkers in non-small cell lung cancer. *Mol Oncol.* 2016; 10(10): 1595-1602.

Sangiorgio V., Pitto M., Palestini P., Masserini M., GPI-anchored proteins and lipid rafts. *Ital J Biochem.* 2004; 53(2): 98-111.

Sarko D. K., McKinney C. E., Exosomes: Origins and therapeutic potential for neurodegenerative disease. *Front Neurosci.* 2017; 11: 82.

Sato Y. T., Umezaki K., Sawada S., Mukai S. A., Sasaki Y., Harada N., Shiku H., Akiyoshi K., Engineering hybrid exosomes by membrane fusion with liposomes. *Sci Rep.* 2016; 6: 21933.

Saunderson S. C., Schuberth P. C., Dunn A. C., Miller L., Hock B. D., MacKay P. A., Koch N., Jack R. W., McLellan A. D., Induction of exosome release in primary B cells stimulated via CD40 and the IL-4 receptor. *J Immunol.* 2008; 180(12): 8146-8152.

Savina A., Furlán M., Vidal M., Colombo M. I., Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. *J Biol Chem.* 2003; 278(22): 20083-20090.

Schekman R., Genes and proteins required for secretion of large particles and miRNAs. Department of Molecular and Cell Biology, Howard Hughes Medical Institute, University of California, Berkeley. KITP course. 2015. Aus <http://online.kitp.ucsb.edu/online/evocell15/schekman/pdf/Schekman_EvoCell15_KITP.pdf>

Scholten D. J., Canals M., Maussang D., Roumen L., Smit M. J., Wijtmans M., de Graaf C., Vischer H. F., Leurs R., Pharmacological modulation of chemokine receptor function. *Br J Pharmacol.* 2012; 165(6): 1617-1643.

Scott C. C., Vacca F., Gruenberg J., Endosome maturation, transport and functions. *Semin Cell Dev Biol.* 2014; 31: 2-10.

Sharonov G. V., Balatskaya M. N., Tkachuk V. A., Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins as regulators of cortical cytoskeleton. *Biochemistry (Mosc).* 2016; 81(6): 636-650.

Shen B., Wu N., Yang J. M., Gould S. J., Protein targeting to exosomes/microvesicles by plasma membrane anchors. *J Biol Chem.* 2011; 286(16): 14383-14395.

Shenoda B. B., Ajit S. K., Modulation of Immune Responses by Exosomes Derived from Antigen-Presenting Cells. *Clin Med Insights Pathol.* 2016; 9(Suppl 1): 1-8.

Sidney L. E., Branch M. J., Dunphy S. E., Dua H. S., Hopkinson A., Concise review: Evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells*. 2014; 32(6): 1380-1389.

Simons K., Ikonen E., Functional rafts in cell membranes. *Nature*. 1997; 387(6633): 569-572.

Simpson R. J., Lim J. W., Moritz R. L., Mathivanan S., Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential. *Expert Rev Proteomics*. 2009; 6(3): 267-283.

Skog J., Würdinger T., van Rijn S., Meijer D. H., Gainche L., Sena-Esteves M., Curry W. T. Jr., Carter B. S., Krichevsky A. M., Breakefield X. O., Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol*. 2008; 10(12): 1470-1476.

Skokos D., Botros H. G., Demeure C., Morin J., Peronet R., Birkenmeier G., Boudaly S., Mécheri S., Mast cell-derived exosomes induce phenotypic and functional maturation of dendritic cells and elicit specific immune responses in vivo. *J Immunol*. 2003; 170(6): 3037-3045.

Song J., Huang J., Chen X., Teng X., Song Z., Xing Y., Wang M., Chen K., Wang Z., Yang P., Hu S., Donor-derived exosomes induce specific regulatory T cells to suppress immune inflammation in the allograft heart. *Sci Rep*. 2016; 6: 20077.

Srivastava M. K., Sinha P., Clements V. K., Rodriguez P., Ostrand-Rosenberg S., Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine. *Cancer Res*. 2010; 70(1): 68-77.

Stenqvist A. C., Nagaeva O., Baranov V., Mincheva-Nilsson L., Exosomes secreted by human placenta carry functional Fas ligand and TRAIL molecules and convey apoptosis in activated immune cells, suggesting exosome-mediated immune privilege of the fetus. *J Immunol*. 2013; 191(11): 5515-5523.

Stoorvogel W., Kleijmeer M. J., Geuze H. J., Raposo G., The biogenesis and functions of exosomes. *Traffic*. 2002; 3(5): 321-330.

Stoorvogel W., Strous G. J., Geuze H. J., Oorschot V., Schwartz A. L., Late endosomes derive from early endosomes by maturation. *Cell*. 1991; 65(3): 417-427.

Street J. M., Barran P. E., Mackay C. L., Weidt S., Balmforth C., Walsh T. S., Chalmers R. T., Webb D. J., Dear J. W., Identification and proteomic profiling of exosomes in human cerebrospinal fluid. *J Transl Med*. 2012; 10: 5.

Sun D., Zhuang X., Xiang X., Liu Y., Zhang S., Liu C., Barnes S., Grizzle W., Miller D., Zhang H. G., A novel nanoparticle drug delivery system: the anti-inflammatory activity of curcumin is enhanced when encapsulated in exosomes. *Mol Ther.* 2010; 18(9): 1606-1614.

Sun Y., Liu J., Potential of cancer cell-derived exosomes in clinical application: a review of recent research advances. *Clin Ther.* 2014; 36(6): 863-872.

Sundborger A. C., Hinshaw J. E., Regulating dynamin dynamics during endocytosis. *F1000Prime Rep.* 2014; 6: 85.

Svensson K. J., Christianson H. C., Wittrup A., Bourseau-Guilmain E., Lindqvist E., Svensson L. M., Mörgelin M., Belting M., Exosome uptake depends on ERK1/2-heat shock protein 27 signaling and lipid Raft-mediated endocytosis negatively regulated by caveolin-1. *J Biol Chem.* 2013; 288(24): 17713-17724.

Szajnik M., Derbis M., Lach M., Patalas P., Michalak M., Drzewiecka H., Szpurek D., Nowakowski A., Spaczynski M., Baranowski W., Whiteside T. L., Exosomes in plasma of patients with ovarian carcinoma: Potential biomarkers of tumor progression and response to therapy. *Gynecol Obstet (Sunnyvale).* 2013; Suppl 4: 3.

Szatanek R., Baran J., Siedlar M., Baj-Krzyworzeka M., Isolation of extracellular vesicles: Determining the correct approach (Review). *Int J Mol Med.* 2015; 36(1): 11-17.

Takahashi A., Okada R., Nagao K., Kawamata Y., Hanyu A., Yoshimoto S., Takasugi M., Watanabe S., Kanemaki M. T., Obuse C., Hara E., Exosomes maintain cellular homeostasis by excreting harmful DNA from cells. *Nat Commun.* 2017; 8: 15287.

Tan X., Gong Y. Z., Wu P., Liao D. F., Zheng X. L., Mesenchymal stem cell-derived micro-particles: a promising therapeutic strategy. *Int J Mol Sci.* 2014; 15(8): 14348-14363.

Tang Y. T., Huang Y. Y., Zheng L., Qin S. H., Xu X. P., An T. X., Xu Y., Wu Y. S., Hu X. M., Ping B. H., Wang Q., Comparison of isolation methods of exosomes and exosomal RNA from cell culture medium and serum. *Int J Mol Med.* 2017; 40(3): 834-844.

Tejima E., Guo S., Murata Y., Arai K., Lok J., van Leyen K., Rosell A., Wang X., Lo E. H., Neuroprotective effects of overexpressing tissue Inhibitor of metalloproteinase TIMP-1. *J Neurotrauma.* 2009; 26(11): 1935-1941.

Thalmeier K., Meissner P., Reisbach G., Falk M., Brechtel A., Dörmer P., Establishment of two permanent human bone marrow stromal cell lines with long-term post irradiation feeder capacity. *Blood.* 1994; 83(7): 1799-1807.

Théry C., Regnault A., Garin J., Wolfers J., Zitvogel L., Ricciardi-Castagnoli P., Raposo G., Amigorena S., Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *J Cell Biol.* 1999; 147(3): 599-610.

Théry C., Zitvogel L., Amigorena S., Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2(8): 569-579.

Thompson S., Martínez-Burgo B., Sepuru K. M., Rajarathnam K., Kirby J. A., Sheerin N. S., Ali S., Regulation of chemokine function: The roles of GAG-binding and post-translational nitration. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(8): 1692.

Tian T., Zhu Y. L., Zhou Y. Y., Liang G. F., Wang Y. Y., Hu F. H., Xiao Z. D., Exosome uptake through clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis and mediating miR-21 delivery. *J Biol Chem.* 2014; 289(32): 22258-22267.

Tian Y., Li S., Song J., Ji T., Zhu M., Anderson G. J., Wei J., Nie G., A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy. *Biomaterials.* 2014; 35(7): 2383-2390.

Trams E. G., Lauter C. J., Salem N. Jr., Heine U., Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim Biophys Acta.* 1981; 645(1): 63-70.

Ung T. H., Madsen H. J., Hellwinkel J. E., Lencioni A. M., Graner M. W., Exosome proteomics reveals transcriptional regulator proteins with potential to mediate downstream pathways. *Cancer Sci.* 2014; 105(11): 1384-1392.

Urbanelli L., Magini A., Buratta S., Brozzi A., Sagini K., Polchi A., Tancini B., Emiliani C., Signaling pathways in exosomes biogenesis, secretion and fate. *Genes (Basel).* 2013; 4(2): 152-170.

