

Untersuchungen zur Charakterisierung und zu
biologischen Wirkungen von Exosome-like Nanopartikeln
pflanzlichen Ursprungs

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

eingereicht am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Eric Woith
aus Weisen

Berlin 2020

Erstgutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. Matthias F. Melzig

Zweitgutachter: Prof. Dr. Burkhard Kleuser

Tag der Disputation: 30. November 2020

„Man muss die Tatsachen kennen, bevor man sie verdrehen kann.“

MARK TWAIN

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	X
1 Einleitung	1
1.1 Terminologie, Biogenese und Zusammensetzung extrazellulärer und anderer Vesikel	2
1.1.1 Eukaryotische extrazelluläre Vesikel	2
1.1.1.1 Tierische extrazelluläre Vesikel	2
1.1.1.2 Pflanzliche Vesikelspezies	5
1.1.1.3 Mykotische extrazelluläre Vesikel	8
1.1.2 Prokaryotische extrazelluläre Vesikel	9
1.1.2.1 Bakterielle extrazelluläre Vesikel	9
1.1.2.2 Archaeale extrazelluläre Vesikel	9
1.2 Physiologische und pharmazeutische Bedeutung extrazellulärer und anderer Vesikel	10
1.2.1 Eukaryotische extrazelluläre Vesikel	10
1.2.1.1 Tierische extrazelluläre Vesikel	10
1.2.1.2 Pflanzliche Nanovesikel	12
1.2.1.3 Mykotische extrazelluläre Vesikel	15
1.2.2 Prokaryotische extrazelluläre Vesikel	15
1.3 kleine nichtkodierende RNA	16
1.4 EVs als Schnittpunkt zwischen Individuen, Spezies, Reichen und Domänen . . .	17
1.5 Zielstellung	19
2 Material	21
3 Methoden	27
3.1 Ausgangsmaterial	27
3.1.1 Apoplastisches Fluid	27
3.1.2 Homogenisate	28
3.1.3 Calluskultur	28
3.1.4 Aseptische Anzucht von Pflanzenmaterial	29
3.2 Puffer der Vesikelisolation	29
3.3 Isolation pflanzlicher Nanovesikel	31
3.3.1 Differentielle Zentrifugation	31
3.3.2 Ultrafiltration	33
3.3.3 Größenausschlusschromatographie	34
3.3.4 Polymerbasierte Präzipitation von Vesikeln	34
3.3.5 Tangentialflussfiltration	34
3.4 Analytik isolierter Nanovesikel	35
3.4.1 Elektronenmikroskopie	35
3.4.2 Partikelgrößenbestimmung	37
3.4.3 Vesikelquantifizierung	38
3.4.3.1 3,3'-Dihexyloxycarbocyaniniodid-basierte Quantifizierung . .	39

3.4.4	Proteinanalytik	40
3.4.4.1	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	40
3.4.4.2	Isoelektrische Fokussierung	41
3.4.4.3	In-Gel-Verdau und Massenspektrometrie	42
3.4.5	Agarose-Gelelektrophorese	42
3.4.6	Chromatographische Untersuchungen	42
3.4.6.1	Sekundärmetaboliten	42
3.4.6.2	Massenspektrometrische Identifikation von Sekundärmetaboliten	45
3.4.6.3	Phospholipide	45
3.4.7	Inhibition der Pankreaslipase durch pflanzliche Nanovesikel	46
4	Ergebnisse und Diskussion	49
4.1	Ausgangsmaterial	49
4.1.1	Apoplastisches Fluid	49
4.1.2	Homogenisate	51
4.1.3	Calluskultur	51
4.2	Isolation pflanzlicher Nanovesikel	52
4.2.1	Differentielle Zentrifugation	53
4.2.2	Ultrafiltration	54
4.2.3	Größenausschlusschromatographie	54
4.2.4	Polymerbasierte Präzipitation von Vesikeln	55
4.2.5	Tangentialflussfiltration	56
4.3	Analytik isolierter Nanovesikel	57
4.3.1	Elektronenmikroskopie	57
4.3.2	Partikelgrößenbestimmung	59
4.3.3	Vesikelquantifizierung	64
4.3.3.1	Evaluation der relevanten Methoden	64
4.3.3.2	Proteinkonzentrationen	66
4.3.3.3	3,3'-Dihexyloxacarboxyaniniodid-basierte Quantifizierung von Nanovesikeln	68
4.3.4	Proteinanalytik	69
4.3.4.1	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	69
4.3.4.2	Zweidimensionale Gelelektrophorese	72
4.3.4.3	In-Gel-Verdau und Massenspektrometrie	74
4.3.5	Agarose-Gelelektrophorese	77
4.3.6	Chromatographische Untersuchungen	80
4.3.6.1	Sekundärmetaboliten	80
4.3.6.2	Phospholipide	91
4.3.7	Inhibition der Pankreaslipase durch pflanzliche Nanovesikel	94
4.4	<i>In vitro</i> Untersuchungen	95
4.5	Anmerkungen und Fazit	96
5	Zusammenfassung & Abstract	97

Literatur	101
Tabellenverzeichnis	114
Abbildungsverzeichnis	114
A Anhang	117
A.1 Methoden	117
A.1.1 Färbelösung mit kolloidalem Coomassie (SDS-PAGE)	117
A.1.2 Protokoll Silberfärbung (SDS-PAGE)	117
A.1.3 Puffer der Isoelektrischen Fokussierung	118
A.1.3.1 Rehydratisierungspuffer	118
A.1.3.2 Äquilibrierungspuffer	118
A.1.4 Protokoll In-Gel-Verdau	118
A.2 Ergebnisse und Diskussion	120
A.2.1 Tangentialflussfiltration pflanzlicher Nanovesikel	120
A.2.2 Chromatographische Untersuchungen	120
A.2.2.1 Aconitin(derivate) in <i>Aconiti tuber</i> und deren Nanovesikeln	120
A.2.2.2 HPTLC-Parameter (saure Sekundärmetaboliten)	125
Publikationsverzeichnis	127
Lebenslauf	129
Danksagung	131
Eidesstattliche Erklärung	133

Abkürzungsverzeichnis

2D-GE	zweidimensionale Gelelektrophorese
APF	apoplastisches Fluid
BCA	Bicinchoninsäure
CHAPS	3-[3-Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]-1-propansulfonat
CHMP	<i>charged multivesicular body protein</i>
CMB	Cellulase-Macerozym-Puffer
DDM	Dodecyl- β -D-maltosid
DiOC₆	3,3'-Dihexyloxycarbocyaniniodid
DLS	dynamische Lichtstreuung
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESCRT	<i>endosomal-sorting complex required for transport</i>
EVs	extrazelluläre Vesikel
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HPTLC	Hochleistungsdünnschichtchromatographie
IEF	isoelektrische Fokussierung
ISEV	Internationale Gesellschaft für Extrazelluläre Vesikel
LC-MS	Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie
LDS	Lithiumdodecylsulfat
m/z	Masse-Ladungs-Verhältnis
MALDI-TOF-MS	Matrix-unterstützte Laserdesorption/-ionisation Flugzeitanalyse-Massenspektrometrie
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
miRNA	microRNA
MISEV	minimale Informationen für Untersuchungen von EVs
mRNA	messenger RNA
MSC	Mesenchymale Stammzellen
MVB	multivesikulärer Körper
NTA	Nanopartikel Tracking Analyse
OMV	Vesikel der äußeren Membran (gram-negativer Bakterien)
PA	Phosphatidsäure
PAMPS	pathogen-associated molecular patterns
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PI	Phosphatidylinositol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PS	Phosphatidylserin
RCF	relative Zentrifugalkraft
REM	Rasterelektronenmikroskop

- Rf** Retentionsfaktor (Dünnschichtchromatographie)
- RISC** RNA-induzierter Stummschaltungskomplex
- RPM** Umdrehungen pro Minute
- RuBisCO** Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase
- S I & S II** Überstände der Hochgeschwindigkeitszentrifugation (50 000 x g) vor (I) & nach (II)
Waschschritt
- s.l.** *sensu lato*, im weiteren Sinne
- s.str.** *sensu stricto*, im engeren Sinne
- SDS-PAGE** Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese
- SEC** Größenausschlusschromatographie
- siRNA** kleine interferierende RNA
- SNARE** *soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*
- sRNA** kleine nichtkodierende RNA
- TBS** Tris-gepufferte Salzlösung
- TEM** Transmissionselektronenmikroskop
- TEMED** N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin
- Tris** Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
- VIB** Vesikel- Isolationspuffer

Das Dezimaltrennzeichen ist der Punkt.

1 Einleitung

Der Begriff „Exosome-like Nanopartikel“ leitet sich von einer Klasse extrazellulärer Vesikel (EVs) ab – den Exosomen. Exosomen wurden erstmals Ende der 1950er Jahre in Algen [1] und Säugerzellen [2] dokumentiert. Zu diesem Zeitpunkt wurde allerdings noch keine Funktion erkannt. Auch in Bakterien, höheren Pflanzen und Pilzen wurden in den darauffolgenden zwei Dekaden vergleichbare Strukturen identifiziert [3–6]. In den 1980er Jahren wurde erstmals eine Funktion postuliert: die Entsorgung von Abbauprodukten durch Exozytose [7–9]. Eine größere Relevanz wurde Exosomen jedoch lange nicht beigemessen. Als Wendepunkt dieser Betrachtungsweise wird im Allgemeinen die Publikation von Raposo *et al.* 1996 angesehen [10]. Seitdem hat sich die Anzahl der wissenschaftlichen Publikationen zu EVs vervielfacht (s. Abb. 1.1) und ihre Bedeutung wird inzwischen deutlich umfassender eingeschätzt. Es ist nunmehr bekannt, dass EVs in allen Domänen und von praktisch jeder Zelle ausgeschüttet werden [11]. Eine Übersicht über die Meilensteine der EV-Forschung ist in Abb. 1.2 zusammengestellt.

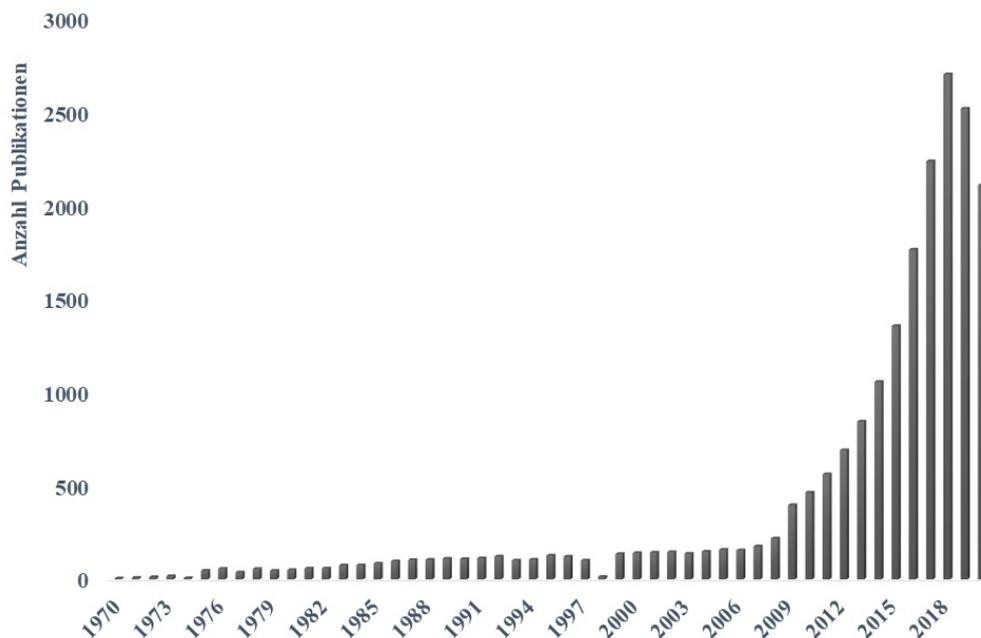


Abbildung 1.1: Anzahl der PubMed Publikationen unter dem Suchbegriff „*extracellular vesicle*“. Stand: 03. August 2020 [12]

Zahlreiche physiologische wie auch pathologische Prozesse finden unter der Beteiligung von EVs statt. Zudem stellen sie ein vielversprechendes Vehikel der pharmazeutischen Technologie für den gerichteten Arzneistofftransport dar [13]. Der Wissensstand in den verschiedenen Domänen ist jedoch ungleichmäßig verteilt, denn während detaillierte Informationen über tierische EVs, insbesondere von Säugern, zur Verfügung stehen, ist über diejenigen aus anderen Reichen vergleichsweise wenig bekannt. Aufgrund ihres ebenfalls großen Potentials in den pharmazeutischen Wissenschaften waren Exosome-like Nanopartikel pflanzlichen Ursprungs Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

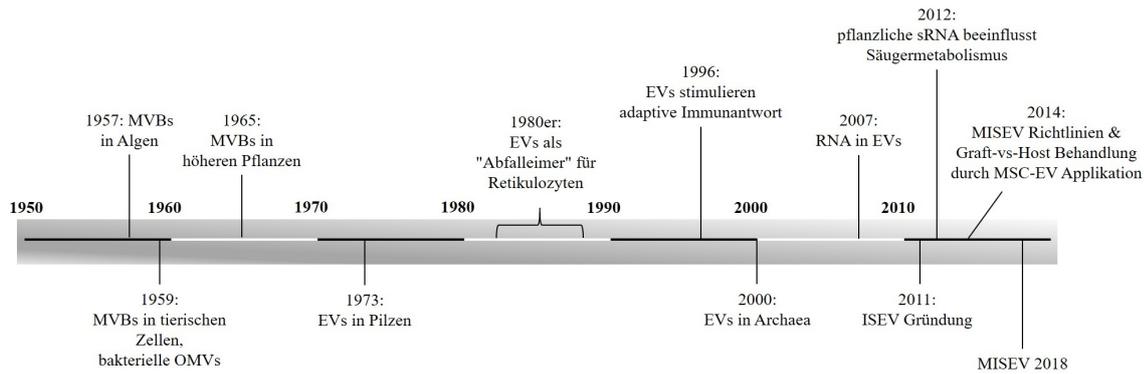


Abbildung 1.2: Zeitstrahl der Forschung an extrazellulären Vesikeln (EVs) aus allen Domänen. In den späten 1950ern entdeckt, wurden sie inzwischen in allen Domänen gefunden. Obwohl zunächst lediglich als „Abfaller“ abgetan, konnte man inzwischen zahlreiche Funktionen identifizieren, sowie klinische Anwendungsbereiche formulieren. *ISEV Internationale Gesellschaft für Extrazelluläre Vesikel; MISEV minimale Informationen für Untersuchungen von EVs; MSC Mesenchymale Stammzellen; MVB Multivesikulärer Körper; OMV Vesikel der äußeren Membran (gram-negativer Bakterien); sRNA kleine nichtkodierende RNA.*

1.1 Terminologie, Biogenese und Zusammensetzung extrazellulärer und anderer Vesikel

Die Nomenklatur von EVs hat sich seit ihrer Entdeckung gewandelt. So wurde die Verwendung des Begriffs „Exosom“ im Jahr 1987 erstmals vorgeschlagen [9, 14]. Seitdem wurden zahlreiche Begriffe für verschiedenste Vesikelspezies verwendet. Allgemein definiert die Internationale Gesellschaft für Extrazelluläre Vesikel (ISEV) EVs als Partikel, die von Zellen natürlicherweise sezerniert werden, von einer Lipiddoppelschicht abgegrenzt sind und sich nicht replizieren können [15]. In diesem Abschnitt sollen die wichtigsten Termini definiert, sowie die Biogenese und Zusammensetzung verschiedener Vesikelspezies vorgestellt werden. Den Ausgangspunkt dafür stellen tierische EVs dar, da diese am besten untersucht sind, ein allgemeiner Konsens zu ihrer Nomenklatur besteht und die Untersuchungen in anderen Reichen zum Teil auf diesen aufbauen.

1.1.1 Eukaryotische extrazelluläre Vesikel

1.1.1.1 Tierische extrazelluläre Vesikel

Innerhalb der Gruppe der tierischen EVs können drei Vesikelspezies unterschieden werden: Exosomen, Mikrovesikel und apoptotische Körper (Abb. 1.3). Letztere sind das Resultat aus dem programmierten Zelltod. Hierbei wird die Zelle fragmentiert, indem 1–5 µm große Vesikel abschnürt werden. Diese apoptotischen Körper bestehen vorwiegend aus Cytosol mit eng gepackten Zellorganellen, zum Teil können auch Kernfragmente enthalten sein. Im Verlauf der Apoptose werden die Vesikel phagozytiert und in Phagolysosomen abgebaut [16]. Sie werden gemeinhin als Abfallprodukte angesehen, wodurch verhältnismäßig wenig über sie bekannt ist [17].

Mikrovesikel, gelegentlich auch als Mikropartikel oder Ectosomen bezeichnet, entstehen durch Knospung an der Plasmamembran und werden durch Abschnüren von dieser in den extrazellulären Raum sezerniert. Ihr hervorstechendstes Merkmal ist ihre Heterogenität. Sie können Größen zwischen 100 und 1000 nm aufweisen und werden aufgrund verschiedener Stimuli freigesetzt.

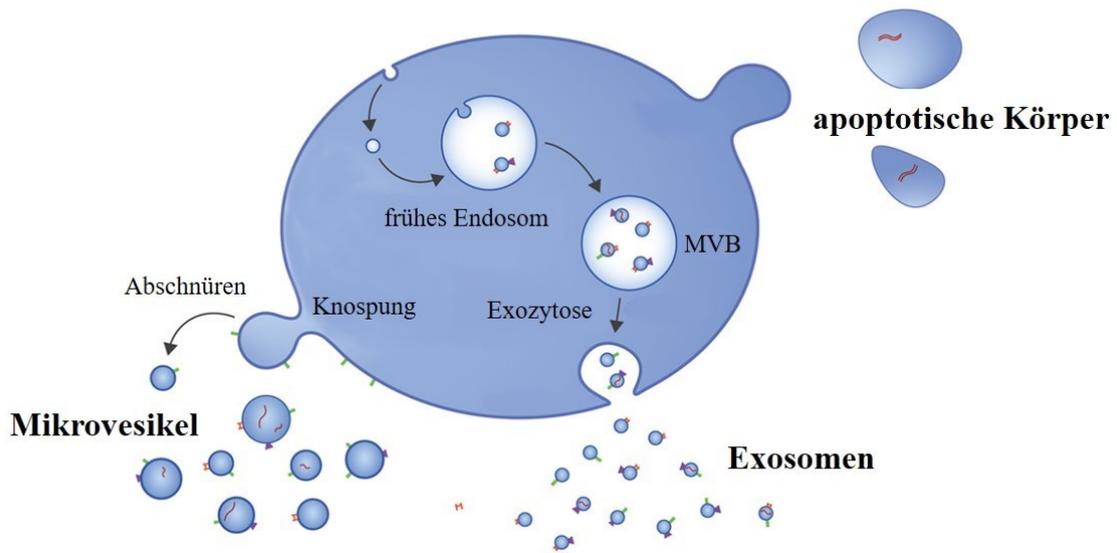


Abbildung 1.3: Schema der Biogenese und Sekretion extrazellulärer Vesikel tierischer Zellen. Während Exosomen über einen endosomalen Prozess aus multivesikulären Körpern (MVB) freigesetzt werden, sind Mikrovesikel das Produkt von Knospung und Abschnürung von der Plasmamembran. Im Verlauf des programmierten Zelltodes werden Zellen zu apoptotischen Körpern fragmentiert. *Abb. modifiziert nach Gustafson et al. 2017 [17].*

Wird die Mikrovesikelbildung durch verschiedene Impulse ausgelöst, kann sich deren Zusammensetzung unterscheiden. Auch bei gleicher Behandlung verschiedener Zelltypen können Mikrovesikel unterschiedlicher Zusammensetzung resultieren [18]. Die jeweilige Fracht, die durch EVs transportiert wird, kann ein solcher Stimulus und damit von zentraler Bedeutung für die EV-Entstehung sein [19]. Proteine, Lipide und Nucleinsäuren, die üblicherweise im Lumen bzw. in der Membran von Mikrovesikeln nachgewiesen werden können, sind in Abb. 1.4 zusammengestellt. Die Bildung von Exosomen folgt einem komplexen und mehrschrittigen Verlauf, der in Abb. 1.5 schematisch zusammengefasst wurde. Den Ausgangspunkt bildet die Entstehung primärer endozytotischer Vesikel, die durch ankommende Stimuli (Proteine, Lipide, Nucleinsäuren oder niedermolekulare Strukturen) an der Zelloberfläche induziert wird [20]. Diese Vesikel fusionieren nun zu frühen Endosomen, die wiederum entweder erneut mit der Plasmamembran verschmelzen („Recycling-Endosomen“), oder zu multivesikulären Körpern (MVB) konditioniert werden können. Durch Einwärtsknospung und Abschnürung der endosomalen Membran entstehen intraluminal Vesikel, die in diesem Schritt mit ihrer Fracht beladen werden [21]. Dieser Mechanismus unterliegt starker Regulierung, insbesondere durch die endosomalen Sortierungskomplexe für Transport (ESCRT, *endosomal-sorting complex required for transport*). Durch ESCRT-0 werden ubiquitinierte Proteine an der endosomalen Membran erkannt und gemeinsam mit ESCRT-I akkumuliert das Protein weitere ubiquitinierte transmembranäre Strukturen zu Mikrodomänen auf dieser Membran. Unterstützt wird dieser Vorgang durch ESCRT-II, welcher zusätzlich ESCRT-III rekrutiert. ESCRT-II und -III initiieren nun die Knospung und Abschnürung der intraluminalen Vesikel [19, 21]. Die so entstandenen MVBs werden zum Lysosom transportiert, um dort abgebaut zu werden, außer die Ubiquitinreste werden durch de-ubiquitinierende Enzyme abgespalten [22]. Werden die MVBs nicht lysosomal abgebaut, können sie in die Peripherie der Zelle trans-

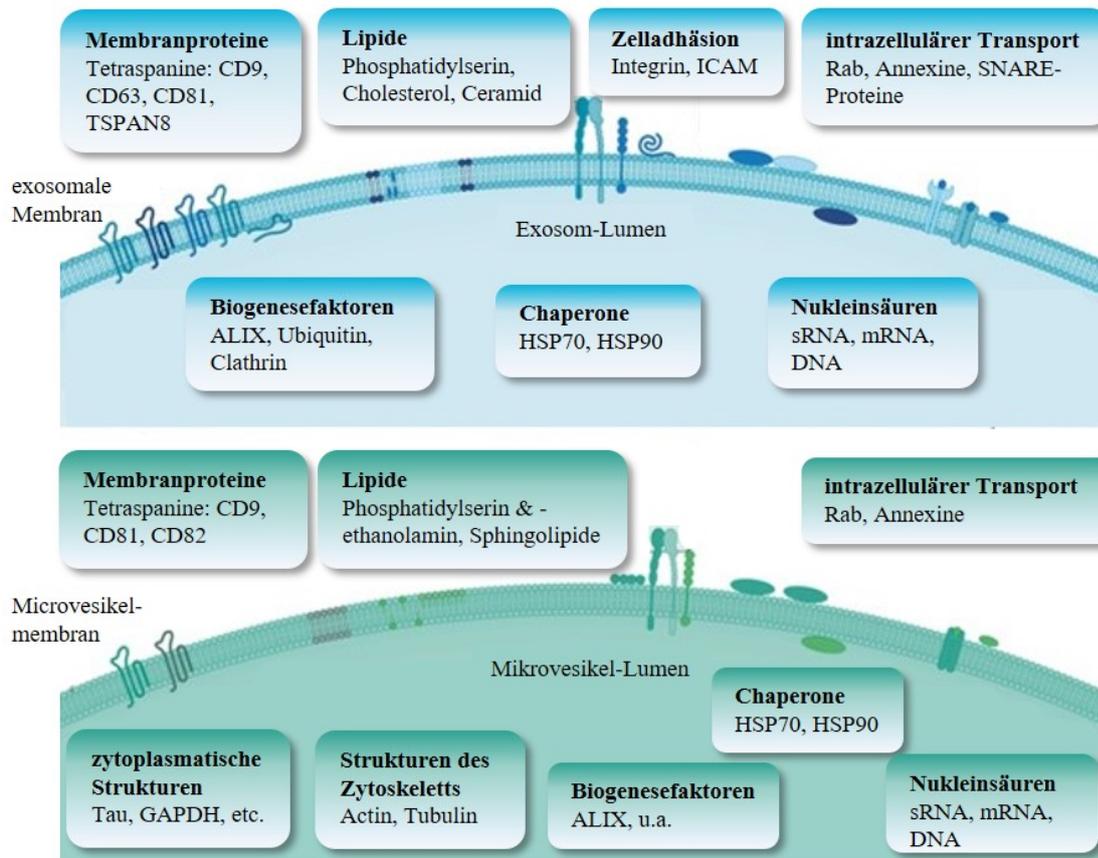


Abbildung 1.4: Übersicht charakteristischer Proteine, Lipide und Nucleinsäuren von Exosomen (blau) und Mikrovesikeln (grün). *Abb. modifiziert nach van Niel et al. 2018 [19]. ALIX Apoptosis-linked gene-2 interacting protein X; GAPDH Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase; HSP Hitze Schock Protein; ICAM Intercellular adhesion molecule; Rab Ras-related in brain; Ras Rat sarcoma; SNARE soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor; sRNA kleine nichtkodierende RNA; TSPAN Tetraspanin*

portiert werden. Hierfür sind die Proteine Rab27A und Rab27B zentrale Mediatoren. SNARE-Komplexe (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*) steuern anschließend die Fusion der MVBs mit der Plasmamembran. Dabei bindet Synaptotagmin zunächst Calcium, welches vermutlich die Exosomensekretion reguliert, und erkennt anschließend das Plasmamembranprotein Syntaxin. Die so eingeleitete Kaskade verläuft unter Mitwirkung diverser Vertreter der SNARE-Proteinfamilie [23] und mündet in der Freisetzung der intraluminalen Vesikel in den extrazellulären Raum, die nun Exosomen genannt werden [19, 21].

Frühe Endosomen können auch ESCRT unabhängig zu MVBs heranreifen. Ein Biogeneseweg verläuft dabei über die Hydrolyse von Sphingomyelin durch Sphingomyelinase zu Ceramid. Ceramid kann dann zu Subdomänen kumulieren, welche spontan intraluminal Vesikel formen können. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass Proteine aus der Familie der Tetraspanine in vergleichbarer Weise fungieren können, zudem sind sie in die Organisation der Fracht involviert. Insbesondere zu nennen sind dabei die Tetraspanine CD9, CD63, CD81 und CD82 [19, 21, 24].

Aufgrund von Überschneidungen zwischen Exosomen und Mikrovesikeln in Anbetracht von Größe, Aufbau und Fracht, gibt es bislang keinen Konsens über spezifische Marker für die genannten Vesikelspezies. Daher lautet die aktuelle Empfehlung der ISEV, EVs nach physikalischen oder biochemischen Eigenschaften, Isolationsbedingungen oder Ursprungszelle zu benennen. Beispi-

le für solche (unverfügbaren) Bezeichnungen können sein: kleine EVs, Tetraspanin CD9 positive EVs oder EVs von mesenchymalen Stammzellen (MSC) [15].

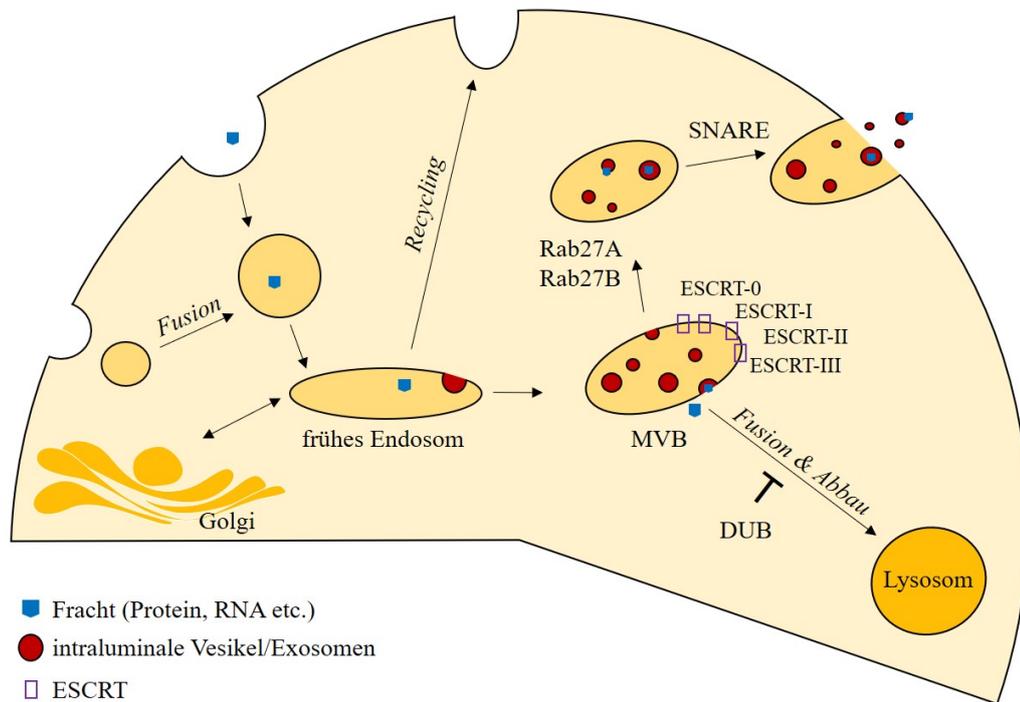


Abbildung 1.5: Biogenese und Sekretion von Exosomen. Durch verschiedene Stimuli, z.B. Rezeptorwechselwirkung mit Fracht-Molekülen oder ubiquitinierte Proteine, wird die Bildung primärer endozytischer Vesikel an der Zelloberfläche induziert. Fusionieren diese zu frühen Endosomen, können diese ihrerseits entweder wieder mit der Plasmamembran verschmelzen („Recycling-Endosomen“) oder zu multivesikulären Körpern (MVB) heranreifen, wobei auch Golgivesikel involviert sein können. Die Reifung geschieht in der Regel ESCRT-abhängig (*endosomal-sorting complex required for transport*) durch Einwärtsknospung der endosomalen Membran, kann aber auch ESCRT-unabhängig ablaufen. Dabei kann ebenfalls Fracht in das Lumen bzw. die Hülle der so entstehenden intraluminale Vesikel gepackt werden. Aufgrund ihrer zum Teil ubiquitinierten Fracht sind MVBs dazu bestimmt lysosomal abgebaut zu werden. De-ubiquitinierende Enzyme (DUB) können diesen Abbau verhindern, indem sie die Ubiquitinreste wieder abspalten. Proteine der Rab-Familie können MVBs nun in die Peripherie der Zelle transportieren, wo sie durch SNARE-Proteine mit der Plasmamembran vereinigt werden und so ihre intraluminale Vesikel als Exosomen freisetzen. *Rab Ras-related in brain; Ras Rat sarcoma; SNARE soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*

1.1.1.2 Pflanzliche Vesikelspezies

In pflanzlichen Zellen wurden sowohl apoptotische Körper [25], als auch MVBs [26, 27] dokumentiert. Pflanzliche Mikrovesikel wurden bislang nicht eindeutig in der Literatur beschrieben, jedoch ist davon auszugehen, dass es sich bei der Bildung extrazellulärer Vesikel um einen evolutionär konservierten Prozess handelt, der in allen eukaryotischen Zellen analog verläuft. Proteine, die in unterschiedlichen Vesikelisolaten identifiziert wurden, unterstützen diese Annahme zusätzlich [28].

Aufgrund des Ausgangsmaterials ist die Nomenklatur für pflanzliche Vesikel unter Beachtung weiterer Aspekte auszuwählen. Während Vesikelisolate aus apoplastischem Fluid (APF) durchaus

vorwiegend EVs enthalten, bleibt der Ursprung von Vesikeln, die aus Homogenisaten (auch aus Presssäften u.ä.) präpariert wurden, häufig unklar bzw. es handelt sich bei solchen Isolaten um Mischungen intra- und extrazellulärer Vesikel [28]. Da die Eigenschaften dieser Vesikel denen von Exosomen ähneln, werden sie zum Teil als Exosome-like Nanopartikel bezeichnet [29–32]. Analog zu den 2018 veröffentlichten Richtlinien der ISEV können pflanzliche Vesikel ebenfalls neutral benannt werden. Pocsfalvi *et al.* 2018 nutzen beispielsweise die Termini Mikrovesikel und Nanovesikel für die verschiedenen Vesikelspezies, die sie aus den Presssäften vier verschiedener Zitrusfrüchte isolierten [33]. Da diese Terminologie nach aktuellem Stand des Wissens gut geeignet ist, werden im Verlauf der vorliegenden Dissertation als Nanovesikel diejenigen Vesikel bezeichnet, deren Durchmesser unter 1 μm liegt. Der Terminus Mikrovesikel erscheint jedoch ungeeignet, das er bereits für von der Plasmamembran abgeschnürte Vesikel verwendet wird (vgl. Abschnitt 1.1.1.1). Pflanzliche Vesikel, die einen Durchmesser von 1 μm oder größer aufweisen, sollten daher besser als Mikrosphären bezeichnet werden. Tab. 1.1 fasst die verwendeten Termini für die unterschiedlichen Vesikelspezies der verschiedenen Reiche zusammen.

Tabelle 1.1: Übersicht zur Terminologie ausgewählter Vesikelspezies.

Bezeichnung	Größe [nm]	Ursprung
Exosom	30–150	Endosom/MVB
Mikrovesikel <i>s.str.</i>	100–1 000	Plasmamembran (Knospung)
apoptotische Körper	1 000–5 000	Plasmamembran (Apoptose)
EVs (Pflanze)	nicht definiert	APF, Zellkulturüberstände
Nanovesikel	< 1 000*	homogenisiertes Gewebe
Mikrosphären	\geq 1 000	homogenisiertes Gewebe
OMV <i>s.str.</i>	20–250	Knospung der äußeren Membran gram-negativer Bakterien
Mikrovesikel (Bakterien)	10–400	Plasmamembran (Knospung) gram-positiver Bakterien
OMV <i>s.l.</i>	10–400	Oberbegriff für bakterielle EVs

* Partikelgröße speziesspezifisch; APF *apoplastisches Fluid*; MVB *multivesikulärer Körper*;

OMV *outer membrane vesicle*

Die Biogenese pflanzlicher EVs ist nicht derart umfassend geklärt wie die tierischer EVs. Die Identifizierung homologer Proteine deutet jedoch darauf hin, dass Pflanzen neben Exosomen [28, 34] auch Mikrovesikel *s.str.* [27, 28] sezernieren. In Tab. 1.2 sind einige ausgewählte Proteine zusammengestellt, die bereits in pflanzlichen Nanovesikeln nachgewiesen wurden und die Verwandtschaft zu tierischen EVs belegen (vgl. Abb. 1.4). Auf der Suche nach Proteinmarkern, könnten einige der dort aufgeführten Vertreter von besonderem Interesse sein. Eine ausführlichere Version dieser Tabelle wurde bereits publiziert [13].

Trotz der Gemeinsamkeiten bezüglich Bildung und Freisetzung von EVs zwischen Pflanzen und Tieren, müssen pflanzliche EVs eine zusätzliche Barriere überwinden: die Zellwand. Die Poren der Zellwand sind *in vivo* zwischen 3 und 10 nm groß [35, 36] und damit eigentlich zu klein, dass EVs sie passieren könnten. Dennoch müssen EVs diese Barriere überwinden können, denn sie

wurden aus APF isoliert [37–39]. Die folgenden Hypothesen, wie diese Hürde überwunden wird, wurden vom Reich der Pilze auf die Pflanzen übertragen [13, 37]:

- EVs könnten mechanisch zwischen den Zellulosefibrillen hindurchgezwängt werden, da diese nicht starr sind,
- Integrität, Dicke und Porengröße der Zellwand könnte bei der Vesikelfreisetzung verändert werden,
- oder EV-assoziierte Enzyme könnten die Zellwandstruktur auflockern.

Die Ergebnisse von Untersuchungen an der Zellwand von Pilzen zeigten, dass Liposomen mit einem Durchmesser von 60–80 nm durch mykotische Zellwände mit einer Porengröße von etwa 5.8 nm gelangen konnten. Diese Ergebnisse zeigen, dass Zellwände nicht die starren Gebilde zu sein scheinen, als die sie gemeinhin gelten. Sie sind vielmehr dynamische Strukturen mit viskoelastischen Eigenschaften und offenbar durchgängig für vesikuläre Strukturen sowohl für die Abgabe von Vesikeln als auch deren Aufnahme [40].

Tabelle 1.2: Proteine, die wiederholt in pflanzlichen Vesikelspezies identifiziert wurden (fett gedruckte Proteine sind von besonderem Interesse als potenzielle Marker).

Actin	Actin, Actin-1 [41], 7 [33, 37] und 101 [33]
Annexine	Annexin [42] und verschiedene Subtypen [33, 34, 37]
Aquaporine	PIP und TIP, verschiedene Subtypen [33, 34, 37, 43]
Clathrin	Clathrin, schwere Kette [27, 33, 34, 42]
Hitze Shock Proteine (HSP)	HSP 70 [34, 41, 42] und Verwandte [27, 33, 37, 43] HSP 90 [33, 34, 42, 44]
Patelline	Patellin 1 & 2 [37], 3 & 3-like [33]
Ras Proteinfamilie	Rab 1-8, 11, 18 und Subtypen [27, 33, 34, 37]
	(GFP-) Penetration 1 [37]
	Synaptobrevin homolog [34]
Syntaxine	Syntaxin A [37] Syntaxin 7 [34], 22 [33] u.a. [34, 37] SNARE- Proteine [33, 34, 37]
	CHMPs [27, 34]
Sonstige	ESCRT I Untereinheiten TSG101, VPS28 & VPS37 [34] TSPAN 8 [37, 45] Ubiquitin konjugierendes Enzym E2 [27]

CHMP charged multivesicular body protein; ESCRT endosomal sorting complex required for transport;

HSP Hitze Schock Protein; PIP Plasma membrane intrinsic protein; Rab Ras-related in brain;

Ras Rat sarcoma; SNARE soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor;

TIP Tonoplast intrinsic protein; TSPAN Tetraspanin

Die Lipidprofile pflanzlicher Nanovesikel können sich, abhängig von der Spezies aus der sie isoliert wurden, stark voneinander unterscheiden [30]. Beispielsweise wurden in der Lipidfraktion von Nanovesikeln aus Beerenfrüchten der Weinrebe (*Vitis vinifera* L.) etwa 98 % Phospholipide

ausgemacht und lediglich 2 % Galactolipide [43], die in pflanzlichen Membranen in der Regel stärker vertreten sind [46]. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass Phosphatidsäure (PA) beim Vergleich zwischen isolierten Vesikeln aus Weintrauben (≈ 47 % PA) und der gesamten Frucht (≈ 18 % PA) in den Vesikeln deutlich angereichert vorlag [43]. PA ist insofern relevant, als dass sie mitogene Eigenschaften besitzt und in die Regulation von Membranfusion bzw. -abspaltung involviert ist [47–49]. Dennoch ist PA offenbar nicht in allen pflanzlichen Nanovesikeln angereichert, denn in solchen aus Grapefruits (*Citrus paradisi* MACFAD.) wurden vorrangig Phosphatidylethanolamin (PE, ≈ 45 %) und Phosphatidylcholin (PC, ≈ 28 %), jedoch nur wenig PA (≈ 2 %) gefunden [44]. Im Vergleich dazu enthält die Lipidfraktion von Ingwer-Nanovesikeln (*Zingiber officinale* ROSCOE) vor allem PA (≈ 43 %) und Digalactosyldiacylglycerol (≈ 46 %) [49, 50]. Die Lipide der Vesikelmembran sind nicht nur entscheidend für die Stabilität sondern sehr wahrscheinlich auch mitverantwortlich für die Adressierung und die Aufnahme der Vesikel am Zielort.