Valadi H., Ekström K., Bossios A., Sjöstrand M., Lee J. J., Lötvall J. O., Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007; 9(6): 654-659.

Valenti R., Huber V., Iero M., Filipazzi P., Parmiani G., Rivoltini L., Tumor-released microvesicles as vehicles of immunosuppression. *Cancer Res.* 2007; 67(7): 2912-2915.

Valenzuela M. M., Ferguson Bennit H. R., Gonda A., Diaz Osterman C. J., Hibma A., Khan S., Wall N. R., Exosomes secreted from human cancer cell lines contain inhibitors of apoptosis (IAP). *Cancer Microenviron.* 2015; 8(2): 65-73.

van den Boorn J. G., Schlee M., Coch C., Hartmann G., SiRNA delivery with exosome nanoparticles. *Nat Biotechnol.* 2011; 29(4): 325-326.

van der Pol E., Coumans F. A., Grootemaat A. E., Gardiner C., Sargent I. L., Harrison P., Sturk A., van Leeuwen T. G., Nieuwland R., Particle size distribution of exosomes and microvesicles determined by transmission electron microscopy, flow cytometry, nanoparticle tracking analysis, and resistive pulse sensing. *J Thromb Haemost.* 2014; 12(7): 1182-1192.

Van Deun J., Mestdagh P., Sormunen R., Cocquyt V., Vermaelen K., Vandesompele J., Bracke M., De Wever O., Hendrix A., The impact of disparate isolation methods for extracellular vesicles on downstream RNA profiling. *J Extracell Vesicles.* 2014; 3: 10.

Veerappan A., Thompson M., Savage A. R., Silverman M. L., Chan W. S., Sung B., Summers B., Montelione K. C., Benedict P., Groh B., Vicencio A. G., Peinado H., Worgall S., Silver R. B., Mast cells and exosomes in hyperoxia-induced neonatal lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2016; 310(11): L1218-L1232.

Verkhratsky A., Matteoli M., Parpura V., Mothet J. P., Zorec R., Astrocytes as secretory cells of the central nervous system: idiosyncrasies of vesicular secretion. *EMBO J.* 2016; 35(3): 239-257.

Vidal M., Mangeat P., Hoekstra D., Aggregation reroutes molecules from a recycling to a vesicle-mediated secretion pathway during reticulocyte maturation. *J Cell Sci.* 1997; 110(Pt 16): 1867-1877.

Villadangos J. A., Schnorrer P., Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat Rev Immunol.* 2007; 7(7): 543-555.

Villarroya-Beltri C., Baixauli F., Gutiérrez-Vázquez C., Sánchez-Madrid F., Mittelbrunn M., Sorting it out: regulation of exosome loading. *Semin Cancer Biol.* 2014; 28: 3-13.

Vlassov A. V., Magdaleno S., Setterquist R., Conrad R., Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta.* 2012; 1820(7): 940-948.

Vojtech L., Woo S., Hughes S., Levy C., Ballweber L., Sauteraud R. P., Strobl J., Westerberg K., Gottardo R., Tewari M., Hladik F., Exosomes in human semen carry a distinctive repertoire of small non-coding RNAs with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42(11): 7290-7304.

Wahlgren J., De L Karlson T., Brisslert M., Vaziri Sani F., Telemo E., Sunnerhagen P., Valadi H., Plasma exosomes can deliver exogenous short interfering RNA to monocytes and lymphocytes. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40(17): e130.

Wahlgren J., Karlson Tde L., Glader P., Telemo E., Valadi H., Activated human T cells secrete exosomes that participate in IL-2 mediated immune response signaling. *PLoS One*. 2012; 7(11): e49723.

Wang J., Yao Y., Wu J., Li G., Identification and analysis of exosomes secreted from macrophages extracted by different methods. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015; 8(6): 6135-6142.

Wang S., Cesca F., Loers G., Schweizer M., Buck F., Benfenati F., Schachner M., Kleene R., Synapsin I is an oligomannose-carrying glycoprotein, acts as an oligomannose-binding lectin, and promotes neurite outgrowth and neuronal survival when released via glia-derived exosomes. *Neurosci*. 2011; 31(20): 7275-7290.

Wang Y., Murakami Y., Yasui T., Wakana S., Kikutani H., Kinoshita T., Maeda Y., Significance of glycosylphosphatidylinositol-anchored protein enrichment in lipid rafts for the control of autoimmunity. *J Biol Chem*. 2013; 288(35): 25490-25499.

Wang Z., Chen J.-Q., Liu J.-l., Tian L., Exosomes in tumor microenvironment: novel transporters and biomarkers. *J Transl Med*. 2016; 14: 297.

Waring P., Müllbacher A., Cell death induced by the Fas/Fas ligand pathway and its role in pathology. *Immunol Cell Biol*. 1999; 77(4): 312-317.

Whiteside T. L., Tumor-derived exosomes and their role in cancer progression. *Adv Clin Chem*. 2016; 74: 103-141.

Wolf P., The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol*. 1967; 13(3): 269-288.

Wolfers J., Lozier A., Raposo G., Regnault A., Théry C., Masurier C., Flament C., Pouzieux S., Faure F., Tursz T., Angevin E., Amigorena S., Zitvogel L., Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med*. 2001; 7(3): 297-303.

Xiang X., Poliakov A., Liu C., Liu Y., Deng Z. B., Wang J., Cheng Z., Shah S. V., Wang G. J., Zhang L., Grizzle W. E., Mobley J., Zhang H. G., Induction of myeloid-derived suppressor cells by tumor exosomes. *Int J Cancer*. 2009; 124(11): 2621-2633.

Xiao X., Yu S., Li S., Wu J., Ma R., Cao H., Zhu Y., Feng J., Exosomes: decreased sensitivity of lung cancer A549 cells to cisplatin. *PLoS One*. 2014; 9(2): e89534.

Yamashiro D. J., Maxfield F. R., Acidification of endocytic compartments and the intracellular pathways of ligands and receptors. *J Cell Biochem*. 1984; 26(4): 231-246.

Yamashiro D. J., Maxfield F. R., Acidification of morphologically distinct endosomes in mutant and wild-type Chinese hamster ovary cells. *J Cell Biol.* 1987; 105(6 Pt 1): 2723-2733.

Yáñez-Mó M., Siljander P. R., Andreu Z., Zavec A. B., Borràs F. E., Buzas E. I., Buzas K., Casal E., Cappello F., Carvalho J., Colás E., Cordeiro-da Silva A., Fais S., Falcon-Perez J. M., Ghobrial I. M., Giebel B., Gimona M., Graner M., Gursel I., Gursel M., Heegaard N. H., Hendrix A., Kierulf P., Kokubun K., Kosanovic M., Kralj-Iglic V., Krämer-Albers E. M., Laitinen S., Lässer C., Lener T., Ligeti E., Linē A., Lipps G., Llorente A., Lötval J., Manček-Keber M., Marcilla A., Mittelbrunn M., Nazarenko I., Nolte-t Hoen E. N., Nyman T. A., O'Driscoll L., Olivan M., Oliveira C., Pállinger É., Del Portillo H. A., Reventós J., Rigau M., Rohde E., Sammar M., Sánchez-Madrid F., Santarém N., Schallmoser K., Ostenfeld M. S., Stoorvogel W., Stukelj R., Van der Grein S. G., Vasconcelos M. H., Wauben M. H., De Wever O., Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles.* 2015; 4: 27066.

Yang J., Zhang X., Chen X., Wang L., Yang G., Exosome mediated delivery of miR-124 promotes neurogenesis after ischemia. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2017; 7: 278-287.

Yang L., Wu X. H., Wang D., Luo C. L., Chen L. X., Bladder cancer cell-derived exosomes inhibit tumor cell apoptosis and induce cell proliferation in vitro. *Mol Med Rep.* 2013; 8(4): 1272-1278.

Yang T., Martin P., Fogarty B., Brown A., Schurman K., Phipps R., Yin V. P., Lockman P., Bai S., Exosome delivered anticancer drugs across the blood-brain barrier for brain cancer therapy in *Danio rerio*. *Pharm Res.* 2015; 32(6): 2003-2014.

Yi H., Ye J., Yang X. M., Zhang L. W., Zhang Z. G., Chen Y. P., High-grade ovarian cancer secreting effective exosomes in tumor angiogenesis. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015; 8(5): 5062-5070.

Yoshioka Y., Konishi Y., Kosaka N., Katsuda T., Kato T., Ochiya T., Comparative marker analysis of extracellular vesicles in different human cancer types. *J Extracell Vesicles.* 2013; 2: 20424.

Yu S., Liu C., Su K., Wang J., Liu Y., Zhang L., Li C., Cong Y., Kimberly R., Grizzle W. E., Falkson C., Zhang H. G., Tumor exosomes inhibit differentiation of bone marrow dendritic cells. *J Immunol.* 2007; 178(11): 6867-6875.

Yuana Y., Koning R. I., Kuil M. E., Rensen P. C., Koster A. J., Bertina R. M., Osanto S., Cryo-electron microscopy of extracellular vesicles in fresh plasma. *J Extracell Vesicles.* 2013; 2: 21494.

Zeringer E., Barta T., Li M., Vlassov A. V., Strategies for isolation of exosomes. *Cold Spring Harb Protoc.* 2015; 2015(4): 319-323.

Zhang B, Wang M, Gong A, Zhang X, Wu X, Zhu Y, Shi H, Wu L, Zhu W, Qian H, Xu W., HucMSC-exosome mediated-Wnt4 signaling is required for cutaneous wound healing. *Stem Cells.* 2015; 33(7): 2158-2168.

Zhang D., Lee H., Zhu Z., Minhas J. K., Jin Y., Enrichment of selective miRNAs in exosomes and delivery of exosomal miRNAs in vitro and in vivo. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2017; 312(1): L110-L121.

Zhang Z., Wang C., Li T., Liu Z., Li L., Comparison of ultracentrifugation and density gradient separation methods for isolating Tca8113 human tongue cancer cell line-derived exosomes. *Oncol Lett.* 2014; 8(4): 1701-1706.

Zhao Q., Kim T., Pang J., Sun W., Yang X., Wang J., Song Y., Zhang H., Sun H., Rangan V., Deshpande S., Tang H., Cvijic M. E., Westhouse R., Olah T., Xie J., Struthers M., Salter-Cid L., A novel function of CXCL10 in mediating monocyte production of proinflammatory cytokines. *J Leukoc Biol.* 2017; 102(5): 1271-1280.

Zheng X., Chen F., Zhang Q., Liu Y., You P., Sun S., Lin J., Chen N., Salivary exosomal PSMA7: a promising biomarker of inflammatory bowel disease. *Protein Cell.* 2017; 8(9): 686-695.

Zhou H., Yuen P. S., Pisitkun T., Gonzales P. A., Yasuda H., Dear J. W., Gross P., Knepper M. A., Star R. A., Collection, storage, preservation, and normalization of human urinary exosomes for biomarker discovery. *Kidney Int.* 2006; 69(8): 1471-1476.

Zhou Q., Li M., Wang X., Li Q., Wang T., Zhu Q., Zhou X., Wang X., Gao X., Li X., Immune-related microRNAs are abundant in breast milk exosomes. *Int J Biol Sci.* 2012; 8(1): 118-123.

Zhu L., Kalimuthu S., Gangadaran P., Oh J. M., Lee H. W., Baek S. H., Jeong S. Y., Lee S. W., Lee J., Ahn BC., Exosomes derived from natural killer cells exert therapeutic effect in melanoma. *Theranostics.* 2017; 7(10): 2732-2745.

Zhuang X., Xiang X., Grizzle W., Sun D., Zhang S., Axtell R. C., Ju S., Mu J., Zhang L., Steinman L., Miller D., Zhang H. G., Treatment of brain inflammatory diseases by delivering exosome encapsulated anti-inflammatory drugs from the nasal region to the brain. *Mol Ther.* 2011; 19(10): 1769-1779.

Zitvogel L., Regnault A., Lozier A., Wolfers J., Flament C., Tenza D., Ricciardi-Castagnoli P., Raposo G., Amigorena S., Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med.* 1998; 4(5): 594-600.

Zlotogorski-Hurvitz A., Dayan D., Chaushu G., Korvala J., Salo T., Sormunen R., Vered M., Human saliva-derived exosomes: comparing methods of isolation. *J Histochem Cytochem.* 2015; 63(3): 181-189.

Zucker S., Cao J., Selective matrix metalloproteinase (MMP) inhibitors in cancer therapy: ready for prime time? *Cancer Biol Ther.* 2009; 8(24): 2371-2373.

G Abkürzungsverzeichnis

A	
a. E.	Arbiträre Einheit
Ak	Antikörper
APC	Allophycocyanin
ATF2	Aktivierender Transkriptionsfaktor 2
ATPase	Adenosintriphosphatase
B	
bla	Blasticidin-Resistenzgen
bp	Basenpaar(e)
C	
CaCl ₂	Calciumchlorid
CAG	(C) Cytomegalovirus-Enhancer – (A) Huhn-β-Aktin-Promoter – (G) Spleiß-Akzeptor des Kaninchen-β-Globin Gens
CCV	<i>Clathrin-coated vesicle</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	Komplementäre DNS (<i>complementary DNA</i>)
CMV	Cytomegalovirus
Cp	<i>Crossing point</i>
CTL	Zytotoxische T-Zelle (<i>cytotoxic T lymphocyte</i>)
CXCL10 (IP-10)	Interferon-γ-induziertes Protein 10
D	
DC	Dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure

E

EE	Frühes Endosom (<i>early endosome</i>)
eEF1 α 1	Eukaryotischer Elongationsfaktor 1-alpha 1
eGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
EMEM	<i>Eagle's minimum essential medium</i>
ENO1	Enolase 1
env	<i>Envelope</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
ESCRT	<i>Endosomal sorting complex required for transport</i>
Exo	Exosomen
EZM	Extrazelluläre Matrix

F

FACS	Fluoreszenzaktivierter Zellsortierer
FasL	Fas-Ligand
FBS	Fötale Kälberserum (<i>fetal bovine serum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL	Fluoreszenz(kanal)
for	<i>Forward</i>
FramycPi	<i>Fraktalkin-MYC-GPI</i>
FS	<i>Forward scatter</i>
FVII	Faktor 7

G

g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GTP	Guanosintriphosphat

H

h	Human
HEK	Human embryonic kidney
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
(h)MSCs	(Humane) mesenchymale Stammzellen
Hsc	<i>Heat shock cognate</i>
Hsp	Hitzeschockprotein
hygro	Hygromycin-Resistenzgen

I

IL	Interleukin
ILV	Intraluminale Vesikel
IP-10 (CXCL10)	Interferon- γ -induziertes Protein 10
IRES	Interne ribosomale Eintrittsstelle

K

kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton

L

Lamp2b	Lysosom-assoziierte Membranglykoprotein 2b
LE	Spätes Endosom (<i>late endosome</i>)
LTR	<i>Long terminal repeat</i>
Luc2	<i>Firefly luciferase 2</i>

M

M	Molar
MDSC	Myeloide Suppressorzelle (<i>myeloid-derived suppressor cell</i>)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
miRNA	Mikro-RNS
MMP	Matrix-Metalloproteasen
MOI	Multiplizität der Infektion

mRNA	Boten-RNS (<i>messenger RNA</i>)
MSD	<i>Membrane-spanning domain</i>
MTA1	Metastasen-assoziiertes Protein 1
MV	Mikrovesikel
MVB	Multivesikulärer Körper (<i>Multivesicular body</i>)
myc	Myelocytomatose-Onkogen
N	
n	Anzahl der Versuche
NKG2D	Natürliche Killer Gruppe 2, Mitglied D
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nt	Nukleotide
NTA	Nanopartikel Tracking-Analyse
O	
oPRE	<i>Optimized posttranscriptional regulatory element</i>
P	
P2A	Peptid 2A
pac	Puromycin N-Acetyltransferase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBST	<i>PBS with tween 20</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
pEFS	<i>Elongation factor 1-alpha short promoter</i>
PEG	Polyethylenglycol
PGE2	Prostaglandin E2
pix	Pixel
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PLL	Poly-L-Lysin

pRSV	Rous-Sarkom-Virus-Promotor
PVDF	Polyvinylidenfluorid

Q

qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit (<i>real time</i>)-Polymerase-Kettenreaktion

R

Rab	<i>Ras-related in brain</i>
RNS	Ribonukleinsäure
ROCK1/2	Rho-assoziierte Proteinkinasen 1 und 2 (<i>Rho-associated, coiled-coil containing kinases 1/2</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase

S

SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SFFV	Milzfokus-formender-Virus (<i>spleen focus forming virus</i>)
SFFVp	Milzfokus-formender-Polyzythämie-induzierender Virusstamm (<i>spleen focus forming virus polycythemia-inducing strain</i>)
sGFP	<i>Superfolder green fluorescent protein</i>
SS	<i>Side scatter</i>
SV40	Simian-Virus 40

T

TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TD#X	Mit Konstrukt X transduzierte Zellen
TF#X	Mit Konstrukt X transfizierte Zellen
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
T _H 1	Typ1-T-Helferzelle
TIMP-1	<i>Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1</i>
T _m	Schmelztemperatur (<i>Melting temperature</i>)

TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
T _{Reg}	Regulatorische T-Zellen
TSG	<i>Tumor susceptibility gene</i>
TU	Transduzierende Einheit
U	
U	Einheit (<i>Unit</i>)
UTR	<i>untranslated region</i>
V	
V	Volt
VCN	Plasmidkopienzahl (<i>vector copy number</i>)
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser
Vsp4	<i>Vacuolar protein sorting-associated protein 4</i>
W	
WB	Western Blot
Z	
ZIP	„Zipcode“-like-Sequenz
ZL	Zelllysate

H Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

19 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Graphische Darstellung der Biogenese von Exosomen.....	4
Abbildung 2:	Graphische Darstellungen zur Beladung von Exosomen.....	13
Abbildung 3:	Vergleich zwischen <i>BCA</i> und Nanophotometer zur Messung der Proteinkonzentration.....	51
Abbildung 4:	Schematische Darstellung der sequenziellen Abfolgen der Plasmide #168, #230, #231; #232; #233, #234 und #235.....	56
Abbildung 5:	Schematische Darstellung der sequenziellen Abfolgen der Plasmide #2944 und #3005.....	59
Abbildung 6:	Modifiziertes Protokoll zum Vergleich zweier Kits zur Aufreinigung von Exosomen aus dem Zellkulturüberstand.....	64
Abbildung 7:	Quantitativer Vergleich der mit Hilfe zweier Kits aufgereinigten Exosomen aus Zellkulturüberständen mittels Western Blot.....	66
Abbildung 8:	Quantitativer Vergleich zweier Kits zur Aufreinigung von Exosomen aus dem Zellkulturüberstand mittels Durchflusszytometrie.....	67
Abbildung 9:	Nachweis und Analyse der mittels <i>Total Exosome Isolation Reagent</i> aufgereinigten Partikel aus dem serumfreien Zellkulturüberstand nativer HT1080-Zellen mittels Nanopartikel Tracking-Analyse (<i>NTA</i>).....	68
Abbildung 10:	Nachweis von Komplexen mit exosomalen Markern im Durchflusszytometer.....	69
Abbildung 11:	Vergleich der Mengen an exosomalen Markern von nativen HT1080-Zellen mit aus diesen gewonnenen Exosomen.....	71
Abbildung 12:	Schematische Darstellung der sequenziellen Abfolge des in HT1080-Zellen transduzierten Plasmids #168.....	72
Abbildung 13:	Charakterisierung der mit Plasmid #168 transduzierten HT1080-Zellen (HT1080_TD#168) im Vergleich zu nativen HT1080-Zellen.....	73