1.1.1.3 Mykotische extrazelluläre Vesikel

Obwohl auch in Pilzen die Bildung von EVs noch nicht abschließend geklärt wurde, deuten Proteinmuster und Morphologie darauf hin, dass auch Pilzzellen sowohl Mikrovessel als auch Exosomen ausschütten [13, 51, 52]. Im Zuge des programmierten Zelltods werden ebenso wie bei Pflanzen und Tieren apoptotische Körper gebildet [53]. Die Problematik der Überwindung der Zellwand ist bei Pilzen genauso unklar wie bei Pflanzen, da allerdings EVs von Pilzen isolierbar sind, gilt auch hier als gesichert, dass sie die Zellwand passieren können. Die Mechanismen werden dabei von einem Reich auf das andere übertragen (s. Abschnitt 1.1.1.2).

Mykotische EVs enthalten wie auch tierische und pflanzliche EVs Nukleinsäuren, darunter mRNA und kleine nichtkodierende RNA (sRNA) und schützen diese vor dem Verdau durch RNasen [54]. Auf diese Weise sind Pilze zu einem interzellulären Informationstransport befähigt und können auch mit anderen Reichen interagieren. In mykotischen EVs wurden homologe Proteine zu denen tierischer und pflanzlicher Vesikelspezies gefunden. Insbesondere zu nennen sind dabei Clathrin (schwere Kette), ESCRT-Komplexe, Hitze Schock Proteine und Syntaxine [13].

Die Lipidzusammensetzung mykotischer EVs ist insofern bemerkenswert, als dass diese ebenfalls Phospholipide enthalten [55]. Zudem wurden Sterole und das Glycosphingolipid Glucosylceramid in EVs verschiedener Spezies gefunden [56–58]. Letzteres ist von besonderem Interesse, da *Cryptococcus neoformans* (SAN FELICE) VUILL. seine Virulenz verliert, wenn es keine Glucosylceramid Synthase exprimiert [59]. Weiterhin ist Glucosylceramid essentiell für Hyphenwachstum und Sporenkeimung beispielsweise in *Aspergillus nidulans* (EIDAM) G. WINTER und *Fusarium graminearum* SCHWABE [60, 61]. Demnach sind EVs nicht nur grundlegend in die Virulenz pathogener Pilze involviert, diese Untersuchungen verdeutlichen auch, dass die Hülle von herausragender Wichtigkeit für die Funktionalität der EVs ist. Ihre Aufgabe besteht offenbar darin, die Fracht zu schützen und die Aufnahme in die Zielzelle zu ermöglichen.

1.1.2 Prokaryotische extrazelluläre Vesikel

1.1.2.1 Bakterielle extrazelluläre Vesikel

Den Ausgangspunkt der Untersuchung bakterieller EVs bildete die Entdeckung von Material der äußeren Membran in zellfreien Überständen von Kulturen der pathogenen gram-negativen Bakterien *Vibrio cholerae* PACINI. Diese hatten zytotoxische Wirkungen auf humane Zellen [3]. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten vesikuläre Strukturen und deren Knospung an der bakteriellen Zellwand [4]. Während gram-negative Bakterien Vesikel der äußeren Membran (OMVs *outer membrane vesicles*) sezernieren, handelt es sich bei EVs gram-positiver Bakterien um Mikrovesikel, da sie von der Plasmamembran abgeschnürt werden [62]. Allerdings werden bakterielle EVs insgesamt häufig auch mit dem Oberbegriff OMV bezeichnet [13].

Die Hülle bakterieller EVs spiegelt in ihrem Aufbau die Struktur der Membran wider, von der die Vesikel abstammen. So besteht die Vesikelhülle üblicherweise aus Lipopolysacchariden, Phospholipiden, Peptidoglycanen und Membranproteinen [63]. Als Fracht wurden verschiedene Proteine, Enzyme, Nukleinsäuren und Sekundärmetaboliten identifiziert [64–66]. Je nach Ursprung und äußeren Bedingungen kann die Zusammensetzung variieren, doch in jedem Fall handelt es sich um chemisch und temperaturbeständige Vehikel [67, 68]. Obwohl die Bildung aktiv oder als Reaktion auf Stress erfolgen kann, wird vermutet, dass die Biogenese bakterieller EVs konstitutiv, jedoch ein Nebenprodukt zellulärer Prozesse ist. Währenddessen wurden bislang keine detaillierten Mechanismen der Vesikelbildung bei Bakterien aufgeklärt, es handelt sich dennoch offenbar um gerichtete Prozesse [13, 69].

Aus der großen Diversität der Bakterien resultiert eine entsprechende Vielfalt bakterieller EVs, so dass bislang keine universellen Markerproteine bekannt sind [70]. Dass kein einheitlicher Mechanismus für die Vesikelbildung gefunden wurde, erschwert die Identifizierung von Markern noch zusätzlich. Einige OMV-Proteine wurden identifiziert, darunter Invasine und Proteine der äußeren Membran, die wahrscheinlich wichtig für die Interaktion mit bzw. die Aufnahme in Wirtszellen sind. Auffällig ist jedoch, dass solche Proteine bzw. Homologe, die in allen eukaryotischen EVs gefunden wurden, in Bezug auf bakterielle EVs nicht genannt werden [13]. Das könnte darauf hindeuten, dass die EV-Bildung und -Freisetzung an sich zwar ein evolutionär konservierter Prozess ist, aber sich entweder in Pro- und Eukaryoten unabhängig voneinander entwickelt hat, oder im Verlauf der Evolution auf den komplexeren Stoffwechsel der Eukaryoten adaptiert wurde.

1.1.2.2 Archaeale extrazelluläre Vesikel

Wie in den bereits beschriebenen Domänen wird auch bei den Archaea angenommen, dass EVs ubiquitär vorkommen. Eine eigene Terminologie für die Vesikel dieser Domäne bislang nicht entstanden. Bei den Gattungen *Sulfolobus* BROCK *et al.* [71, 72], *Ignicoccus* HUBER *et al.* [73], *Thermococcus* ZILLIG [74] und *Halorubrum* MCGENITY ET GRANT [75] wurden bereits EVs beschrieben und voraussichtlich werden weitere Genera folgen.

In *Sulfolobus* EVs wurden Lipide und Proteine identifiziert, die sich von der Plasmamembran der Mikroben unterscheiden. Zudem deutet der Nachweis von ESCRT III Homologen [72] darauf hin, dass der Biogeneseweg mit dem von Exosomen verwandt ist. Gleichzeitig deuten elektro-

nenmikroskopische Aufnahmen gemeinsam mit Lipid- und Proteinanalytik von *Thermococcus* EVs darauf hin, dass sie wie Mikrovessikel von der Plasmamembran abgeschnürt werden [74]. Als gesichert gilt, dass es sich dabei um gerichtete Prozesse handelt, denn in archaealen EVs wurden antimikrobielle Proteine entdeckt [76]. Archaeale EVs scheinen also für die Abwehr anderer Mikroorganismen wichtig zu sein. Die Proteinanalytik archaealer EVs ist nicht sehr umfassend, dennoch bemerkenswert ist, dass ABC Transporter identifiziert wurden [74, 77], die auch in eukaryotischen EVs zu finden sind [33, 34, 37].

Da Archaea evolutionär zwischen Bakterien und Eukaryoten stehen [78], könnten sie möglicherweise das Bindeglied zwischen bakteriellen und eukaryotischen EV Biogenesewegen darstellen. Während sowohl bei eukaryotischen als auch bei bakteriellen EVs die Hülle aus Phospholipiden (und anderen Komponenten) besteht, wurden bei archaealen EVs Diglycerol-di(tri)alkyl-tetraether nachgewiesen, aus denen auch die Plasmamembran der Archaea besteht [72, 74]. Auch in dieser Domäne wird vermutet, dass EVs eine Schutzfunktion für ihre Fracht übernehmen und sie den Transport von Nucleinsäuren und weiteren Strukturen ermöglichen [74, 77, 79].

1.2 Physiologische und pharmazeutische Bedeutung extrazellulärer und anderer Vesikel

EVs wird eine wachsende Bedeutung für verschiedenste physiologische, pathologische und immunologische Prozesse beigemessen. Daher werden in diesem Abschnitt ausgewählte Wirkungen und mögliche pharmazeutische Einsatzgebiete von EVs vorgestellt.

EVs aus allen Domänen bestehen aus biologisch aktiven Proteinen, Lipiden und Nucleinsäuren. Sie ermöglichen die Signalübertragung über weite Distanzen hinweg, entweder indem sie am Zielort durch Membranfusion oder Endozytose aufgenommen werden, oder durch Rezeptorinteraktion an der Zelloberfläche [19, 80]. Die enthaltenen Nucleinsäuren, können den Metabolismus der Empfängerzelle im Sinne der post-transkriptionalen Regulation beeinflussen. Die Entdeckung von mRNA und sRNA in EVs 2007 wandelte das Denken über interzelluläre Kommunikation, denn bis dahin ging man davon aus, dass Informationen insbesondere durch niedermolekulare Substanzen wie Hormone übertragen werden [81–84]. Zentrale Bedeutung kommt dabei der sRNA zu, denn ihre Vertreter können die Proteinexpression noch nach erfolgter Transkription unterbinden (s. Abschnitt 1.3). Die EV Hülle trägt dabei entscheidend zur Stabilität dieser besonders fragilen Fracht bei und ist verantwortlich für die Adressierung des Empfängers [37, 85–88].

1.2.1 Eukaryotische extrazelluläre Vesikel

1.2.1.1 Tierische extrazelluläre Vesikel

Die Wichtigkeit von EVs für physiologische Vorgänge wird deutlich, wenn man das Augenmerk auf Erkrankungen legt, die mit deren Fehlregulierung einhergehen. Die Liste von Erkrankungen, die mit einer veränderten EV Zusammensetzung assoziiert sind, wird stetig länger. Störungen physiologischer Prozesse bzw. Stress können ebenfalls zu Veränderungen im Lipid-, Protein- oder Nucleinsäuremuster von EVs führen. Die Frage, ob derartig veränderte EVs Ursache oder Resultat neurodegenerativer Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, M. Parkinson, Multipler Sklerose, amyotropher Lateralsklerose und Schlaganfällen sind, konnte bislang nicht abschließend beant-

wortet werden [89–91]. Auch Autoimmunerkrankungen (z.B. systemischer Lupus erythematoses, rheumatoide Arthritis) und Zivilisationskrankheiten (Arteriosklerose, Übergewicht, metabolisches Syndrom u.a.) gehen mit Veränderungen der EVs einher [80, 92, 93]. Zudem könnten Exosomen aus Adipozyten übergewichtiger Patienten oxidativen Stress verstärken und zum Voranschreiten chronischer Entzündungen führen [94].

In der Diagnostik können die veränderten Muster der EV Zusammensetzung herangezogen werden, um verschiedene Erkrankungen frühzeitig zu erkennen. So etablieren sich EVs zunehmend als probate Mittel für die minimalinvasive Krebsdiagnostik aus Blut- oder Urinproben [80, 91, 95]. Entartete EVs, die von Krebszellen sezerniert werden, können jedoch auch in den Stoffwechsel gesunder Zellen eingreifen und Metastasierung, Angiogenese, Tumorgenese und -wachstum, sowie Arzneimittelresistenz auslösen. Doch auch EVs gesunder Zellen sind im Stande Apoptose auszulösen und so eine Tumorregression zu bewirken (s. Abb. 1.6) [96–99]. Inwiefern sich exogene EVs als Agenzien bzw. als Vehikel in der Therapie eignen, ist eine zentrale Frage in der Erforschung tierischer EVs [100, 101].

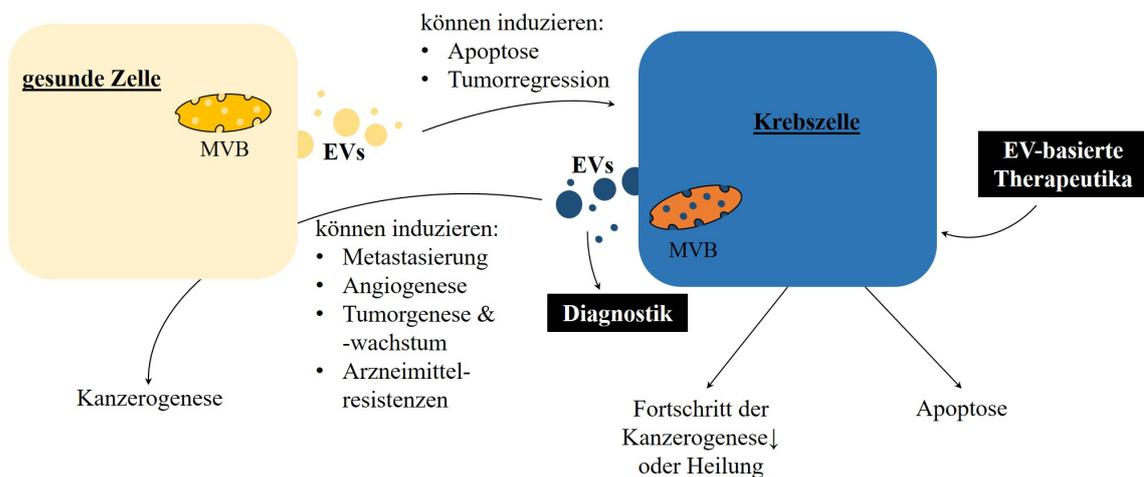


Abbildung 1.6: EV vermittelte, bidirektionale Regulierung von Krebs. Während EVs von gesunden Zellen positive Effekte auf Krebszellen haben, können entgegengesetzt auch Prozesse der Tumorentstehung durch entartete EVs in gesunden Zellen ausgelöst werden. Während EVs von Krebszellen anhand ihrer veränderten Zusammensetzung identifiziert und als Marker genutzt werden, können exogene EVs in Zukunft Vehikel für die Krebstherapie darstellen. *EVs extrazelluläre Vesikel; MVB multivesikulärer Körper*

Auch in Anbetracht der Bedeutung der EVs in anderen Reichen nehmen sie offenbar eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit Infektionen ein. Dabei scheint es zu einem Wettstreit zwischen Wirt und Pathogen zu kommen (s. Abschnitt 1.4). Tierische Zellen senden dabei EVs aus, um die Immunantwort zu verstärken, indem infizierte Zellen EVs mit PAMPS (*pathogen-associated molecular patterns*) beladen und aussenden [13, 102].

Verschiedene präklinische und klinische Studien eröffnen zahlreiche Einsatzmöglichkeiten für EVs als Arzneimittel [103]. EVs werden allgemein gut toleriert und können sowohl selbst die aktive Komponente darstellen, als auch Vehikel sein. Beispielsweise um Löslichkeitsprobleme zu bewältigen oder für den gerichteten Arzneistofftransport. Untersuchungen zeigten, dass EVs von MSCs entzündungshemmende bzw. immunmodulatorische Wirkungen innehaben [104, 105] und die Gewebsregenerierung nach Schäden an Herz, Leber, Niere oder Knochen positiv beeinflussen

können [103, 106]. Bei der Nutzung von EVs als Vehikel für Arzneistoffe ist ein zentraler Vorteil, dass die Bioverfügbarkeit erhöht wird. Somit kann die Dosis reduziert werden, was sich wiederum in einer verminderten Toxizität äußert. Besonders relevant ist dieser Aspekt, wenn Zytostatika appliziert werden sollen [107]. Maßgeblich limitierend für den Einsatz von EVs als Pharmaka bzw. technologische Vehikel sind jedoch die vergleichsweise geringen Ausbeuten aus tierischen Zellkulturen. Die Ausbeuten können zwar durch Induktion der EV-Freisetzung oder in Bioreaktoren stark erhöht werden [13], betrachtet man jedoch Abb. 1.6, so erscheint es nicht zweckmäßig EVs aus Tumorzelllinien als Pharmaka einzusetzen, denn sie besitzen offenbar kanzerogenes Potenzial. Neben der Kultivierung gesunder Zellen sollten auch alternative Quellen für EVs besser untersucht werden. Während mykotische und bakterielle EVs immunogene Eigenschaften aufweisen (s. Abschnitte 1.2.1.3 und 1.2.2), ergab die Literaturrecherche keine Hinweise auf Bioinkompatibilitäten durch pflanzliche Exosome-like Nanopartikel.

Bereits erwähnt wurde, dass pathologische Veränderungen sich auf die EV-Homöostase auswirken können. Auch externe Faktoren können diese Homöostase beeinflussen. So können pflanzliche Sekundärmetabolite die EV-Anzahl und die exosomale sRNA von Säugern beeinflussen. Der Übersichtsartikel von Otsuka *et al.* 2018 zeigt Einflüsse von Substanzen wie Curcumin, Epigallocatechin-3-gallat, Resveratrol, Quercetin u.a. auf sRNA in EVs auf. Dabei wurden günstige Effekte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* auf Krebszellen beobachtet wie z.B. verringerte Metastasierung oder Apoptoseinduktion bei Kolon-, Lungen-, Brust- und Prostatakarzinom [82]. Auch pflanzliche Mikrosphären und Nanovesikel können offenbar den Stoffwechsel von Säugern beeinflussen. Zirkulieren mit sRNA beladene EVs im Körperkreislauf, so können diese durch RNA-Interferenz eine unüberschaubare Vielzahl von Effekten im gesamten Organismus auslösen [82, 85]. Offenbar schützt die Hülle der Vesikel, die mit der Nahrung aufgenommen werden, ihre fragile Fracht vor den harschen Bedingungen in Magen und Duodenum und ermöglicht dort die Resorption sowohl durch Membranfusion als auch durch Endozytose [13, 97, 108, 109]. Ob die aufgenommenen Vesikel in den Enterozyten zu endogenen EVs prozessiert, oder unverändert ins Blut abgegeben werden, bleibt ungeklärt. Abb. 1.7 fasst die beschriebenen Prozesse zusammen. Da die menschliche Ernährung zu einem Großteil auf Pflanzen beruht, können pflanzliche Sekundärmetaboliten gemeinsam mit den Vesikeln umfassenden Einfluss auf den humanen Stoffwechsel [13] und auf das Mikrobiom [82, 110] nehmen.

1.2.1.2 Pflanzliche Nanovesikel

Es ist davon auszugehen, dass auch in Pflanzen EVs dazu dienen Informationen über größere Distanzen von einer Zelle zur anderen zu transportieren, auch wenn es bislang keine konkreten Untersuchungen diesbezüglich gibt. Jedoch gibt es eine zunehmende Anzahl an Hinweisen darauf, dass EVs für Pflanzen eine zentrale Rolle in der Abwehr pathogener Mikroorganismen einnehmen (s. Abschnitt 1.4).

Betrachtet man die ernährungsphysiologische und pharmazeutische Bedeutung von pflanzlichen Vesikelspezies, so stellt die Publikation von Zhang *et al.* 2012 den maßgeblichen Ausgangspunkt für das wissenschaftliche Interesse dieser Sparte dar, denn bis dahin wurde aufgrund der Instabilität freier RNA – insbesondere im Gastrointestinaltrakt – nicht angenommen, dass RNA die Darmbarriere intakt überwinden könnte. Doch Zhang und seine Kollegen wiesen die pflanzliche

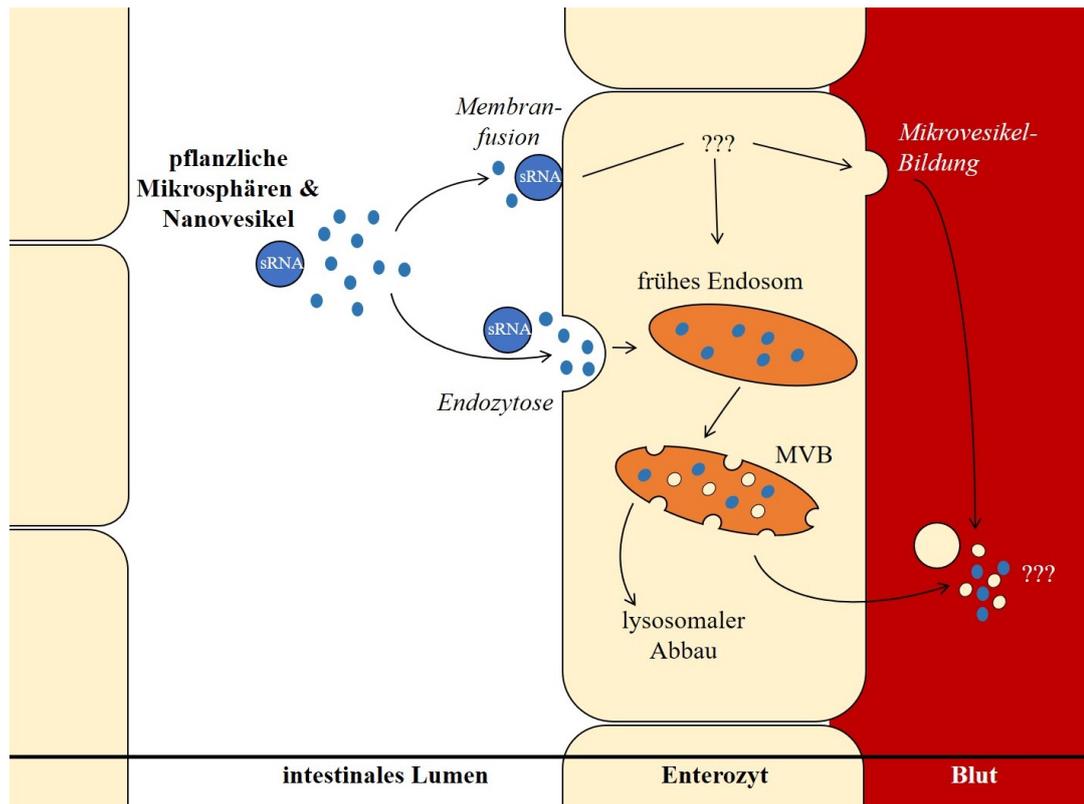


Abbildung 1.7: Intestinale Resorption pflanzlicher Mikrosphären und Nanovesikel. Pflanzliche Vesikelspezies aus der Nahrung können von Enterozyten durch Membranfusion und Endozytose resorbiert werden. Ob sie oder ihre Fracht im Enterozyten prozessiert werden, sie dort den Stoffwechsel beeinflussen, oder unverändert ins Blut abgegeben werden, wurde bislang nicht geklärt. *MVB* Multivesikulärer Körper; *sRNA* kleine nichtkodierende RNA

sRNA MIR168a im Blut von Mäusen nach, die zuvor mit Reis gefüttert wurden und zeigten einen Einfluss auf den LDL-Stoffwechsel [111]. Diese Erkenntnisse zogen zusätzliches Interesse auf exogene sRNA und auf die Vesikel, die wahrscheinlich die Vehikel der RNA sind.

Seitdem zeigt sich mehr und mehr, dass pflanzliche Nanovesikel sowohl selbst potenzielle Pharmaka, als auch Ausgangsmaterial für neue liposomale Formulierungen sein könnten. So zeigten Nanovesikel aus Weintrauben (*V. vinifera*) positive Effekte auf die Regeneration der Darmmukosa bei Mäusen. Die Applikation der Nanovesikel führte bei pathologisch verändertem Epithel zu einer induzierten Proliferation intestinaler Stammzellen und einer beschleunigten Regeneration über die gesamte Länge des Darms hinweg. Zudem schützte die kontinuierliche orale Applikation der Nanovesikel die Mäuse vor natriumdextransulfat-induzierter Colitis und verdoppelte die Lebensdauer gegenüber der Kontrollgruppe [29, 43]. Für Nanovesikel aus Ingwer (*Z. officinale*) konnte gezeigt werden, dass diese besonders gut von intestinalen Makrophagen und Monocyten aufgenommen werden und dort die Sekretion anti-inflammatorischer Mediatoren anregen [30]. Die orale Applikation von Ingwer-Nanovesikeln schützte Mäuse vor Alkohol-induzierten Leberschäden. Daher können sie als neue Agenzien zur Prävention und eventuell zur Behandlung von Leberschäden in Betracht gezogen werden [108]. Es wird außerdem angenommen, dass die Aufnahme pflanzlicher EVs aus einer Vielzahl von Pflanzen die intestinale Homöostase günstiger beeinflusst, als würden die EVs von einer Pflanze allein stammen [30]. Nanovesikel aus Zitronen (*Citrus limon* (L.) OSBECK) hemmten *in vitro* und *in vivo* Krebszellwachstum und Angiogenese ohne dabei normale

Zellen zu beeinflussen [34].

Eine weitere Strategie der pharmazeutischen Verwendung pflanzlicher Nanovesikel ist die Formulierung von Nanovektoren aus den Vesikel-Lipiden. Untersuchungen an derartigen Nanovektoren aus Grapefruit- und Ingwervesikeln zeigten Eigenschaften, die sie aus pharmazeutischer Sicht besonders vielversprechend machen wie:

- keine Zytotoxizität [50, 109],
- effizientere Aufnahme im Vergleich zu Liposomen für den überwiegenden Teil der untersuchten Zellen [109],
- keine nachweisbare Immunreaktion [109] oder adverse Effekte [112],
- effektive Adressierung von miR-17 an Tumorzellen im Gehirn nach intranasaler Applikation, während Liposomen das Gehirn nicht erreichten [112],
- Induktion von antitumoralen M1 Makrophagen durch miR-18a in intravenös applizierten Nanovektoren [113] und
- effiziente zelluläre Aufnahme und Unterdrückung von Krebs durch Aptamer-Doxorubicin beladene Nanovektoren [114].

Zentrale Vorteile solcher vesikulär verpackter Arzneistoffe waren dabei erhöhte Stabilität, verbesserte Löslichkeit und Bioverfügbarkeit hydrophober Arzneistoffe ohne Veränderung der biologischen Aktivität, wobei das Vehikel hierbei in Bezug auf Biokompatibilität und Bioabbaubarkeit besonders geeignet ist [109]. Pflanzen können dabei in Zukunft eine rationale, sichere und kosteneffiziente Quelle für das Ausgangsmaterial zur klinischen Anwendung dieser Vehikel darstellen [49, 113, 115]. Betrachtet man die unterschiedlichen Lipidprofile der Vesikel verschiedener Spezies (s. Abschnitt 1.1.1.2) gemeinsam mit den *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen, legen diese Erkenntnisse die Hypothese nahe, dass die Kombination der Vesikellipide verschiedener Spezies zur Adressierung bestimmter Zelltypen optimiert werden kann. Pflanzliche Nanovesikel ermöglichen also im Wesentlichen zwei Therapieoptionen:

1. Die Isolation und Applikation unveränderter Vesikel mit komplexer Zusammensetzung.
2. Die Isolation der Vesikel, Extraktion der Lipidfraktion und Formulierung von arzneistoffbeladenen Nanovektoren, die die positiven Eigenschaften von Liposomen mit sehr guter Verträglichkeit vereinigen.

EVs wurden von Pflanzen infolge von Pilzinfektionen verstärkt ausgeschüttet und hemmten Keimung, Myzelwachstum und Viabilität von Pilzsporen [37, 42, 45]. Auch antimikrobielle Sekundärmetaboliten wie Naringin, Naringenin [44] und Shogaol [108] wurden in pflanzlichen Nanovesikeln nachgewiesen. Pflanzenzellen scheinen also EVs als eine Art permanente Patrouille gegen invasive Mikroorganismen in den apoplastischen Raum abzugeben. Möglicherweise können die antimikrobiellen Eigenschaften pflanzlicher EVs auch in der Therapie topischer oder systemischer Mykosen genutzt werden. Auch für die Prävention und Bekämpfung von Pilzbefall an Kulturpflanzen können EVs eine Alternative zu Pestiziden ohne Toxizität für Umwelt, Mensch oder Tier darstellen [116].

1.2.1.3 Mykotische extrazelluläre Vesikel

Durch EVs können Pilzzellen untereinander Informationen austauschen, sie aber auch in andere Reiche übermitteln [117]. So wird angenommen, dass die Virulenz pathogener Pilze mit ihren EVs korreliert, denn während Mutanten mit eingeschränkter EV-Sekretion eine verminderte Virulenz aufwiesen, wurde die Infektiosität von *C. neoformans* durch zusätzliche Applikation von EVs verstärkt [13, 51, 56, 57, 118–122]. Dass verschiedene und zum Teil redundante Mechanismen der EV-Bildung und -Freisetzung identifiziert wurden, unterstreicht zusätzlich ihre große physiologische Bedeutung [52].

Im Gegensatz zu pflanzlichen Nanovesikeln lösen mykotische EVs bei *in vivo* Applikation eine Immunreaktion aus. Daher können sie perspektivisch von klinischer Relevanz als Vakzine gegen Mykosen sein [51, 56, 120]. *In vivo* Untersuchungen zeigten, dass mykotische EVs die Freisetzung der Zytokine IL-4 und TNF- α stimulieren [123], während *in vitro* vermehrt NO, IL-10, IL-12 und TNF- α freigesetzt wurde, sowie die fungizide Aktivität von Makrophagen erhöht war [54, 56, 124].

1.2.2 Prokaryotische extrazelluläre Vesikel

Die Bedeutung bakterieller EVs wurde noch nicht umfassend aufgeklärt. Generell wird angenommen, dass es sich um eine von verschiedenen Transportmöglichkeiten handelt, die gegenüber der Sekretion von freien Molekülen folgende Vorteile bietet [13, 69]:

- Geringe Mengen Signalmoleküle können in vergleichsweise hohen Konzentrationen und von Diffusion weitestgehend unbeeinflusst transportiert werden.
- Fragile Fracht wird vor Abbau im extrazellulären Milieu geschützt.
- Sowohl benachbarte, als auch weit entfernte Zellen können erreicht werden.

Diese Vorteile sind allerdings nicht exklusiv bakteriellen EVs zuzuschreiben, sondern es scheinen die wesentlichen Aspekte zu sein, aus denen die evolutionäre Bedeutung aller EVs resultiert. OMVs beeinflussen ihre Umgebung, sind mitverantwortlich für die Kommunikation mit anderen Individuen (*Quorum sensing*) sowohl der gleichen, als auch anderer Spezies und stellen Virulenzfaktoren dar [125, 126]. Des Weiteren enthalten OMVs lytische Enzyme um Beutebakterien abzubauen und es wird angenommen, dass sie bei der Ausbildung von Biofilmen Ausgangspunkte und Stabilisatoren darstellen [69, 127, 128]. Zudem könnten OMVs dazu dienen fehlerhafte Proteine mit potentiell adversen Effekten zu entsorgen [129–131].

Die pharmazeutische Anwendung von OMVs wird dadurch limitiert, dass sie virulente Proteine und Lipopolysaccharide enthalten und sie somit eine Immunantwort auslösen. Verschiedene Immunzellen wie neutrophile Granulozyten, Makrophagen und dendritische Zellen werden durch OMVs aktiviert und *in vitro* wie auch *in vivo* wurden erhöhte Level an proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β , IL-12 und TNF- α festgestellt. Aufgrund dieser Eigenschaften sind OMVs, genau wie mykotische EVs, eine hervorragende Basis für die Entwicklung neuer Vakzine, da sie eine Immunreaktion auslösen, jedoch kein offensichtliches Risiko einer tatsächlichen Infektion besteht [132]. Die Intensität der Immunreaktion auf OMV-Applikationen kann, je nach Bakterienstamm von dem sie isoliert wurden, variieren. Diejenigen OMVs, die nur eine geringe Immunant-

wort auslösen, z.B. von Myxobakterien, sind ebenfalls von Interesse als Vehikel für Arzneistoffe [132, 133].

Archaeale EVs wurden bis dato nicht für eine pharmazeutische Verwendung in Erwägung gezogen und neben dem Informationsaustausch innerhalb der jeweiligen Spezies wird angenommen, dass sie ein Element zur Abwehr anderer Mikroorganismen darstellen (s. Abschnitt 1.1.2.2).

1.3 kleine nichtkodierende RNA

Aus der Gruppe der sRNA kommen microRNA (miRNA) und kleine interferierende RNA (siRNA) üblicherweise in den genannten Vesikelspezies vor und deren Wirkungen werden maßgeblich auf diese sRNA zurückgeführt [13]. Sowohl miRNA, als auch siRNA verhindern die Translation von *messenger RNA* (mRNA) in Form des RNA-induzierten Stummschaltungskomplexes (RISC). Während siRNA aus doppelsträngigen RNA Vorläufern entstehen, handelt es sich bei primärer miRNA um einsträngige DNA-Transkripte, die sich zufällig falten (Basenpaarung). Diese werden durch RNasen fragmentiert und aus dem Zellkern heraus in das Zytoplasma transportiert. Treffen prä-siRNA oder prä-miRNA nun auf die Typ III RNase DICER, so entstehen etwa 20–22 Nukleotide lange doppelsträngige RNA-Fragmente. Diese werden von Argonaut-Proteinen in Einzelstränge gespalten und der Leitstrang bleibt an das Argonaut-Protein gebunden, während der komplementäre Strang abgebaut wird. Gemeinsam mit weiteren Proteinen entsteht aus dem sRNA-Argonaut-Komplex der RISC. Bindet dieser Komplex nun komplementär an mRNA, so wird deren Translation blockiert und die mRNA abgebaut. Dieser Vorgang der post-transkriptionalen Gen-Stummschaltung wird als RNA-Interferenz bezeichnet [85, 134–137]. Abb. 1.8 fasst die beschriebenen Vorgänge noch einmal zusammen.

Die US amerikanische Arzneimittelbehörde (*Food and Drug Administration*) hat jüngst das erste Arzneimittel zugelassen, das auf RNA-Interferenz basiert. Die siRNA wird in synthetischen Lipidnanopartikeln formuliert und dient der Therapie der familiären Amyloidpolyneuropathie. Die Nanopartikel verhindern den Abbau der RNA und ermöglichen die zelluläre Aufnahme, nehmen also exakt die Rolle ein, die EVs zugesprochen wird. Die synthetischen Nanopartikel wiesen jedoch Einschränkungen auf, denn sie zeigten eine dosislimitierende Toxizität und transportierten ihre Fracht nahezu ausschließlich in die Leber [138]. EVs, oder Nanopartikel aus EV-Lipiden könnten bei diesen Problemen zukünftig Abhilfe schaffen. Insbesondere pflanzliche Vesikel sollten dabei aus den in Abschnitt 1.2.1.2 genannten Gründen in Erwägung gezogen werden.

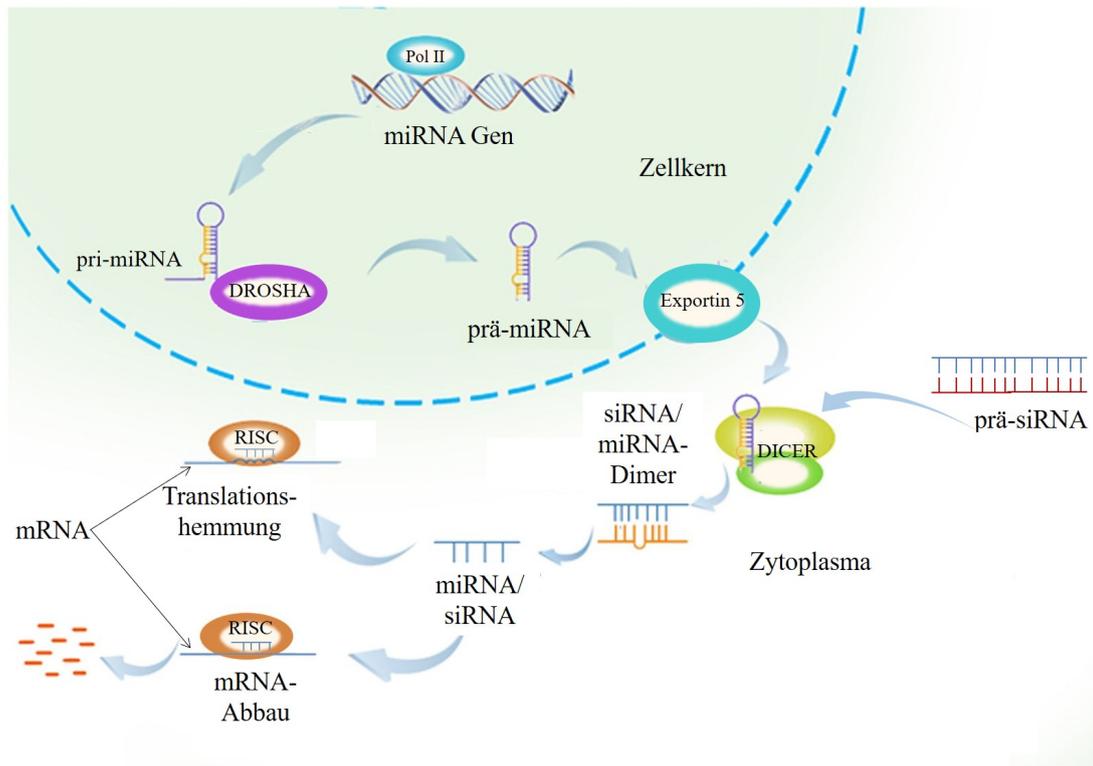


Abbildung 1.8: RNA-Interferenz durch microRNA (miRNA) und kleine interferierende RNA (siRNA). Die RNA Polymerase II (Pol II) transkribiert die primäre miRNA (pri-miRNA), die durch die Typ III RNase DROSHA weiterprozessiert und aus dem Zellkern ins Zytoplasma transportiert wird. DICER, eine weitere Typ III RNase, schneidet etwa 20–22 Nukleotide lange Fragmente von den Vorläufern (prä-miRNA oder prä-siRNA) ab und der RNA-induzierte Stummschaltungskomplex (RISC) wird gebildet. Die siRNA kann nun komplementär an ihre Ziel-mRNA binden. In der Folge wird die Translation gehemmt und die mRNA abgebaut. *Abb. modifiziert nach Peng und Croce 2016 [135].*

1.4 EVs als Schnittpunkt zwischen Individuen, Spezies, Reichen und Domänen

Neben dem Transport von Informationen innerhalb ein und desselben Organismus, können EVs auch andere Individuen beeinflussen. Dieser interindividuelle Informationsfluss wird dabei weder durch die Grenzen zwischen den Spezies noch zwischen Reichen oder Domänen limitiert. Tab. 1.3 fasst derartige Interaktionen, von Mutter-Kind bis Wirt-Pathogen, zusammen.