Abbildung 14: Nachweis und Charakterisierung von HT1080_TD#168-Exosomen mittels Western Blot und <i>NTA</i>	76
Abbildung 15: Anteile <i>GFP</i> -positiver HT1080- und 293T-Zellen nach 6-stündiger Inkubation mit HT1080_TD#168-Exosomen.....	77
Abbildung 16: Schematische Darstellung der sequenziellen Abfolge des in HT1080-Zellen transduzierten Plasmids #233.....	78
Abbildung 17: Charakterisierung der mit Plasmid #233 transduzierten HT1080-Zellen (HT1080_TD#233-Zellen) im Vergleich zu nativen HT1080-Zellen.	79
Abbildung 18: Nachweis und Charakterisierung von HT1080_TD#233-Exosomen mittels Western Blot und <i>NTA</i>	82
Abbildung 19: Anteile <i>TIMP-1</i> -positiver HT1080- und 293T-Zellen nach 6-stündiger Inkubation mit HT1080_TD#233-Exosomen.	83
Abbildung 20: Vergleich der Konstrukte mit und ohne „ <i>Zipcode</i> “-like-Sequenz.	84
Abbildung 21: Charakterisierung der mit Plasmid #230 transduzierten HT1080-Zellen (HT1080_TD#230) im Vergleich zu HT1080_TD#168-Zellen.....	85
Abbildung 22: Nachweis und Charakterisierung von HT1080_TD#230-Exosomen mittels Western Blot und <i>NTA</i>	88
Abbildung 23: Darstellung der Schmelzkurven von <i>GFP</i> und <i>GAPDH</i> nach Durchführung einer <i>qRT-PCR</i>	90
Abbildung 24: Detektion der mittels <i>qPCR</i> amplifizierten <i>GFP</i> - und <i>GAPDH</i> -DNS von aus HT1080_TD#168-Zellen isolierten Exosomen mittels Gelelektrophorese....	91
Abbildung 25: Anteile <i>GFP</i> -positiver HT1080- und 293T-Zellen nach 6-stündiger Inkubation mit HT1080_TD#230-Exosomen im Vergleich zu HT1080_TD#168-Exosomen.	92
Abbildung 26: Vergleich der Konstrukte mit und ohne „ <i>Zipcode</i> “-like-Sequenz. Schematisch dargestellt sind die sequenziellen Abfolgen der in HT1080-Zellen transduzierten Plasmide #233 und #234.....	93
Abbildung 27: Charakterisierung der mit Plasmid #234 transduzierten HT1080-Zellen (HT1080_TD#234) im Vergleich zu HT1080_TD#233-Zellen.....	94

Abbildung 28: Nachweis und Charakterisierung von HT1080_TD#234-Exosomen mittels Western Blot und <i>NTA</i>	97
Abbildung 29: Anteile <i>TIMP-1</i> -positiver HT1080- und 293T-Zellen nach 6-stündiger Inkubation mit HT1080_TD#234-Exosomen im Vergleich zu HT1080_TD#233-Exosomen.	98
Abbildung 30: Vergleich der Konstrukte mit unterschiedlichen Membranankern zur Bindung von <i>TIMP-1</i>	99
Abbildung 31: Charakterisierung der mit Plasmid #235 transduzierten HT1080-Zellen (HT1080_TD#235-Zellen) im Vergleich zu HT1080_TD#233-Zellen.	100
Abbildung 32: Nachweis und Charakterisierung von HT1080_TD#235-Exosomen mittels Western Blot und <i>NTA</i>	103
Abbildung 33: Anteile <i>TIMP-1</i> -positiver HT1080- und 293T-Zellen nach 6-stündiger Inkubation mit HT1080_TD#235-Exosomen bzw. HT1080_TD#233-Exosomen..	104
Abbildung 34: Vergleich zweier Zellpopulationen bezüglich ihres Migrationsverhaltens...	106
Abbildung 35: Schematische Darstellung der sequenziellen Abfolgen der in L87/4-Zellen transfizierten Plasmide #2944 und #3005.	108
Abbildung 36: Charakterisierung von L87/4_TF#110-Zellen und L87/4_TD#168-Zellen. .	109
Abbildung 37: Nachweis und Charakterisierung von nativen L87/4-, L87/4_TF#110- und L87/4_TD#168-Exosomen mittels Western Blot und <i>NTA</i>	112

20 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Reagenzien für die Klonierungsreaktionen der Konstrukte #230, #231 und #232 mittels <i>In-Fusion HD Cloning Kit</i>	37
Tabelle 2: Reagenzien für die Klonierungsreaktionen der Konstrukte #233 und #234 mittels <i>In-Fusion HD Cloning Kit</i>	38
Tabelle 3: Reagenzien für die Synthese von <i>cDNA</i> aus RNS mittels <i>Omniscrypt RT Kit</i> ..	45
Tabelle 4: Komponenten für die Amplifizierung von <i>eGFP-cDNA</i> mittels <i>qRT-PCR</i>	46
Tabelle 5: Komponenten für die Amplifizierung von <i>GAPDH-cDNA</i> mittels <i>qRT-PCR</i>	46
Tabelle 6: Protokoll zur Amplifizierung der <i>cDNA</i> mittels <i>qRT-PCR</i>	47
Tabelle 7: Reagenzien zur Amplifizierung der DNS mittels <i>PCR</i>	48
Tabelle 8: Protokoll des Thermozyklers zur Vervielfältigung der DNS.	48
Tabelle 9: Komponenten zur Amplifizierung von <i>oPRE</i> mittels <i>qPCR</i> zur Bestimmung der <i>VCN</i>	49
Tabelle 10: Komponenten zur Amplifizierung von <i>FVII</i> mittels <i>qPCR</i> zur Bestimmung der <i>VCN</i>	50
Tabelle 11: Programmverlauf zur Vervielfältigung von <i>oPRE</i> und <i>FVII</i> mittels <i>qPCR</i> zur Bestimmung der integrierten Vektorkopien.....	50
Tabelle 12: Einstellungen des <i>NanoSight NS300</i> Nanopartikel Tracking-Analysators zur Aufnahme und Analyse von Exosomen.....	60
Tabelle 13: Proben-, Mess- und Analyse-Parameter des <i>ZetaView PMX 110</i> Nanopartikel Tracking-Analysators zur Aufnahme und Analyse von Exosomen.....	61
Tabelle 14: Nachweis von Komplexen mit exosomalen Markern im Durchflusszytometer...	70
Tabelle 15: Nachweis von membranhaltigen Komplexen mit exosomalen Markern im Durchflusszytometer.	70
Tabelle 16: Expressionslevel von exosomalen Oberflächenmarkern und <i>GFP</i> der mit Plasmid #168 transduzierten HT1080-Zellen (HT1080_TD#168) gegenüber nativen HT1080-Zellen.....	74
Tabelle 17: Nachweis von Komplexen mit exosomalen Markern im Durchflusszytometer...	74