Neben mitogenen Lipiden und Signalproteinen wird für die EV-vermittelte Kommunikation hauptsächlich sRNA verantwortlich gemacht. Diese kann verschiedenste biologische Prozesse wie Zellwachstum, Differenzierung, Metabolismus und Apoptose beeinflussen [29, 86, 139]. Essentiell für die Übertragung der Informationen sind dabei die Stabilität und die Aufnahme dieser Signalmoleküle. Dabei verhilft die vesikuläre Verpackung ihrer eigentlich fragilen Fracht zu unerwartet hohen Resistenzen der sRNA gegenüber pH- und Temperaturstress und gegenüber RNasen sowohl in Säugern, als auch in Pflanzen [13]. Die Annahme, dass die Vesikelhülle entscheidend zu dieser erhöhten Stabilität beiträgt, wird dadurch untermauert, dass Pasteurisieren und Homogenisieren von Kuhmilch, bzw. Ultraschalldepletion von Exosomen aus selbiger, mit einem gravierenden Verlust der sRNA einhergeht. Die Vesikelhülle wird zudem für die zelluläre Aufnahme der Fracht verantwortlich gemacht [13, 85, 140, 141].

EVs wurden bereits aus der Milch verschiedener Säuger isoliert, darunter aus der von Kühen,

Schweinen und Menschen, womit sich eine Vielzahl von möglichen interindividuellen und Interspezies-Regulationen ergibt [13, 85, 142, 143]. Der Nachweis von erhöhten Serumkonzentrationen kuhmilchspezifischer sRNA beim Menschen nach Konsum der Milch untermauert diese These [140].

Tabelle 1.3: EV-vermittelte Interaktionen.

interindividuelle Regulation		Mutter ↔ Fetus [144]
		Mutter → Säugling [85, 145, 146]
		erhöhte Virulenz von Pilzen [147, 148]
		erhöhte Virulenz und Resistenz bei Bakterien innerhalb einer Spezies [126, 131, 149, 150]
Interspezies- Regulation		diätetische Aufnahme, z.B. Kuhmilch → andere Tiere [140, 151]
		Wirt-Pathogen Interaktionen, z.B. Helminth ↔ tierischer Wirt [87, 152]
		erhöhte Virulenz und Resistenz bei Bakterien, speziesübergreifend [126, 131, 149, 150, 153]
		archaeale antimikrobielle Proteine inhibieren Wachstum anderer Archaeen [71, 76]
		archaealer DNA-Transfer [74, 77]
Regulation zwischen Reichen und Domänen	Wirt-Pathogen Interaktionen:	Pflanze ↔ Pilz [37, 42, 45, 154–156]
		Tier ↔ Pilz [56, 123, 147]
		Tier ↔ Bakterie [149, 150, 157–162]
		diätetische Aufnahme, z.B. Pflanze → Tier [82, 111]
		archaeale antimikrobielle Proteine inhibieren Bakterienwachstum [71, 76]

Zahllose EV-vermittelte Effekte auf den Stoffwechsel des Empfängerorganismus sind vorstellbar. Dennoch wurden bislang nur wenige explizit nachgewiesen. So profitieren beispielsweise Säuglinge von der sRNA-Aufnahme aus Muttermilch aufgrund der resultierenden erhöhten T-Zell-Anzahl, sowie verbesserter B-Zell-Differenzierung [85, 86, 143, 163].

Über die Grenzen von Reichen hinaus gehen Interaktionen wie die Beeinflussung des Stoffwechsels von Säugern durch diätetische Aufnahme pflanzlicher sRNA oder die antimykotischen Wirkungen pflanzlicher EVs (s. Abschnitt 1.2.1.2). Im Gegenzug beeinflussen mykotische EVs die Immunantwort des Wirtsorganismus. Es kommt zu einer Art Wettrüsten zwischen Wirt und Pathogen. Sowohl bei Interaktionen zwischen pathogenen Pilzen und Menschen, als auch zwischen Pilzen und Pflanzen verstärkten die EVs die Virulenz der Pathogene durch RNA-Interferenz [123, 147, 154, 156, 164].

Auf dem Gebiet problematischer bakterieller Infektionen spielen OMVs ebenso eine Rolle, denn sie können Resistenzgene zwischen Bakterien transferieren, unabhängig davon, ob es sich um die gleiche oder eine andere Spezies handelt [126]. OMVs enthalten PAMPs und andere Virulenzfaktoren, die eine starke Immunantwort auslösen können. Analog zu mykotischen EVs tragen auch OMVs zur Infektiosität der Mikroorganismen bei und können dem Pathogen helfen, die Immunreaktion des Wirts zu überstehen. Für eine Reihe bakterieller Pathogene wie *Bacillus anthracis*

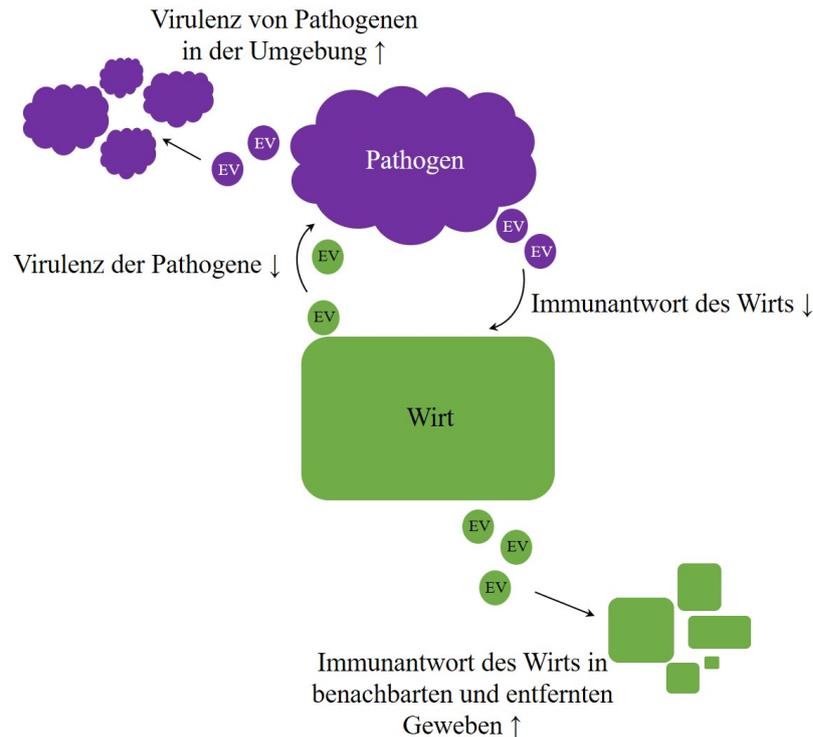


Abbildung 1.9: Wettrüsten durch extrazelluläre Vesikel (EVs) zwischen Wirt und Pathogen. Während angegriffene Wirtszellen versuchen die Virulenz des Pathogens abzumildern und die Immunantwort des Organismus zu verbessern, sendet das Pathogen seinerseits EVs aus, um die eigenen Chancen in diesem Wettrüsten zu verbessern.

COHN, *Helicobacter pylori* (MARSHALL) GOODWIN, *Neisseria gonorrhoeae* (ZOPF) TREVISAN, *Pseudomonas aeruginosa* (SCHROETER) MIGULA und *Streptococcus pneumoniae* (KLEIN) CHESTER wurde gezeigt, dass ihre Virulenz mit ihren OMVs assoziiert ist [13]. Wirt-Pathogen Interaktionen sind jedoch nicht auf einzellige Pathogene limitiert, denn auch auch bei Helminthen wie *Heligiosomoides polygyrus* DUJARDIN [87] und *Dicrocoelium dendriticum* RUDOLPHI [152] wurde beobachtet, dass sie die Immunantwort des Wirts modulieren. Abb. 1.9 fasst die zentralen Funktionen der EVs im Wettrüsten zwischen Wirt und Pathogen schematisch zusammen.

1.5 Zielstellung

Die vorangegangenen Abschnitte zeigen, dass EVs eine vielversprechende Basis für die Zukunft der Arzneimittelentwicklung bilden könnten. Während zahlreiche Labore und Arbeitsgruppen sich mit Säuger-EVs beschäftigen, bleiben Nanovesikel aus anderen Klassen und Reichen dahinter zurück. Um pflanzliche Nanovesikel perspektivisch als neue Arzneimittel, bzw. als Vehikel für Arzneistoffe nutzen zu können, müssen sie zunächst besser charakterisiert werden, um ihre Eigenschaften optimal nutzen und eine Standardisierung vornehmen zu können. Zu diesem Zweck sollten im Rahmen der vorliegenden Dissertation Methoden zur Isolation, Visualisierung, Aufreinigung und Analytik etabliert werden.

Für die Isolation sollten bewährte mit innovativen Methoden verglichen und an die Eigenschaften der pflanzlichen Nanovesikel angepasst werden. Um Erfolg oder Misserfolg der Isolation zu überprüfen, mussten die Nanovesikel zuverlässig detektiert bzw. visualisiert werden können. Hierfür

sollte vor allem die Elektronenmikroskopie genutzt werden, da diese nicht nur eine qualitative Aussage ermöglicht, sondern gleichzeitig Rückschlüsse auf Morphologie und Größe zulässt.

Um etwaige Störungen durch Begleitstoffe zu minimieren, sollten einerseits die Isolationsmethoden bzw. das Ausgangsmaterial so ausgewählt werden, dass diese bereits weitestgehend von den aufkonzentrierten Vesikeln abgetrennt, andererseits weitere Möglichkeiten der Aufreinigung in Erwägung gezogen werden. Für humane EVs stehen antikörperbasierte Isolations- bzw. Reinigungsmethoden zur Verfügung, da Markerproteine auf der Vesikeloberfläche bekannt sind. Um langfristig vergleichbare Systeme für pflanzliche Nanovesikel initiieren zu können, müssten zunächst entsprechende Proteinmarker identifiziert werden. Für Letzteres sollten im Rahmen der vorliegenden Dissertation die Proteinprofile von Nanovesikeln aus verschiedenen Pflanzenspezies verglichen, charakteristische Proteine ausgewählt und mit der verfügbaren Literatur abgeglichen werden.

Pflanzen oder Pflanzenteile sind nicht nur ein wesentlicher Bestandteil einer ausgewogenen Ernährung, sondern auch tief in der (traditionellen) Medizin verwurzelt. Neben der vergleichsweise häufig untersuchten sRNA könnten auch Sekundärmetaboliten durch die vesikuläre Verpackung ihren Einfluss auf den humanen Metabolismus auf bisher unbekannte Weise entfalten. Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob Sekundärmetaboliten in pflanzlichen Nanovesikeln nachweisbar sind. Da die Hülle der zu untersuchenden Nanovesikel eine wesentliche Rolle für Stabilität, Resorption und Adressierung spielt, sollte auch deren Zusammensetzung, sowie die Stabilität gegenüber Verdauungsenzymen untersucht werden.

2 Material

Die verwendeten Geräte sind in Tab. 2.1, Verbrauchsmaterial in Tab. 2.2, Referenzsubstanzen in Tab. 2.3, sonstige Chemikalien in Tab. 2.4 und die Herkunft des verwendeten Pflanzenmaterials in Tab. 2.5 aufgelistet.

Tabelle 2.1: Auflistung der verwendeten Geräte.

Gerät	Hersteller
Zentrifuge Allegra X30R mit SX4400 Rotor	Beckman Coulter, Brea, USA
Zentrifuge Avanti J-26 S XP mit JA 25.50 Rotor	Beckman Coulter, Brea, USA
Ultrazentrifuge Optima L-90k mit Rotor SW41 und 70 TI	Beckman Coulter, Brea, USA
Elektrophorese- Zubehör (Halterungen, Glasplatten etc.)	Bio Rad Laboratories, Hercules, USA
Mini- Protean Tetra System (Elektrophoresekammer)	Bio Rad Laboratories, Hercules, USA
Power Pac 300 (<i>Powersupply</i>)	Bio Rad Laboratories, Hercules, USA
UV Transilluminator	Biostep, Burkhardtsdorf, Deutschland
Ultraflex-II TOF/TOF mit 200 Hz <i>solid-state Smart beam™ laser</i>	Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland
AMD 2 automatische Mehrfachentwicklungskammer	CAMAG, Muttenz, Schweiz
ADC 2 automatische DC Kammer	CAMAG, Muttenz, Schweiz
DC- Horizontalkammern 10x10 cm und 20x10 cm	CAMAG, Muttenz, Schweiz
Linomat IV (halbautomatisches DC- Auftragegerät)	CAMAG, Muttenz, Schweiz
TLC Scanner 4	CAMAG, Muttenz, Schweiz
Kamera: Canon EOS 700D	Canon, Tokyo, Japan
Pflanzenlampen 12 W LED	Conrad Electronic, Hirschau, Deutschland
Nicomp ZLS Z3000	Entegris, Billerica, USA
Mikroliterpipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Photometer Eppendorf BioSpectrometer <i>basic</i>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Größenausschlussäule, vorgepackt	HansaBioMed, Tallinn, Estland
Tangentialflussfilter für EVs (TFF-Easy) & große EVs (TFF-MV)	HansaBioMed, Tallinn, Estland
Elektronenmikroskop Hitachi SU 8030	Hitachi, Tokyo, Japan
Kühlzentrifuge Mikro 200 R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

Tabelle 2.1: Auflistung der verwendeten Geräte (Fortsetzung).

Gerät	Hersteller
Isoelektrische Fokussierung Einheit IEF100	Hofer, Holliston, USA
Varioklav Dampfsterilisator	HP Medizintechnik, Oberschleißheim, Deutschland
Sicherheitswerkbank Tecnoflow	Integra Bioscience, Fernwald, Deutschland
pH - Meter 766 Calimatic	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin
Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-2 LDplus	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen, Osterode, Deutschland
Vakuumkammer für Festphasenextraktion HPLC	Merck, Darmstadt, Deutschland Shimadzu, Kyoto, Japan
LaboStar UV 2 Reinstwassersystem	Siemens, Berlin/München, Deutschland
Sephacryl S-500 HR	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Ikamag RCT (Magnetrührer)	IKA- Werke, Staufen im Breisgau, Deutschland
MS1 Minishaker	IKA- Werke, Staufen im Breisgau, Deutschland
Sartorius BP211D (Präzisionswaage)	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Sartorius CP224S- 0CE (Analysenwaage)	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Thermomixer HLC MKR 13	Science Services, München, Deutschland
Tecan Infinite F200 Microplate Reader	Tecan Group, Männedorf, Schweiz
Kryo- Elektronenmikroskop Talos™ Arctica	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Vakuumzentrifuge Savant™ SPD111V SpeedVac™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Vitrobot	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Tabelle 2.2: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Material	Hersteller
Spritzen 5 ml, 10 ml, 20 ml	B.Braun, Melsungen, Deutschland
Zentrifugengefäße entsprechend Rotortyp (Polycarbonat)	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Spritzenfilter 0.22 µm, 0.45 µm, 0.8 µm	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Zellstofftücher	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TEM-Grids 300 Mesh, <i>Formvar/Carbon coated</i>	Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA

Tabelle 2.2: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien (Fortsetzung).

Material	Hersteller
Pipettenspitzen epT.I.P.S. Standard, 10 µl, 200 µl, 1 ml, 5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße Protein LoBind 0.5 ml/1.5 ml/2.0 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
KIMTECH Labortücher, fusselfrei	Kimberly-Clark, Dallas, USA
HPTLC-Platten mit Nano-Kieselgel Nano-SIL-20 / UV ₂₅₄ , 10 x 20 cm	MACHEREY-NAGEL, Düren, Deutschland
Amicon Ultra-15 Zentrifugen-Filtereinheiten	Merck, Darmstadt, Deutschland
Säulen für Festphasenextraktion Strata ABW	Phenomenex, Torrance, USA
Reaktionsgefäße 15 ml & 50 ml	Sarstädt, Nümbrecht, Deutschland
ReadyLyzer 3, MWCO 12 – 14 kDa	SERVA, Heidelberg, Deutschland
Leersäulen 20 ml & 100 ml	Schott, Mainz, Deutschland

Tabelle 2.3: Auflistung der verwendeten Referenzen.

Referenz	Hersteller
1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
2-Oleoyl-1-palmitoyl-sn-glycero-3- phosphocholin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Aconitin	abcr, Karlsruhe, Deutschland
Acteosid	Phytolab, Vestenbergsgreuth, Deutschland
Albumin, aus bovinem Serum	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Arbutin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Chlorogensäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Curcuminoide	Merck, Darmstadt, Deutschland
Echinacosid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Exosomen Standard	HansaBioMed, Tallinn, Estland
Gallussäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kaffeesäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Nicotin	abcr, Karlsruhe, Deutschland
Phosphatidsäure	Avanti Polar Lipid, Alabaster, USA
Phosphatidylcholin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Phosphatidylethanolamin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Phosphatidylinositol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Phosphatidylserin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Protein-Molekulargewichtsmarker für die SDS-PAGE; Roti®-Mark Standard	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 2.3: Auflistung der verwendeten Referenzen (Fortsetzung).

Referenz	Hersteller
Protein-Molekulargewichtsmarker für die SDS-PAGE; Pierce™ ungefärbt	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Sitosterol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Stigmasterol	Merck, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 2.4: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Enzyme.

Chemikalie bzw. Enzym	Hersteller
2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure (MES)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS)	SERVA, Heidelberg, Deutschland
3,3'-Dihexyloxycarbocyaniniodid (DiOC ₆)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Agar Agar	SERVA, Heidelberg, Deutschland
Agarose	SERVA, Heidelberg, Deutschland
Ammoniumpersulfat	SERVA, Heidelberg, Deutschland
Bomphenolblau	GE Healthcare, Chicago, USA
Bradford-Assay ROTI® Nanoquant	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Cellulase „Onozuka“ RS aus <i>Trichoderma viride</i> ca. 2 $\frac{\text{U}}{\text{mg}}$	SERVA, Heidelberg, Deutschland
Coomassie Brilliant Blau R-250	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dithioerythritol	SERVA, Heidelberg, Deutschland
Dulbecco-modifiziertes Eigel-Medium (DMEM)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Dodecyl- β -D-maltosid (DDM)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fetales bovines Serum (FBS) „Superior“	Biochrom, Berlin, Deutschland
Glycerol	VWR, Radnor, USA
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Harnstoff	SERVA, Heidelberg, Deutschland
Immersionsöl „HPE IPG Overlay“	SERVA, Heidelberg, Deutschland
Iodacetamid	SERVA, Heidelberg, Deutschland
Kupfer-(II)-sulfat-pentahydrat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
4x Lämmli Buffer	Bio Rad Laboratories, Hercules, USA
Lösungsmittel (Acetonitril, Methanol, etc.)	VWR, Radnor, USA

Tabelle 2.4: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Enzyme (Fortsetzung).

Chemikalie bzw. Enzym	Hersteller
Macerozym R-10 aus <i>Rhizopus sp. ca.</i> 0.5 $\frac{\text{U}}{\text{mg}}$ (Pektinase)	SERVA, Heidelberg, Deutschland
Murashige und Skoog Minimal-Pulvermedium	SERVA, Heidelberg, Deutschland
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat Pellets	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhypochloritlösung, 5 % aktiver Chlor	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	SERVA, Heidelberg, Deutschland
Konzentrat für phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Pankreatin USP (Schweinepankreas)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Pierce TM Bicinchoninsäure (BCA) Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Phosphorsäure 85 %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure 35 %	VWR, Radnor, USA
Servalyt pH 3-10	SERVA, Heidelberg, Deutschland
Sucrose	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin für Massenspektrometrie aus porcinem Pankreas	SERVA, Heidelberg, Deutschland
<i>Total Exosome Isolation Kit (from cell culture media)</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
UranylLess	Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA

Tabelle 2.5: Herkunft des verwendeten Pflanzenmaterials.

Pflanzenmaterial	Konsti- tution	Herkunft
<i>Aconiti tuber, Aconitum napellus L.</i>	Droge ¹	Alfred Galke, Bad Grund, Deutschland
<i>Belladonnae folium, Atropa belladonna L.</i>	Droge	Alfred Galke, Bad Grund, Deutschland

¹ Anmerkung: In der vorliegenden Dissertation wird der Begriff „Droge“ im pharmazeutischen Sinne für getrocknetes Pflanzenmaterial verwendet.

Tabelle 2.5: Herkunft des verwendeten Pflanzenmaterials (Fortsetzung).

Pflanzenmaterial	Konstitution	Herkunft
<i>Betulae folium, Betula pendula</i> ROTH und/oder <i>Betula pubescens</i> EHRH.	Droge	Alfred Galke, Bad Grund, Deutschland
<i>Chelidonii herba, Chelidonium majus</i> L.	Droge	Alfred Galke, Bad Grund, Deutschland
<i>Citrus limon</i> (L.) OSBECK (Frucht, Presssaft)	frisch	Supermarkt
<i>Citrus sinensis</i> (L.) OSBECK (Frucht, Presssaft)	frisch	Supermarkt
<i>Craterostigma plantagineum</i> HOCHST.	Callus	Luxembourg Institute of Science and Technology
<i>Curcumae longae rhizoma, Curcuma longa</i> L.	Droge	Alfred Galke, Bad Grund, Deutschland
<i>Curcumae zanthorrhizae rhizoma, Curcuma zanthorrhiza</i> ROXB.	Droge	Alfred Galke, Bad Grund, Deutschland
<i>Hedera helix</i> L. (Blätter)	frisch	Botanischer Garten Berlin, ohne Akzessionsnummer*
<i>Nicotiana tabacum</i> L. (Blätter)	frisch & getrocknet	Anzucht aus Samen aus dem Botanischen Garten Berlin, Akzessionsnummer 107-01-95-14
<i>Nicotiana tabacum</i> L.	Callus	AG Prof. Dr. A. Matkowski, pharmazeutische Biologie, Medizinische Universität Breslau
<i>Solanum lycopersicum</i> L. „Moneymaker“ (Blätter und homogenisierte Früchte)	frisch	Anzucht aus zertifiziertem Saatgut
<i>Uvae-ursi folium, Arctostaphylos uva-ursi</i> (L.) SPRENG.	Droge	Alfred Galke, Bad Grund, Deutschland
<i>Vincae minoris herba, Vinca minor</i> L.	Droge	Alfred Galke, Bad Grund, Deutschland
<i>Visci herba, Viscum album</i> L.	Droge	Alfred Galke, Bad Grund, Deutschland
<i>Visci herba, Viscum album</i> L.	frisch	Botanischer Garten Berlin, ohne Akzessionsnummer*
<i>Vitis vinifera</i> L. (Früchte, Homogenisat)	frisch	Supermarkt
<i>Zingiberis rhizoma, Zingiber officinale</i> ROSCOE	Droge	Alfred Galke, Bad Grund, Deutschland

*Spezies durch Abgleich mit der Arzneipflanzensammlung des Instituts für Pharmazie der Freien Universität Berlin bestimmt.

3 Methoden

3.1 Ausgangsmaterial

3.1.1 Apoplastisches Fluid

Als Apoplast werden alle Kompartimente bezeichnet, die sich außerhalb der Plasmamembran befinden. Bei Pflanzen besteht er also aus dem Interzellularraum, sowie den Zellwänden. Der apoplastische Raum ist somit der Aufenthaltsort von EVs. Neben metabolischen und Transportprozessen, finden dort auch Abwehrmechanismen statt. Der physiologische pH-Wert im Apoplasten ist leicht sauer (pH 4.5 – 6.5), da der H⁺-Gradient den Transport von Zuckern, Aminosäuren, Ionen oder sonstigen Nährstoffen ermöglicht [165, 166]. Einige pathogene Mikroorganismen nutzen den pflanzlichen Apoplasten für ihre parasitäre Lebensweise. Sie können durch Verletzungen oder Spaltöffnungen in den Interzellularraum gelangen und sich dort vor Umwelteinflüssen weitgehend geschützt vermehren. Zur Abwehr der Erreger können von der Pflanze vermehrt reaktive Sauerstoffspezies durch extrazelluläre Oxidasen und Peroxidasen gebildet, sowie die Zellwandstruktur durch Quervernetzung und Callose-Abdichtung (Papillen) verstärkt werden [166]. Während diese Abwehrmechanismen allgemein anerkannt sind, ist die Rolle von EVs zur Abwehr von Mikroorganismen noch nicht abschließend geklärt (vgl. Abschnitt 1.4).

Die Isolation von APF erfolgte nach der Methode von O’Leary *et al.* 2014 [167] mit Modifikationen nach Rutter und Innes 2016 [37], sowie Anpassungen an die vorliegenden Labor- und Versuchsbedingungen. Das APF wurde aus Blattmaterial mittels Vakuuminfiltration und anschließender Zentrifugation gewonnen. Hierfür wurden zunächst etwaige oberflächliche Kontaminationen der Blätter mit demineralisiertem Wasser abgewaschen. Sehr große Blätter wurden mit einem Skalpell zerkleinert und erneut gewaschen, um cytosolische Kontaminationen zu minimieren. Anschließend wurden die Blätter mit Zellstofftüchern vorsichtig getrocknet und in eine Saugflasche adäquater Größe überführt. Die Blätter wurden vollständig mit Puffer bedeckt, die Flasche verschlossen und Unterdruck angelegt. Nach 10 Minuten wurde die Saugflasche belüftet und nach weiteren 10 Minuten erneut entgast. Der Fortschritt der Infiltration konnte durch Verdunklung der Blattfarbe visuell verfolgt werden. Der Vorgang des Be- und Entlüftens wurde so lange wiederholt, bis die Blätter gänzlich dunkelgrün gefärbt waren, bzw. sich keine Änderung mehr zeigte (s. Abb. 3.1). Durch den reduzierten Druck in dem Ansatz wurde dem Blatt das apoplastische Gasvolumen durch die Spaltöffnungen hindurch entzogen. Nachdem wieder Atmosphärendruck herrschte, füllte sich dieser Gasraum mit dem das Blatt umgebenden Puffer (s. Abb. 4.1) [165, 167]. Als Puffer wurde der schwach saure Vesikel-Isolationspuffer (VIB) verwendet, da sein pH-Wert im physiologischen pH-Bereich des Apoplasten (pH 4.5 – 6.5) liegt und damit wenig Schäden an Zellen bzw. Zellwänden zu erwarten waren [37, 165].

Die infiltrierten Blätter wurden erneut mit Zellstoff getrocknet, vorsichtig gerollt und in eine 20 ml Spritze, deren Kolben zuvor entfernt wurde, gebracht. Diese Spritze wurde in ein 50 ml Reaktionsgefäß eingesetzt. Die so präparierten Blätter wurden für 15 min bei 4000 x g und 4°C im Ausschwingrotor zentrifugiert, um das APF zu gewinnen.

Die Pflanzen wurden entweder vom Botanischen Garten Berlin bereitgestellt, oder im Gewächshaus des Instituts für Pharmazie der Freien Universität Berlin angezogen. Die Anzucht erfolgte



Abbildung 3.1: Abdunkeln der Blattfarbe durch Vakuuminfiltration. Im Verlauf der Vakuuminfiltration (von links nach rechts) werden zunächst einige Areale dunkler, bis letztlich das gesamte Blatt dunkelgrün und durchscheinend ist.

aus kommerziell erhältlichem, zertifiziertem Saatmaterial bzw. aus Samen, die vom Botanischen Garten Berlin zur Verfügung gestellt wurden.

3.1.2 Homogenisate

Für die Isolation von Nanovesikeln aus anderen frischen Pflanzenteilen als Blättern (z.B. aus Früchten oder Rhizomen) wurde das Pflanzenmaterial zerkleinert. Je nach Beschaffenheit wurden dazu Mörser und Pistill oder ein Stabmixer verwendet. Das so entstandene Homogenisat wurde je nach Viskosität mit einer adäquaten Menge Puffer versetzt und anschließend daraus Vesikel isoliert.

Zur Isolation von Nanovesikeln aus getrocknetem Pflanzenmaterial wurden die Drogen zunächst pulverisiert. Um die Vesikel zu rehydratisieren wurde eine 10-prozentige (m/V) Suspension der Droge in Puffer hergestellt und über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Isolation vorgenommen (s. Abschnitt 3.3).

3.1.3 Calluskultur

Calli sind amorphe lockere Ansammlungen dünnwandiger Zellen. Die Bildung dieses parenchymatischen Gewebes ist in der Regel das Resultat einer Verletzung und kann von beinahe jedem Pflanzenteil ausgehen. Dieses unorganisierte Callusgewebe besteht aus differenzierten Zellen, von denen ausgehend sich wenig- bzw. undifferenzierte Zellen (s. Abb. 3.2) bilden und dient dem Wundverschluss. Unter bestimmten Bedingungen kann Callusgewebe in bzw. auf Nährmedien, die meist Auxine und/oder Cytokinine als Wachstumshormone enthalten, steril kultiviert werden [166, 168].

Das untersuchte Probenmaterial wurde dabei freundlicherweise von zwei Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt. Frau Dr. Agata Janik-Polanowicz aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Adam Matkowski der Abteilung für pharmazeutische Biologie an der Medizinischen Universität Breslau kultivierte Callus von *Nicotiana tabacum* L. und Frau Dr. Gea Gerriero vom Luxembourg Institute of Science and Technology kultivierte *Craterostigma plantagineum* HOCHST. Untersucht



Abbildung 3.2: Calluskultur. Unorganisierte Ansammlung wenig- bis undifferenzierter Zellen, die dem Wundverschluss dienen und in oder auf Nährmedien kultiviert werden können.

wurden sowohl die Zellkulturüberstände, die der Definition gemäß EVs enthielten, sowie das eigentliche Callusgewebe, aus dem Nanovesikel isoliert wurden. Das Callusgewebe wurde im Mörser zerkleinert und mit Puffer versetzt.

3.1.4 Aseptische Anzucht von Pflanzenmaterial

Um Tabakpflanzen (*N. tabacum*) unter aseptischen Bedingungen anzuziehen, wurde das Nährmedium nach Murashige und Skoog [169] ausgewählt. Hierzu wurde das Murashige und Skoog Minimal-Pulvermedium entsprechend den Herstellerangaben mit $30 \frac{\text{g}}{\text{l}}$ Sucrose und $8 \frac{\text{g}}{\text{l}}$ Agar Agar versetzt, in Wasser heiß gelöst und anschließend in 1550 ml WECK®-Sturzgläser RR100 gegeben, sodass diese etwa 5 cm hoch gefüllt waren. Die Gläser wurden verschlossen und mit heißem Wasserdampf bei 121°C und 2 bar Druck für 20 min autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die zuvor desinfizierten Samen auf den Nährboden aufgebracht. Hierfür wurden die Gläser unter der Sicherheitswerkbank geöffnet, je ein Samen auf den Nährboden gelegt und die Gläser wieder verschlossen. Der Spalt zwischen Korpus und Deckel des Glases wurde dabei mit Parafilm abgedichtet. Zur Desinfektion der Samen wurden diese 30 min in Natriumhypochloritlösung ($\approx 5\%$ aktiver Chlor) inkubiert und anschließend mit steril filtriertem Wasser gewaschen [170]. Die so vorbereiteten Gläser wurden täglich für 12 h mit 12 W LED Pflanzenlampen beleuchtet (s. Abb. 3.3).

3.2 Puffer der Vesikelisolation

In der Regel wurden die Nanovesikel in VIB isoliert, da dieser für die Isolation von APF verwendet wurde und zunächst kein Anlass zur Verwendung verschiedener Puffer bestand. Bei der Analytik sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe spielt der pH-Wert jedoch nicht selten eine entscheidende Rolle, da einige Sekundärmetabolite sauer, andere alkalisch reagieren. Daher wurde neben VIB mitunter auch eine Tris-gepufferte Salzlösung (TBS) mit einem pH-Wert von 8.0 verwendet. Sollten Alka-

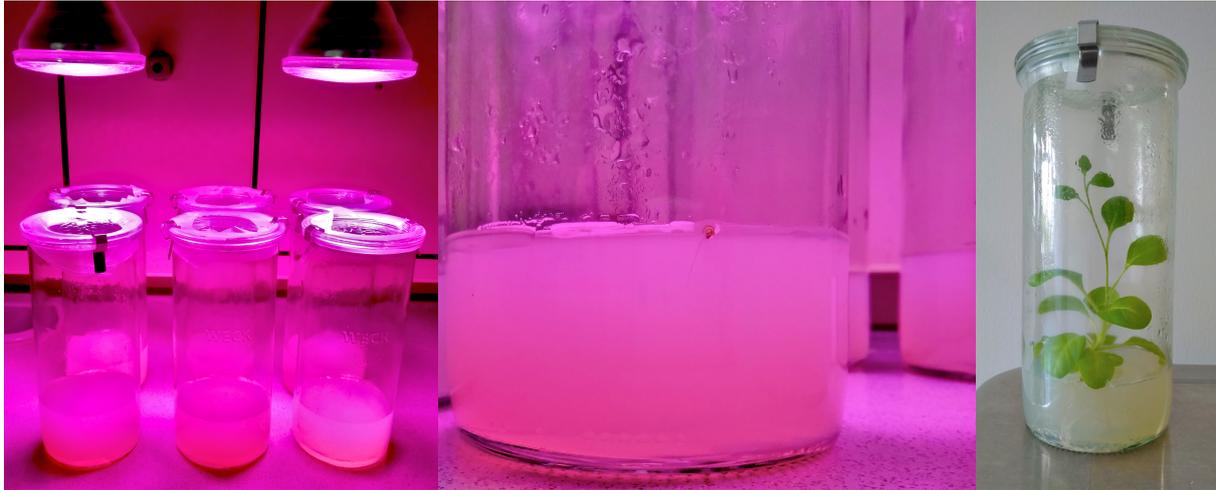


Abbildung 3.3: Aseptische Anzucht von *Nicotiana tabacum*.

loide untersucht werden, so wurde saurer VIB zur Isolation der Nanovesikel genutzt und analog alkalische TBS für die Untersuchung von sauren Sekundärmetaboliten (vgl. Abschnitt 4.3.6.1). Eine weitere Anforderung an den Puffer stellte die Inhibition von eventuell vorhandenen Proteasen dar. Metalloproteasen wurden durch den Zusatz von EDTA inaktiviert. Um Serin- und Cysteinproteasen zu inaktivieren, wurde Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) zugesetzt, s. Tab 3.1. Da PMSF in wässrigen Lösungen nur wenig stabil ist (Halbwertszeit bei Raumtemperatur ca. 1 h), wurde dieses stets kurz vor Verwendung des Puffers hinzugesetzt und letzterer kühl gelagert, um die Zersetzungsreaktion zu verlangsamen. Aufgrund der Toxizität von PMSF wurde dieses nicht verwendet, wenn Untersuchungen in der Zellkultur durchgeführt werden sollten. Eine weitere Maßnahme zur Reduktion von proteolytischem Verdau war die Einhaltung einer Kühlkette. So wurden die Proben stets im Kühlschrank bzw. auf Eis zwischengelagert. Für längere Lagerzeiten wurden die Proben aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

Um ein Platzen der Vesikel aufgrund des osmotischen Druckes in demineralisiertem Wasser zu verhindern, wurde den Puffern Natriumchlorid zugesetzt. Salze von mehrwertigen Kationen wurden nicht verwendet, da diese mit dem EDTA-Zusatz interferieren würden. Tab 3.1 fasst die Bestandteile der verwendeten Puffer zusammen. Um die Ausbeute an Nanovesikeln bei der Isolation zu erhöhen, wurde ein Puffer verwendet, dem Cellulase und Pektinase (= Macerozym) zugesetzt worden sind. Diese Enzyme dienen der Auflösung der Zellwand bzw. der Minderung von deren Integrität, mit dem Ziel die Nanovesikel leichter aus dem apoplastischen Raum zu extrahieren zu können.

Die Zusammensetzung des Cellulase-Macerozym-Puffers (CMB) orientierte sich dabei an Puffern zur Isolation von Protoplasten [171, 172]. Für den Fall, dass ein human-physiologischer pH-Wert eingestellt werden sollte, wurde ein Puffer mit 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) und pH 7.4 verwendet.

Tabelle 3.1: Zusammensetzungen der verwendeten Puffer.

VIB	CMB	HEPES	TBS
20 mM MES	20 mM MES	20 mM HEPES	100 mM Tris
100 mM NaCl	20 mM NaCl	100 mM NaCl	100 mM NaCl
10 mM EDTA	5 mM EDTA	10 mM EDTA	10 mM EDTA
10 M NaOH q.s. (pH 5.5)	400 mM Mannitol	10 M NaOH q.s. (pH 7.4)	10 % HCl q.s. (pH 8.0)
0.5 mM PMSF (frisch)	0.25 % Cellulase 0.25 % Macerozym 10 M NaOH q.s. (pH 5.5)	0.5 mM PMSF (frisch)	0.5 mM PMSF (frisch)

CMB Cellulase-Macerozym-Puffer; EDTA Ethylendiamintetraessigsäure; MES 2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure; HEPES 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure; PMSF Phenylmethylsulfonylfluorid; Tris Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan.; TBS Tris-gepufferte Salzlösung; VIB Vesikel-Isolationspuffer

3.3 Isolation pflanzlicher Nanovesikel

Verschiedene Methoden zur EV-Isolation wurden in Positionspapieren der ISEV vorgestellt und bewertet [15, 173]. Daraus wurden im Rahmen der vorliegenden Dissertation die nachfolgend erörterten Isolationsmethoden für die Präparation pflanzlicher Nanovesikel als potenziell geeignet eingeschätzt und durchgeführt.

3.3.1 Differentielle Zentrifugation

Die Grundlage für die Aufarbeitung von Proben mittels Zentrifuge wird durch das Stokes'sche Sedimentationsgeschwindigkeitsgesetz (Gl. 1) gebildet [174, 175]. Diese zeigt die Abhängigkeit der Sedimentationsgeschwindigkeit des Partikels v_p vom Partikelradius r_p , der Differenz aus der Partikeldichte ρ_p und der Dichte des Fluids ρ_f , der Viskosität des Fluids η_f , sowie der Beschleunigung g .

$$v_p = \frac{2r_p^2 g (\rho_p - \rho_f)}{9\eta} \quad (1)$$

Bei der differentiellen Zentrifugation wird ausgenutzt, dass große und dichte Partikel schneller sedimentieren als kleine Partikel und solche mit geringerer Dichte. Die Zentrifugalbeschleunigung wird sukzessive erhöht, um immer kleiner werdende Partikel ins Sediment zu überführen [48, 174]. Die dabei wirkende relative Zentrifugalkraft (RCF) ist das Verhältnis aus dem Quadrat der Winkelgeschwindigkeit ω bei einem bestimmten Radius r zur Beschleunigung g (Gl. 2) und wird in der Regel in der Pseudoeinheit xg , dem Vielfachen der Erdbeschleunigung, angegeben. Die Winkelgeschwindigkeit wiederum ist abhängig von der Frequenz f bzw. der Drehzahl, die für Zentrifugen meist in Umdrehungen pro Minute (RPM) angegeben wird (Gl. 3). Mit der resultierenden Gl. 4 und dem rotorspezifischen Radius kann aus der Drehzahl die entsprechende RCF berechnet werden [175, 176].

$$RCF = \frac{r \omega^2}{g} \quad (2)$$

$$\omega = 2\pi f = 2\pi \frac{RPM}{60} \quad (3)$$

$$RCF = \frac{r \left(2\pi \frac{RPM}{60}\right)^2}{g} \quad (4)$$

Die Berechnung der RCF ist erforderlich, wenn unterschiedliche Geräte bzw. Rotoren verwendet werden bzw. um Angaben aus der Literatur auf die vorliegenden Laborbedingungen anzupassen. Der Radius des verwendeten Rotors beeinflusst die RCF maßgeblich. Auch innerhalb des Zentrifugengefäßes unterscheidet sich die RCF beachtlich. Beispielsweise herrschen in einem JA 25.50 Festwinkelrotor bei einer Drehzahl von rund 20 000 RPM am Innenradius etwa 18 000 x g und gleichzeitig wirkt am äußeren Radius die 50 000-fache Erdbeschleunigung.

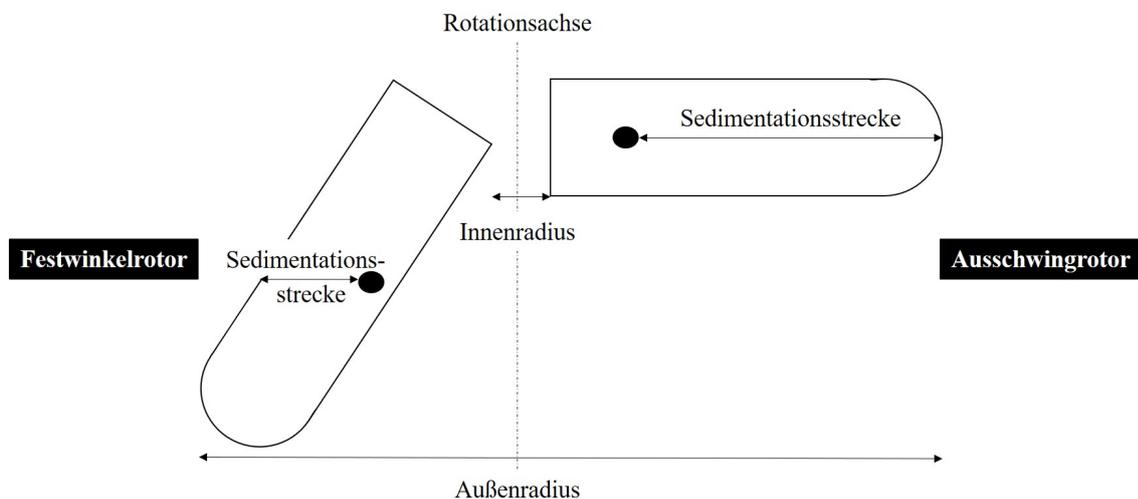


Abbildung 3.4: Vergleich von Festwinkel und Ausschwingrotor. Während im Festwinkelrotor ein kleineres Gefälle der relativen Zentrifugalkraft und eine im Mittel kürzere Sedimentationsstrecke vorliegen, eignet sich der Ausschwingrotor aufgrund des Verlaufs der Sedimentationsstrecke durch das gesamte Zentrifugengefäß für die Dichtegradientenzentrifugation.

Zusätzlich beeinflusst der verwendete Rotortyp (Ausschwing- oder Festwinkelrotor) die Zentrifugation, da die Partikel im Festwinkelrotor eine kürzere Strecke zurücklegen müssen als im Ausschwingrotor. In letzterem herrscht ein größeres RCF-Gefälle, da der 180° Winkel (im Festwinkelrotor ca. 35°) eine größere Differenz zwischen Innen- und Außenradius ergibt. Der 180° Winkel und der daraus resultierende Verlauf der Sedimentationsstrecke durch das gesamte Zentrifugengefäß eignet sich gut für die Dichtegradientenzentrifugation, kann aber auch für die differentielle Zentrifugation verwendet werden (s. Abb. 3.4).

In die Aufarbeitung einer Probe mittels Zentrifuge fließen also viele verschiedene Parameter ein und es sind komplexe Berechnungen möglich, beispielsweise um die Zentrifugationszeit festzulegen. Diese ist abhängig vom k-Faktor, der wiederum rotorspezifisch ist [174, 177]. Daraus folgt, dass die Probenvorbereitung mitunter gewisse Anpassungen erfordert und nicht uneingeschränkt aus der Literatur übernommen werden kann. Um Dichte und Viskosität des Fluids konstant zu

halten, wurden alle Zentrifugationsschritte bei 4°C durchgeführt und die Lösungen entsprechend vorgekühlt. Für die vorliegende Dissertation zeigten sich die nachfolgend erläuterten Parameter als geeignet, um pflanzliche Nanovesikel zu isolieren (s. Abb. 3.5).

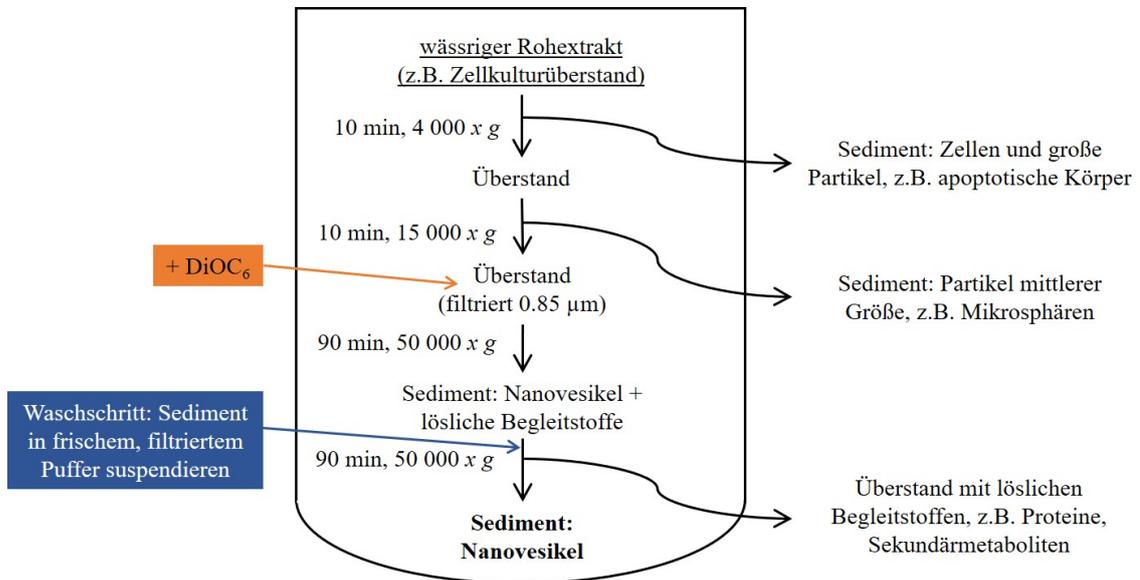


Abbildung 3.5: Fließschema der differentiellen Zentrifugation. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Der Membranfarbstoff 3,3'-Dihexyloxycarbocyanin Iodid (DiOC_6) wurde optional zugegeben (Endkonzentration $\approx 2 \mu\text{M}$), wenn das Sediment nicht anders erkennbar war.

Begonnen wurden die Isolationen mit einer niedrigen RCF (4 000 x g, 10 min, Zentrifuge: Beckman Allegra X30R, Rotor: SX4400), um unlösliche anorganische Begleitstoffe, Zellen und große Partikel wie apoptotische Körper, von dem wässrigen Rohextrakt abzutrennen. Dieser Rohextrakt war je nach Ausgangsmaterial APF, ein Homogenisat oder Zellkulturüberstand. Das Sediment der 4 000 x g Zentrifugation wurde verworfen, der Überstand bei 15 000 x g zentrifugiert und dabei Partikel mittlerer Größe, z.B. Mikrosphären, abgetrennt. Das Sediment wurde wiederum verworfen und der Überstand durch einen Spritzenfilter mit 0,85 µm Porengröße filtriert, um die restlichen noch im Ansatz verbliebenen Partikel abzutrennen. Optional wurde der Membranfarbstoff 3,3'-Dihexyloxycarbocyaniniodid (DiOC_6) in einer Endkonzentration von ca. 2 µM zugesetzt, um das Sediment besser erkennen zu können. Das Filtrat wurde bei 50 000 x g zentrifugiert (90 min, Zentrifuge: Beckman Avanti J-26 S XP, Rotor: JA 25.50). Anschließend wurde der Überstand (S I) abgenommen und als Referenzprobe aufbewahrt. Das Sediment beinhaltete nun vorwiegend die Nanovesikel. Um diese zu waschen und lösliche Begleitstoffe wie Proteine aber auch Sekundärmetaboliten usw. weitestgehend zu entfernen, wurden die Nanovesikel in frischem, filtriertem Puffer wieder suspendiert und erneut bei 50 000 x g zentrifugiert. Das Sediment enthielt nun die angereicherten und gewaschenen Nanovesikel. Der Überstand (S II) wurde ebenfalls als Referenzprobe aufbewahrt.

3.3.2 Ultrafiltration

Bei der Ultrafiltration durch eine Membran mit einer Ausschlussgröße von 100 kDa oder kleiner werden Exosomen, sowie größere Vesikelspezies effektiv von der Membran zurückgehalten [178]. Üblicherweise werden Ausschlussgrößen von 100 kDa verwendet, um möglichst viele Begleit-

stoffe mit dem Durchfluss abzutrennen. Bei der Versuchsdurchführung wurden Amicon Ultra-15 Zentrifugen-Filtereinheiten mit einer Ausschlussgröße von 100 kDa verwendet. Diese wurden zunächst mit TBS äquilibriert und anschließend mit 15 ml Probe beladen. Dabei handelte es sich um einen wässrigen Extrakt aus getrocknetem und pulverisiertem *Curcuma zanthorriza* Rhizom. Das Drogenmaterial wurde über Nacht in TBS rehydratisiert, anschließend bei 4 000 x g und 20 000 x g zentrifugiert und durch einen 0.85 µm Spritzenfilter filtriert. Nach dem Beladen der Filtereinheit wurde diese zentrifugiert und das Retentat mit TBS gewaschen und erneut zentrifugiert bis das Volumen des Retentats etwa 1.5 ml eingenommen hatte.

3.3.3 Größenausschlusschromatographie

Eine weitere Möglichkeit zur Isolation von Nanovesikeln stellt die Größenausschlusschromatographie (SEC) dar [15, 173, 179]. Hierbei wird ein Gemisch aufgrund unterschiedlicher Partikelgrößen an einer porösen Matrix aufgetrennt. Kleine Partikel können die Matrix penetrieren und werden somit stärker retiniert als große Partikel [180]. Eine Vielzahl an Matrices ist im Handel erhältlich, um genau auf den jeweiligen Analyten abgestimmt werden zu können. Für die vorliegende Dissertation wurden SEC-Säulen verschiedener Größe (5, 10 und 75 ml) selbst mit der Matrix Sephacryl S-500 HR gepackt. Das Auftragsvolumen wurde an das Säulenvolumen angepasst (1 – 2 % des Säulenvolumens). Als Eluens wurde PBS verwendet. Der Ablauf der Vorgehensweise wird in Abschnitt 4.2.3 mit den jeweiligen Resultaten erörtert.

3.3.4 Polymerbasierte Präzipitation von Vesikeln

Im Handel sind Exosomen-Isolations-Kits erhältlich, die für die Isolation pflanzlicher Nanovesikel als potenziell geeignet eingeschätzt wurden. Diese Kits sind zur Anreicherung intakter Exosomen aus Zellkulturmedien, Plasma, Serum oder Urin konzipiert. Die genaue Zusammensetzung ist nicht bekannt, nur dass sie Polymere, meist Polyethylenglykol, enthalten. Diese Polymere binden Wasser und zwingen schlecht lösliche Komponenten wie Vesikel, aber auch Proteine, aus der Lösung. Diese können anschließend bei vergleichsweise niedriger RCF gesammelt werden [173, 181]. Hierfür wurde zu zwei Teilen filtriertem (0.85 µm, um Mikrosphären und sonstige Partikel abzutrennen) Zellkulturüberstand, APF etc. ein Teil des Polymerreagenzes zugesetzt. Das Gemisch wurde über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend bei 4°C und 10 000 x g für 60 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in PBS resuspendiert.

3.3.5 Tangentialflussfiltration

Im Verlauf der Bearbeitungszeit der vorliegenden Dissertation wurde neben den bereits beschriebenen Methoden zur Vesikelisolation die Tangentialflussfiltration als weitere Option eingeführt. Dabei strömt die Probe, aus der z.B. Vesikel gewonnen werden soll, in Längsrichtung (tangential) an einer Membran entlang. Die Vesikel können die Membran nicht passieren, Wasser, kleinere Partikel und gelöste Stoffe gelangen jedoch hindurch und so werden die Vesikel aufkonzentriert [182]. Verwendet wurden Tangentialflussfilter, die speziell für die Gewinnung von EVs bis 150 nm (TFF-Easy) bzw. von größeren EVs (TFF-MV) entwickelt wurden.

Die Tangentialflussfilter wurden verwendet, um EVs aus APF und aus Zellkulturüberständen der

Calluskultur von *N. tabacum* zu isolieren. Das jeweilige Fluid wurde zunächst filtriert (0.85 μm), um Zellreste bzw. sonstige größere Partikel abzutrennen. Anschließend wurde der Tangentialflussfilter TFF-MV verwendet, um große EVs aufzukonzentrieren. Aus dem Permeat wurden dann die kleinen EVs mittels TFF-Easy gewonnen.

3.4 Analytik isolierter Nanovesikel

3.4.1 Elektronenmikroskopie

Um überprüfen zu können, ob tatsächlich vesikuläre Strukturen isoliert wurden, musste eine geeignete Methode zur Visualisierung etabliert werden. Die Standardmethode für diesen Zweck stellt die Elektronenmikroskopie dar, denn die Lichtmikroskopie wird durch die Wellenlänge des Lichts limitiert. Lichtmikroskope, einschließlich Konfokalmikroskope, stoßen bei etwa 200 nm oder etwas darunter an ihre Grenzen [183, 184]. Während die Wellenlänge des Lichts nicht beeinflusst werden kann, hängt die Wellenlänge von Elektronen von der angelegten Beschleunigungsspannung ab. Nach De-Broglie kann die Wellenlänge der Materiewelle $\lambda_{De-Broglie}$ eines Teilchens berechnet werden (s. Gl. 5). Der Zusammenhang zwischen Beschleunigungsspannung U_e und Teilchengeschwindigkeit v_e ergibt sich aus Gl. 6.

$$\lambda_{De-Broglie} = \frac{h}{m_e \cdot v_e} \quad (5)$$

$$v_e = \sqrt{\frac{2U_e}{m_e}} \quad (6)$$

h Planck'sches Wirkungsquantum ($6.626 \cdot 10^{-34} \text{J} \cdot \text{s}$), m_e Masse des Teilchens

Bei, in der Elektronenmikroskopie üblichen, Beschleunigungsspannungen zwischen 20 und 100 kV ergeben sich damit Wellenlängen von 0.0086 – 0.0037 nm. Diese sind um Faktor 10^5 kürzer als die des sichtbaren Lichts. Aufgrund von Linsenfehlern ergeben sich praktisch letztlich Auflösungen von etwa 100 pm [183]. Bei Höchstauflösungsgeräten konnten bereits Auflösungen unter 50 pm erreicht werden [185].

Im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) liegt der Detektor unterhalb der Probe. Das dort in ein Bild umgewandelte Signal ergibt sich aus der Abschwächung des Primärelektronenstrahls durch Streuung und Absorption in der Probe. Währenddessen befindet sich der Detektor im Rasterelektronenmikroskop (REM) oberhalb der Probe und zeichnet das Auftreffen von Sekundärelektronen auf. Sekundärelektronen entstammen den Elektronenhüllen des Probenmaterials. Sie werden vom Primärelektronenstrahl aus ihrer Hülle herausgeschlagen und können von den Primärelektronen unterschieden werden, da sie weniger energiereich sind. Um ein Bild zu erzeugen wird der Primärelektronenstrahl auf einen einzigen Punkt der Probe fokussiert und das Signal aufgenommen. So wird die Probe Punkt für Punkt abgerastert, bis ein vollständiges Bild entsteht [183].

Aus der Funktionsweise der Geräte ergeben sich jedoch insbesondere bei biologischen Proben, z.B. Nanovesikel, gewisse Einschränkungen. So muss die Probe für das REM auf einen elektronenleitenden Untergrund aufgebracht werden. Hierfür werden in der Regel Siliciumscheiben

(*Si-wafer*) verwendet. Die Probe wird hierfür auf die Scheibe pipettiert und eingetrocknet. Allerdings muss die Probe dabei salzfrei sein, da Salze anderenfalls auskristallisieren und die Probe überdecken können. Um die Vesikelisolate zur entsalzen wurden sie mittels SERVA ReadyLyzer 3 Dialysiersystem mit einer molekularen Ausschlussgröße von 12–14 kDa über Nacht in demineralisiertem Wasser dialysiert.

Die wesentlichste Einschränkung des TEM ist, dass organische Verbindungen vorwiegend aus Kohlenstoff, Wasserstoff, Sauerstoff und Stickstoff bestehen und diese Elemente vergleichsweise kleine Elektronenhüllen besitzen. Somit erzeugen die Proben selbst in der Regel nur wenig Absorption und Streuung. Daher wird der Kontrast bei biologischen Proben häufig mit Schwermetallsalzlösungen erhöht. Die Schwermetallsalze lagern sich dabei auf der Beschichtung der TEM-Gitter (*grids*) ab, die hierbei als Probenhalter dienen. An denjenigen Stellen, an denen sich Probenmaterial befindet, lagert es sich jedoch nicht ab und es entsteht ein Negativ-Bild [183]. Als Kontrastmittel wurde UranylLess verwendet. Dieses Gemisch aus Lanthanoidsalzen ersetzte das häufig verwendete Kontrastmittel Uranylacetat aufgrund besserer Stabilität und geringerer Toxizität.

Das Protokoll zur Präparation der Proben für das TEM basiert auf der Methode von Rutter und Innes 2017 [37]. Detaillierte Anweisungen wurden von Prof. Dr. Roger W. Innes auf Anfrage freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Diese wurden auf die vorliegenden Laborbedingungen angepasst und wie folgt durchgeführt:

1. Formvar-Carbon beschichtete TEM-Gitter aus Kupfer mit 3 mm Durchmesser (Maschenzahl 300) wurden einzeln in eine selbstschließende Pinzette mit anti-kapillarer Präzisionsspitze gespannt.
2. Auf diese Gitter wurde je ein Tropfen Probe² (2–5 µl) pipettiert und 1 min inkubiert.
3. Überschüssige Probe wurde anschließend vorsichtig mit einem Zellstofftuch (KIMTECH fusselfrei) entfernt und das Gitter 1 min getrocknet.
4. Für die Kontrastierung wurde das Gitter in einem 60° Winkel gehalten, wobei der untere Rand leichten Kontakt zu einem Zellstofftuch hatte. Nun wurden 80 µl des Kontrastmittels UranylLess langsam über das Gitter pipettiert und überschüssige Lösung vorsichtig in Zellstoff aufgenommen.
5. Das Gitter wurde nun 10 min in horizontaler Lage getrocknet um ein Zusammenlaufen am Rand zu verhindern.
6. Anschließend wurde das Gitter in eine dafür vorgesehene Lagerbox gelegt und über Nacht im Exsikkator getrocknet.
7. So vorbereitet konnten die Gitter im Elektronenmikroskop Hitachi SU 8030 bei 30 kV betrachtet werden.

Für die untersuchten Nanovesikel eignet sich ein weiteres Gerät besonders: das Kryo-TEM [186]. Hierbei werden die Proben im wässrigen Medium schockgefroren, sodass das Wasser vitrifiziert

² Die Proteinkonzentration wurde zuvor, soweit möglich, auf ca. 1 000 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ eingestellt

(„verglast“), also erhärtet ohne Kristallstrukturen auszubilden. Im Kryo-TEM selbst werden die Proben anschließend unter Stickstoffkühlung betrachtet. Dies geschieht ohne Additive unter Nutzung des Phasenkontrasts. Hierbei wird die unterschiedliche Ausbreitungsgeschwindigkeit der Elektronen in der Probe bzw. der Matrix und die daraus resultierende Phasenverschiebung ausgenutzt [187]. Erstellt wurden die kryoelektronenmikroskopischen Aufnahmen vom Gerätezentrum BioSupraMol (PD Dr. Christoph Böttcher) mittels Vitrobot (zur Vitrifizierung) und Talos™ Arctica (Kryo-TEM).

3.4.2 Partikelgrößenbestimmung

Zur Partikelgrößenbestimmung von EVs bzw. Nanovesikeln gibt es im Wesentlichen zwei Methoden: die dynamische Lichtstreuung (DLS) und die Nanopartikel Verfolgungsanalyse (*Nanoparticle Tracking Analysis*, NTA). Beide Verfahren basieren auf der Photonenkorrelationsspektroskopie. Dabei wird ein Laserstrahl durch eine Dispersion von Partikeln geleitet und dieser von den Partikeln gestreut. Das gestreute Signal wird detektiert und daraus die Partikelgeschwindigkeit bestimmt. Aus der Partikelgeschwindigkeit wird wiederum die Diffusionskonstante und über die Stokes-Einstein-Gleichung letztlich die Partikelgröße berechnet. Die Grundlage bildet die Brown'sche Molekularbewegung. Dabei stoßen Lösungsmittelteilchen mit dispergierten Partikeln zusammen und übertragen bei dem Stoß Energie und Impuls auf die Partikel. Im Mittel wird die gleiche Energie zwischen den Lösungsmittelteilchen und den Partikeln ausgetauscht, alle Partikel erhalten also die gleiche kinetische Energie. Da größere Partikel eine größere Masse aufweisen, ist ihre Geschwindigkeit geringer [188]. DLS und NTA unterscheiden sich im Aufbau und der Detektion. Während bei der DLS das Streulicht von einem Photoelement detektiert wird [188], ist die NTA grundsätzlich wie ein Mikroskop aufgebaut. Die Lichtquelle ist dabei der Laser und das entstehende Bild wird von einer Kamera (s. Abb. 3.6) aufgenommen. Mittels Software werden nun die einzelnen Partikel verfolgt („*tracking*“) und die Partikelgröße berechnet [189].

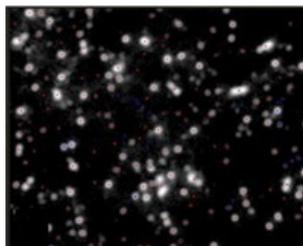


Abbildung 3.6: Beispiel für die Nanopartikel Verfolgungsanalyse [189].

Während es sich bei der NTA um eine Einzelpartikelanalyse handelt, wird bei der DLS das von vielen Partikeln gestreute Licht detektiert. Hierbei überlagern sich die verschieden gestreuten Wellen und interferieren zu einer bestimmten Streuintensität. Werden mehrere Messungen innerhalb kurzer Zeit durchgeführt, haben sich kleine Partikel schneller weiterbewegt als große. Die Dispersion muss für die Messung ausreichend verdünnt sein, damit ein Lichtstrahl nicht an mehreren Teilchen gestreut wird, bevor er detektiert wird. Gleichzeitig darf nicht zu stark verdünnt werden, da sonst kein klares Signal über dem Grundrauschen entsteht [188].

Für die Partikelgrößenbestimmung mittels DLS wurde das Gerät von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Daniel Klinger im Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin zur Verfügung ge-

stellt. Die Vesikelproben wurden zunächst auf eine Proteinkonzentration von etwa $100 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ verdünnt und vermessen. Vor der Messung wurde die Probe mindestens für 10 min bei Raumtemperatur äquilibriert. Ein Messdurchgang bestand aus drei Einzelmessungen über je 1 min. Anschließend wurde die Probe zu gleichen Teilen verdünnt und die Messung wiederholt. Es wurde so oft erneut verdünnt, bis die ermittelte Partikelgrößenverteilung zweier Verdünnungen übereinstimmte bzw. bis das Gerät keine Partikel mehr identifizieren konnte.

3.4.3 Vesikelquantifizierung

Entsprechend der Richtlinien zu minimalen Informationen für Untersuchungen von EVs der ISEV (MISEV 2018 [15]) stehen verschiedene Methoden zur Einschätzung der isolierten Vesikelmenge zur Verfügung. Hierfür können folgende (Surrogat-) Parameter bestimmt werden:

- Partikelanzahl (z.B. NTA, Kryo-TEM, Durchflusszytometrie),
- Gesamtproteinkonzentration (Bradford-, Bicinchoninsäure (BCA)-Assay u.a.),
- Gesamtlipidmenge (Sulfophosphovanilin-Assay, oder fluorimetrisch mit Membranfarbstoffen),
- Gesamt-RNA-Menge,
- Quantifizierung charakteristischer Moleküle (z.B. antikörperbasierte Bestimmung von Oberflächenproteinen).

Die genannten Verfahren wurden bezüglich ihrer Eignung zur Quantifizierung pflanzlicher Nanovesikel und EVs evaluiert (s. Abschnitt 4.3.3). Als Standard-Quantifizierungsmethode wurde die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels PierceTM BCA Protein Assay Kit ausgewählt.

Die Grundlage für diesen Assay bildet die Biuret-Reaktion. Dabei bildet sich im alkalischen Milieu zunächst ein Kupfer-Protein-Chelatkomplex und Cu (II) wird zu Cu (I) reduziert. Dies geschieht vor allem durch die Aminosäuren Cystin, Tyrosin und Tryptophan. BCA reagiert mit dem entstehenden Cu (I) und bildet einen violetten Komplex, dessen Absorptionsmaximum bei 562 nm liegt [190, 191].

Die Bestimmungen wurden mindestens in Triplikaten und gemäß den Vorgaben des Kit-Herstellers in transparenten Mikrotiterplatten (96-Well) durchgeführt. Zur Kalibrierung wurde bovines Serumalbumin als Referenz verwendet und mit dem für die jeweilige Isolation verwendeten Puffer verdünnt. Jede Probe wurde in 3 Verdünnungen (1:2, 1:5 und 1:10) vermessen, um eine Proteinkonzentration innerhalb der Grenzen der Kalibrierung ermitteln zu können. Eine Wiederholung des Versuchs mit weiteren Verdünnungen war nur in Ausnahmefällen nötig. Die Messung der Absorption bei 360 nm erfolgte nach 30 min Inkubation bei 37°C im Tecan Infinite F200 Mikroplatten-Leser.

Für einige Proben war die Empfindlichkeit des BCA-Assays nicht ausreichend bzw. wäre mit zu großem Verbrauch an Probe verbunden gewesen. Für diese Proben wurde der empfindlichere, aber auch störungsanfälligeren Bradford-Assay durchgeführt. Dieser Assay beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums des Triphenylmethanfarbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250

bei Ausbildung eines Farbstoff-Protein-Komplexes [192]. Verwendet wurde ROTI[®]Nanoquant-Lösung gemäß den Herstellervorgaben [193]. Um Störungen zu minimieren, wurden die Proben ausschließlich in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) präpariert bzw. der Proteinstandard (bovines Serumalbumin) für die Kalibrierung mit PBS verdünnt. Die Messung der Absorptionen bei 590 und 450 nm erfolgte in Triplikaten nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur. Der Quotient der Absorptionen ($\frac{A_{590}}{A_{450}}$) wurde dabei gegen die Proteinkonzentrationen der Kalibrierung aufgetragen und aus der resultierenden Kalibrierfunktion die entsprechende Proteinkonzentration für die Proben berechnet.

3.4.3.1 3,3'-Dihexyloxycarbocyaniniodid-basierte Quantifizierung

Zusätzlich zu den genannten Quantifizierungsmethoden wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertation eine neue Methode zur Vesikelquantifizierung konzipiert und deren Anwendbarkeit überprüft. Das Konzept der Methode beruht darauf, dass die Fluoreszenzintensität von Membranfarbstoffen wie DiOC₆ steigt, wenn sie in eine Membran eingelagert werden [194]. Die Hypothese lautete, dass die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der DiOC₆-Konzentration so lange einen großen Anstieg hat, bis die Membran vollständig mit Farbstoff gesättigt ist (Äquivalenzpunkt). Wird die DiOC₆-Konzentration darüber hinaus weiter erhöht, so sollte die Fluoreszenzintensität mit einem kleineren Anstieg zunehmen, wie in Abb. 3.7 dargestellt. Um einen Assay auf dieser Grundlage zu entwickeln, wurde zunächst ein Konzentrationsbereich gesucht, in dem sich DiOC₆-Konzentration und Fluoreszenzintensität linear zueinander verhalten. Anschließend wurden Vesikel, sowie bovines Serumalbumin als Referenz für Proteinverunreinigungen in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt und nach 10 min Inkubation im Dunkeln die Fluoreszenzintensitäten in schwarzen 96-Well-Mikrotiterplatten gemessen. Die Messung erfolgte mittels Tecan Infinite F200 Mikroplatten-Leser bei einer Extinktionswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm.

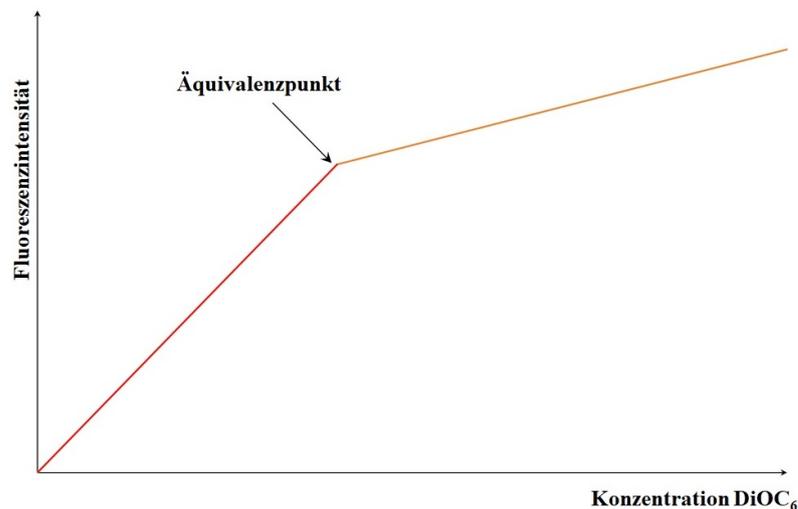


Abbildung 3.7: Hypothese der 3,3'-Dihexyloxycarbocyaniniodid (DiOC₆)-basierten Vesikelquantifizierung. Bis zur Absättigung der Vesikelmembran mit DiOC₆ am Äquivalenzpunkt steigt die Fluoreszenzintensität steil an. Danach flacht der Anstieg ab, da der Farbstoff allein weniger intensiv fluoresziert, als wäre er mit der Membran assoziiert.

3.4.4 Proteinanalytik

Über Proteine in pflanzlichen Vesikelspezies ist bislang wenig nur bekannt (vgl. Abschnitt 1.1.1.2). Um einen Einblick in das Proteom der isolierten Nanovesikel zu erhalten und – soweit möglich – Markerproteine zu identifizieren, wurden die nachfolgend erörterten Verfahren durchgeführt.

3.4.4.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine Standardmethode zur Auftrennung von Proteingemischen anhand ihrer Größe. Sie wurde nach dem Protokoll für diskontinuierliche SDS-PAGE aus „Gentechnische Methoden“ [195] durchgeführt.

Die Denaturierung der Proben in reduzierendem Lämmli-Puffer (9 Volumenteile einer Mischung von 277.8 mM Tris-HCl pH 6.8, 44.4 % (V/V) Glycerol, 4.4 % (m/V) Lithiumdodecylsulfat (LDS) und 0.02 % (m/V) Bromphenolblau vor Gebrauch mit 1 Volumenteil β -Mercaptoethanol gemischt) führt neben der Auffaltung der Proteine auch zur Lyse der Vesikel, da Lithiumdodecylsulfat (LDS) in der mehr als zehnfachen Mizellbildungskonzentration im Lämmli-Puffer enthalten ist und die Lipide emulgiert werden. Gleichzeitig werden Membranproteine reduziert und verlieren ihre Funktionalität. Neben der Lyse der Vesikel ist die Ausbildung von Protein-Dodecylsulfat-Komplexen wichtig, denn sie gewährleistet die Auftrennung der Proteine nach Größe. Für die Denaturierung und Lyse wurden die Proben bei 95°C für 10–15 min geschüttelt. Die Polyacrylamid-Gele wurden mit einer Trenngelkonzentration von 12.5 % (m/V) und einem 5-prozentigen (m/V) Sammelgel hergestellt. Die Polymerisation von Acrylamid und Methylenbisacrylamid erfolgte radikalisch mit Ammoniumpersulfat als Radikalstarter. Der pH-Wert von 6.8 im Sammelgel führt dazu, dass die Proteine sich zwischen dem Leition Chlorid und dem bei pH 6.8 nur schwach negativ geladenen Folgeion Glycin stapeln. Chlorid ist im Sammelgelpuffer (1 M Tris-HCl, pH 6.8) und Glycin im Elektrodenpuffer (14.4 $\frac{g}{l}$ Glycin, 3 $\frac{g}{l}$ Tris, 1 $\frac{g}{l}$ SDS) im Überschuss enthalten. Auf diese Art gelangen alle Proteine annähernd gleichzeitig in das Trenngel, wo Glycin durch den vorliegenden pH-Wert von 8.8 stärker negativ geladen vorliegt und das Gel gemeinsam mit Chlorid deutlich schneller als die Proteine passiert. Durch diesen Gelaufbau werden die Proteinbanden schärfer, als würde nur ein Trenngel verwendet werden [195].

Von jeder Probe wurden in der Regel etwa 20 μ g Gesamtprotein in eine Geltasche und auf jedem Gel ein Proteinstandard aufgetragen. Der Standard diente als Positivkontrolle zur Überprüfung, ob der Versuch erfolgreich verlaufen ist und als Größenvergleich, da das Molekulargewicht der enthaltenen Proteine bekannt ist. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 200 V etwa 45 min durchgeführt. Die Elektrophorese wurde beendet, als das Bromphenolblau des Lämmli-Puffers am unteren Ende des Trenngels angelangt war. Im Anschluss wurden die Gele mit Wasser gewaschen, um überschüssiges SDS zu entfernen und sofort in die Färbelösung nach Neuhoff *et al.* 1988 [196] überführt. Bei dieser kolloidalen Coomassie Färbung werden die Proteine im Gel präzipitiert um eine erneute Diffusion der Proteine zu unterbinden und gleichzeitig gefärbt. Die Zusammensetzung der Lösung kann dem Anhang A.1.1 entnommen werden. Die Gele mit den nun aufgetrennten Proteinen wurden mindestens über Nacht gefärbt und danach die Gelmatrix mit 25 % (V/V) Methanol wieder entfärbt. Bei schwacher Coomassie-Färbung, oder geringem Proteingehalt der Probe wurde die empfindlichere Silberfärbung gemäß Protokoll nach Jansohn und

Rothhämel in „Gentechnische Methoden“ [195] durchgeführt. Die durchgeführte Vorgehensweise ist detailliert im Anhang A.1.2 aufgeführt.

3.4.4.2 Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung (IEF) ist eine weitere gelelektrophoretische Methode zur Auftrennung von Proteingemischen. Das Trennkriterium ist hierbei der isoelektrische Punkt der Proteine. Bei der IEF enthält das Gel ein Gemisch aus Ampholyten, die im elektrischen Feld einen pH-Gradienten ausbilden. Die aufzutrennenden Proteine wandern entsprechend ihrer Ladung in Richtung Anode oder Kathode. Je näher ein Protein seinem isoelektrischen Punkt kommt, desto langsamer wandert es aufgrund der geringer werdenden Nettoladung. Am isoelektrischen Punkt angekommen ist die Nettoladung des Proteins gleich null und es wird dort fokussiert [195].

Die durchgeführte Methode basiert zum Teil auf der Publikation von Carpentier *et al.* 2005 [197]. Deren Vorgehen wurde etwas modifiziert, um sie entsprechend auf die isolierten Nanovesikel anzuwenden. Zunächst wurden die Nanovesikel lyophilisiert. Anschließend wurden 500 µl eines Gemisches aus gleichen Teilen Methanol und Chloroform auf das Lyophilisat gegeben, um die vesikuläre Struktur zu zerstören. Die Probe wurde mindestens 2 h (oder über Nacht) bei -20°C inkubiert und anschließend bei 4°C und 20 000 x g für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und durch 500 µl eines Gemisches aus 4 Teilen Aceton mit 1 Teil demineralisiertem Wasser ersetzt, um sie zu entsalzen. Die Probe wurde erneut für mindestens 2 h bei -20°C inkubiert. Der Überstand wurde wiederum abgenommen und der Entsalzungsschritt zweimal wiederholt.

Der Rückstand wurde in 80 µl Rehydratisierungspuffer (s. Anhang A.1.3.1) aufgenommen, 10 min mit Ultraschall behandelt und 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde für 2 min bei 10 000 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und auf Eis gelagert. Der Rückstand wurde erneut mit 60 µl Rehydratisierungspuffer extrahiert und dieser Überstand mit dem ersten Überstand vereinigt. 130 µl dieses Gemisches wurden 15 min mit den vorgefertigten Gelstreifen (SERVA BlueStrips 7 cm, pH 3 – 10) inkubiert. Anschließend wurden die Streifen mit Immersionsöl bedeckt um ein Austrocknen zu verhindern. Nach der Rehydratation über Nacht wurde das Immersionsöl abgestreift und die Gelstreifen in der IEF-Kammer ausgerichtet. Für den Kontakt zu den Elektroden wurden angefeuchtete Filterstücke an beiden Seiten des Gels positioniert und die Elektroden eingesetzt. Die Streifen wurden nun wiederum mit Immersionsöl bedeckt und die Fokussierung gestartet. Dabei wurde eine Anfangsspannung von 250 V angelegt, diese über 2 h auf die Endspannung von 3 000 V erhöht und dann für 3 h konstant gehalten [195].

Nach Ende der IEF wurde überschüssiges Immersionsöl von den Gelstreifen entfernt und diese jeweils 10 min in Äquilibrierungspuffer I und II (s. Anhang A.1.3.2) unter leichtem Schütteln inkubiert. Dann wurden die Streifen auf ein Trenngel für die SDS-PAGE aufgebracht. Es wurde darauf geachtet, dass beide Gele in direktem Kontakt zueinander standen und der Streifen mit heißer 1-prozentiger (m/V) Agaroselösung auf dem Trenngel fixiert. Es wurde ein Proteinstandard als Größenmarker aufgetragen und die SDS-PAGE gestartet. Die Kombination von IEF mit SDS-PAGE wird als zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-GE) bezeichnet.

3.4.4.3 In-Gel-Verdau und Massenspektrometrie

Durch den In-Gel-Verdau entstehen aus Proteinen Fragmente und aus diesen Peptiden wiederum charakteristische Muster, die massenspektrometrisch identifiziert werden können (Massen-Fingerabdruck) [195].

Nach erfolgter SDS-PAGE wurden ausgewählte Proteinbanden bzw. Spots aus dem Gel herausgeschnitten und entsprechend des Protokolls im Anhang A.1.4 bearbeitet. Das Protokoll für den tryptischen In-Gel-Verdau basiert auf der Methode von Shevchenko *et al.* 1996 [198] und wurde vom Kooperationspartner Dr. Christoph Weise (Freie Universität Berlin, Institut für Chemie und Biochemie, Biomassenspektrometrie) modifiziert. Die Verdauüberstände wurden mittels Matrix-unterstützter Laserdesorption/-ionisation Flugzeitanalyse-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) untersucht und Massenspektren mit Masse-Ladungs-Verhältnissen (m/z) von 600–4 000 aufgenommen. α -Cyano-4-hydroxymizinsäure wurde als Matrix verwendet. Als Datenbank für den Abgleich der Spektren diente Mascot (Matrix Science Ltd., <http://www.matrixscience.com>). Zusätzlich wurden MS/MS-Spektren ausgewählter Peptide erstellt [199]. Die Weiterbearbeitung der Verdauüberstände, einschließlich der eigentlichen massenspektrometrischen Analyse und Datenbankabgleich wurde von Dr. Christoph Weise durchgeführt.