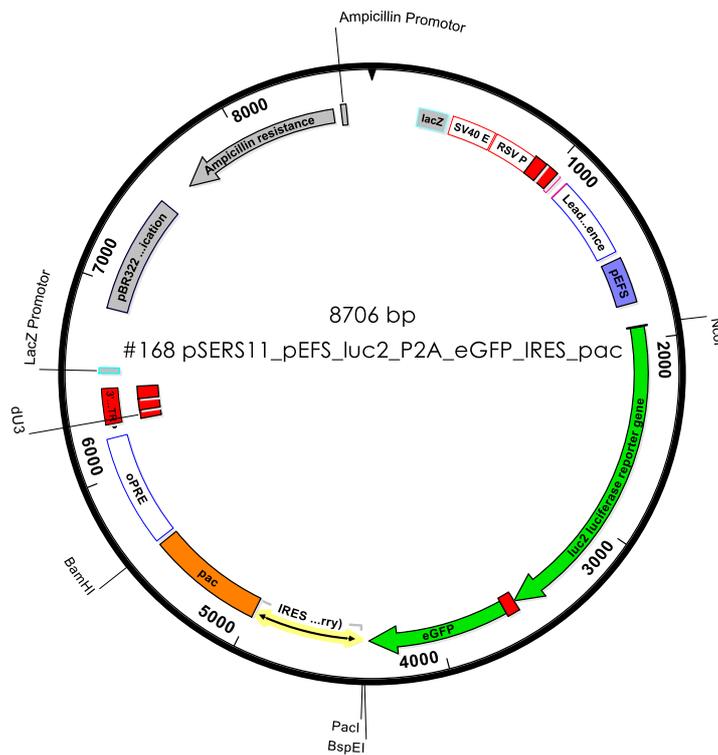
Tabelle 18: Nachweis von membranhaltigen Komplexen mit exosomalen Markern im Durchflusszytometer..	75
Tabelle 19: Expressionslevel von exosomalen Oberflächenmarkern und <i>TIMP-1</i> der mit Plasmid #233 transduzierten HT1080-Zellen (HT1080_TD#233)..	80
Tabelle 20: Nachweis von Komplexen mit exosomalen Markern im Durchflusszytometer...	80
Tabelle 21: Nachweis von membranhaltigen Komplexen mit exosomalen Markern im Durchflusszytometer..	81
Tabelle 22: Expressionslevel von exosomalen Oberflächenmarkern sowie <i>GFP</i> der HT1080_TD#233-Zellen gegenüber HT1080_TD#168-Zellen.....	86
Tabelle 23: Nachweis von Komplexen mit exosomalen Markern im Durchflusszytometer...	86
Tabelle 24: Nachweis von membranhaltigen Komplexen mit exosomalen Markern im Durchflusszytometer.	87
Tabelle 25: Darstellung der <i>C_p</i> -Werte von <i>GFP</i> und <i>GAPDH</i> aus den aufgelisteten Exosomen und Zellen nach Durchführung einer <i>qRT-PCR</i>	89
Tabelle 26: Anteile <i>GFP</i> -positiver HT1080- und 293T-Zellen nach Inkubation mit HT1080_TD#230-Exosomen gegenüber HT1080_TD#168-Exosomen.....	93
Tabelle 27: Expressionslevel von exosomalen Oberflächenmarkern sowie <i>TIMP-1</i> der mit Plasmid #234 transduzierten HT1080-Zellen (HT1080_TD#234) verglichen mit HT1080_TD#233-Zellen.....	95
Tabelle 28: Nachweis von Komplexen mit exosomalen Markern im Durchflusszytometer...	95
Tabelle 29: Nachweis von membranhaltigen Komplexen mit exosomalen Markern im Durchflusszytometer.	96
Tabelle 30: Anteile <i>TIMP-1</i> -positiver HT1080- und 293T-Zellen nach Inkubation mit HT1080_TD#234-Exosomen gegenüber HT1080_TD#233-Exosomen.....	99
Tabelle 31: Expressionslevel von exosomalen Oberflächenmarkern und <i>GFP</i> sowie <i>TIMP-1</i> der mit Plasmid #235 transduzierten HT1080-Zellen (HT1080_TD#235) im Vergleich zu HT1080_TD#233-Zellen.	101
Tabelle 32: Nachweis von Komplexen mit exosomalen Markern im Durchflusszytometer.	101

Tabelle 33: Nachweis von membranhaltigen Komplexen mit exosomalen Markern im Durchflusszytometer..	102
Tabelle 34: Anteile <i>TIMP-1</i> -positiver HT1080- und 293T-Zellen nach Inkubation mit HT1080_TD#235-Exosomen gegenüber HT1080_TD#233-Exosomen.....	105
Tabelle 35: Größe der zellfreien Flächen bei der Migration nativer HT1080-Zellen verglichen mit HT1080_TD#234-Zellen zu den verschiedenen Zeitpunkten nach Verwundung.	107
Tabelle 36: Expressionslevel von exosomalen Oberflächenmarkern sowie <i>GFP</i> von nativen L87/-Zellen, L87/4_TD#168-Zellen und L87/4_TF#110-Zellen.	110
Tabelle 37: Nachweis von membranhaltigen Komplexen mit exosomalen Markern im Durchflusszytometer.	111
Tabelle 38: Anteile <i>GFP</i> -positiver Jurkat-Zellen und deren <i>CXCR3</i> -Expressionen nach 6-stündiger Inkubation mit L87/4_TF#110-Exosomen bzw. L87/4_TD#168-Exosomen mit und ohne Blockierung des <i>IP-10</i> -Liganden.....	114

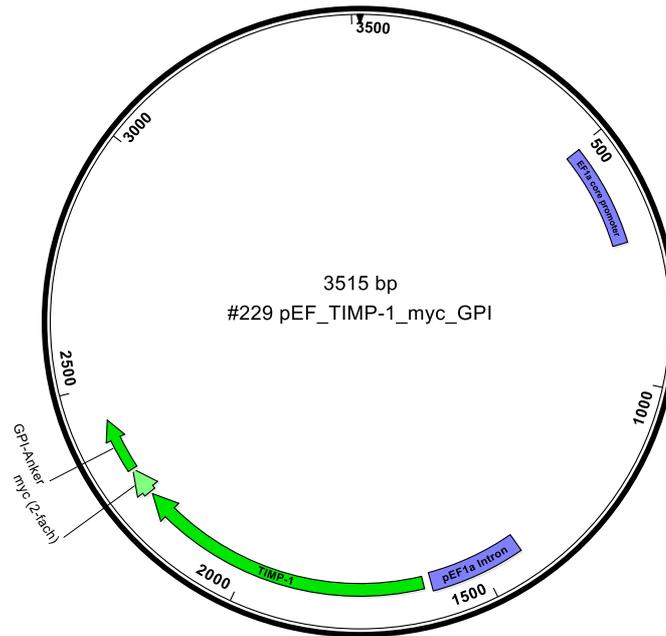
I Anhang

1 Plasmidkarten

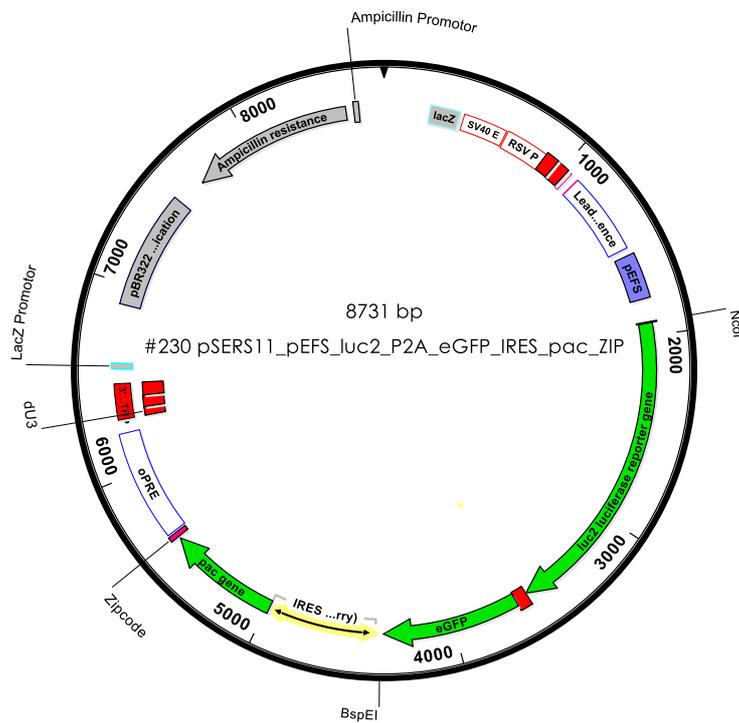
1.1 Plasmide in HT1080-Zellen



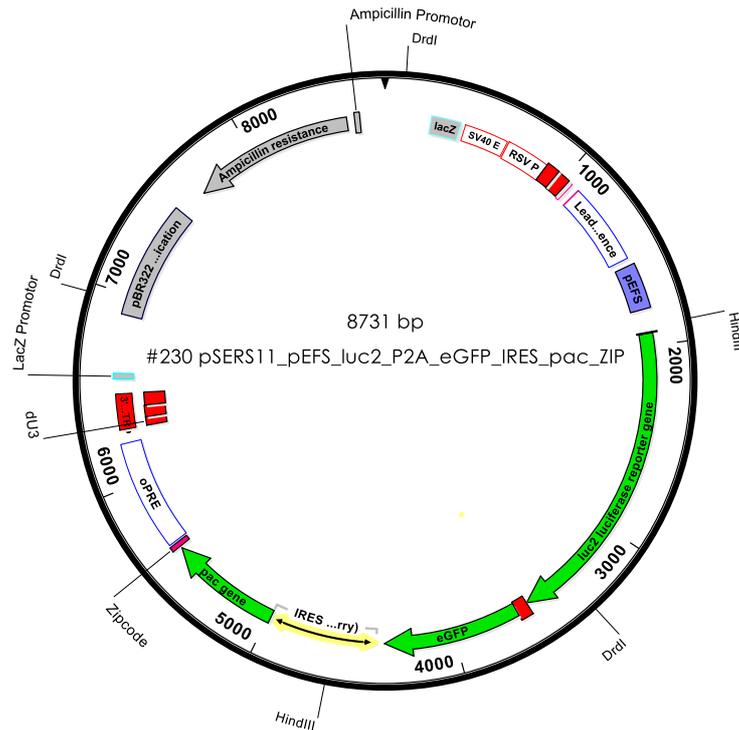
Ergänzende Abbildung 1: Plasmidkarte von Konstrukt #168 *pSERS11_pEFS_luc2_P2A_eGFP_IRES_pac* mit Restriktionsschnittstellen für Klonierungsarbeiten.



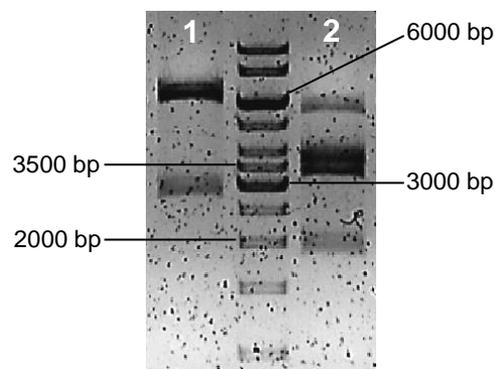
Ergänzende Abbildung 2: Plasmidkarte von Konstrukt #229 *pEF_TIMP-1_myc_GPI*.