3.4.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wird in der Regel für die Auftrennung von Nukleinsäuren genutzt [195], im Rahmen der vorliegenden Dissertation jedoch als Methode zur simultanen Visualisierung und Reinigung pflanzlicher Nanovesikel etabliert [39]. Hierfür wurden die Vesikel mit einem Überschuss DiOC₆ angefärbt (1 μ l 1 mM DiOC₆ je 25 μ l Probe) und 1 Teil Probe mit 3 Teilen Auftragspuffer gemischt (50 % (V/V) Glycerol, 0,05 % (m/V) Bromphenolblau in Tris-Borat-EDTA-Puffer: 89 mM Tris-Base, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA). Jeweils 25 μ l dieser Mischung wurden in die Taschen eines Agarosegels pipettiert (1 % Agarose in Tris-Borat-EDTA-Puffer). Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 100 V für 60 min durchgeführt. Die Detektion erfolgte mittels Kamera mit 530 nm Bandfilter auf einem UV-Transilluminator.

Die Rückgewinnung der Vesikel aus dem Gel erfolgte analog zu der DNA-Extraktionsmethode nach Sun *et al.* 2012 [200]. Hierfür wurde das Gel sektioniert und die ausgeschnittenen Segmente in ein 500 μ l Reaktionsgefäß gebracht. Dieses Gefäß wurde zuvor mit einer Kanüle am Boden perforiert und die Perforation mit wenig Watte bedeckt (s. Abb. 3.8). Das mit dem Gel bestückte 500 μ l Reaktionsgefäß wurde in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß eingesetzt und für 20 min bei 4°C und 20 000 x g zentrifugiert.

3.4.6 Chromatographische Untersuchungen

3.4.6.1 Sekundärmetaboliten

In pflanzlichen Nanovesikeln wurden vereinzelt Sekundärmetaboliten wie Naringin, Naringenin [44] und Shogaol [108] dokumentiert. Um zu untersuchen, inwiefern weitere Sekundärmetaboliten in pflanzlichen Nanovesikeln aus verschiedenen Spezies vorkommen, wurde insbesondere die instrumentelle Hochleistungsdünnenschichtchromatographie (HPTLC) genutzt. Die HPTLC zeich-



Abbildung 3.8: Vesikelrückgewinnung aus Agarosegelen. Mit dem Skalpell ausgeschnittene Gelsegmente wurden in ein 500 µl Reaktionsgefäß, dessen Boden mit der Kanüle perforiert und das Loch mit Watte bedeckt war, überführt, anschließend in das größere Reaktionsgefäß eingesetzt und zentrifugiert.

net sich im Vergleich zur Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) insbesondere durch ihre geringere Störanfälligkeit aus, welche aufgrund der Komplexität der Vesikelproben von zentraler Bedeutung war. Da die Isolate neben Salzen und Sekundärmetaboliten auch Lipide und Proteine enthielten, waren nicht alle Untersuchungslösungen schwebstofffrei. Für die HPTLC sind Schwebstoffe nicht von größerer Bedeutung, während Kapillaren oder die Säule der HPLC verstopfen und Schaden nehmen könnten. Zwar können Schwebstoffe abfiltriert werden, jeder zusätzliche Aufarbeitungsschritt geht aber auch immer mit Probenverlust einher.

Die HPTLC wurde daher als Standardmethode zur Sekundärstoffanalytik herangezogen. Die Vorgehensweise zur Probenvorbereitung, Durchführung und Auswertung der HPTLC wird im Folgenden beispielhaft anhand der Untersuchung von Aconitin in *Aconitum napellus* L. Nanovesikeln erläutert³:

Die *A. napellus* Nanovesikel wurden in VIB (pH 5.5) isoliert, um Aconitin zu protonieren und so zu verhindern, dass die Membranbarriere überwunden werden konnte. Je 1 ml des Vesikelisolats, sowie des Überstandes der Hochgeschwindigkeitszentrifugation S I, des Überstandes nach dem Waschschrift S II und VIB mit 100 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ zugesetzter Aconitin-Referenz als Positivkontrolle wurden lyophilisiert. Die Lyophilisate wurden mit jeweils 200 µl einer Mischung von gleichen Teilen Methanol und Chloroform versetzt, um die Membranhülle aufzubrechen. Die Proben wurden kräftig durchgemischt und anschließend zentrifugiert. 100 µl des Überstandes wurden abgenommen und für die Lipid-Analytik zurückgestellt. Anschließend wurden 20 µl einer 10 M NaOH Lösung zugesetzt um das Aconitin zu deprotonieren und möglichst vollständig im Überstand zu lösen⁴. Es wurde erneut gemischt und zentrifugiert. 5 bzw. 10 µl des Überstandes wurden mit dem Linomat IV (CAMAG) bandförmig auf die HPTLC-Platte aufgetragen und die Platte in der automatischen Mehrfachentwicklungskammer AMD 2 (CAMAG) chromatographiert. Dabei wurde der in Tab. 3.2 genannte Gradient genutzt. Die Auswertung erfolgte unter UV Licht bei 256 bzw. 366 nm, sowie densitometrisch mittels TLC Scanner 2 (CAMAG). Um dessen Detektions-

³ Spezifische Details weiterer Analysen wie Probenvolumen, mobile Phase etc. werden gemeinsam mit den entsprechenden Ergebnissen in Abschnitt 4.3.6 angegeben. ⁴ Für die Untersuchung saurer Sekundärmetaboliten wurde entsprechend TBS (pH 8.0) zur Vesikelisolation genutzt und die organische Phase mit Ameisensäure angesäuert.

wellenlänge zu optimieren wurden zunächst Chromatogramme bei 210, 250 und 280 nm erstellt. Von ausgewählten Banden wurde nun ein UV-Spektrum aufgenommen und bei einem zweiten Scan die daraus ermittelten Absorptionsmaxima als Wellenlängen für die Erstellung der weiteren Chromatogramme ausgewählt, um die Empfindlichkeit zu erhöhen. Für Aconitin wurde ein Maximum bei 236 nm detektiert und diese Wellenlänge für weitere Scans genutzt. Zusätzlich wurden wiederum Absorptionsspektren ausgewählter Banden aufgenommen. Diese dienten neben dem Retentionsfaktor (Rf) als zusätzliches Kriterium zur Identifizierung der Substanzen. Im Anschluss an die densitometrische Auswertung wurde die Platte mit Dragendorff-Reagenz besprüht, um die Alkaloide anzufärben.

Tabelle 3.2: Zusammensetzung und Laufstrecke des HPTLC-Gradienten für *Aconitum*-Alkaloide.

Ammoniak 25 %	Ethylacetat	Methanol	Wasser	Laufstrecke
5 %	-	90 %	5 %	15 mm
5 %	24 %	70 %	1 %	30 mm
5 %	55 %	40 %	-	40 mm
5 %	85 %	10 %	-	50 mm

Die verbliebene Menge des Methanol-Chloroform-Extraktes wurde zu gleichen Teilen mit Acetonitril gemischt, durch einen 0.2 µm Spritzenfilter filtriert und mittels Shimadzu HPLC System mit Autosampler flüssigchromatographisch untersucht. Hierfür wurde als Basis die Methode nach Csupor *et al.* 2011 [201] herangezogen. Die Parameter für die Durchführung wurden wie folgt gewählt:

- Stationäre Phase: Knauer Eurospher II 100-5 C 18 H, 100 x 4.6 mm mit Vorsäule
- Injektionsvolumen: 20 µl
- Flussrate: 1 $\frac{\text{ml}}{\text{min}}$
- Detektion: UV-Vis, 236 nm
- Säulenofen: 30°C

Als mobile Phase wurde ein Gradient aus 10 mM Ammoniumbicarbonatpuffer in Wasser (pH 10.0) und Acetonitril verwendet. Die Zusammensetzung des Gradienten kann Tab. 3.3 entnommen werden. Eine Einzelmessung war jeweils nach 30 min beendet. Anschließend wurde 10 min äquilibriert und ggf. erneut injiziert.

Tabelle 3.3: Zusammensetzung des HPLC-Gradienten für *Aconitum*-Alkaloide.

Zeit [min]	mobile Phase
0	80 % 10 mM NH ₄ HCO ₃ , 20 % Acetonitril
25	10 % 10 mM NH ₄ HCO ₃ , 90 % Acetonitril
30	80 % 10 mM NH ₄ HCO ₃ , 20 % Acetonitril

3.4.6.2 Massenspektrometrische Identifikation von Sekundärmetaboliten

Ausgewählte HPTLC-Banden von *Aconiti tuber* wurden massenspektrometrisch identifiziert. Dafür wurden 2 g gemahlene Droge in 20 ml 0.2 M Salzsäure für 24 h bei Raumtemperatur agitiert und danach filtriert⁵. 5 ml dieses Mazerates wurden über die Festphasenextraktion mit einer gemischten Anionen- und Kationenaustauschersäule (Strata ABW) aufgereinigt und konzentriert. Die Elution erfolgte mit 0.5 M NaOH in Methanol. 50 µl des Eluats wurden bandförmig aufgetragen und mittels HPTLC aufgetrennt, dann die betreffenden Banden unter UV Licht bei 256 nm identifiziert, von der Platte abgekratzt und mit Acetonitril vom Kieselgel eluiert. Diese Eluate wurden einzeln erneut chromatographiert und die resultierenden Banden, sowie als Positivkontrolle Aconitin, das ebenfalls mit aufgetragen worden war, wiederum von der Platte abgekratzt, in Acetonitril gelöst, durch einen 0.2 µm Spritzenfilter filtriert und durch das Gerätezentrum BioSupraMol (Dr. Jan Joseph) mittels Flüssigchromatographie mit angeschlossener Massenspektrometrie (LC-MS) analysiert.

3.4.6.3 Phospholipide

Auf Grundlage der Methode von Deranieh *et al.* 2013 [202] wurde eine instrumentelle HPTLC-Methode zur Erstellung von Phospholipidchromatogrammen etabliert.

Die Probenvorbereitung erfolgte analog zur Analytik der Sekundärmetaboliten, jedoch ohne Zusatz von Säure oder Base, da die Phospholipide aufgrund ihrer amphiphilen Struktur (s. Abb. 3.9) trotz Ladung in einer Mischung aus gleichen Teilen Methanol und Chloroform löslich sind, bzw. zum Teil gleichzeitig saure und basische Gruppen aufweisen [203]. Je 5 und 10 µl der Chloroform-Methanol-Extrakte und 5 µl der Referenzlösungen (Phospholipid-Konzentration je 1 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$) betrug, wurden mittels Linomat IV bandförmig auf die Platten aufgetragen und diese in der automatischen

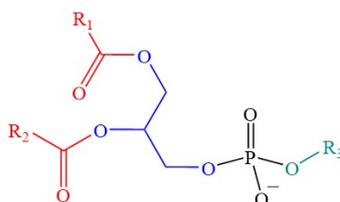


Abbildung 3.9: Struktur der Phospholipide. Bestehend aus einem Glycerol-Rückgrat, welches mit zwei Fettsäureresten (R₁ und R₂), sowie einem Phosphorsäurerest verestert ist, wird der Phospholipidtyp vom Alkohol (R₃) bestimmt, der seinerseits mit dem Phosphorsäurerest einen Ester bildet. Bleibt die Säurefunktion ungebunden (R₃ = H), liegt Phosphatidsäure vor.

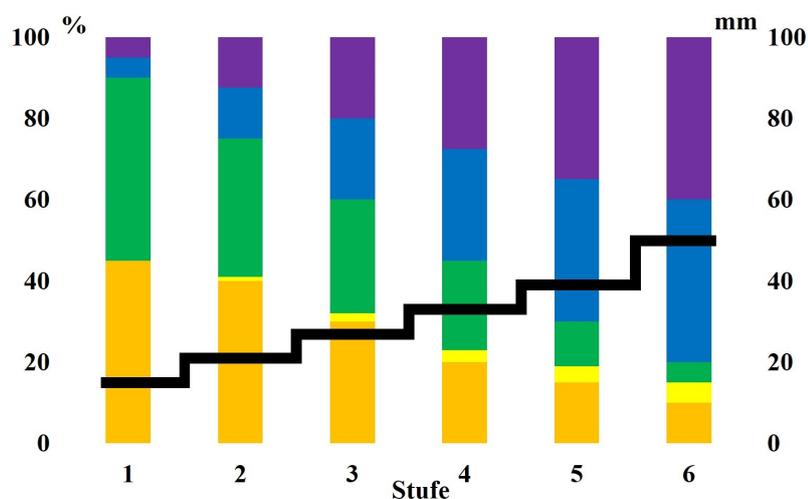
Mehrfachentwicklungskammer mit dem Fließmittelgradienten, der in Tab. 3.4 bzw. Abb. 3.10 aufgelistet und visualisiert wurde, entwickelt.

Die Detektion erfolgte nach Churchward *et al.* 2008 [204] durch Tauchen der Platte in eine Lösung von 10 % (m/V) CuSO₄ in 8 % (V/V) H₃PO₄. Beim anschließenden Erhitzen der Platte auf 140–145°C für etwa 10 min wurden die Phospholipide und andere Substanzen wie Sterole etc. verkohlt.

⁵ Eine Extraktion mit siedender 0.2 M HCl erzeugte einen nicht filtrierbaren Schleim, vermutlich durch Verkleisterung enthaltener Kohlenhydrate.

Tabelle 3.4: Zusammensetzung und Laufstrecke des HPTLC-Gradienten für Phospholipide.

Chloroform	Ethanol	Methanol	Triethylamin	Wasser	Laufstrecke
45 %	5 %	45 %	5 %	-	15 mm
40 %	12.5 %	34 %	12.5 %	1 %	21 mm
30 %	20 %	28 %	20 %	2 %	27 mm
20 %	27.5 %	22 %	27.5 %	3 %	33 mm
15 %	35 %	11 %	35 %	4 %	39 mm
10 %	40 %	5 %	40 %	5 %	50 mm

**Abbildung 3.10:** Schematische Darstellung des HPTLC-Gradienten zur Auftrennung von Phospholipiden mit stufenweiser Entwicklung (schwarze Markierungen). Abgebildet sind die Anteile an Chloroform (orange), Wasser (gelb), Methanol (grün), Ethanol (blau) und Triethylamin (violett).

3.4.7 Inhibition der Pankreaslipase durch pflanzliche Nanovesikel

Zur Aktivitätsbestimmung der Pankreaslipase wurden zwei Assays durchgeführt – ein absorptionsphotometrischer Assay mit p-Nitrophenyllaurat als Substrat und ein fluorimetrischer Assay mit dem Substrat 4-Methylumbelliferyloleat. Beide Assays beruhen auf der hydrolytischen Spaltung ihres Substrats (s. Abb. 3.11) und einer daraus resultierenden verstärkten Absorption, respektive Fluoreszenz nach Abspaltung der quenchenden Fettsäurereste. Nach Inkubation der Pankreaslipase mit der Positivkontrolle Rutin oder mit pflanzlichen Nanovesikeln wurde die Inhibition der Lipaseaktivität im Verhältnis zum unbehandelten Enzym bestimmt.

Der absorptionsphotometrische Assay wurde auf transparenten 96-Well-Mikrotiterplatten wie folgt durchgeführt: 75 µl Untersuchungslösung wurden mit 75 µl Pankreatinlösung ($3.5 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ in TBS) für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 50 µl Substratlösung (1 mM p-Nitrophenyllaurat, 0.6 mM SDS, 1 % (V/V) Triton X-100 in TBS) zugegeben, die Platte geschüttelt, im Mikroplattenleser auf 37°C temperiert und über 35 min jede Minute die Absorption bei 410 nm gemessen. Als Referenzwert (100 %) für die Berechnung der relativen Lipaseaktivität wurde die Untersuchungslösung durch TBS ersetzt. Um die nicht enzymatisch katalysierte Hydrolyserate zu bestimmen,

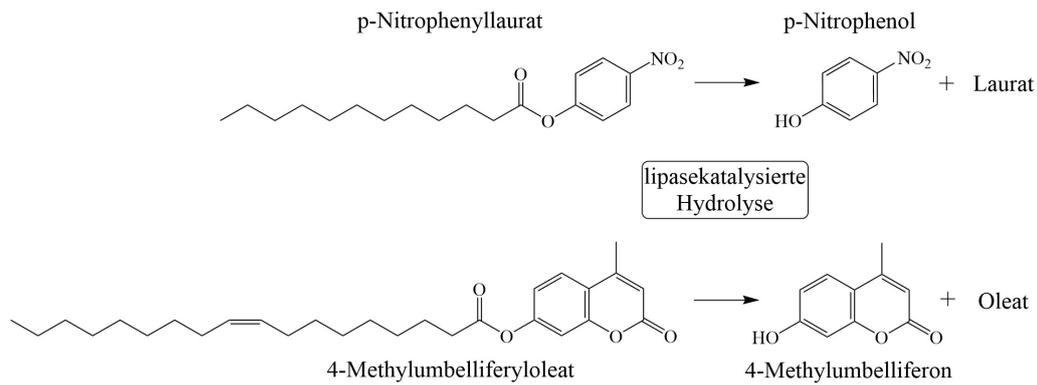


Abbildung 3.11: Reaktionen des absorptionsphotometrischen (oben) und des fluorimetrischen (unten) Assays zur Bestimmung der Lipaseaktivität.

wurde zusätzlich ein Blindwert ermittelt, indem die Substratlösung mit TBS anstelle von Pankreatinlösung versetzt wurde. Die Auswertung der kinetischen Messung erfolgte auf Grundlage der Steigung der Absorptions-Zeit-Funktion. Für jede Lösung wurde eine Vierfach-Bestimmung durchgeführt.

Der fluorimetrische Assay wurde wie in der Dissertation von Frau Dr. Tina Buchholz beschrieben durchgeführt [205]: 25 μl Untersuchungslösung wurden mit 25 μl Pankreatinlösung (0.5 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ in TBS) versetzt und 30 min bei 37°C vorinkubiert. Danach wurden 50 μl Substratlösung (0.5 mM 4-Methylumbelliferyloleat in 6 % (V/V) 2-Methoxyethanol in TBS) zugegeben, die Platte geschüttelt und die Fluoreszenz jede Minute bei einer Exzitationswellenlänge von 360 nm und einer Emissionswellenlänge von 465 nm gemessen. Aufgrund der unterschiedlichen Messprinzipien wurden schwarze Mikrotiterplatten verwendet, da diese eine geringere Lichtreflexion und damit ein günstigeres Signal-Rausch-Verhältnis aufweisen. Alle weiteren Schritte wurden wie bei der absorptionsphotometrischen Bestimmung durchgeführt.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Ausgangsmaterial

4.1.1 Apoplastisches Fluid

EVs werden per Definition von Zellen in den extrazellulären Raum sezerniert. Daher stellt der Apoplast das Kompartiment mit der höchsten Aufenthaltswahrscheinlichkeit für Exosomen und Mikrovesikel *s.str.* dar. Zudem bleiben die Zellen bei der Gewinnung von APF weitestgehend intakt und cytosolische Kontaminationen werden auf ein Minimum reduziert.

Während Unterdruck an die Blätter angelegt wird, öffnen sich die Spaltöffnungen. Wird der Ansatz wieder belüftet, schließen sich die Spaltöffnungen zunächst abrupt und öffnen sich nach einigen Sekunden erneut [206]. Daher wurden 10-Minuten-Intervalle für die Ent- bzw. Belüftung gewählt. Da das Infiltrationsvolumen nahezu identisch mit dem apoplastischen Gasvolumen ist [165], kann davon ausgegangen werden, dass Gase durch den Unterdruck aus dem apoplastischen Raum abgesogen werden. Das Abdunkeln der Blattfarbe konnte beobachtet werden, wenn die Saugflasche belüftet wurde. Also gelangte an diesem Punkt das Infiltrationsmedium in den apoplastischen Raum (s. Abb. 4.1).

Bei der Gewinnung von APF aus Blättern verschiedener Spezies unterschieden sich die Ausbeuten. So wurden beispielsweise ca. 50 µl APF je Gramm Mistelblätter (*Viscum album* L.) gewonnen, etwa 250 µl APF pro Gramm Efeublätter (*Hedera helix* L.) und 470 µl pro Gramm Tabakblätter (*N. tabacum*). Unterschiede in den Ausbeuten bei verschiedenen Pflanzenarten können insbesondere durch das variierende apoplastische Gasvolumen unterschiedlicher Spezies erklärt werden. Zudem konnten Lohaus *et al.* 2001 nachweisen, dass zwischen stomatärer Leitfähigkeit und der Anzahl der erforderlichen Infiltrationszyklen bis zur Massenkonstanz der Blätter eine inverse Korrelation besteht [165]. Die Spaltöffnungen verschiedener Spezies lassen sich also unterschiedlich gut öffnen und beeinflussen die Ausbeuten ebenfalls. Die praktische Relevanz der Ausbeuten liegt vor allem in der Auswahl geeigneter Spezies für die Untersuchungen.

Tabelle 4.1: Vergleich der Ausbeuten an apoplastischem Fluid nach Vakuuminfiltration und Zentrifugation für *Viscum album* mit und ohne Cellulase und Macerozym.

Inkubationszeit	VIB	CMB
0.5 h	50 $\frac{\mu\text{l}}{\text{g}}$	56 $\frac{\mu\text{l}}{\text{g}}$
1 h	-	56 $\frac{\mu\text{l}}{\text{g}}$
24 h	78 $\frac{\mu\text{l}}{\text{g}}$	99 $\frac{\mu\text{l}}{\text{g}}$

CMB Cellulase-Macerozym-Puffer

(je 0.25 % (m/V) Cellulase und Macerozym)

Um die Ausbeute zu erhöhen wurde APF aus Mistelblättern unter Zuhilfenahme von Cellulase und Macerozym (Pektinase) gewonnen. Hierfür wurde der Apoplast der Blätter einerseits mit VIB und im Vergleich dazu mit CMB (je 0.25 % (m/V) Cellulase und Macerozym) infiltriert und die Blätter nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (bei Raumtemperatur) zentrifugiert. Tab. 4.1 zeigt, dass

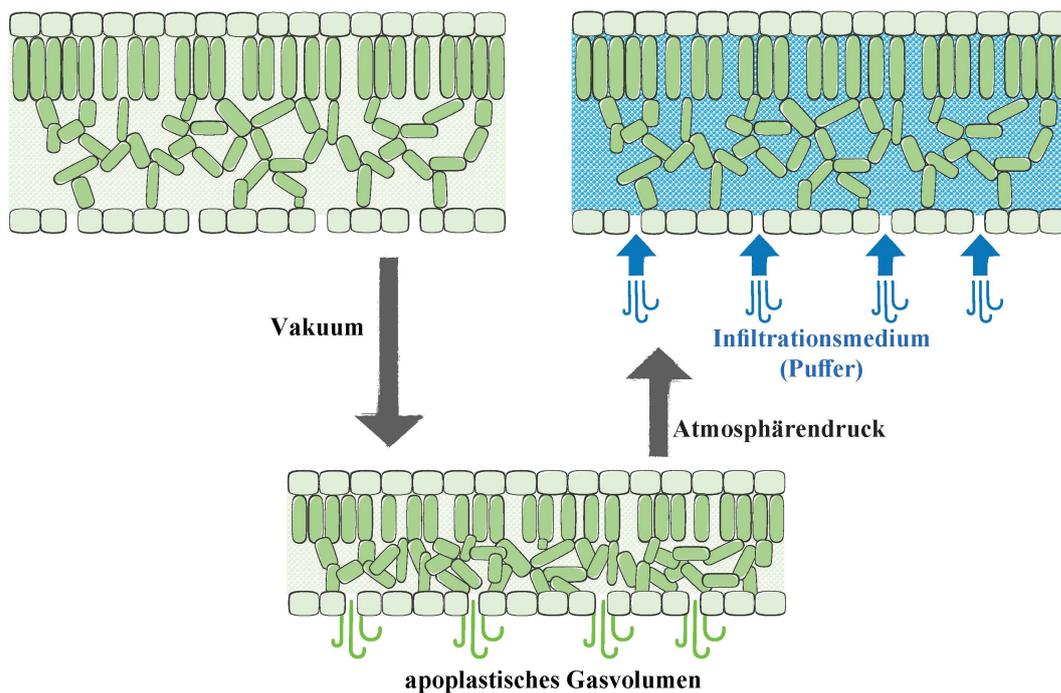


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der Infiltration des apoplastischen Raumes.

nach 24 stündiger Inkubation etwa 25 % mehr APF isoliert wurden. Dieser Zuwachs in der Ausbeute stand jedoch in keinem Verhältnis zu den erheblichen Mehrkosten von CMB im Vergleich zu VIB, denn um die Blätter vollständig zu bedecken sind große Volumina an Infiltrationsmedium notwendig und somit wären auch große Mengen der Enzyme erforderlich. Aus Gründen der Wirtschaftlichkeit wurde die APF-Isolation mit Cellulase und Macerozym also nicht weiter verfolgt. Die Blätter von *N. tabacum* wurden im Rahmen der vorliegenden Dissertation häufig für die APF-Isolation genutzt, da die Ausbeute ausreichend für die beabsichtigten weiteren Untersuchungen war. Zudem wurde das Genom von *N. tabacum* bereits sequenziert, was insbesondere die spätere Identifizierung von EV-Proteinen erleichtern sollte. Doch obwohl die Methode gut zur Isolation pflanzlicher EVs geeignet war, gab es auch Einschränkungen. Diese waren im Wesentlichen:

- viel frisches Blattmaterial erforderlich (kleine Ausbeuten)
- sehr aufwändig
- APF enthält Proteasen [167] → Zusatz von Proteaseinhibitoren nötig
- Pflanzenzellen könnten auf die Verdünnung des APF während der Infiltration reagieren [167] → Artefaktbildung

Obwohl bei der APF-Isolation cytosolische Begleitstoffe auf ein Minimum reduziert werden können, wurde diese Methode aufgrund des großen Aufwandes und der großen Mengen hierfür erforderlichen Blattmaterials eher selten angewandt. Nachdem die Isolationsmethode etabliert war und zuverlässig angewendet werden konnte, diente sie für spezielle analytische Zwecke. So wurden

weitere Untersuchungen zunächst mit Vesikelisolaten aus Homogenisaten auf die Eigenschaften der Vesikel abgestimmt und anschließend mit EVs, die ihrerseits aus APF isoliert wurden, durchgeführt.

Die APF-Extraktion ist eine der wenigen bekannten Methoden um pflanzliche EVs zu isolieren, denn aus Homogenisaten können keine EVs sondern Nanovesikel unterschiedlicher Genese isoliert werden.

4.1.2 Homogenisate

Während die Literaturrecherche zeigte, dass Nanovesikel aus frischem, homogenisiertem Pflanzenmaterial isoliert werden können [43, 44, 48, 115], war bislang nicht bekannt, ob die Vesikel einen Trocknungsprozess unbeschadet überstehen und aus Drogenmaterial isoliert werden könnten. Aus kommerziell erhältlichen Drogen, z.B. aus *Aconiti tuber*, *Belladonnae folium*, *Chelidonii herba* oder *Curucumae zanthorrhizae rhizoma* konnten Nanovesikel ohne Ausnahme isoliert werden (s. Abb. 4.2). Auch die im Zusammenhang mit der vorliegenden Dissertation von Frau Janine Schanz angefertigte Masterarbeit [207] zeigte, dass aus Drogenmaterial jeglichen Ursprungs Nanovesikel isoliert werden können. Unabhängig davon, welche Organe getrocknet wurden, waren in den Mazeraten aller untersuchten ober- und unterirdischer Pflanzenteile Vesikel zu finden. Diese Ergebnisse deuten stark darauf hin, dass Nanovesikel in allen pflanzlichen Geweben gefunden werden können, was im Einklang mit der allgemeinen Erkenntnis steht, dass EVs ubiquitär vorkommen bzw. von allen Zellen ausgeschüttet werden, auch wenn es sich bei den hier isolierten Nanovesikeln nicht mit Sicherheit ausschließlich um EVs handelt.

Dass aus getrocknetem Pflanzenmaterial intakte Nanovesikel isoliert werden konnten, zeigt, dass es sich dabei um robuste Vehikel handelt, denn Trocknung und Rehydratation bedeuten hohe osmotische und folglich auch mechanische Beanspruchung. Für eine eventuelle pharmazeutische Nutzung kann die Gewinnung aus APF aufgrund des hohen Arbeitsaufwandes und der benötigten großen Mengen Pflanzenmaterials kaum in Erwägung gezogen werden. Getrocknete Drogen hingegen können durchaus geeignete Ausgangsmaterialien hierfür sein. Daneben stellt die Kultivierung von Calli eine vielversprechende Quelle für pflanzliche EVs oder Nanovesikel dar.

4.1.3 Calluskultur

Die Kultivierung der Pflanzenzellen wurde von den in Abschnitt 3.1.3 genannten Kollaborationspartnern durchgeführt, da diese sowohl über die nötige Expertise als auch Ausstattung verfügen. Die Isolation von EVs erfolgte aus den Zellkulturüberständen, während Nanovesikel aus homogenisierten Calluszellen gewonnen wurden. Während die Literaturrecherche keine Hinweise auf pflanzliche Nanovesikel aus Calluskulturen ergab, konnten im Rahmen der vorliegenden Dissertation erstmals EVs bzw. Nanovesikel aus Calluskulturen isoliert werden (s. Abb. 4.3).

Diese Ergebnisse untermauern wiederum die These, dass EVs von praktisch jeder Zelle ausgeschüttet werden. Für eine pharmazeutische Verwendung würden sich EVs aus Calluskulturen besonders eignen, da diese unter aseptischen Bedingungen gehandhabt werden. Währenddessen ist die mikrobielle Belastung von Drogenmaterial oft hoch, was vor allem bei parenteralen Anwendungen beachtet werden muss, denn eine Sterilfiltration von zum Teil 800 nm großen Partikeln ist nicht möglich.

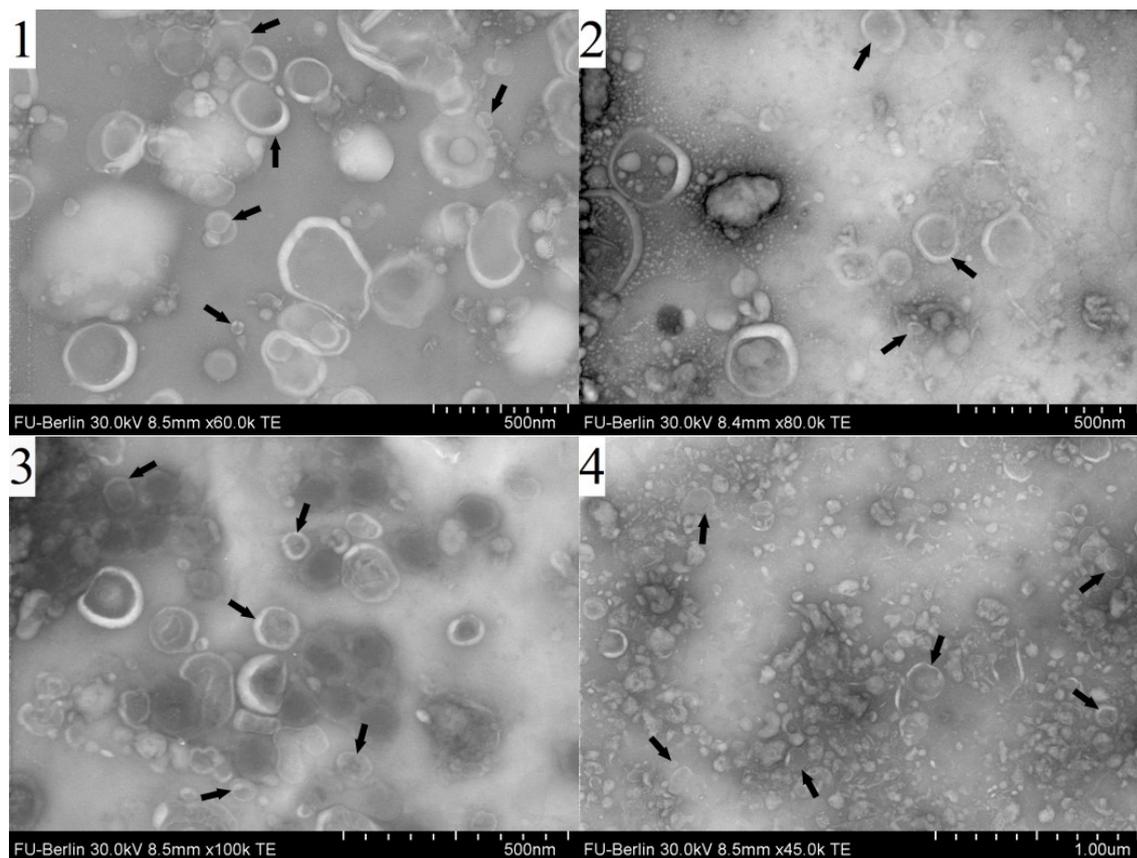


Abbildung 4.2: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Nanovesikeln aus den Drogen **1) Aconiti tuber** **2) Belladonnae folium** **3) Chelidonii herba** **4) Curucumae zanthorrhizae rhizoma**. Kontrastierung: UranylLess; Gerät: Hitachi SU8030

Bei der weiteren Untersuchung der Nanovesikel bzw. des Mediums ergab sich außerdem, dass der Tabak-Callus kein Nicotin produzierte (vgl. Abschnitt 4.3.6), EVs konnten jedoch isoliert werden. Beide Ergebnisse gemeinsam zeigen, dass Produktion und Ausschüttung von EVs für Zellen von elementarer Wichtigkeit sein müssen, denn Sekundärmetaboliten (z.B. Nicotin) dienen der Pflanze in der Regel dazu, sich an ihre Umgebung bestmöglich anzupassen. Die fehlende Nicotinproduktion deutet darauf hin, dass für die Calluszellen optimale Bedingungen herrschten. Dass dennoch EVs gefunden werden konnten, legt die Annahme nahe, dass EVs für die Homöostase ebenso entscheidend sind wie für die Abwehr von Mikroorganismen (vgl. Abschnitt 1.2.1.2 und 1.4).

4.2 Isolation pflanzlicher Nanovesikel

Gemäß aktuellen ISEV-Richtlinien (MISEV 2018 [15]) ist eine quantitative Isolation von EVs praktisch unmöglich. Es handelt sich eher um eine Anreicherung bzw. Konzentrierung. In einem Positionspapier der ISEV wurden verschiedene Methoden zur EV-Isolation vorgestellt und bewertet [173]. Anzumerken ist dabei, dass im Fokus der ISEV besonders tierische EVs stehen und die Methoden nicht uneingeschränkt auf pflanzliche Nanovesikel übertragbar sind. Die in Abschnitt 3.3 beschriebenen Isolationsmethoden wurden im Rahmen der vorliegenden Dissertation für die Gewinnung pflanzlicher Nanovesikel als potenziell geeignet eingeschätzt und durchgeführt.

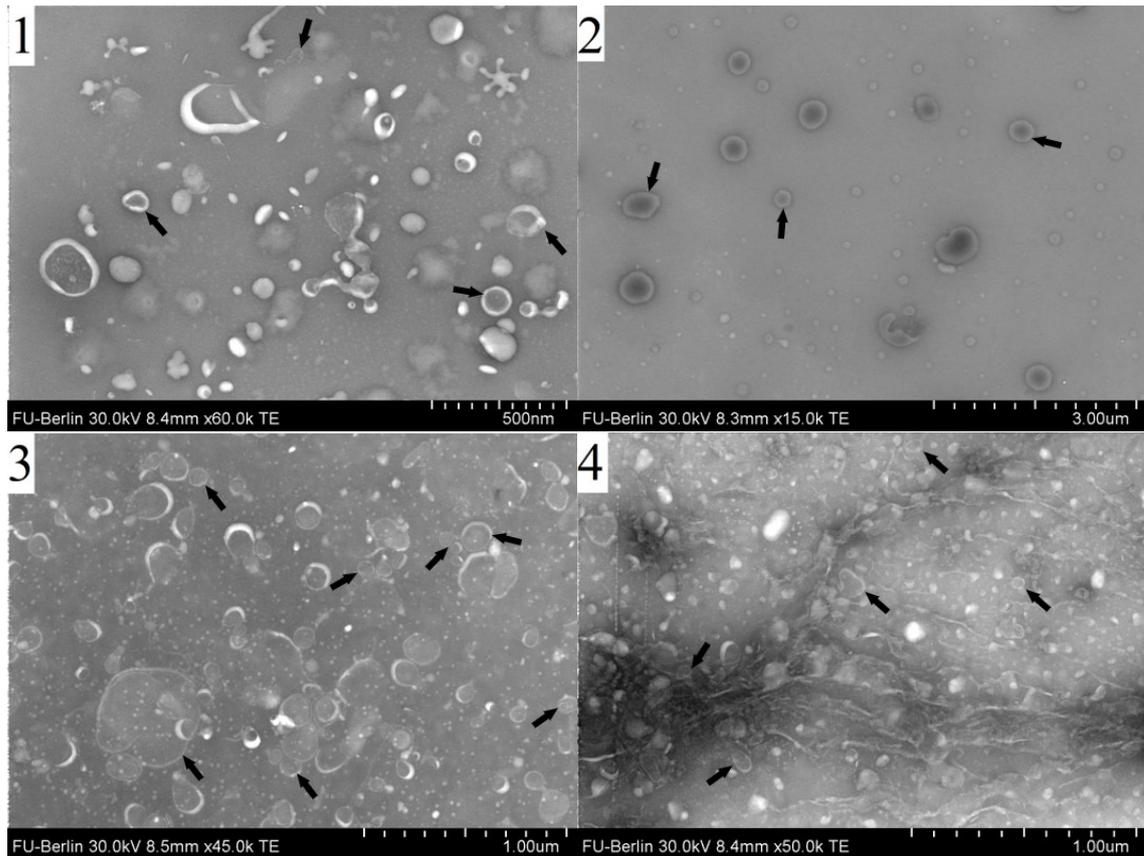


Abbildung 4.3: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von EVs und Nanovesikeln aus Calluskulturen. 1) EVs aus Zellkulturüberstand von *Nicotiana tabacum* Callus 2) Nanovesikel aus *Nicotiana tabacum* Calluszellen 3) EVs aus Zellkulturüberstand von *Craterostigma plantagineum* Callus 4) Nanovesikel aus *Craterostigma plantagineum* Calluszellen. Kontrastierung: UranylLess; Gerät: Hitachi SU8030

4.2.1 Differentielle Zentrifugation

Die verschiedenen Isolationsmethoden unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Spezifität und Effektivität. Da die differentielle Zentrifugation eine gute Balance zwischen diesen beiden Parametern darstellt [15] und mit dieser Methode zuverlässig Nanovesikel isoliert werden konnten, wurde die differentielle Zentrifugation die überwiegend genutzte Isolationsmethode der vorliegenden Dissertation. Durch die hohen während der Zentrifugation anliegenden Kräfte werden die Vesikel mechanisch stark beansprucht. Diese Beanspruchung führte zum Teil zu sehr kompakten Sedimenten, die kaum resuspendiert werden konnten. Diese Aggregation⁶ war problematisch für manche, jedoch nicht alle weiterführenden Untersuchungen. Probleme aufgrund von Aggregation traten beispielsweise bei der Partikelgrößenbestimmung mittels DLS auf (s. Abschnitt 4.3.2), während sie für die Analytik von Proteinen oder Sekundärmetaboliten nicht von Belang war. Der Zusatz von DiOC₆ bewährte sich besonders bei der Isolation von Nanovesikeln aus APF und Calluskulturen, da deren Sedimente bei der Hochgeschwindigkeitszentrifugation ohne Farbstoffzusatz kaum zu erkennen waren. Der Membranfarbstoff ermöglichte außerdem eine visuelle Bestätigung, ob die Isolation erfolgreich verlaufen war, selbst wenn nur kleine Mengen Vesikel im Sediment vorlagen.