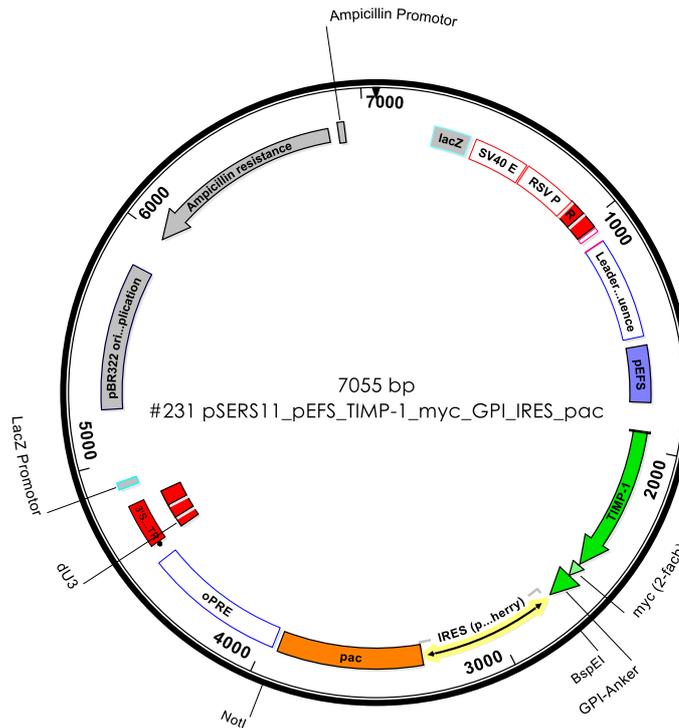
Ergänzende Abbildung 3.1: Plasmidkarte von Konstrukt #230 *pSERS11_pEFS_luc2_P2A_eGFP_IRES_pac_ZIP* mit Restriktionsschnittstellen für Klonierungsarbeiten.



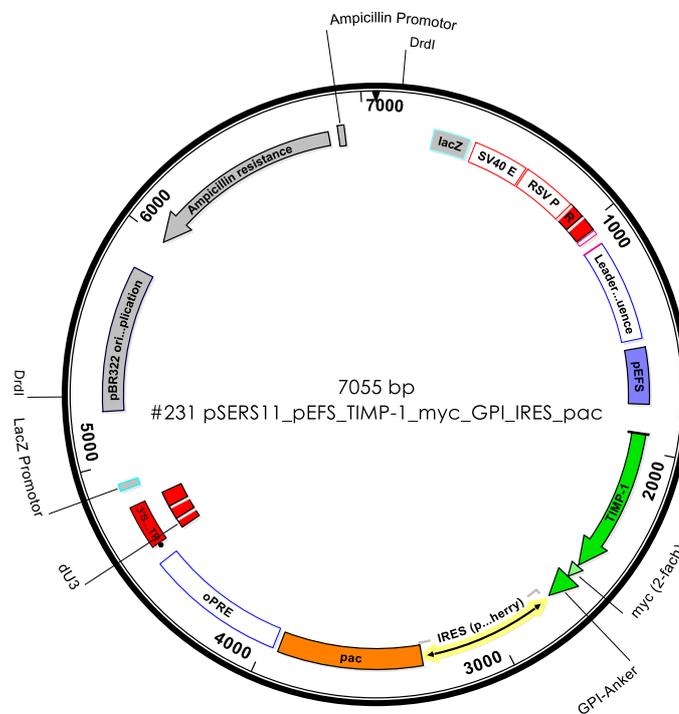
Ergänzende Abbildung 3.2: Plasmidkarte von Konstrukt #230 pSERS11_pEFS_luc2_P2A_eGFP_IRES_pac_ZIP mit Restriktionsschnittstellen für den enzymatischen Testverdau.



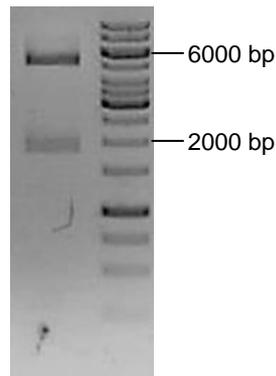
Ergänzende Abbildung 3.3: Elektrophoretische Analyse von Konstrukt #230 pSERS11_pEFS_luc2_P2A_eGFP_IRES_pac_ZIP. Die enzymatischen Testverdaue erfolgten mittels *Bam*HI und *Hind*III mit den zu erwartenden Banden bei 5993 bp/2738 bp (1) bzw. *Bam*HI und *Drd*I mit den zu erwartenden Banden bei 3623 bp/3239 bp/1869 bp (2).



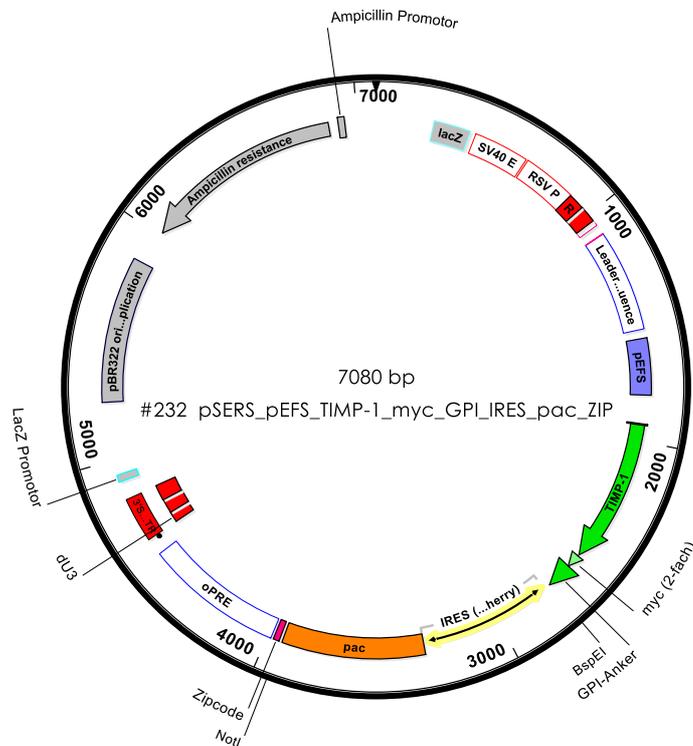
Ergänzende Abbildung 4.1: Plasmidkarte von Konstrukt #231 *pSERS11_pEFS_TIMP-1_myc_GPI_IRES_pac* mit Restriktionsschnittstellen für Klonierungsarbeiten.



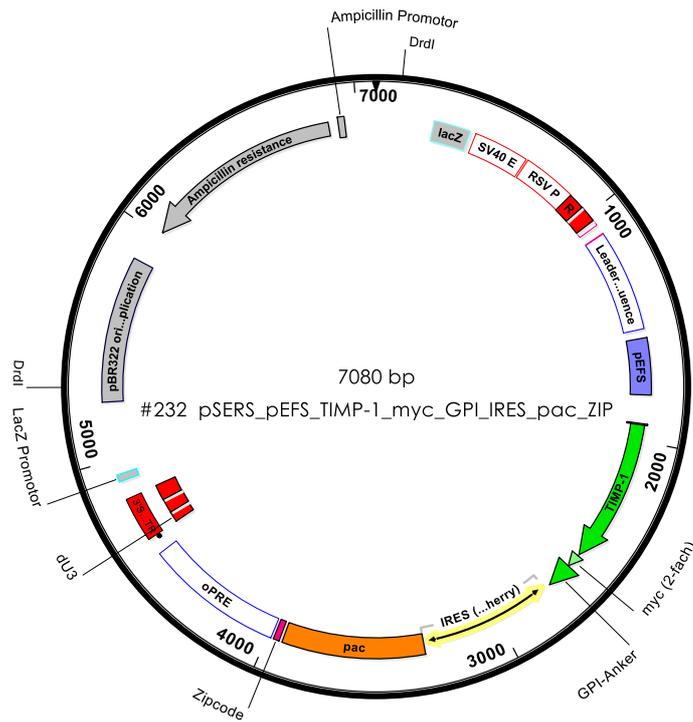
Ergänzende Abbildung 4.2: Plasmidkarte von Konstrukt #231 *pSERS11_pEFS_TIMP-1_myc_GPI_IRES_pac* mit Restriktionsschnittstellen für den enzymatischen Testverlauf.



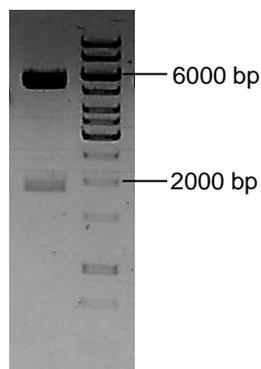
Ergänzende Abbildung 4.3: Elektrophoretische Analyse von Konstrukt #231 *pSERS11_pEFS_TIMP-1_myc_GPI_IRES_pac*. Der enzymatische Testverdau erfolgte mittels *DrdI* mit den zu erwartenden Banden bei 5186 bp/1869 bp.