⁶ Auch bei der Hochgeschwindigkeitszentrifugation tierischer EVs wurde Aggregatbildung beobachtet [208].

4.2.2 Ultrafiltration

Die Ultrafiltration wurde wie unter 3.3.2 beschrieben mit einem wässrigen Extrakt aus getrockneten und pulverisierten Rhizomen von *Curcuma zanthorrhiza* ROXB. in TBS durchgeführt. Die Vorteile der Ultrafiltration im Vergleich zur differentiellen Zentrifugation sind insbesondere der geringere apparative Aufwand, sowie eine wesentlich schnellere Aufarbeitung.

Beim Wiederaufnehmen der aufkonzentrierten Vesikel wurde jedoch beobachtet, dass sich die Viskosität stark erhöht hatte. Diese Beobachtung ist wahrscheinlich auf höhermolekulare Begleitstoffe wie polymere Kohlenhydrate zurückzuführen. Problematisch ist eine derart hochviskose Probe aus mehreren Gründen:

- Der erhöhte osmotische Druck kann zur Schrumpfung und eventuellen Zerstörung der Vesikel führen.
- Hochviskose Lösungen eignen sich nicht zur Charakterisierung, da Polymere z.B. in elektronenmikroskopischen Aufnahmen ein Rauschen erzeugen und die Probe einbetten bzw. überdecken können, sodass keine Negativkontrastierung möglich ist.
- Reproduzierbares Pipettieren, wie es unter anderem für die Proteinquantifizierung erforderlich ist, wäre nicht möglich.

Aufgrund dieser Problematik wurde die Ultrafiltration nicht weiter zur Vesikelisolation eingesetzt. Möglicherweise würde sich die Methode eignen, um Vesikelisolate aus APF oder aus Überständen der Callus-Kultur zu gewinnen. Jedoch sind bei der Ultrafiltration Verluste durch Bindung der Vesikel an die Filtermembran zu erwarten. Die genannten Ausgangsmaterialien standen aber in deutlich geringerem Umfang zur Verfügung, als die Extrakte aus getrocknetem Pflanzenmaterial und zeigten vergleichsweise kleine Ausbeuten. Weiterhin wurde in der Literatur beschrieben, dass bei der Aufkonzentration von EVs mittels Ultrafiltration die Vesikel deformiert und diese zu kleineren Vesikeln aufgespalten werden könnten [209].

Da bei der differentiellen Zentrifugation die genannten Begleitstoffe effektiv abgetrennt werden konnten und geringere Verluste zu erwarten waren, wurde die Isolation durch Zentrifugation trotz des höheren Arbeitsaufwandes der Ultrafiltration vorgezogen. Die Ultrafiltration kann als Reinigungsschritt für pflanzliche Nanovesikel in Betracht gezogen werden.

4.2.3 Größenausschlusschromatographie

Die im Rahmen der vorliegenden Dissertation durchgeführte Literaturrecherche ergab, dass die SEC, neben den bereits vorgestellten, eine weitere geeignete Isolationsmethode für Nanovesikel sein kann [179]. Daher wurden zunächst kleine Säulen (5 und 10 ml) mit der Matrix Sephacryl S-500 HR gepackt und mit einem Probenvolumen von 1 % des Säulenvolumens beladen und Fraktionen zu je 1 ml aufgefangen. Detektiert wurden die Fraktionen mittels DLS. Die DLS-Auswertung blieb jedoch ergebnislos, denn es konnten keine Partikel detektiert werden, die sich vom Grundrauschen der Messung abhoben. Vermutlich aufgrund der Verdünnung der ohnehin nur in geringen Mengen enthaltenen Vesikel. Daher wurden fortan 2 % des Säulenvolumens appliziert und das Säulenvolumen vergrößert (75 ml). Eine Vorauswahl der Fraktionen (hier je 5 ml) für die

DLS-Messung erfolgte mittels BCA-Assay. Die anschließende DLS-Analyse blieb dennoch ohne auswertbare Ergebnisse.

Daraufhin wurde die Probe, in diesem Fall der Presssaft einer Zitrone (*C. limon*), in der Vakuumzentrifuge etwa fünffach aufkonzentriert, dann die SEC (75 ml Säule, 1.5 ml Probenvolumen) durchgeführt und die gesammelten 5 ml Fraktionen wiederum in der Vakuumzentrifuge etwa fünffach aufkonzentriert. Diese wurden nun auf Agarosegele aufgetragen (vgl. Abschnitt 4.3.5). So konnten drei Fraktionen identifiziert werden, in denen Nanovesikel angereichert waren (s. Abb. 4.4).

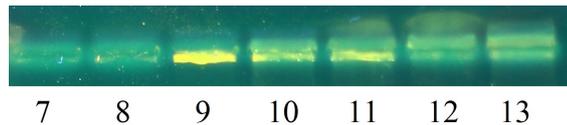


Abbildung 4.4: Fraktionen 7 – 13 der Größenausschlusschromatographie von *Citrus limon* Presssaft. Besonders Fraktion 9 enthielt Nanovesikel, außerdem die Fraktionen 10 und 11.

Prinzipiell ist die Isolation von Nanovesikeln mittels SEC also möglich. Die zentrale Problematik war jedoch die Verdünnung durch die Methode. Zudem war die SEC nicht nur verhältnismäßig aufwändig, sondern beanspruchte die Proben auch stark, da lange Bearbeitungszeiten nötig waren und diese ohne Kühlung durchgeführt werden mussten. Auch osmotisch wurden die Vesikel durch die alternierenden Aufkonzentrierungs- und Verdünnungsschritte gestresst. Inwiefern das die Integrität der Nanovesikel beeinflusste, wurde jedoch nicht weiter untersucht, da die SEC im Vergleich zur differentiellen Zentrifugation weniger gut als Isolationsmethode geeignet war.

Ein bereits anderweitig gewonnenes Vesikelisolat könnte jedoch mittels SEC aufgereinigt werden. Hierfür können kommerzielle SEC-Säulen für die EV-Präparation in Erwägung gezogen werden. Dieser Reinigungsschritt bedürfte jedoch noch eines optimierten Protokolls und insbesondere einer geeigneten Detektion. Bei Vesikelisolaten, die mittels differentieller Zentrifugation gewonnen wurden, muss außerdem zunächst eine Lösung für das Problem der Aggregation der Vesikel gefunden werden (vgl. Abschnitt 4.3.2).

4.2.4 Polymerbasierte Präzipitation von Vesikeln

Die wesentlichen Vorteile der polymerbasierten Präzipitation, gegenüber anderen Isolationsmethoden, sind der geringe präparative und apparative Aufwand, sowie die flexible Anpassung an beliebige Probenvolumina. Besonders für kleine Probenvolumina (< 20 ml) war diese Art der Vesikelisolation von Interesse, da aufgrund der zur Verfügung stehenden Ausstattung der Hochgeschwindigkeitszentrifuge mindestens 20 ml Probe mittels differentieller Zentrifugation zur Verfügung stehen sollten.

Nachteilig an der Vesikelisolation mittels polymerbasierter Präzipitation ist neben den hohen Kosten, dass auch Proteine co-präzipitiert werden [173]. Weiterhin zeigten Proben, die auf diese Weise isoliert wurden, Störungen in weitergehenden Untersuchungen. So erschwerten die Polymere die Handhabung und es konnten weder TEM-Aufnahmen der EVs erzeugt, noch scharfe Banden in der SDS-PAGE (s. Abb. 4.5) erzielt werden. Die Polymere störten dabei wahrscheinlich die für das TEM erforderliche Kontrastierung, da sich dort wo eigentlich das Kontrastierungsreagenz anlagert werden sollte, bereits eine Polymerschicht befunden haben kann. Letztlich waren keine Struktu-

ren erkennbar. Die unscharfen Banden in der SDS-PAGE können auf Wechselwirkungen zwischen SDS und Polyethylenglykol zurückgeführt werden, wodurch die Protein-SDS Interaktion gestört gewesen sein kann [210].

Da die differentielle Zentrifugation zuverlässig zur Vesikelisolation genutzt werden konnte, wurde die polymerbasierte Vesikelpräzipitation nicht weiter optimiert.

4.2.5 Tangentialflussfiltration

Die Tangentialflussfiltration ist für Probenvolumina bis zu 20 ml ausgelegt und zeichnet sich durch eine besonders schnelle und einfache Handhabung aus. Die Filtereinheiten selbst können mehrfach verwendet werden, sodass deren Anschaffung durchaus ökonomisch ist. Im Vergleich zur differentiellen Zentrifugation war allerdings keine direkte visuelle Kontrolle des Erfolgs der Isolation möglich. Abb. 4.5 zeigt, dass die Tangentialflussfiltration nicht mit der SDS-PAGE interferierte, da hier keine störenden Zusätze nötig waren wie bei der polymerbasierten Präzipitation.

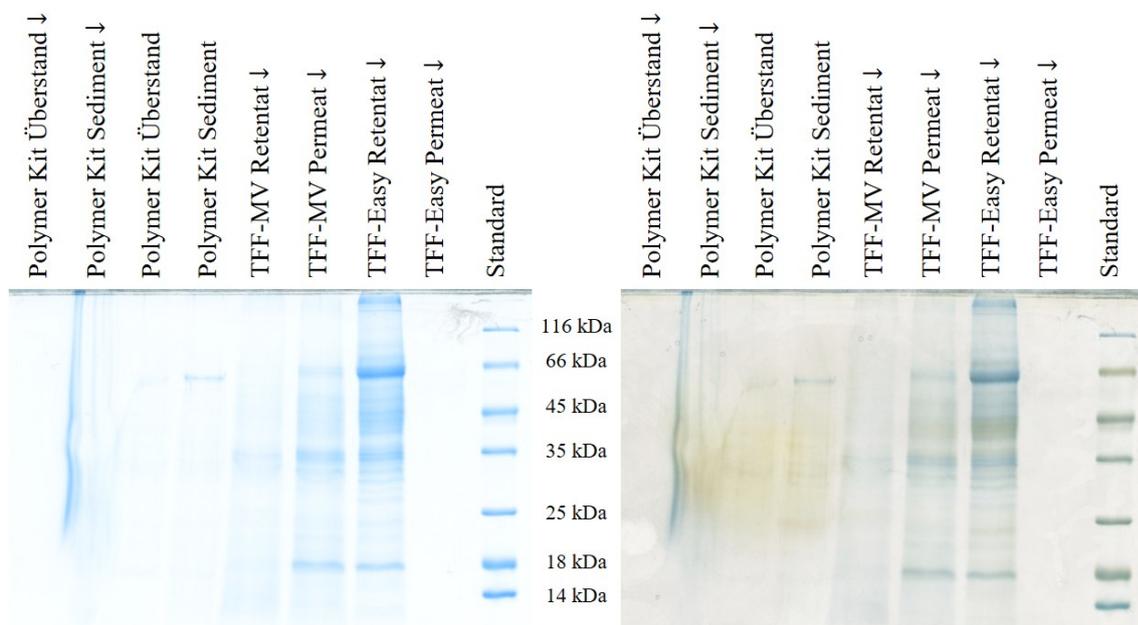


Abbildung 4.5: SDS-PAGE von Proben der polymerbasierten Vesikelpräzipitation, sowie der Tangentialflussfiltration. Ausgangsmaterial: Zellkulturüberstand von *Nicotiana tabacum* Callus. Färbung: erst kolloidales Coomassie (links), anschließend Silber (rechts). TFF-MV Tangentialflussfilter für EVs > 150 nm; TFF-Easy Tangentialflussfilter für EVs < 150 nm; ↓ Proteine vor Denaturierung mit Trichloressigsäure gefällt.

Die SDS-PAGE von *N. tabacum* EVs aus Calluskulturmedium (Abb. 4.5) zeigte ebenfalls, dass aus der untersuchten Probe nur wenig große (> 150 nm) EVs vom Tangentialflussfilter zurückgehalten wurden. Das Permeat aus der TFF-MV Einheit wurde in die TFF-Easy Einheit injiziert, woraufhin einige Proteine aufkonzentriert wurden. Das Permeat aus dem TFF-Easy Filter war wiederum praktisch frei von Proteinen. Ob tatsächlich alle in der Probe enthaltenen Proteine aus Nanovesikeln < 150 nm stammen, erscheint fraglich. Die Wiederholung des Versuchs mit *N. tabacum* EVs aus APF zeigte ein ähnliches Resultat (s. Abb. A.1 im Anhang) und die Elektronenmikroskopie bestätigte, dass mit beiden Filtereinheiten tatsächlich EVs aufkonzentriert worden sind (s. Abb. 4.6), auch wenn aufgrund der kleinen Mengen nur vereinzelt EVs auf den TEM-Grids gefunden werden

konnten.

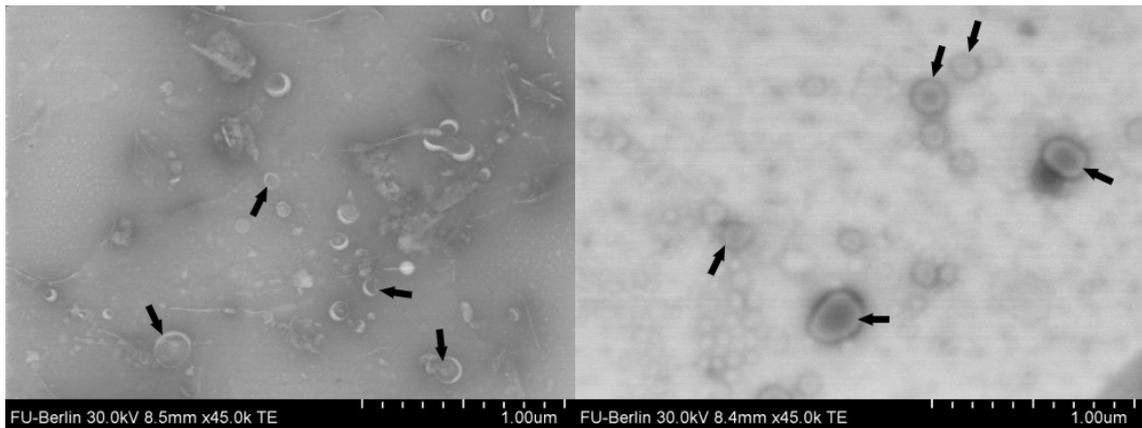


Abbildung 4.6: TEM-Aufnahmen der Konzentrate aus der Tangentialflussfiltration von apoplastischem Fluid aus *Nicotiana tabacum*. **Links:** Konzentrat des Filters für Vesikel > 150 nm (TFF-MV) **Rechts:** Konzentrat des Filters für Vesikel < 150 nm (TFF-Easy). Kontrastierung: UranylLess; Gerät: Hitachi SU8030

Aufgrund der engen Verwandtschaft dieser Technik mit der Ultrafiltration erscheinen die Tangentialflussfilter für die Isolation von Nanovesikeln aus Drogen ungeeignet. Die Filter würden wahrscheinlich genau wie bei der Ultrafiltration (vgl. Abschnitt 4.2.2) höhermolekulare Begleitstoffe aufkonzentrieren. Da ein solches Vorgehen die Tangentialflussfilter voraussichtlich unbrauchbar machen würde, wurden sie nicht mit Drogenmazeraten beladen.

Die Tangentialflussfiltration eignet sich vor allem für die Isolation von EVs oder Nanovesikeln aus APF oder Zellkulturmedien, da hierbei üblicherweise kleinere Volumina zur Verfügung stehen.

4.3 Analytik isolierter Nanovesikel

4.3.1 Elektronenmikroskopie

Wie in Abschnitt 3.4.1 beschrieben, erreichen Lichtmikroskope Auflösungen von etwa 200 nm. Da die isolierten Nanovesikel häufig Größen von etwa 100 – 500 nm aufwiesen (s. Abschnitt 4.3.2), könnte das Gros der zu untersuchenden Strukturen allenfalls als voneinander getrennte Punkte abgebildet werden (vgl. Abb. 3.6), was jedoch keine Rückschlüsse auf die Morphologie zuließe. Währenddessen erreichen Elektronenmikroskope in der Regel Auflösungen von bis zu ca. 100 pm und eignen sich somit zur Visualisierung von Nanovesikeln [183].

Die am besten zur Visualisierung von vesikulären Strukturen geeignete Technik stellt die Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie dar, denn diese benötigt keine Additive wie Kontrastmittel oder Reagenzien zur Fixierung. Zudem werden Form und Größe der Vesikel besser erhalten als unter dehydratisierenden Bedingungen. Die Bildung von Artefakten wird also insgesamt vermieden. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Membran klar als Lipid-Doppelschicht erkennbar wird [15, 186]. Ein wesentlicher Nachteil ist jedoch der hohe apparative und präparative Aufwand pro Probe. Weiterhin sind die Messzeiten am Kryo-TEM limitiert. Daher wurde diese Methode lediglich für EVs aus APF von *N. tabacum* durchgeführt, um das Gelingen der Isolation zweifelsfrei zu bestätigen. Zwei der resultierenden Aufnahmen sind in Abb. 4.7 dargestellt. Diese zeigen die besondere Eignung der Methode für die untersuchte Probe. Die hohe Auflösung visualisiert hervorragend

die vesikuläre Struktur, sowie die Lipid-Doppelschicht. Sogar membranständige Proteine sind erkennbar.

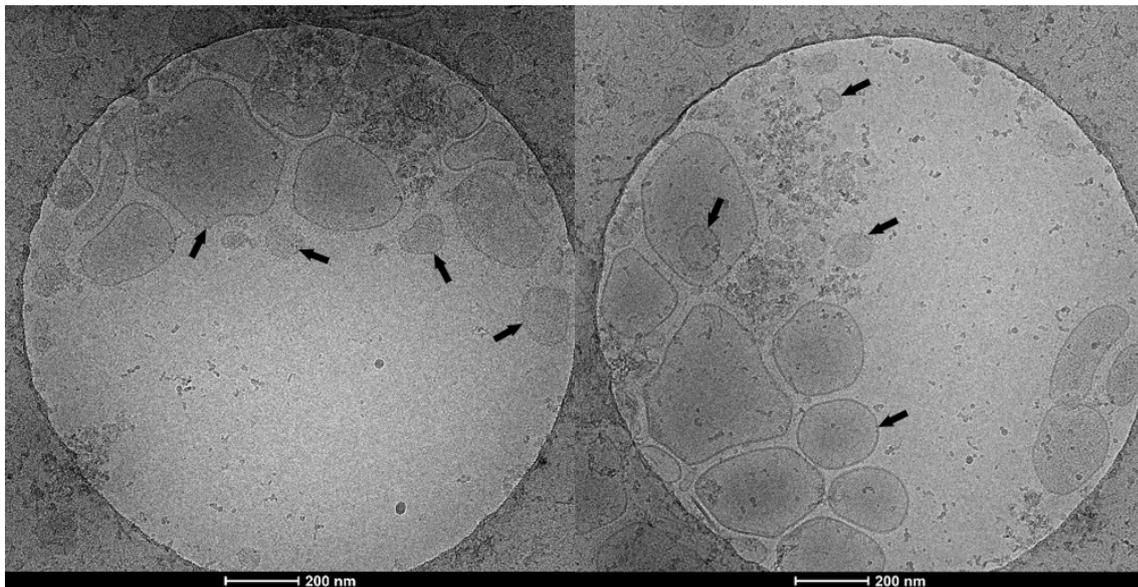


Abbildung 4.7: Kryo-TEM Aufnahmen von *Nicotiana tabacum* EVs aus apoplastischem Fluid. Gerät: Talos™ Arctica

Die im weiteren Verlauf dieser Arbeit präsentierten elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden an einem Hitachi SU 8030 REM aufgenommen. Dieser Gerätetyp weist die Besonderheit auf, dass er ebenfalls im TEM-Modus betrieben werden kann. Zunächst wurden jedoch Messungen im REM-Modus durchgeführt. Eine Störung, die eine Auswertung mittels REM unmöglich machte, wurde durch Salze aus dem Puffer, in dem die Vesikel isoliert wurden, verursacht (s. Abb. 4.8). Eine Dialyse, um die Probe zu entsalzen, führte wahrscheinlich zum Zerplatzen der Vesikel aufgrund des osmotischen Druckes, denn nach der Dialyse hatte sich die Konsistenz der ursprünglichen Suspension gallertartig verändert und im REM waren zwar keine Salze, aber auch keine Konturen zu erkennen. Auch die Fixierung mit Glutaraldehyd und/oder Paraformaldehyd nach Thery *et al.* 2006 [211] zur Quervernetzung der Proteine und deren Arretierung mit anschließender Dialyse führte nicht zu auswertbaren Ergebnissen.

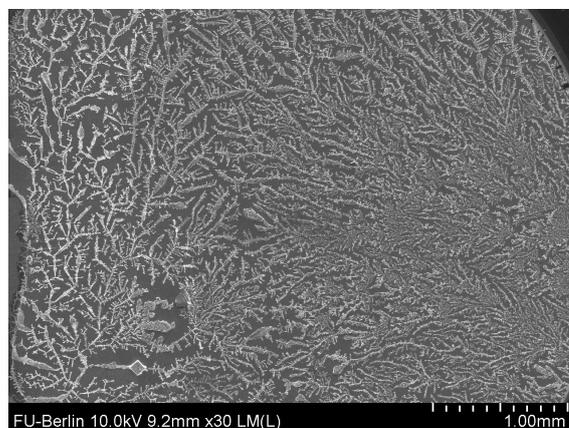


Abbildung 4.8: REM-Aufnahme einer nicht salzfreien Probe. Gerät: Hitachi SU8030

Die Auswertung im TEM Modus in Kombination mit der in Abschnitt 3.4.1 beschriebenen Präparation führte zu verwertbaren Bildern, wie Abb. 4.9 zeigt. Dargestellt sind die TEM-Aufnahmen eines kommerziell erhältlichen Exosomen Standards, der als Positivkontrolle diente. Es ist erkennbar, dass einige Vesikel eine Art Glocken- oder Tassenform annehmen. Diese Beobachtung wird in der Literatur häufig für TEM-Aufnahmen beschrieben und kann als Artefaktbildung aufgrund von Schrumpfung durch Trocknen der Probe zurückgeführt werden [37, 43, 211, 212], denn die Kryo-TEM-Aufnahmen lassen auf eine annähernd sphärische, jedoch flexible Form der Vesikel schließen (s. Abb. 4.7).

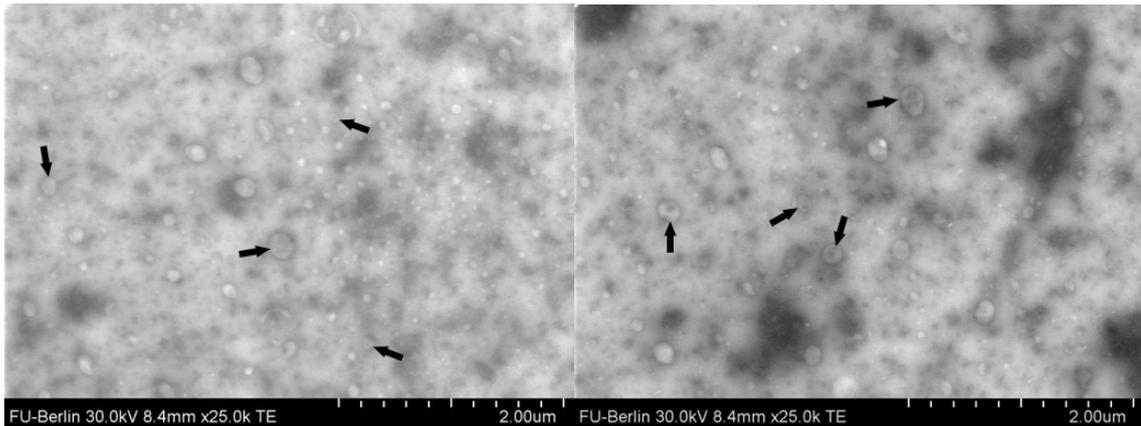


Abbildung 4.9: TEM-Aufnahmen eines Exosomen-Standards. Kontrastierung: UranylLess; Gerät: Hitachi SU8030

Trotz der Artefaktbildung, die für TEM-Aufnahmen zu berücksichtigen sind, stellt die Methode ein adäquates Mittel dar, um den Erfolg der Isolation zu überprüfen und Rückschlüsse auf die Morphologie ziehen zu können.

4.3.2 Partikelgrößenbestimmung

Die NTA ist im Vergleich zur DLS grundsätzlich besser für die Partikelgrößenbestimmung von EVs bzw. Nanovesikeln geeignet, da diese in der Regel polydisperse Größenverteilungen aufweisen [28]. Währenddessen eignet sich die DLS aufgrund der Messmethodik bzw. des Aufbaus eher für die Analytik von monodispersen Partikeln. Allerdings stand am Bearbeitungsort der Vesikelproben kein NTA zur Verfügung. Obwohl im Fachbereich ein entsprechendes Gerät zur Verfügung stünde, wurde dieses nicht für die Partikelgrößenbestimmung der isolierten Vesikel verwendet. Der Grund dafür liegt in der hohen Empfindlichkeit der Methode, die mit geringer Spezifität einhergeht. Bei der NTA können Vesikel nicht von anderen Partikeln unterschieden werden und aus Probengefäßen werden leicht Mikro- und Nanopartikel mobilisiert. Diese Mobilisierung würde durch den Transport in ein anderes Institut zur Durchführung der Messung verstärkt werden und es würde nicht nur die Größe der Vesikel bestimmt werden, sondern auch die der Verunreinigungen. Da ein Gerät für die DLS-Messungen am Bearbeitungsort zur Verfügung stand, war ein längerer Transport nicht erforderlich und das Risiko von Verunreinigungen durch Partikelmobilisierung aus den Probengefäßen wurde so minimiert.

Während der Versuchsdurchführung wurde stets beobachtet, dass EV-Präparationen schnell präzipitierten. Anhand von Radius (< 850 nm) und Dichte (ca. $1.15 - 1.19 \frac{\text{g}}{\text{ml}}$) [48]) der Vesikel wäre

diese Beobachtung nicht so ausgeprägt zu erwarten gewesen. Aus der Literatur ist allerdings bekannt, dass EVs aufgrund der großen relativen Zentrifugalkräfte, die während der differentiellen Zentrifugation herrschen (bis zu 50 000 x g), aggregieren können [208]. Neben der Bildung von Aggregaten könnte eine mechanisch forcierte Fusion zu größeren Vesikeln eine Erklärung für diese Beobachtung liefern, wurden jedoch elektronenmikroskopisch nicht beobachtet. Weiter könnten auch kleinere Vesikel in größere hineingezwängt werden, worauf die kryoelektronenmikroskopischen Aufnahmen durchaus teilweise hindeuteten (s. Abb. 4.7). Allerdings kann nicht sicher festgestellt werden, ob die Vesikel übereinander oder ineinander vorlagen. Unabhängig davon scheint ein solcher Vorgang aber eine Ausnahme und nicht die Regel zu sein. Damit stellte sich die Aggregatbildung als plausibelste Begründung für die derart schnelle Sedimentation heraus.

Der Vergleich der Ergebnisse der DLS mit TEM-Aufnahmen untermauert diese Annahme. So wurden für *C. plantagineum* EVs mittels DLS zunächst Größen über 800 nm ermittelt (s. Abb. 4.10). Da die Proben vor dem finalen Zentrifugationsschritt durch einen Filter mit einer Porengröße von

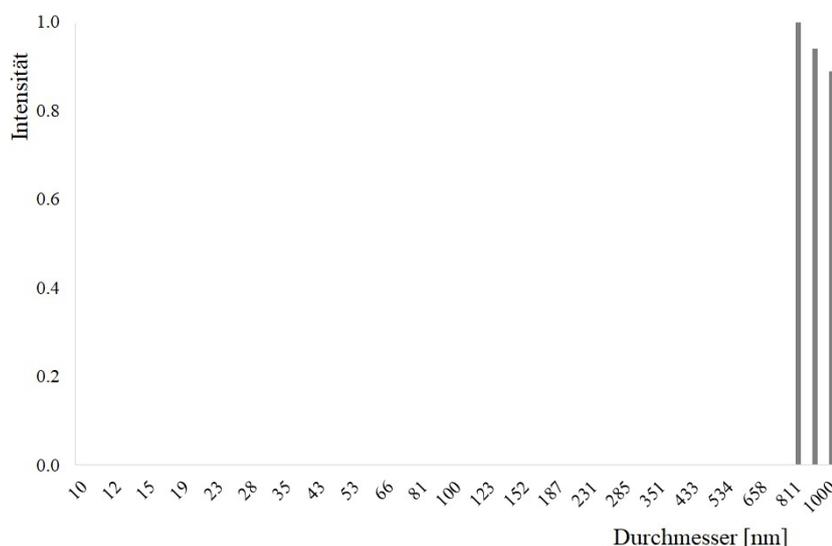


Abbildung 4.10: (Vorläufige) DLS-Ergebnisse von *Craterostigma plantagineum* EVs. (n=3)

850 nm filtriert wurden, erschien dieses Ergebnis zwar ungewöhnlich, jedoch nicht unmöglich. Die nominelle Porengröße eines Membranfilters gibt zwar in der Regel den größten Porendurchmesser an, jedoch können auch größere Partikel nicht zu 100 % zurückgehalten werden [213]. Bei den untersuchten Nanovesikeln handelt es sich zudem nicht um starre Gebilde, denn die Membranhülle besitzt eine gewisse Flexibilität und auch größere Vesikel könnten zumindest teilweise durch die Poren hindurchgezwingt werden.

Das gänzliche Fehlen kleinerer Vesikelpopulationen stand jedoch im Gegensatz zu den im TEM identifizierten Nanovesikeln, denn dort konnten Durchmesser vorwiegend im Bereich von etwa 100–150 nm, aber auch vereinzelt um 50 bzw. 500 nm große Vesikel beobachtet werden (vgl. Abb. 4.3 (3) und Abb. 4.11). Daraufhin wurde die Probe für 10 min mit Ultraschall behandelt, mehrmals auf- und abpipettiert und die DLS-Messung wiederholt. Wie in Abb. 4.12 dargestellt, wurden dabei in derselben Probe Nanovesikel in einer Größenordnung von 100–200 nm detektiert (mittlerer Durchmesser: 140 ± 19 nm). Diese Messung deckte sich mit den Beobachtungen aus den TEM-Aufnahmen. Dass die vereinzelt vorkommenden kleineren (ca. 50 nm) und größeren (ca.

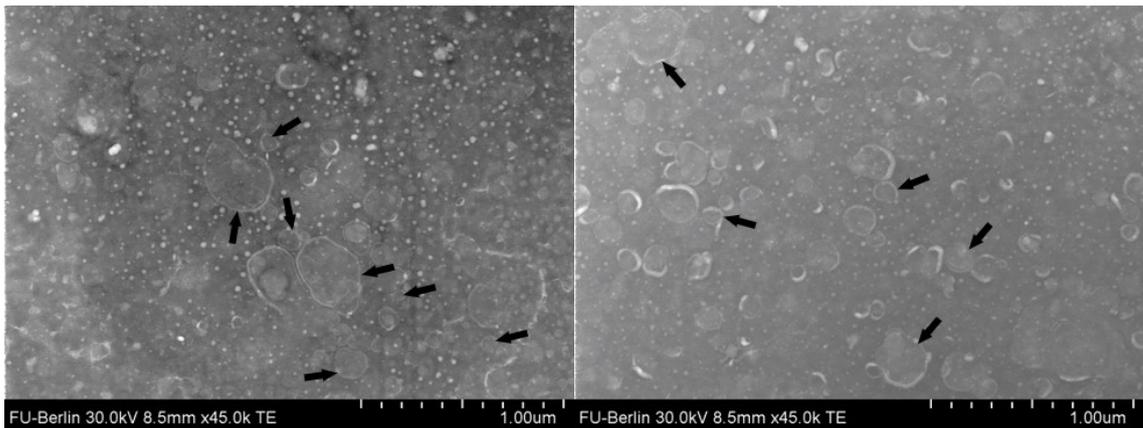


Abbildung 4.11: TEM-Aufnahmen von *Craterostigma plantagineum* EVs. Kontrastierung: UranylLess; Gerät: Hitachi SU8030

500 nm) Vesikel bei der DLS-Messung nicht auftauchten, ist wahrscheinlich durch die geringe Anzahl bedingt.

Im zweiten Messdurchgang wurden noch Signale oberhalb von 800 nm detektiert, allerdings mit einer geringeren Intensität im Verhältnis zu denen um 140 nm. Folglich hatte die Ultraschallbehandlung einzelne Vesikel aus den Aggregaten herausgelöst, diese jedoch nicht vollständig aufgebrochen.

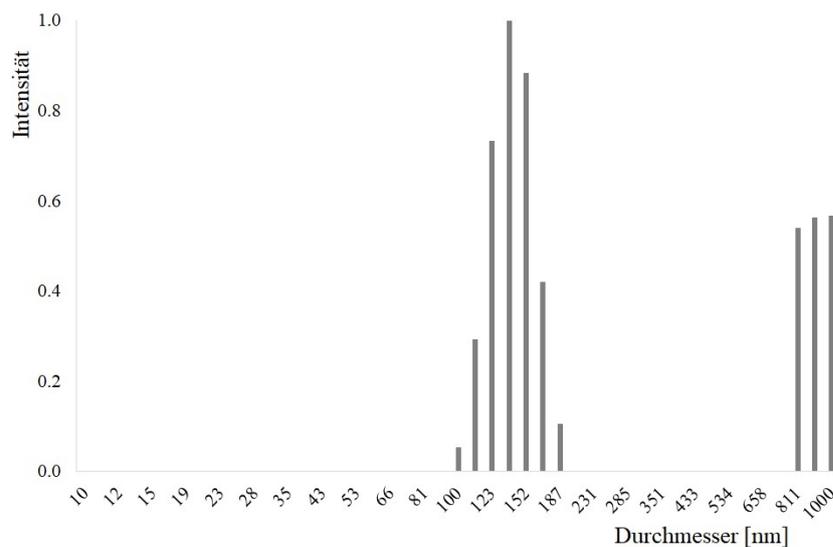


Abbildung 4.12: DLS-Ergebnisse von *Craterostigma plantagineum* EVs nach Ultraschallbehandlung. Mittlerer Durchmesser der Vesikelpopulation zwischen 100 und 200 nm: 140 ± 19 nm ($n=3$).

Die Ergebnisse der DLS-Messungen wurden daher nicht losgelöst von den TEM-Aufnahmen betrachtet. Die folgenden Ergebnisse zeigten allerdings zum Teil dennoch gewisse Diskrepanzen zwischen den ermittelten Größen. So wurde für Nanovesikel aus *Vincae minoris herba*, *Vinca minor* L. ein mittlerer Durchmesser von 380 ± 200 nm und für solche aus *Visci herba*, *V. album* ein mittlerer Durchmesser von 280 ± 115 nm am DLS bestimmt. Während die TEM-Aufnahmen für *V. minor* die DLS-Daten durchaus unterstützten (geschätzter Durchmesser ca. 300 nm), wurden im Fall von *V. album* deutlich kleinere Vesikel (ca. 150 nm) am TEM beobachtet (vgl. Abb. 4.13). Diese Beobachtung geht jedoch konform mit der bekannten Artefaktbildung durch Schrumpfung

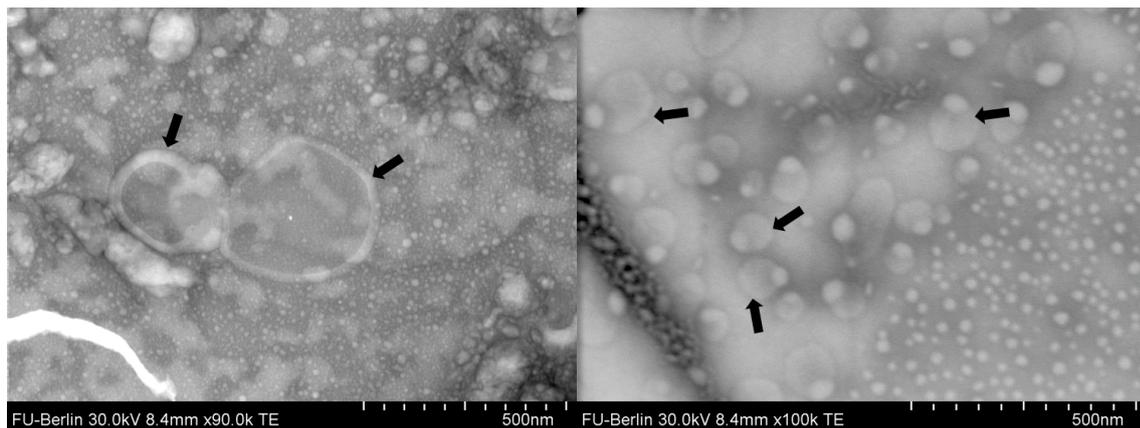


Abbildung 4.13: TEM-Aufnahmen von Nanovesikeln aus *Vincae minoris herba* (links) und *Visci herba* (rechts). Kontrastierung: UranylLess; Gerät: Hitachi SU8030

während der TEM-Präparation (s. Abschnitt 4.3.1).

Vergleicht man die DLS-Ergebnisse von *N. tabacum* EVs mit den Kryo-TEM Aufnahmen, so decken sich die im DLS ermittelten zwei Kohorten mit mittleren Durchmessern von 70 ± 20 nm, respektive 520 ± 170 nm mit den am Kryo-TEM gemachten Beobachtungen (vgl. Abb. 4.7 und Abb. 4.14).

Auch Frau Janine Schanz zeigte in ihrer Masterarbeit, dass bei der Betrachtung der Vesikelgrößen die Kombination von DLS und TEM nötig und sinnvoll ist, um deren Dimension möglichst realistisch einschätzen zu können [207]. Aufgrund der Artefaktbildung wären TEM-Bilder allein nicht aussagekräftig genug und da das DLS keine Rückschlüsse auf die Morphologie der untersuchten Partikel zulässt, wären diese Daten allein ebenso wenig belastbar. In Tab. 4.2 wurden die Ergebnisse der Partikelgrößenbestimmung der vorliegenden Dissertation, sowie der betreuten Masterarbeiten von Frau Schanz und Frau Zhang zusammengefasst. Trotz Ultraschallbehandlung und mehrmaligem auf- und abpipettieren war es nicht für alle Vesikelisolate möglich die Aggregate aufzubrechen und realistische Partikelgrößen zu bestimmen.

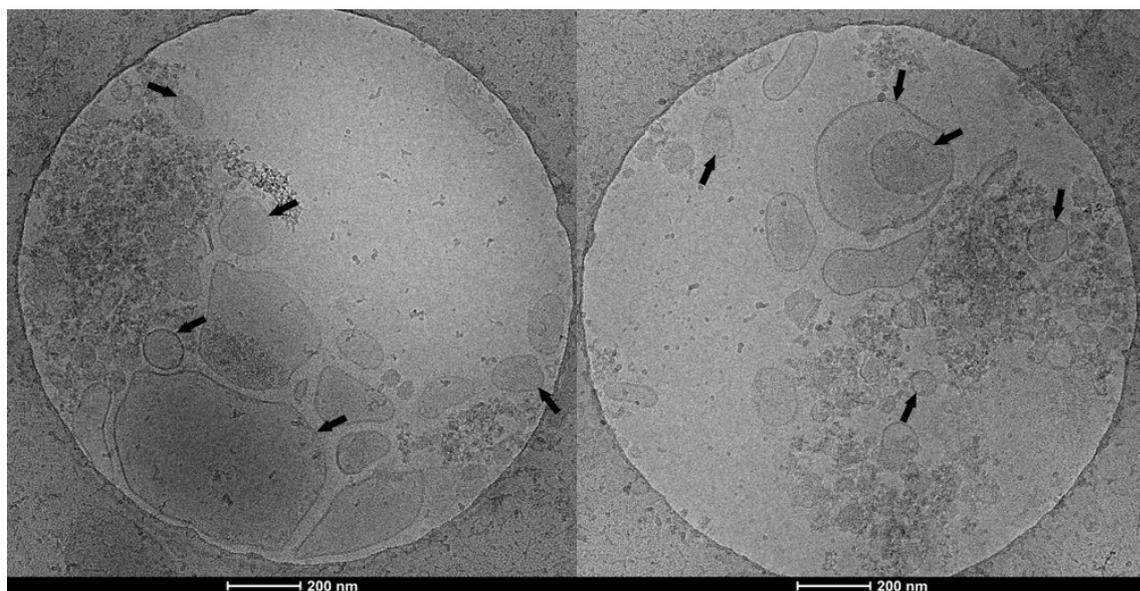


Abbildung 4.14: Kryo-TEM Aufnahmen von *Nicotiana tabacum* EVs. Gerät: Talos™ Arctica

Eine weitere Beobachtung bei der Bearbeitung der pflanzlichen Nanovesikel war, dass sich Aggregate der Vesikel schlechter aufbrechen ließen, wenn die Präparation im leicht alkalischen TBS erfolgte, als wenn VIB verwendet worden war. Da sich der pH-Wert auf die Ladung der Vesikeloberfläche auswirken kann, könnte sich so auch das Zetapotential verändern und diese Beobachtung erklären.

Betrachtet man die in Tab. 4.2 aufgelisteten, sowie publizierte Daten [13, 30, 33, 37, 48], so zeigt sich, dass die Größe der Nanovesikel im Pflanzenreich eine hohe Variabilität aufweist und offenbar speziesspezifisch ist. Denkbar wäre weiterhin, dass der Vesikeldurchmesser vom Gewebetyp abhängt, von dem die Vesikel sezerniert werden, bzw. die Größe sich danach richtet, welche Zielzelle adressiert werden soll.

Tabelle 4.2: Übersicht der mittels DLS ermittelten Partikelgrößen.

Pflanze	Ausgangs- material	mittlere Partikelgröße in nm $\pm \sigma$ (n \geq 3)
<i>Allium cepa</i> L.*	D	60 und 450
<i>Betula pendula</i> ROTH, <i>B. pubescens</i> EHRH.	D	26 \pm 3; 74 \pm 6 und 478 \pm 61
<i>Calendula officinalis</i> L.*	D	340
<i>Chelidonium majus</i> L.*	D	-
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> BL.*	D	-
<i>Craterostigma plantagineum</i> HOCHST.	CM	140 \pm 19
<i>Curcuma longa</i> L.**	D	40 \pm 4; 100 \pm 12; 189 \pm 24 und 390 \pm 55
<i>Curcuma</i> sp.**	F	140 \pm 17 und 500 \pm 62
<i>Curcuma zanthorrhiza</i> ROXB.*	D	100 und 450
<i>Ginkgo biloba</i> L.*	D	450
<i>Nicotiana tabacum</i> L.	APF	70 \pm 20 und 520 \pm 170
<i>Taraxacum officinale</i> WEBER EX WIGG.*	D	-
<i>Vinca minor</i> L.	D	380 \pm 200
<i>Viscum album</i> L.*	D	200
<i>Viscum album</i> L.	D	280 \pm 115
<i>Vitex agnus-castus</i> L.*	D	240 und 450
<i>Zingiber officinale</i> ROSCOE*	D	-

*Ergebnisse Masterarbeit Janine Schanz [207] **Ergebnisse Masterarbeit Xinting Zhang [214]

APF apoplastisches Fluid; CH Calluskultur Homogenisat; CM Calluskultur Medium; D Droge; F frisches, homogenisiertes Pflanzenmaterial; σ Standardabweichung

Die Relevanz der Partikelgrößenbestimmung ergibt sich einerseits als Kriterium für eine Sicherstellung gleichbleibender Qualität, wenn pflanzliche Nanovesikel in Zukunft pharmazeutisch angewendet werden sollen. Andererseits ist die festgestellte Aggregatbildung problematisch, wenn

die Vesikel erneut filtriert werden müssen, beispielsweise vor der Aufreinigung mittels SEC (große Aggregate würden die Säule verstopfen), oder vor einer *in vitro* bzw. *in vivo* Applikation. Eine mögliche Lösung für die Problematik der Aggregation kann nach Bosch *et al.* 2016 der Zusatz von Trehalose zum verwendeten Puffer bieten [215]. In einem Versuch mit 0 mM, 25 mM, 50 mM und 100 mM Trehalose als Zusatz bei der Isolation von Nanovesikeln aus *Betulae folium* wurde dessen Eignung hierfür überprüft. 100 mM Trehalose waren zwar bei Raumtemperatur löslich, bei der Lagerung auf Eis fielen jedoch wieder feine Kristalle aus. Da (ungleichmäßige) Kristallisation zu einer Unwucht während der Zentrifugation führen könnte, wurde der 100 mM Ansatz nicht weiter verwendet. Nach der Hochgeschwindigkeitszentrifugation wurden die Nanovesikel für 10 min mit Ultraschall behandelt, danach verdünnt und die Partikelgrößen mittels DLS bestimmt. Wie aus Abb. 4.15 hervorgeht, konnte der Zusatz von 50 mM Trehalose dabei die Aggregatbildung reduzieren, wenn auch nicht gänzlich verhindern. 25 mM zeigten keinen messbaren Einfluss. Zu beachten bleibt, dass der Zusatz einer osmotisch aktiven Substanz wie Trehalose auch zu Veränderungen von Größe und Dichte der Nanovesikel führen kann. Daher sollte der Zucker nur verwendet werden, wenn es der weitere Versuchsaufbau unbedingt erforderlich macht.

Für die, im Rahmen der vorliegenden Dissertation angedachte, weitere Analytik der Nanovesikel war aber die Aggregation nicht von größerem Belang und wurde daher nicht eingehender untersucht. Gegenstand weiterführender Untersuchungen könnte der Einfluss des pH-Wertes auf die Bildung von Aggregaten und das Zetapotential pflanzlicher Nanovesikel sein.

4.3.3 Vesikelquantifizierung

4.3.3.1 Evaluation der relevanten Methoden

Die Quantifizierung von EVs ist ein Aspekt der Analytik, der in den Fachgesellschaften nicht unumstritten ist. Dies zeigt nicht zuletzt die große Bandbreite der von der ISEV vorgeschlagenen Quantifizierungsmethoden [15]. Für die vorliegende Dissertation wurde die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration ausgewählt, da es sich hierbei um eine schnelle, bereits etablierte und robuste Methode handelt. Auch in der Literatur findet sie Anwendung zur Charakterisierung pflanzlicher Vesikelisolate [43, 108]. Bei der Proteinbestimmung ist jedoch zu beachten, dass gelöste Proteine aus der umgebenden Matrix nicht von denen der Vesikel unterschieden und dass vor allem Membranproteine bestimmt werden. Zur Standardisierung der Proben ist die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration dennoch zweckmäßig.

Eine weitere Methode, die sich zur Quantifizierung pflanzlicher Nanovesikel grundsätzlich eignet, ist die fluoreszenzbasierte Gesamtlipidbestimmung mit Membranfarbstoffen [37]. Diese Methode macht sich die Tatsache zu Nutze, dass Membranfarbstoffe wie DiOC₆ (s. Abb. 4.16) in wässriger Lösung nur wenig fluoreszieren und die Fluoreszenzintensität steigt, sobald der Farbstoff in die Membran eingelagert wird [194]. Allerdings können auch Proteine die Fluoreszenzintensität verstärken [39]. Eine Kalibrierung mit kommerziell erhältlichen Exosomen-Standards wäre unökonomisch, allerdings nicht zwingend erforderlich, da die ermittelten Fluoreszenzintensitäten verschiedener Vesikelproben miteinander vergleichbar wären. Hierfür wäre lediglich die Bestimmung eines Referenzwertes erforderlich. Ein Bereich, in dem Fluoreszenzintensität und Vesikelanzahl linear miteinander korrelieren, müsste dennoch etabliert werden. Letztlich hat diese Methode

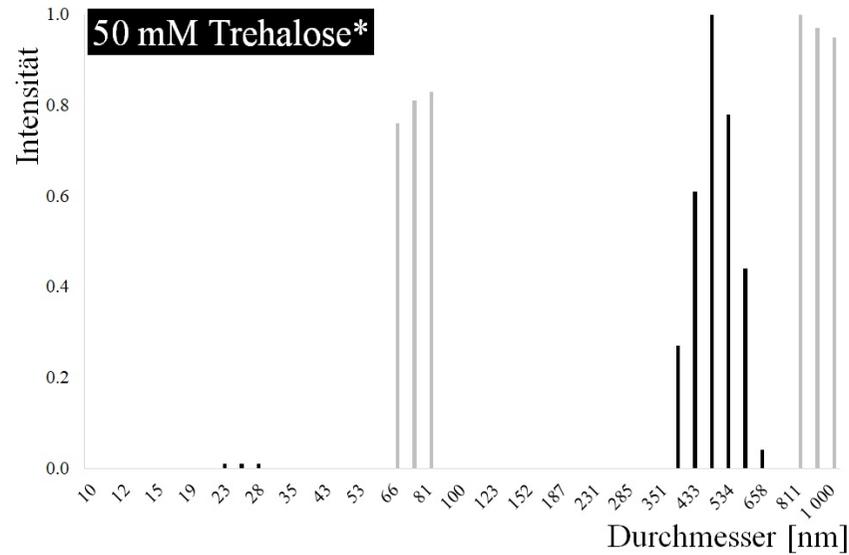
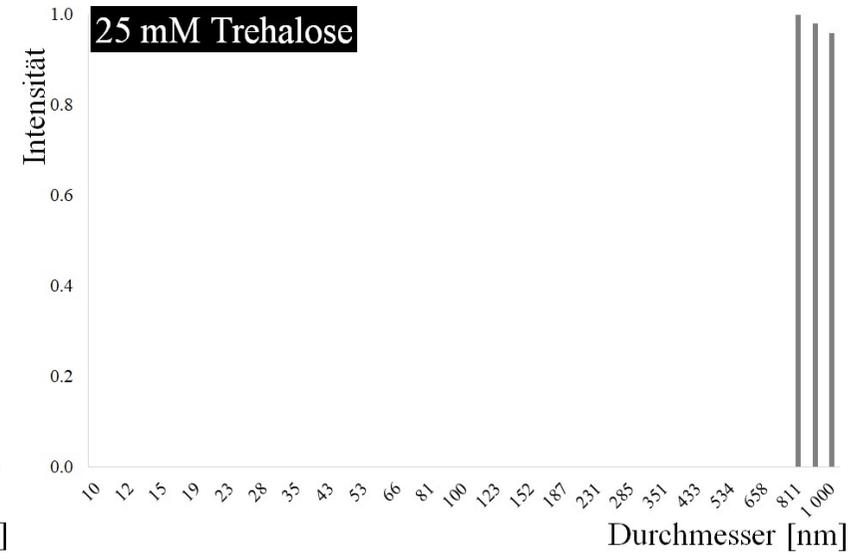
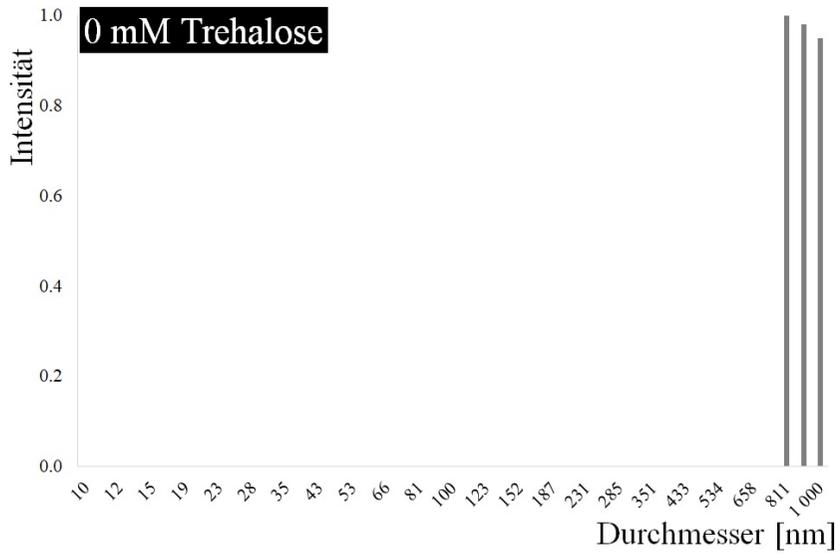


Abbildung 4.15: Einfluss verschiedener Trehalosekonzentrationen auf die Aggregation von Nanovesikeln aus *Betulae folium*. Der Zusatz von 50 mM Trehalose reduzierte die Aggregatbildung in diesem Versuch. * Das Diagramm für 50 mM Trehalose wurde aus den Messungen zweier Verdünnungen zusammengeführt.

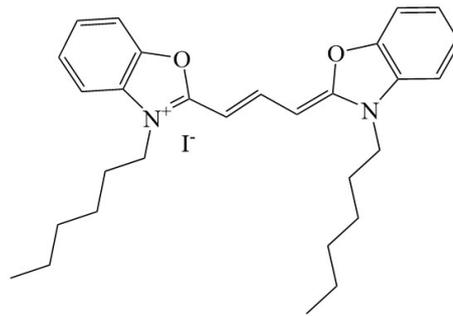


Abbildung 4.16: Struktur des Membranfarbstoffes 3,3'-Dihexyloxycarbocyaniniodid (DiOC_6).

also im Vergleich zur Proteinbestimmung keinen Zusatznutzen, denn bei beiden Methoden werden Surrogatparameter bestimmt. Die Proteinbestimmung konnte allerdings auch für zugehörige Proben aus der Vesikelaufarbeitung, beispielsweise auf die Überstände der differentiellen Zentrifugation, angewandt werden und wurde somit regelmäßig für die untersuchten Vesikelisolate durchgeführt.

Von der Verwendung der Gesamt-RNA-Menge als Surrogatparameter wird in der MISEV 2018 Richtlinie abgeraten, da sie vergleichsweise anfällig für Störungen ist [15]. Die Bestimmung der Partikelanzahl kam ebenfalls nicht als Standardmethode zur Quantifizierung in Betracht, da kein NTA genutzt werden konnte und der Aufwand von Kryo-TEM bzw. der Etablierung der Durchflusssyztometrie den Nutzen der gewonnenen Information überstiegen hätte.

Antikörperbasierte Methoden zur Bestimmung von Oberflächenproteinen können bislang nicht durchgeführt werden, da kein allgemein akzeptiertes Oberflächenprotein für pflanzliche Nanovesikel bekannt ist. Die Quantifizierung definierter Moleküle als Surrogatparameter für die Vesikelmenge kommt bei pflanzlichen Nanovesikeln vorerst nur in Ausnahmefällen in Betracht. In Einzelfällen könnte die Gehaltsbestimmung von Sekundärmetaboliten hierzu dienen, jedoch wäre diese Option nur für den Vergleich von Vesikeln derselben Spezies sinnvoll. Perspektivisch könnte diese auch ein Aspekt der Qualitätskontrolle von Arzneimitteln auf Basis pflanzlicher Nanovesikel werden.

4.3.3.2 Proteinkonzentrationen

Für die vorliegende Dissertation diente die Bestimmung der Proteinkonzentration vorwiegend der Einschätzung der zu verwendenden Mengen bzw. des Verdünnungsgrades für weiterführende Untersuchungen – beispielsweise für die Präparation der TEM-Proben, DLS-Messungen oder SDS-PAGE bzw. IEF. Zusätzlich konnte die Effektivität der Abtrennung gelöster Proteine von den Vesikeln nach der Aufkonzentration letzterer überprüft werden. In Tab. 4.3 wurde eine repräsentative Auswahl ermittelter Proteinkonzentrationen zusammengestellt.

Je nach untersuchter Spezies unterschieden sich die Proteinkonzentrationen und damit die Mengen isolierter Vesikel zum Teil stark voneinander (vgl. auch [207]). Während Nanovesikel aus Homogenisaten vergleichsweise effizient isoliert werden konnten, erforderte die Isolation von EVs den Einsatz großer Mengen Pflanzenmaterial. Der Zusatz von DiOC_6 konnte hierbei die Ausbeute erhöhen, da das Sediment besser sichtbar war und vollständiger wieder aufgenommen werden konnte.

Inwiefern sich der verwendete Puffer und der Einsatz von Cellulase und Macerozym auf die Ausbeuten der Nanovesikel auswirken, war zum Zeitpunkt der Abfassung der vorliegenden Dissertation Gegenstand der Masterarbeit von Frau Xinting Zhang. Vorläufige Ergebnisse legten nahe, dass der verwendete Puffer die Ausbeute nur geringfügig beeinflusst, durch den Einsatz von CMB jedoch eine vielfach (bis zu Faktor 8) höhere Menge an Vesikeln aus pulverisierten Drogen isoliert werden kann. Diese Beobachtung ist durch den teilweisen Verdau der Zellwand zu erklären, wodurch die Vesikel weniger stark zurückgehalten werden und die Ausbeute steigt. Bei einer derart hohen Steigerung der Ausbeute erscheint der Einsatz der Enzyme ökonomischer als für die Gewinnung von APF (vgl. Abschnitt 4.1.1).

Tabelle 4.3: Repräsentative Auswahl ermittelter Proteinkonzentrationen isolierter Nanovesikel und der Überstände der Hochgeschwindigkeitszentrifugation. ($n \geq 3$)

Pflanze	Ausgangs- material	Proteinkonzentration in $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \pm \sigma$		
		Vesikel	SI	SII
<i>Aconitum napellus</i>	D	358 ± 6.2	11 100 ± 130	350 ± 1.7
<i>Arctostaphylos uva-ursi</i>	D	12 400 ± 210	13 000 ± 190	1 170 ± 16
<i>Craterostigma plantagineum</i>	CM	72 ± 3.7	437 ± 19	13* ± 1.0
<i>C. plantagineum</i>	CH	5 630 ± 350	2 000 ± 110	47* ± 4.8
<i>Curcuma zanthorrhiza</i> **	D	2 190 ± 120	2 700 ± 39	223 ± 6.5
<i>Nicotiana tabacum</i> + DiOC ₆	APF	340 ± 40	1 000 ± 10	n/m
<i>N. tabacum</i> – DiOC ₆	APF	288 ± 32	1 040 ± 34	n/m
<i>N. tabacum</i> + DiOC ₆	D	2 150 ± 160	-	-
<i>N. tabacum</i> – DiOC ₆	D	1 350 ± 110	-	-
<i>N. tabacum</i> + DiOC ₆	CH	175 ± 11	-	-

* Proteinkonzentration extrapoliert ** S III: Proteinkonzentration nicht messbar

APF apoplastisches Fluid; CH Calluskultur Homogenisat; CM Calluskultur Medium; D Droge; DiOC₆ 3,3'-Dihexyloxycarbocyaniniodid; n/m nicht messbar; SI erster Überstand der Hochgeschwindigkeitszentrifugation; SII Überstand der Hochgeschwindigkeitszentrifugation nach Waschschrift; SIII Überstand der Hochgeschwindigkeitszentrifugation nach zusätzlichem (2.) Waschschrift; σ Standardabweichung

Bei allen untersuchten Proben zeigte sich deutlich die Effektivität des durchgeführten Waschschrilles der Hochgeschwindigkeitszentrifugation, denn von S I zu S II reduzierte sich die Konzentration löslicher Proteine in allen Fällen mindestens um Faktor 10 und die Vesikel wurden anschließend in frischem Puffer aufgenommen. Für *C. zanthorrhiza* wurde zusätzlich ein weiterer Waschschrift durchgeführt. Die Proteinkonzentration in S III lag dabei unter der Bestimmungsgrenze des BCA-Assays.

4.3.3.3 3,3'-Dihexyloxycarbocyaniniodid-basierte Quantifizierung von Nanovesikeln

Um die aufgestellte Hypothese zu überprüfen, dass die unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten von freiem bzw. membrangebundenem DiOC₆ für die Quantifizierung der isolierten Nanovesikel ausgenutzt werden können, wurde zunächst ein Bereich ermittelt, in dem Fluoreszenzintensität und DiOC₆-Konzentration linear miteinander korrelierten. In Vorversuchen mit verschiedenen Verdünnungen wurde dieser Bereich auf Konzentrationen zwischen 1 und 25 µM eingegrenzt (s. Abb. 4.17).

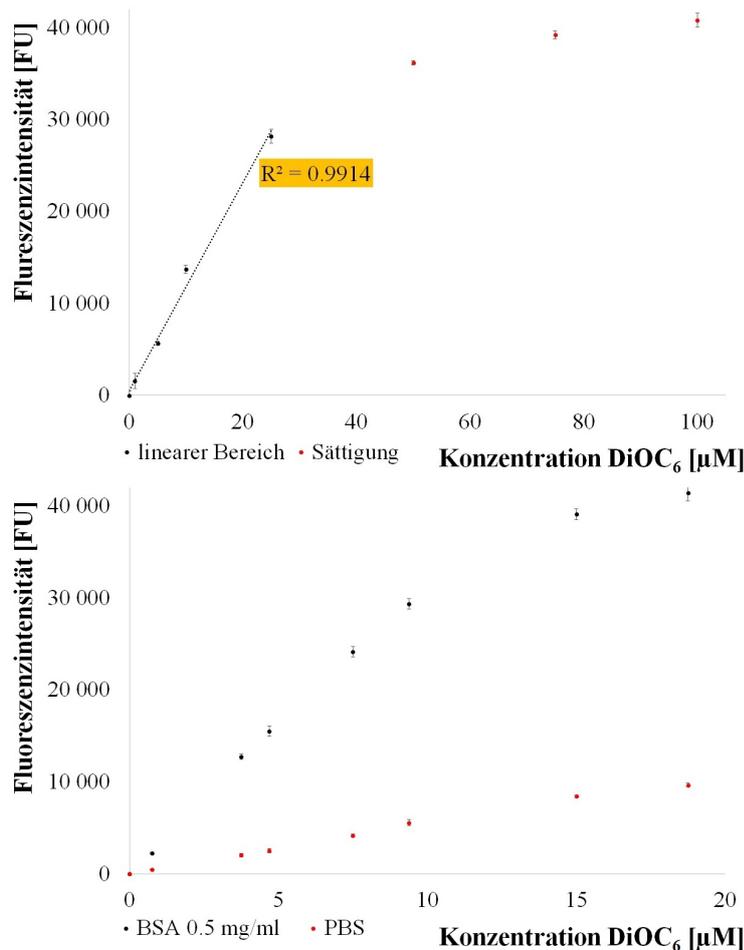


Abbildung 4.17: Fluoreszenzintensität \pm Standardabweichung in Abhängigkeit der 3,3'-Dihexyloxycarbocyaniniodid (DiOC₆)-Konzentration ($n=4$). **Oben:** Festlegung des linearen Bereichs. **Unten:** Fluoreszenzintensität der DiOC₆-Lösungen mit und ohne Zusatz von BSA. *BSA bovines Serumalbumin*

In den darauffolgenden Untersuchungen wurden Lösungen diverser DiOC₆-Konzentrationen mit Nanovesikeln versetzt, sowie mit bovinem Serumalbumin, um etwaige Proteinkontaminationen zu simulieren. Außerdem wurden unterschiedliche Kombinationen dieser Komponenten getestet. Tatsächlich war die Steigung der Fluoreszenz-Konzentrations-Funktion größer, wenn zusätzlich zu DiOC₆ auch Nanovesikel in der Probe enthalten waren. Allerdings führte auch der Zusatz von BSA zum gleichen Resultat (s. Abb. 4.17). Der Farbstoff scheint eine Intensivierung der Fluoreszenz zu zeigen, sobald er an eine lipophile Domäne bindet und zwar unabhängig davon, ob es sich dabei um Proteine oder Lipide handelt. Somit kann nicht unterschieden werden, ob der größere Anstieg

durch Proteine oder Vesikel hervorgerufen wurde. Die neue Methode zur Vesikelquantifizierung konnte somit nicht in die Praxis umgesetzt werden.

4.3.4 Proteinanalytik

Um Proteinprofile pflanzlicher Nanovesikel zu vergleichen, eignen sich elektrophoretische Methoden wie SDS-PAGE und IEF bzw. deren Kombination zur 2D-GE. Charakteristische Banden bzw. Spots sollten nach erfolgter Gelelektrophorese und In-Gel-Verdau massenspektrometrisch identifiziert werden.

4.3.4.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der Methodik wurde die SDS-PAGE zunächst mit APF aus Efeublättern (*H. helix*) durchgeführt. Hierfür wurde APF sowohl mit, als auch ohne zugesetztem β -Mercaptoethanol⁷ als Proteaseinhibitor im Infiltrationsmedium (VIB) isoliert und anschließend in reduzierendem Lämmli-Puffer denaturiert. Aufgetragen wurden jeweils ca. 5, 10 und 20 μ g Gesamtprotein. Zwei identisch beladene Gele wurden entwickelt und anschließend eines mit kolloidalem Coomassie, das zweite mit Silber gefärbt. Abb. 4.18 zeigt, dass die SDS-PAGE unter den gewählten Bedin-

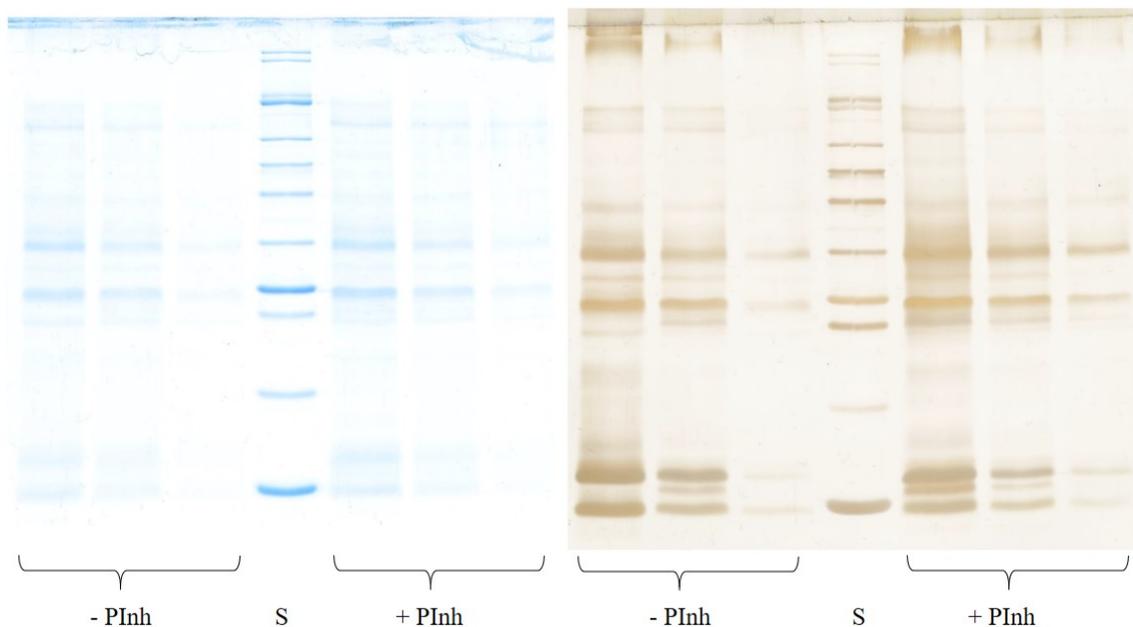


Abbildung 4.18: SDS-PAGE von APF aus Efeublättern. Aufgetragen wurde APF mit (+) und ohne (-) Zusatz von Proteaseinhibitor (PInh) jeweils von links nach rechts 20, 10 und 5 μ g Gesamtprotein. Färbung links: kolloidales Coomassie, rechts: Silber. *S* Proteinstandard

gungen zu von einander getrennten, scharfen Proteinbanden führte und dass sich die Methodik grundsätzlich zur Proteinanalytik eignete. Zudem ist erkennbar, dass zwei voneinander unabhängige APF-Isolationen zu identischen Proteinprofilen führten und dass sich der Zusatz eines Proteaseinhibitors nicht wesentlich auf das Proteinmuster auswirkte. Es ist jedoch davon auszugehen, dass die Verwendung eines Proteaseinhibitors zu einer verbesserten Stabilität der Probe führt, was

⁷ Zu Beginn der Bearbeitungszeit der vorliegenden Dissertation diente β -Mercaptoethanol (0.1 % V/V) als Proteaseinhibitor im Isolationspuffer, wurde jedoch im weiteren Verlauf durch 10 mM EDTA und 0.5 mM PMSF ersetzt.

nicht zuletzt bei der IEF von Relevanz sein kann, da dabei lange Elektrophoresezeiten bei vergleichsweise hohen Spannungen zu proteolytischer Zersetzung führen könnten [195]. Ebenfalls gut ersichtlich war die höhere Empfindlichkeit der Silberfärbung, da bei gleicher Proteinmenge mit Coomassie-Blau weniger Banden detektiert werden konnten. Aufgrund des deutlich höheren Aufwandes bei der Silberfärbung wurde diese jedoch erst durchgeführt, wenn die Coomassiefärbung nicht für alle aufgetragenen Proben ausreichend war (vgl. Abb. 4.19). Grundsätzlich lieferten alle drei aufgetragenen Proteinmengen auswertbare Gele. Für die Coomassiefärbung waren 20 µg Protein gut geeignet und wurden daher als Richtwert für weitere Gele verwendet. Da keine überladenen Banden entstanden, konnte die Proteinmenge auch noch geringfügig erhöht werden.

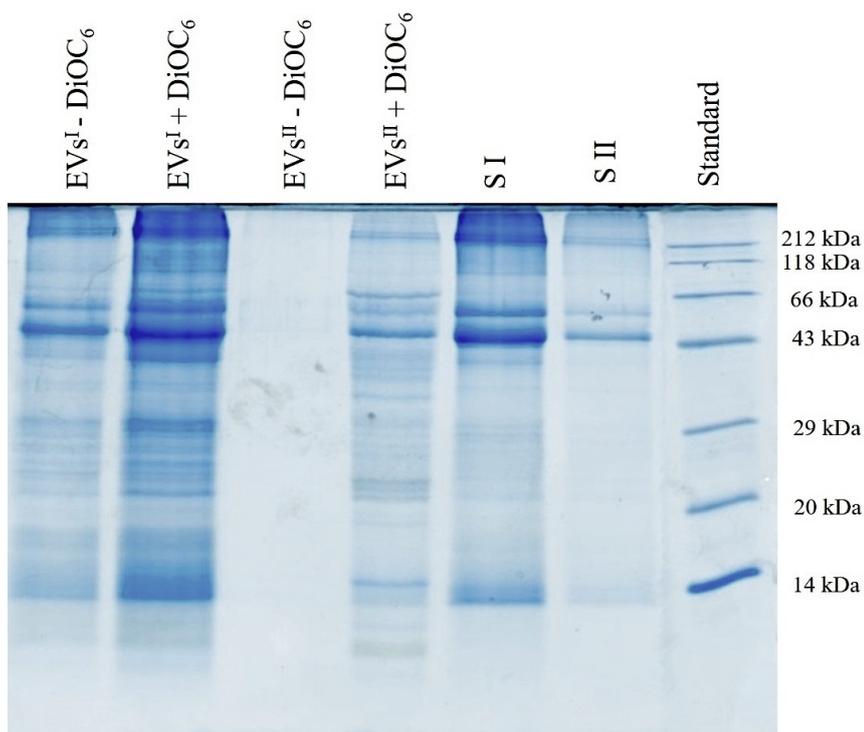


Abbildung 4.19: SDS-PAGE von EVs vor^I und nach^{II} Waschen und mit (+) bzw. ohne (-) Zusatz von 3,3'-Dihexyloxycarbocyaniniodid (DiOC₆), sowie von den Überständen der Hochgeschwindigkeitszentrifugation vor (S I) und nach dem Waschschrift (S II) aus APF von Tomatenblättern. Färbung: erst kolloidales Coomassie, anschließend Silber.

Bei der SDS-PAGE von EVs aus dem APF von Tomatenblättern (*Solanum lycopersicum* L.) verdeutlichte das resultierende Gel (Abb. 4.19) die bereits in Abschnitt 4.3.3.2 beschriebene Gegebenheit, dass die Verwendung von DiOC₆ die Ausbeute wesentlich erhöhte, wenn nicht ausschlaggebend für eine erfolgreiche Isolation von EVs war. Bei sonst gleicher Aufarbeitung waren die Proteinbanden der Probe mit DiOC₆-Zusatz vor dem Waschschrift (EVs^I) intensiver, als die ohne DiOC₆. Nach dem Waschen (EVs^{II}) konnten die Vesikel ohne DiOC₆ nicht wiedergefunden werden. Auch die im Anschluss an die Coomassiefärbung durchgeführte Silberfärbung des Gels konnte für diese Probe keine Proteinbanden identifizieren. Auch die Effektivität des Waschschriftes zeigt sich anhand der deutlichen Reduktion detektierbarer Banden von S I zu S II. Bei der dennoch charakteristischen Bande zwischen 43 und 66 kDa könnte es sich aufgrund der Grö-

ße und des häufigen Vorkommens⁸ möglicherweise um Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/oxygenase (RuBisCO, \approx 53 kDa) handeln (vgl. Abschnitt 4.3.4.3).

Bei der SDS-PAGE von *Curcuma*-Nanovesikeln (Abb. 4.20) war der Waschschrift noch effizienter, denn in S II war die Proteinkonzentration bereits so gering, dass mit Coomassie-Blau keine Proteine detektiert werden konnten. Beim Vergleich der SDS-PAGE-Gele von Nanovesikeln, die aus verschiedenen Drogen isoliert worden waren, fiel auf, dass einige der Proben keine scharfen Proteinbanden lieferten, sondern nur diffuse Schleier (s. Abb. 4.20). Aufgrund dieser Beobachtung

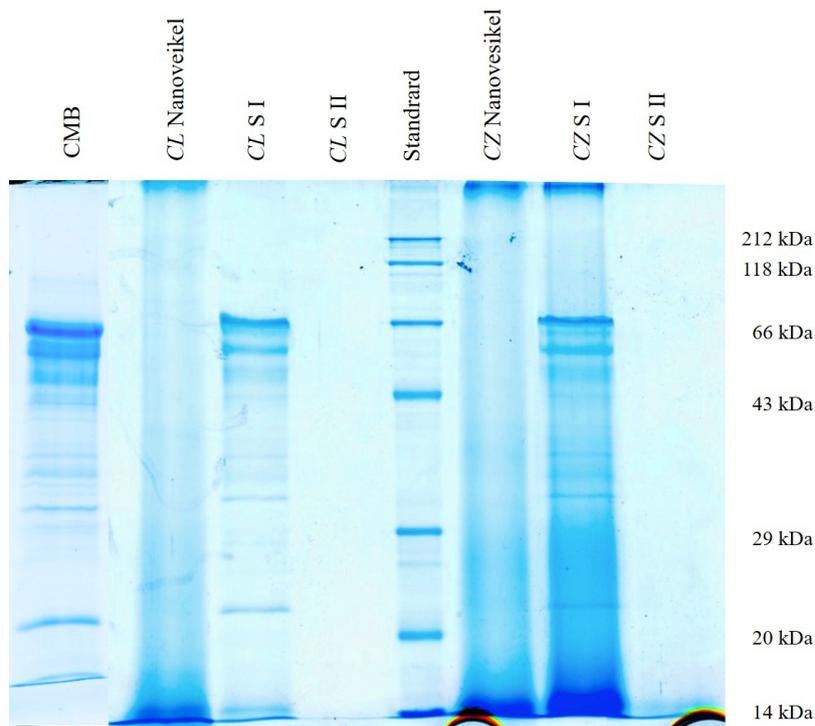


Abbildung 4.20: SDS-PAGE von Nanovesikeln aus *Curcumae longae rhizoma* (CL) und *Curcumae zanthorrhizae rhizoma* (CZ), sowie den Überständen der Hochgeschwindigkeitszentrifugation vor (S I) und nach (S II) dem Waschschrift. Die Proteinbanden in S I entsprachen denen von Cellulase und Macerozym. CMB Cellulase-Macerozym-Puffer

wurde die Zusammensetzung des ursprünglich verwendeten VIB angepasst. Der Puffer enthielt zunächst gemäß Rutter und Innes 2016 [37] 20 mM MES, 100 mM NaCl, 2 mM CaCl₂ und optional β -Mercaptoethanol. Da letzteres nicht mit dem BCA-Assay kompatibel war, wurde es zum Teil nicht verwendet und später durch 10 mM EDTA und 0.5 mM PMSF ersetzt. EDTA inhibiert Metalloproteasen und PMSF v.a. Serinproteasen [217]. Die Verwendung von EDTA gemeinsam mit CaCl₂ wäre jedoch widersinnig, daher wurde CaCl₂ nicht mehr zugesetzt. Diese Anpassungen gemeinsam mit der strikten Einhaltung einer Kühlkette führten dennoch nicht zu einem anderen Ergebnis.

Auch im Rahmen der Masterarbeit von Frau Schanz wurde dieselbe Beobachtung bei einer Reihe von Nanovesikeln aus Drogen gemacht. Allerdings nicht durchgehend, denn einige Vesikelisolate lieferten durchaus klare Banden (s. Abb. 4.21). Die diffusen Schleier in den Gelen zeigen, dass der Großteil der Proteine bereits zu Beginn der Elektrophorese zersetzt vorlag. Dass weder verschie-

⁸ RubBisCO ist noch vor Actin das wahrscheinlich häufigste Protein der Erde [216].