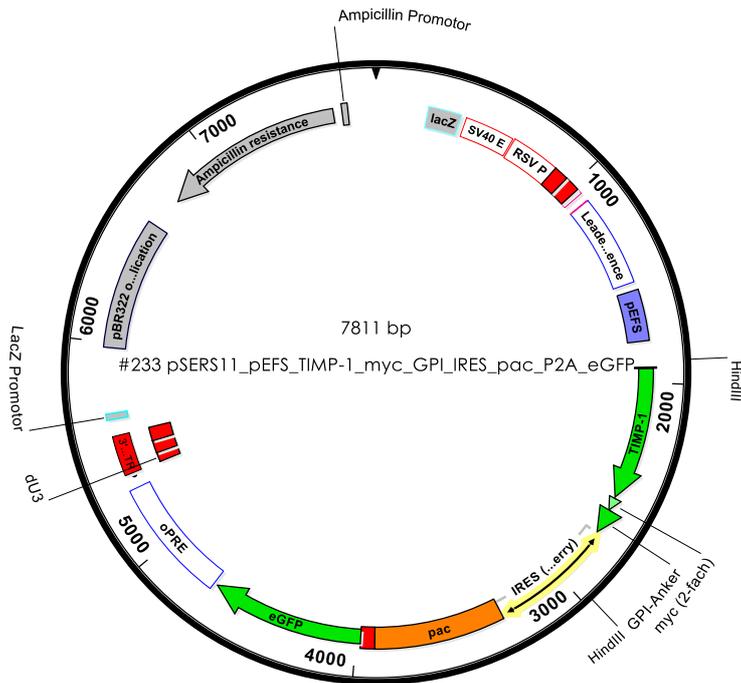
Ergänzende Abbildung 5.1: Plasmidkarte von Konstrukt #232 *pSERS11_pEFS_TIMP-1_myc_GPI_IRES_pac_ZIP* mit Restriktionsschnittstellen für Klonierungsarbeiten.



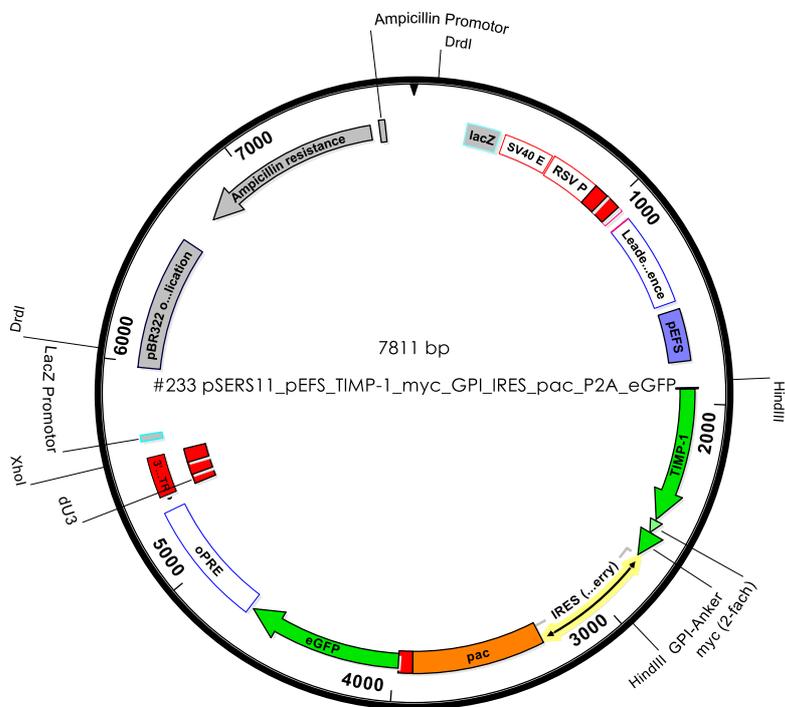
Ergänzende Abbildung 5.2: Plasmidkarte von Konstrukt #232 *pSERS11_pEFS_TIMP-1_myc_GPI_IRES_pac_ZIP* mit Restriktionsschnittstellen für den enzymatischen Testverdau.



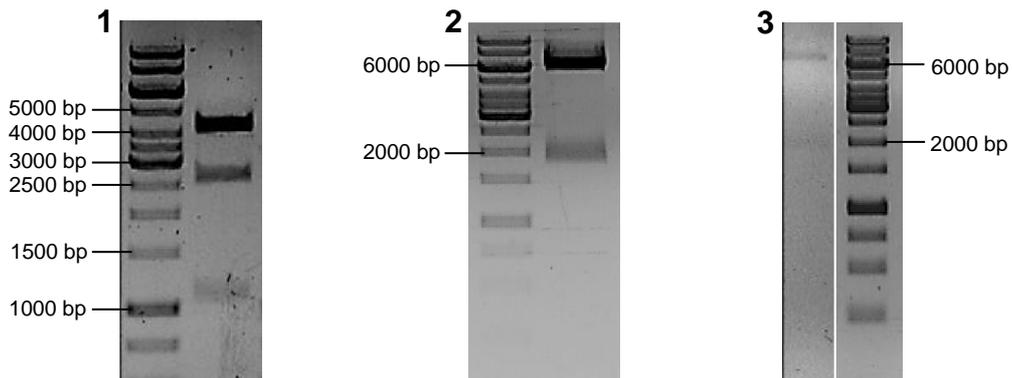
Ergänzende Abbildung 5.3: Elektrophoretische Analyse von Konstrukt #232 *pSERS11_pEFS_TIMP-1_myc_GPI_IRES_pac_ZIP*. Der enzymatische Testverdau erfolgte mittels *DrdI* mit den zu erwartenden Banden bei 5211 bp/1869 bp.



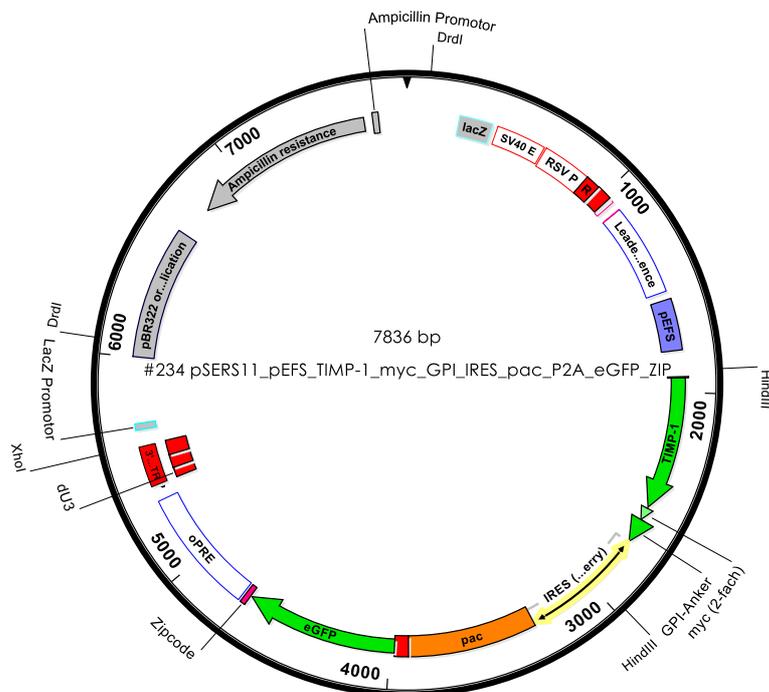
Ergänzende Abbildung 6.1: Plasmidkarte von Konstrukt #233 *pSERS11_pEFS_TIMP-1_myc_GPI_IRES_pac_P2A_eGFP* mit Restriktionsschnittstellen für Klonierungsarbeiten.



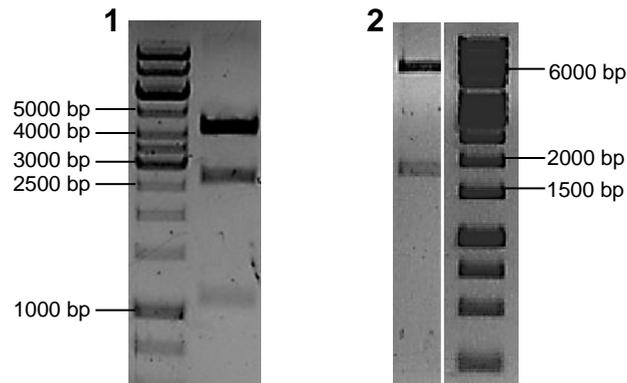
Ergänzende Abbildung 6.2: Plasmidkarte von Konstrukt #233 *pSERS11_pEFS_TIMP-1_myc_GPI_IRES_pac_P2A_eGFP* mit Restriktionsschnittstellen für den enzymatischen Testverdau.



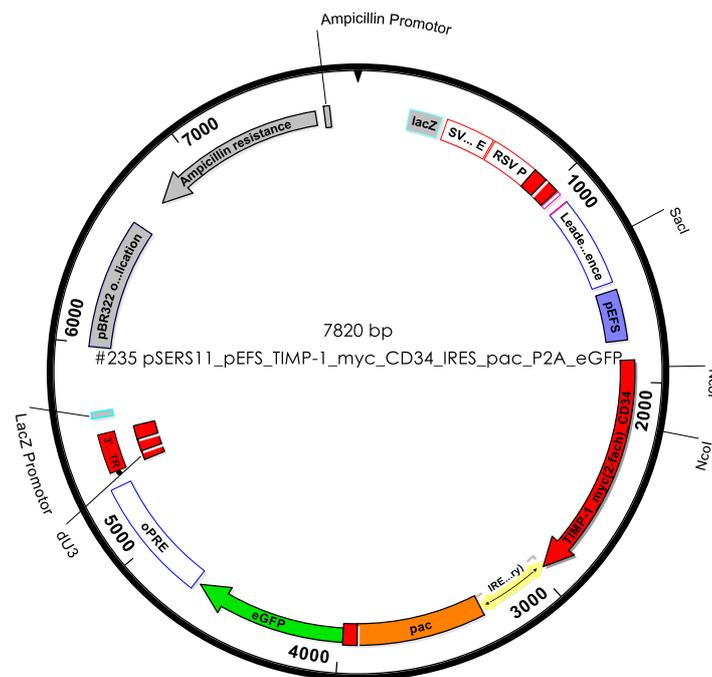
Ergänzende Abbildung 6.3: Elektrophoretische Analyse von Konstrukt #233 *pSERS11_pEFS_TIMP-1_myc_GPI_IRES_pac_ZIP*. Die enzymatischen Testverdaue erfolgten mittels *HindIII-HF* + *XhoI* mit den zu erwartenden Banden bei 4145 bp/2600 bp/1066 bp (1) bzw. mittels *DrdI* sowie *DrdI* + *PacI* mit den zu erwartenden Banden bei 5942 bp/1869 bp (2/3).



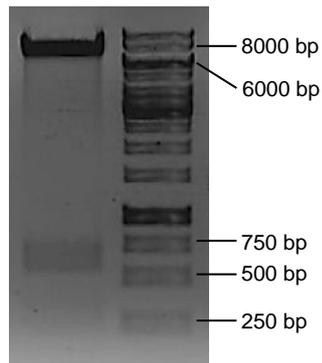
Ergänzende Abbildung 7.1: Plasmidkarte von Konstrukt #234 *pSERS11_pEFS_TIMP-1_myc_GPI_IRES_pac_P2A_eGFP_ZIP* mit Restriktionsschnittstellen für den enzymatischen Testverdaue.



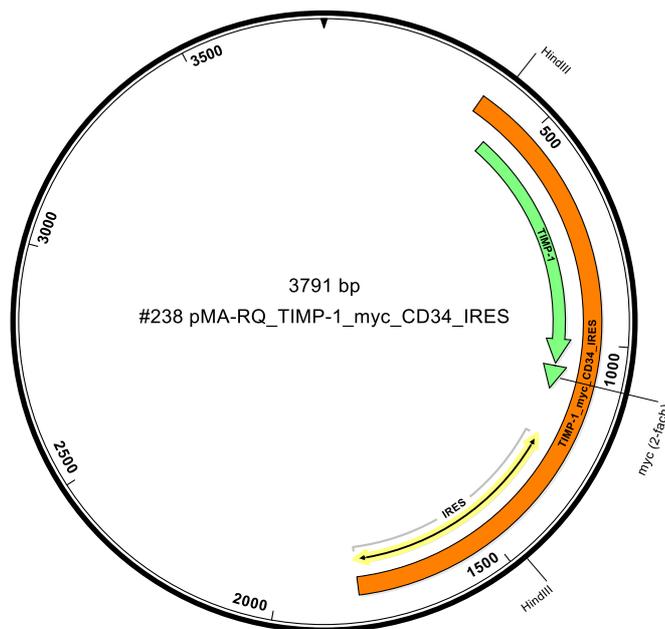
Ergänzende Abbildung 7.2: Elektrophoretische Analyse von Konstrukt #234 *pSERS11_pEFS_TIMP-1_myc_GPI_IRES_pac_P2A_eGFP_ZIP*. Die enzymatischen Testverdaue erfolgten mittels *HindIII-HF* + *XhoI* mit den zu erwartenden Banden bei 4145 bp/2625 bp/1066 bp bzw. mittels *DrdI* + *PacI* mit den zu erwartenden Banden bei 5967 bp/1869 bp.



Ergänzende Abbildung 8.1: Plasmidkarte von Konstrukt #235 *pSERS11_pEFS_TIMP-1_myc_MSD_IRES_pac_P2A_eGFP* mit Restriktionsschnittstellen für den enzymatischen Testverdaue.

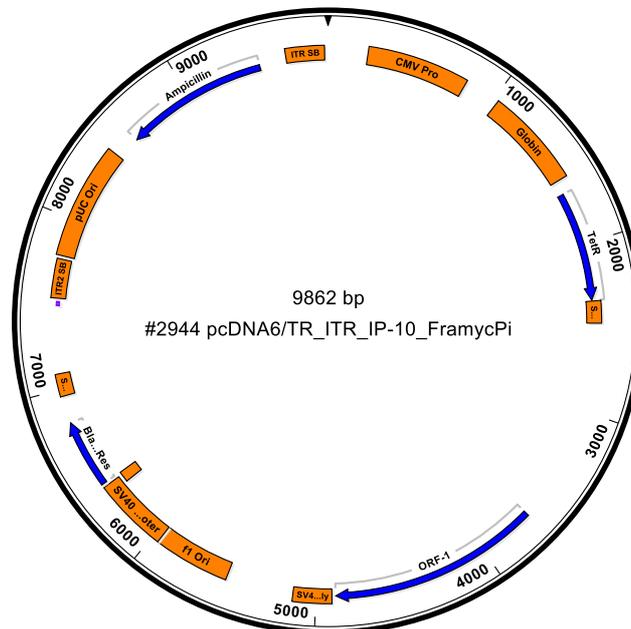


Ergänzende Abbildung 8.2: Elektrophoretische Analyse von Konstrukt #235 *pSERS11_pEFS_TIMP-1_myc_MSD_IRES_pac_P2A_eGFP*. Der enzymatische Testverdau erfolgte mittels *NcoI* + *SacI-HF* mit den zu erwartenden Banden bei 6966 bp/590 bp/264 bp.

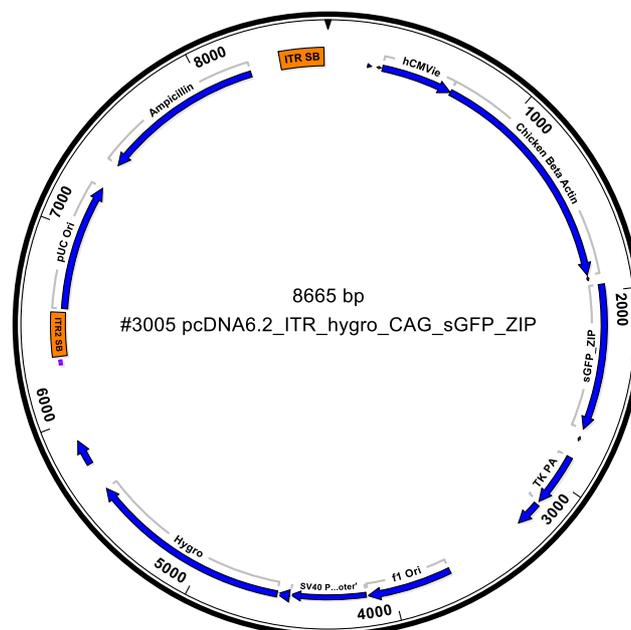


Ergänzende Abbildung 9: Plasmidkarte von Konstrukt #238 *pMA-RQ_TIMP-1_myc_MSD_IRES* mit Restriktionsschnittstellen für Klonierungsarbeiten.

1.2 Plasmide in L87/4-Zellen



Ergänzende Abbildung 10: Plasmidkarte von Konstrukt #2944 *pcDNA6/TR_ITR_IP-10_FramycPi*.



Ergänzende Abbildung 11: Plasmidkarte von Konstrukt #3005 *pcDNA6.2_ITR_hygro_CAG_sGFP_ZIP*.

Danksagungen

Ich bedanke mich bei all denen, die mir bei der Fertigstellung dieser Arbeit zur Seite standen.

Mein besonderer Dank gilt vor allem Herrn Prof. Dr. Peter J. Nelson, der mich bei der Durchführung meiner Dissertation betreute und mich durch seine intensive wissenschaftliche Beratung tatkräftig unterstützte.

Ich bedanke mich ebenfalls ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Ralf Huss für das Ermöglichen meiner Dissertation und seine fantastischen Ideen, welche die Wissenschaft noch spannender machen als sie schon ist.

Bei Frau Dr. Christine Günther bedanke ich mich sehr für ihre Motivation und ihr Vertrauen.

Ein großes Dankeschön geht an Dr. Felix Hermann für seine Diskussionsbereitschaft und Anregungen während meiner Arbeit.

Herzlich danken möchte ich meine Arbeitskolleginnen und -kollegen aus der präklinischen Entwicklung Dr. Christoph Prinz, Daria Forster, Dr. Sabine Geiger-Schredelseker, Marina Hereth, Dr. Daniela Hirsch, Dr. Patrick Ketzer und Sven Willenborg für die großartige Unterstützung bei meiner Tätigkeit und die entstandenen Freundschaften.

Dr. Ulf Geumann, dir möchte ich einen vornehmlichen Dank für die vielen informativen Gespräche aussprechen. Dein Wissen scheint nahezu grenzenlos.

Zudem danke ich allen Mitarbeitern der apceth Biopharma GmbH sowohl für die kollegiale Atmosphäre und Hilfsbereitschaft als auch den Spaß außerhalb des Labors.

Zu Dank verpflichtet bin ich auch den technischen Assistentinnen der Arbeitsgruppe Klinischen Biochemie der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV (LMU) Anke Fischer und Monika Hofstetter für ihre Unterstützung und Versorgung bei Engpässen.

Ein herzliches Dankeschön gebührt meiner Familie und meinen Freunden für ihre moralische Unterstützung.

Eidesstattliche Versicherung

Bauer, Stephan Thomas Otto

Name, Vornamen

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„Modifizierung und Charakterisierung von Exosomen als therapeutisches Transportsystem“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 19.11.2019

Stephan Bauer