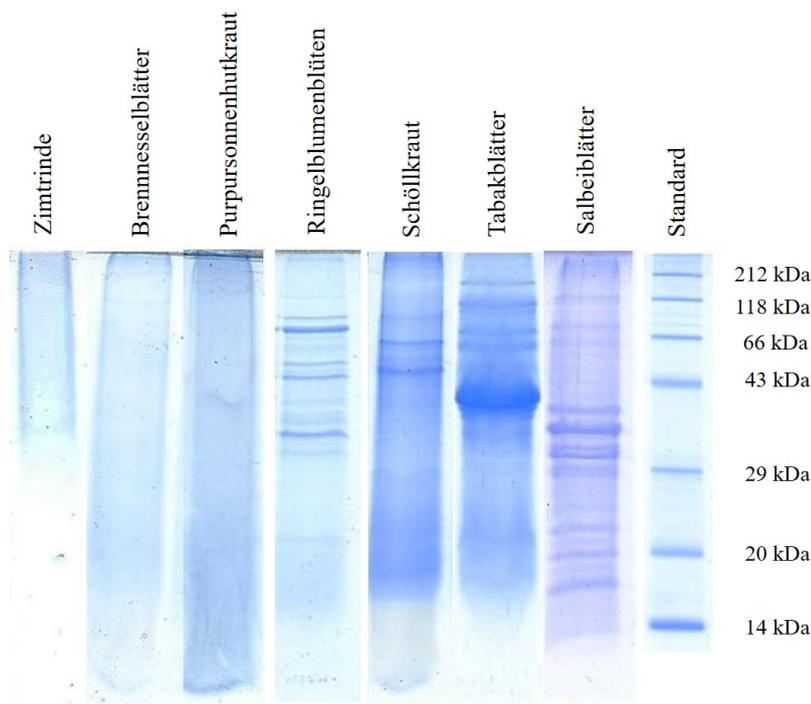


Abbildung 4.21: SDS-PAGE von Nanovesikeln aus verschiedenen Drogen. Während einige Proben aufgrund von Proteolyse keine auswertbaren Proteinprofile lieferten, eigneten sich andere Drogen besser für diese Untersuchung. *Auswahl aus der Masterarbeit von Janine Schanz 2019 [207].*

dene Proteaseinhibitoren, noch die Einhaltung einer Kühlkette die Ergebnisse beeinflusste, lässt den Schluss zu, dass die Proteolyse dabei nicht während der Probenvorbereitung, sondern bereits zuvor abgelaufen war. Auch tauchte diese Problematik nicht bei Vesikeln aus APF oder Calluskultur auf, sodass es sehr wahrscheinlich ist, dass die Zersetzung der Proteine während der Trocknung der Drogen erfolgte. Bemerkenswert ist, dass dennoch Vesikel im Elektronenmikroskop beobachtet werden konnten (z.B. *C. zanthorrhiza* s. Abb. 4.2 (4) und Abb. 4.22 (1)), was darauf hindeutet, dass Lipide für die Integrität der Vesikel eine wichtigere Rolle spielen als Proteine. Bei den diffusen Banden im Bereich von etwa 14 kDa handelt es sich wahrscheinlich um die Bruchstücke der abgebauten Proteine. Darunter könnten auch Fragmente von membranassoziierten Proteinen der Nanovesikel sein (s. Abb. 4.22 (2)).

Für die massenspektrometrische Identifizierung von Proteinen wurden Nanovesikel aus APF, sowie aus getrocknetem Pflanzenmaterial von *N. tabacum* isoliert. *N. tabacum* wurde ausgewählt, da das Genom der Pflanze bereits vollständig sequenziert ist und somit eine Basis für den späteren Datenbankabgleich vorhanden war [218]. Weiterhin eigneten sich Tabakblätter aufgrund der vergleichsweise hohen Ausbeute gut für die Gewinnung von APF. Die Ergebnisse der Massenspektrometrie (s. Abschnitt 4.3.4.3) zeigten jedoch die Notwendigkeit einer Methode, bei der die Proteine besser voneinander getrennt werden wie z.B. bei der 2D-GE.

4.3.4.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die Trennung der Proteine erfolgt bei der 2D-GE zunächst anhand des isoelektrischen Punktes, anschließend anhand der Größe. Aufgrund der Kombination dieser zwei verschiedenen Prinzipien, ist davon auszugehen, dass die Proteine besser voneinander abgetrennt werden, als bei der Nutzung

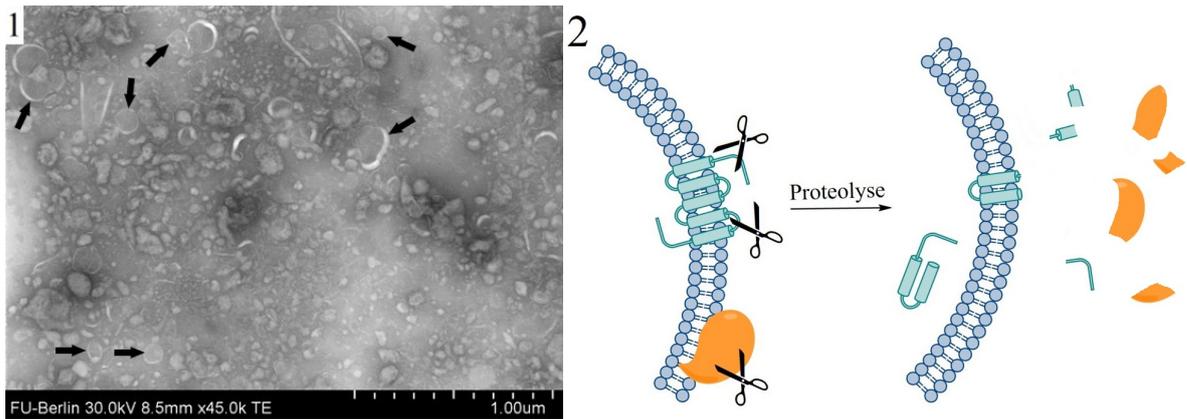


Abbildung 4.22: 1) TEM-Aufnahme von Nanovesikeln aus *Curcumae zanthorrhizae rhizoma*. Kontrastierung: Uranylless; Gerät: Hitachi SU8030 2) Schematische Darstellung der Hypothese zur Proteolyse. An der Außenseite der Vesikel könnten Proteasen membranassoziierte Proteine zu Fragmenten hydrolysieren, ohne dabei die Membran selbst zu zerstören.

nur einer Methode. Für das Resultat war dabei die Probenvorbereitung zur IEF von entscheidender Wichtigkeit, da die Proteine hierfür nativ, gelöst und weitestgehend frei von Salzen und ionischen Tensiden vorliegen mussten [195, 197].

Auch die Auswahl der Proben beeinflusste das Ergebnis maßgeblich. So wurden bei der 2D-GE von Nanovesikeln aus *C. zanthorrhizae rhizoma* analog zu Abb. 4.20 ebenfalls nur diffuse Schleier detektiert. Spots konnten detektiert werden, als EVs aus Calluskultur-Medium von *N. tabacum* mittels 2D-GE untersucht worden waren (s. Abb. 4.23). Aufgrund der geringen Ausbeute an EVs



Abbildung 4.23: Zweidimensionale Gelelektrophorese von *Nicotiana tabacum* Callus EVs.

wurde kein BCA-Assay zur Proteinquantifizierung durchgeführt, sondern die gesamte Probe für die 2D-GE verwendet. Damit ist unklar, welche Proteinmenge aufgetragen worden ist, allerdings zeigt das Gel, dass eine größere Proteinmenge wahrscheinlich sinnvoll wäre. Um die Proteinkonzentration weiterer Proben für die IEF mit geringerem Probenverlust bestimmen zu können, wurde der Bradford-Assay genutzt. Dessen höhere Empfindlichkeit geht allerdings mit einer höheren Anfälligkeit für Störungen, verglichen mit dem BCA-Assay, einher. Aus diesem Grund wurde für die 2D-GE APF aus aseptisch angezogenem Tabak (s. Abschnitt 3.1.4) unter Verwendung von PBS verwendet und PMSF erst nach der Proteinbestimmung zugesetzt. Durch die mehrschrittige

Aufarbeitung der Probe für die IEF war ein nicht unerheblicher Verlust an Protein zu erwarten und daher sollte so viel Probe wie möglich verwendet. In diesem Fall standen aufgrund der kleinen EV-Ausbeute jedoch lediglich 5.1 µg Gesamtprotein zur Verfügung⁹. Weder die Färbung mit Coomassie-Blau, noch mit Silber zeigte Proteinspots.

Besonders der Anspruch der IEF, dass die zu untersuchenden Proteine in Lösung, aber ohne Salze oder ionische Tenside vorliegen müssen, steht im Widerspruch zu den Anforderungen der Nanovesikel an ihre Umgebung. In demineralisiertem Wasser waren die isolierten Nanovesikel nicht stabil, sodass die Proben nachträglich entsalzt werden mussten, was wiederum zu Problemen aufgrund von Probenverlust führte.

Als Reaktion auf die genannten Probleme wurden Nanovesikel aus *C. plantagineum* Callus an den Kollaborationspartner vom Luxembourg Institute of Science and Technology gesandt, um dort ohne Gelelektrophorese mittels LC-MS Proteine zu identifizieren. Die Messungen wurden allerdings aufgrund von unvorhersehbaren Termenschwierigkeiten auf unbestimmte Zeit verschoben.

Ein weiterer Ansatz die Probe zu entsalzen ist, das Sediment der Hochgeschwindigkeitszentrifugation anstelle von Puffer direkt in Rehydratationspuffer für die IEF aufzunehmen. Ob Salze des für die Isolation unbedingt notwendigen Puffers dabei ausreichend abgetrennt werden können, bleibt bis zu einem entsprechenden Versuch fraglich. Außerdem können weder Begleitstoffe abgetrennt, noch weitere Untersuchungen (z.B. DLS oder TEM) mit der Probe durchgeführt werden, da die Vesikel ihre strukturelle Integrität verlieren würden.

4.3.4.3 In-Gel-Verdau und Massenspektrometrie

Zur massenspektrometrischen Identifizierung ausgewählter, charakteristischer Proteinbanden wurden zunächst die in Abb. 4.24 gekennzeichneten Banden (1 – 6) aus dem Gel ausgeschnitten und wie in Abschnitt 3.4.4 beschrieben behandelt. Die massenspektrometrische Analyse selbst wurde von Herrn Dr. Christoph Weise in der Abteilung Biomassenspektrometrie des Instituts für Chemie und Biochemie der Freien Universität Berlin durchgeführt. Per Abgleich der Massenspektren mit entsprechenden Datenbanken wurde einerseits die Identität des bovinen Serumalbumins, das als Positivkontrolle mitgeführt wurde, bestätigt und so die Funktionsfähigkeit des Versuchs verifiziert. Weiterhin wurden drei verschiedene Proteine des *Dickeya* Phagen BF25/12 identifiziert (s. Tab. 4.4), jedoch keine Proteine, die dem Tabak selbst zugeordnet werden konnten.

Dieses Ergebnis entsprach nicht den Erwartungen, dennoch liefert es eine Erklärung für die unterschiedlichen Proteinprofile von Nanovesikeln aus getrocknetem Tabakkraut bzw. APF (vgl. Abb. 4.24). Es ist bekannt, dass der *Dickeya* Phage BF25/12 häufig *Dickeya spp.* (früher *Erwinia*) infiziert [219] und dass *Dickeya* Spezies ihrerseits häufig *Solanaceae* wie Tabak befallen [220]. Diese Ergebnisse zeigten, dass die Proteinidentifizierung mit der gewählten Methode zwar geeignet, der Tabak aber wahrscheinlich mit *Dickeya* infiziert war. Makroskopisch wiesen die Tabakpflanzen bei der Ernte keine Besonderheiten oder Anzeichen einer Infektion bzw. Fäulnis auf. Die isolierten Vesikel wurden erneut elektronenmikroskopisch untersucht, allerdings keine Phagen beobachtet (vgl. Abb. 4.25). Da mehrere verschiedene Proteine des selben Phagen eindeutig identifiziert wurden, jedoch nur Vesikel beobachtet werden konnten, wäre es möglich, dass die Phagen innerhalb der Vesikel vorlagen und darum mit ihnen aufkonzentriert worden sind. Hieraus

⁹ Die verwendeten IEF-Gelstreifen könnten mit bis zu 300 µg beladen werden.

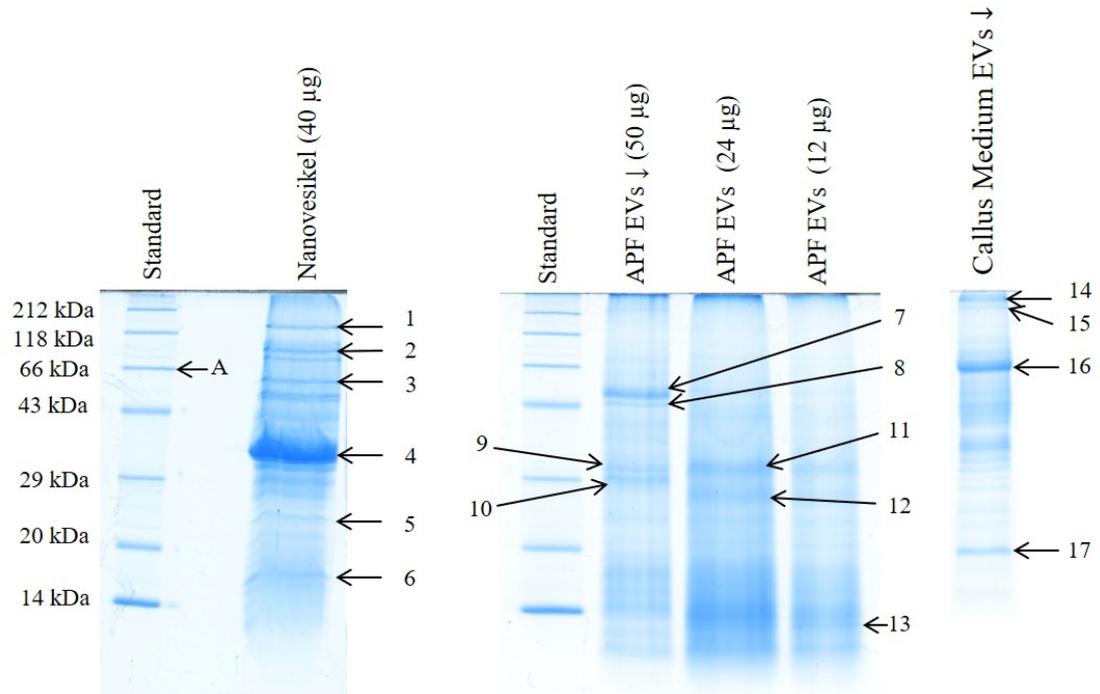


Abbildung 4.24: Ausgewählte Protein-Banden für den In-Gel-Verdau aus der SDS-PAGE von Nanovesikeln aus getrocknetem Kraut (1–6) bzw. von EVs aus APF (7–13) und Calluskultur-Medium (14–17) von *Nicotiana tabacum*. Als Positivkontrolle diente das Albumin aus bovinem Serum (A) des Proteinstandards. ↓ Proteine vor Denaturierung mit Aceton gefällt

lässt sich die Hypothese aufstellen, dass die Pflanze die Phagen nutzte, um die bakterielle Infektion besser zu beherrschen. Haben Phagen sich in ihren Wirtszellen ausreichend vermehrt, so wird die Bakterienzelle zerstört und eine große Menge neuer Phagen wird freigesetzt. In Nanovesikel verpackt könnte die Pflanze diese Phagen theoretisch im ganzen Organismus verteilen und sich gegen neue invasive Bakterien zu Nutze machen. Möglicherweise handelt es sich aber auch um eine Entsorgungsstrategie. Um definitiv abzuschließen, dass die Phagen in den Nanovesikeln vor-

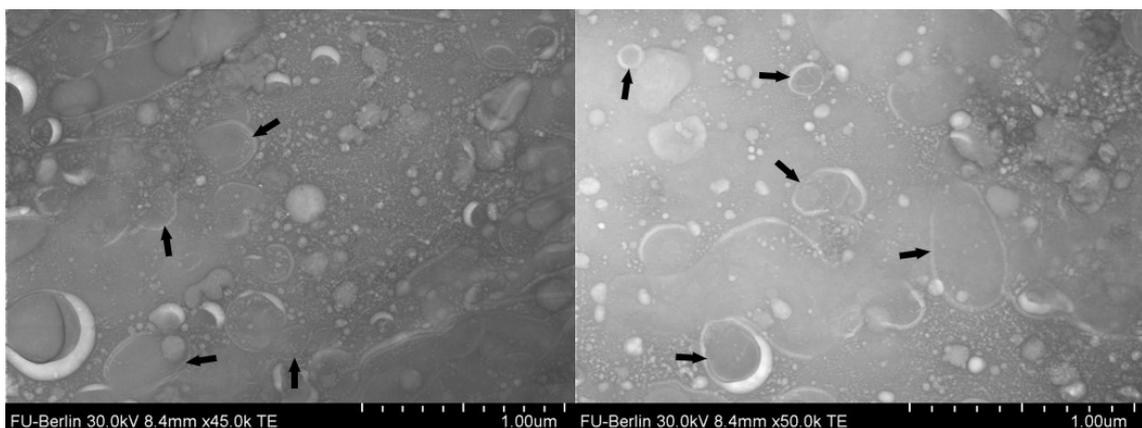


Abbildung 4.25: TEM-Aufnahmen von Nanovesikeln aus getrocknetem Tabakkraut. Kontrastierung: UranylLess; Gerät: Hitachi SU8030

lagen und nicht nur mit ihnen gemeinsam isoliert wurden, ohne am TEM detektiert werden zu können, wäre eine denkbare Möglichkeit die Kombination von Immunogold-Kontrastierung mit

einer Ultramikrotom-Sektionierung, die allerdings nur in einem entsprechend ausgerüsteten und spezialisierten Labor möglich wäre.

Bei der Wiederholung des Versuchs mit Proteinbanden von Tabak EVs aus APF (Abb. 4.24 Banden 7–13) wurden keine Phagenproteine detektiert (s. Tab. 4.4). Allerdings konnten auch hier keine Hinweise auf das Proteom der EVs gewonnen werden, da für das Gros der Banden RuBisCO identifiziert wurde. Das Enzym wurde offenbar nicht ausreichend von den Vesikeln abgetrennt, sodass sich ein diffuser Hintergrund mit diesem stark exprimierten Protein im Gel ausbildete, der andere Proteine überdeckte. Mittels MS/MS konnte Herr Dr. Weise dennoch zwei weitere Proteine identifizieren, die allerdings nicht viel mehr Aufschluss lieferten, da es sich um 40S ribosomale Proteine handelte. Verwandte Proteine wurden bereits in Nanovesikeln aus anderen Pflanzen gefunden [33, 37], können jedoch nicht als spezifisch für EVs eingeschätzt werden.

Aus den Ergebnissen wird ersichtlich, dass entweder eine effizientere Trennmethode für die Proteine (z.B. 2D-GE) genutzt werden sollte, oder (und) ein zusätzlicher Reinigungsschritt der Vesikel sinnvoll wäre, um Aufschluss über charakteristische Proteine pflanzlicher Nanovesikel zu erhalten. Für diesen Zweck würden sich insbesondere die SEC und die Agarose-Gelelektrophorese eignen. Allerdings muss zuvor die Problematik der Aggregation für die SEC, sowie der hohe Probenverlust bei Rückgewinnung der Vesikel aus Agarosegelen überwunden werden. Ein weiterer Ansatz war die Verwendung von Calluskulturmedium als Ausgangsmaterial, da hier weder Verunreinigungen durch Infektionen, noch durch RuBisCo zu erwarten waren.

Die erneute Wiederholung des Versuchs unter Verwendung von EVs, die mittels Tangentialflussfiltration (TFF-Easy) aus dem Zellkulturmedium von Tabak Callus gewonnen wurden (Abb. 4.24 Banden 14–17), führte zur Identifikation des Proteins in Bande 16 als β -Xylosidase/ α -L-arabinofuranosidase 2-like. Diese Hydrolase ist in die Zellwandreorganisation involviert [221, 222]. Die Identifikation eines zellwandmodulierenden Enzyms in der Vesikelfraktion unterstützt die in Abschnitt 1.1.1.2 dargestellte Hypothese, dass pflanzliche EVs die Zellwand überwinden können, indem sie selbst die Zellwandstruktur auflockern. Ob derartige Enzyme möglicherweise auf der Vesikeloberfläche lokalisiert sind, oder sie lediglich gemeinsam mit den EVs aufkonzentriert wurden, muss in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden. Dazu könnten die aufkonzentrierten EVs zum einen zusätzlich mittels Ultrafiltration von evtl. gelösten Hydrolasen usw. abgetrennt werden¹⁰, weiterhin wären Zymogramme zur Untersuchung der (Hemi-)Cellulase-Aktivität denkbar. Sollten diese Versuche bestätigen, dass die identifizierte Hydrolase tatsächlich mit EVs assoziiert ist, kann wiederum die o.g. Bestätigung mittels TEM und Immunogold-Ultramikrotom-Technik in Betracht gezogen werden.

¹⁰ Unter Verwendung einer Molekulargewicht-Ausschlussgröße von 100 kDa sollte die Hydrolase β -Xylosidase/ α -L-arabinofuranosidase 2-like mit ≈ 85 kDa effektiv abgetrennt werden, während die EVs vom Filter zurückgehalten werden.

Tabelle 4.4: Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse der Banden aus Abb. 4.24.

Bande	identifiziertes Protein
A	bovines Serumalbumin (entsprach Spezifikation des Proteinstandards)
1	putatives internes Kernprotein <i>Dickeya</i> Phage BF25/12 \approx 113 kDa
2	Datenbankabgleich des Spektrums ergebnislos
3	Datenbankabgleich des Spektrums ergebnislos
4	putatives Kopf-Schwanz-Verbindungsprotein <i>Dickeya</i> Phage BF25/12 \approx 56 kDa
5	Datenbankabgleich des Spektrums ergebnislos
6	putatives Capsidprotein \approx 37 kDa <i>Dickeya</i> Phage BF25/12 (MS-MS bestätigt)
7	RuBisCO lange Kette \approx 53 kDa
8	RuBisCO lange Kette \approx 53 kDa
9	RuBisCO lange Kette \approx 53 kDa
10	40S ribosomales Protein S4 \approx 30 kDa und 40S ribosomales Protein S6 \approx 22 kDa
11	ohne signifikante Übereinstimmung, wahrscheinlich mehrere Proteine
12	RuBisCO lange Kette \approx 53 kDa
13	RuBisCO lange Kette \approx 53 kDa
14	Datenbankabgleich des Spektrums ergebnislos
15	Datenbankabgleich des Spektrums ergebnislos
16	β -Xylosidase/ α -L-arabinofuranosidase 2-like [<i>Nicotiana tabacum</i>] \approx 85 kDa (MS-MS bestätigt), evtl. Mischung aus zwei oder mehreren Isoformen
17	Datenbankabgleich des Spektrums ergebnislos

RuBisCO Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase

4.3.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese von Nanovesikeln wurde zunächst mit einer Agarose-Konzentration von 1 % (m/V) durchgeführt, die für die Elektrophorese von Nukleinsäuren üblich ist. Dabei wurde beobachtet, dass die pflanzlichen Nanovesikel die Taschen zwar in Richtung der Anode deformierten, jedoch nur ein Bruchteil der Vesikel das Gel penetrieren konnte. Daraufhin wurde die Agarosekonzentration auf 0.3 % reduziert. Die Folge war, dass die Gele nicht mehr auf den Transilluminator transferiert werden konnten, da sie zu fragil waren. 0.5-prozentige Agarosegele waren gerade noch handhabbar, die Nanovesikel gelangten dennoch nicht vollständig in das Gel, sondern wurden nach wie vor in der Tasche zurückgehalten (s. Abb. 4.26, Bahn 6).

Weitere Versuche zeigten, dass Exosomen von humanen Zellen, die als Standard mit aufgetragen wurden, nicht in der Tasche verblieben, sondern Banden ausbildeten (s. Abb. 4.26, Bahnen 3–5). Aufgrund der Größenverteilung der Vesikel waren diese Banden jedoch nicht scharf abgegrenzt.

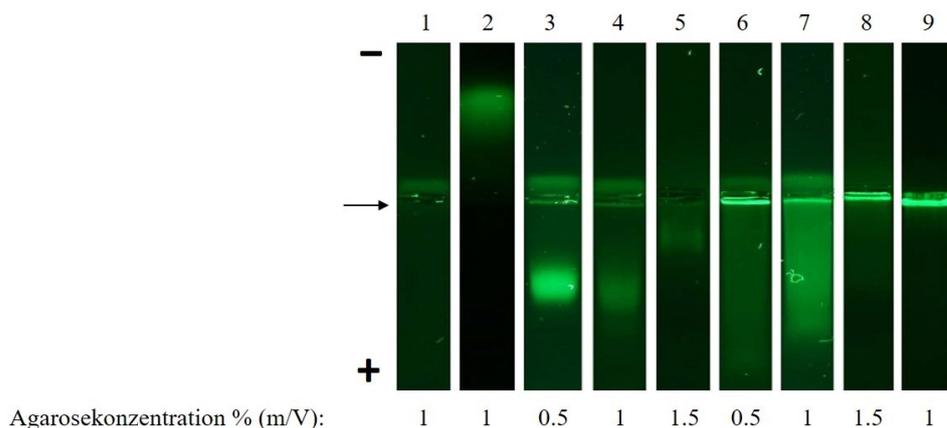


Abbildung 4.26: Agarose-Gelelektrophorese von Exosomen und Nanovesikeln. **1)** Arbeitskonzentration 3,3'-Dihexyloxycarbocyaniniodid (DiOC_6) **2)** 10-fache Arbeitskonzentration DiOC_6 **3–5)** Standard-Exosomen **6–8)** Nanovesikel aus *Visci herba*, *Viscum album* **9)** Nanovesikel aus *Vincae minoris herba*, *Vinca minor*. + Anode; – Kathode; → Position der Geltaschen

Die pflanzlichen Nanovesikel wurden also nicht aufgrund ihrer Beschaffenheit, sondern aufgrund ihrer Größe in der Tasche zurückgehalten¹¹. Außerdem wurde beobachtet, dass der Membranfarbstoff DiOC_6 allein nicht in der verwendeten Arbeitskonzentration detektiert werden konnte. Die zehnfache Konzentration DiOC_6 war detektierbar und erwartungsgemäß wanderte der Farbstoff allein in Richtung Kathode (s. Abb. 4.26, Bahnen 1 und 2). Die Beobachtung, dass der Farbstoff in Assoziation mit Membranen stärker fluoresziert als allein, wurde durch die Literatur bestätigt [194] und war Anlass zur Konzipierung des in den Abschnitten 3.4.3 und 4.3.3.3 beschriebenen Assays.

Alle aufgetragenen Vesikel orientierten sich in Richtung Anode, was auf eine negative Nettoladung schließen lässt. Der kometartige Schweif, der bei den Nanovesikeln von der Geltasche ausging, kann zum Teil auf die breite Größenverteilung der Nanovesikel zurückgeführt werden. Da mit steigender Agarosekonzentration ein kleiner werdender Anteil der Vesikel das Gel penetrieren konnte, war dieser Schweif entsprechend weniger stark ausgeprägt (s. Abb. 4.26, Bahnen 6–8). Die Ausschlussgröße kann demnach über die Agarosekonzentration reguliert werden. Ein weiterer Grund für die Ausbildung unscharfer Banden waren Protein- DiOC_6 -Addukte, wie aus Abb. 4.27 hervorgeht. Um darzulegen, dass lösliche Begleitproteine von den Vesikeln abgetrennt werden konnten, wurde den Vesikeln 10 μg BSA zugesetzt, um ein solches Begleitprotein zu imitieren. Die Negativkontrolle (10 μg BSA + DiOC_6) zeigte ebenfalls eine diffuse fluoreszierende Bande, die in Richtung Anode migriert war. Diese kann nur durch ein BSA- DiOC_6 -Addukt hervorgerufen worden sein, denn DiOC_6 allein wäre zur Kathode gelaufen und in der aufgetragenen Konzentration nicht sichtbar gewesen. Bestätigt wurde diese Schlussfolgerung durch SDS-PAGE nach Segmentierung des Gels. Die Gelstücke wurden rückextrahiert und die Proteine mit Trichloressigsäure gefällt.

Abb. 4.27 zeigt zudem, dass in SI keine relevanten Mengen an Vesikeln detektiert werden konnten. Die aufgetragenen Nanovesikel deformierten die Geltasche in ihrem Streben zur Anode stark, gelangten jedoch kaum in das Gel. Das Pseudo-Begleitprotein BSA wurde nur in den Segmenten

¹¹ Durchmesser von tierischen Exosomen ca. 30–150 nm, von pflanzlichen Nanovesikeln variabel, häufig > 200 nm

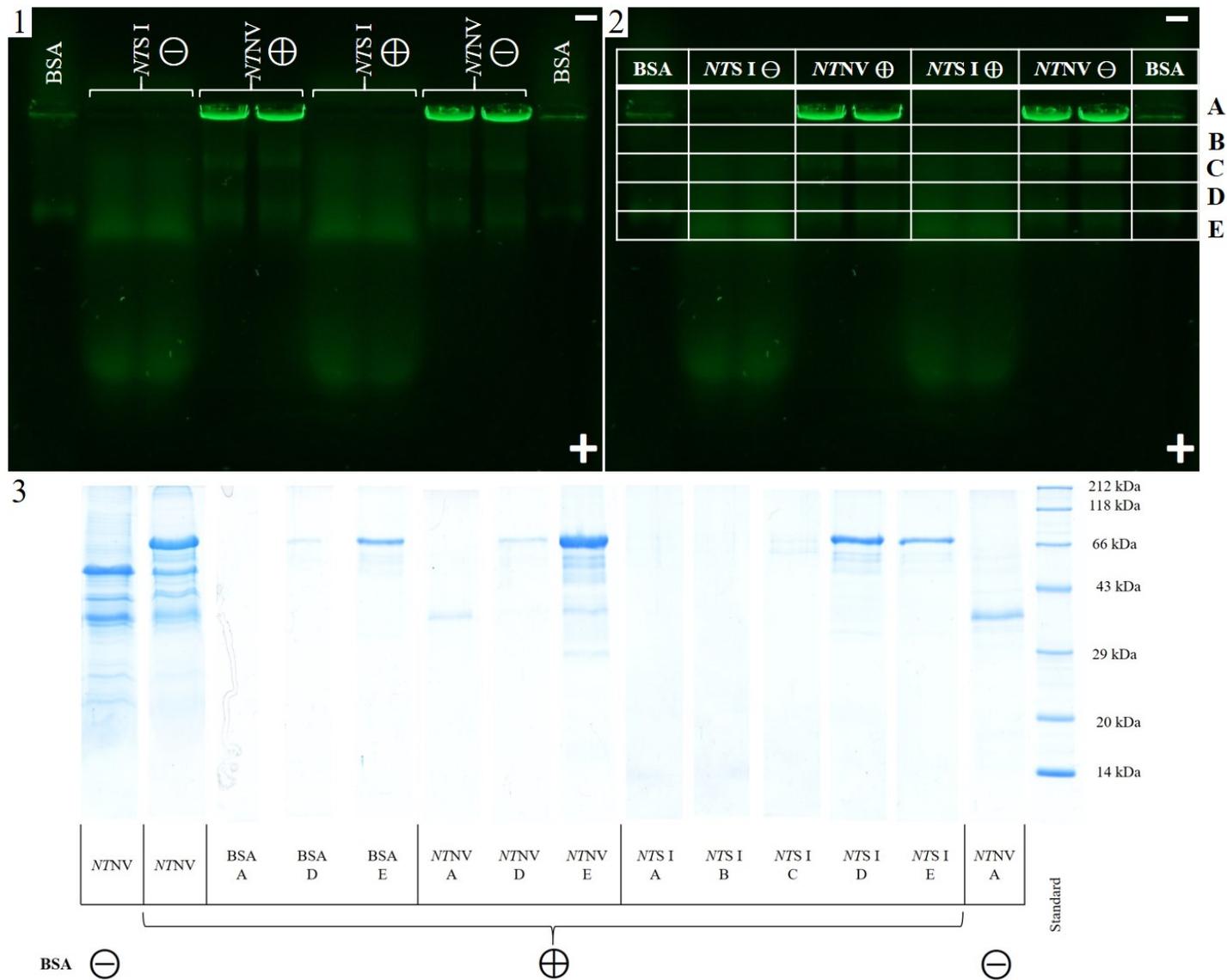


Abbildung 4.27: Agarosegelelektrophorese mit angeschlossener SDS-PAGE. **1)** Agarosegel (0.5 % (m/V)) von Nanovesikeln aus getrocknetem Tabakraut (NTNV) und dem ersten Überstand der Hochgeschwindigkeitszentrifugation (NTS I) mit ⊕ und ohne ⊖ Zusatz von BSA (≈ 66 kDa, sowie BSA allein bei 254 nm mit 530 nm Bandfilter. **2)** Muster der Segmentierung des Agarosegels aus (1) **3)** SDS-PAGE von NTN V vor der Agarose-Gelelektrophorese mit ⊕ und ohne ⊖ BSA-Zusatz, sowie ausgewählter Agarosegelsegmente nach Rückextraktion und Proteinfällung mit Trichloressigsäure. + Anode; - Kathode; BSA bovines Serumalbumin

D oder E wiedergefunden und Proteine, die charakteristisch für die Vesikel waren, nur in Segment A. Währenddessen waren alle Gelsegmente in Abschnitt A frei von BSA.

Die Nanovesikel konnten mit der Agarose-Gelelektrophorese also gleichzeitig visualisiert und von Begleitproteinen abgetrennt werden. Eine Einschränkung der Methode ergibt sich lediglich aus den erheblichen Verlusten bei der Rückgewinnung der Vesikel aus dem Agarosegel. Sie ist aber dennoch eine mögliche Ergänzung der Methoden zur Nanovesikelisolation bzw. deren Aufreinigung.

4.3.6 Chromatographische Untersuchungen

4.3.6.1 Sekundärmetaboliten

Da der pH-Wert die Sekundärstoffanalytik maßgeblich beeinflussen kann, wurden je nach Analyt unterschiedliche Puffer verwendet. Für die Analytik saurer Sekundärmetaboliten in Nanovesikeln wurden letztere in TBS mit einem pH-Wert von 8.0 isoliert. Der eingestellte pH-Wert des Puffers sollte die sauren Analyten¹² deprotonieren. Diese würden dann geladen vorliegen und eine Passage der Membranbarriere wäre ihnen nicht möglich (s. Abb. 4.28). Sekundärmetaboliten könnten weder aus dem Vesikel in die umgebende Lösung, noch in die entgegengesetzte Richtung über-treten. Für die Untersuchung von Alkaloiden wurde aus dem selben Grund entsprechend VIB mit

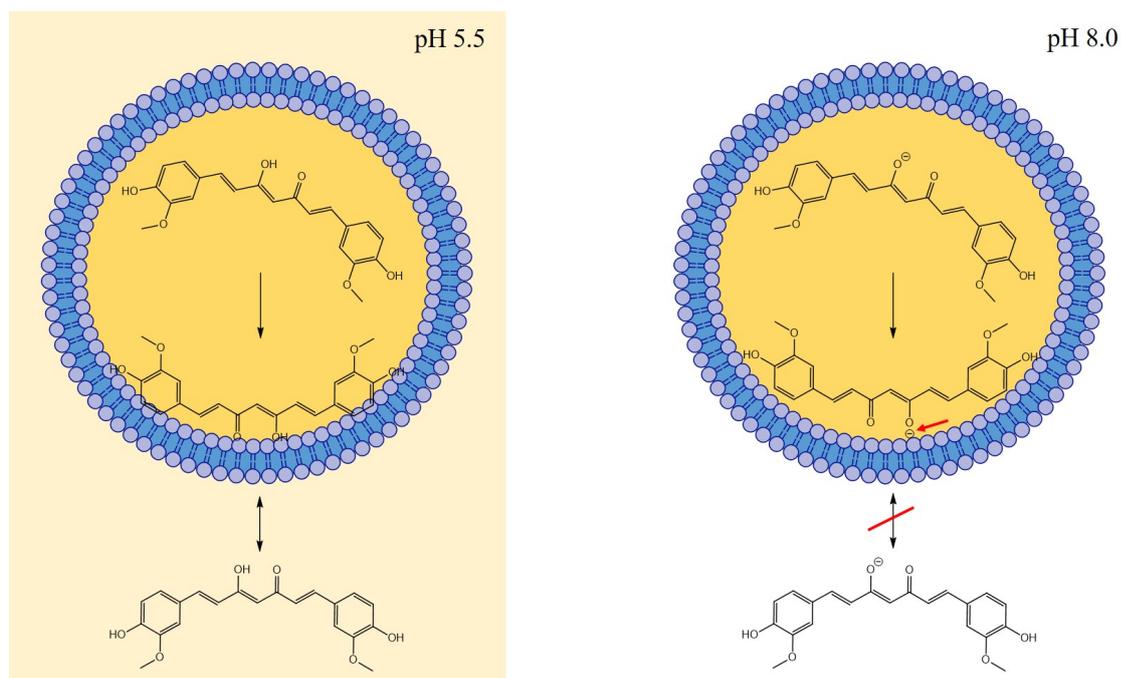


Abbildung 4.28: Darstellung der Membranpassage von Sekundärmetaboliten in Abhängigkeit des pH-Wertes am Beispiel Curcumin. Das protonierte, ungeladene Curcumin kann in sauren pH-Werten die Membranbarriere der Vesikel in beide Richtungen überwinden, bzw. sich in der Membran anreichern. Währenddessen kann das negativ geladene Curcuminat weder aus dem Vesikel herausgelangen, noch aus der Umgebung hineindiffundieren.

einem pH-Wert von 5.5 verwendet. Alkaloide liegen bei diesem pH-Wert weitestgehend protoniert vor, sodass eine Membranpassage ebenfalls aufgrund der Ladung praktisch unmöglich wäre.

¹² Die Methode zielte insbesondere auf die Analytik von (vinylogen/phenylogen) Carbonsäuren wie Curcuminoiden, Flavonoiden und Kaffeesäurederivaten ab.

Um zu untersuchen, ob Nanovesikel aus *C. zanthorrhizae rhizoma* Curcuminoide enthalten, wurde grundsätzlich wie in Abschnitt 3.4.6 beschrieben vorgegangen. Die an den Versuch angepassten Parameter sind in Tab. 4.5 zusammengefasst.

Tabelle 4.5: Parameter der HPTLC von Nanovesikeln und Überständen der Hochgeschwindigkeits-zentrifugation vor (S I) und nach (S II) Waschschrift aus *Curcumae zanthorrhizae rhizoma*.

		Auftrags- volumen	Ameisen- säurezusatz
Proben*	<i>C. zanthorrhiza</i> Nanovesikel in VIB		–
	<i>C. zanthorrhiza</i> Nanovesikel in TBS		–
	<i>C. zanthorrhiza</i> Nanovesikel in TBS	5 µl	+
	<i>C. zanthorrhiza</i> S I in TBS		+
	<i>C. zanthorrhiza</i> S II in TBS		+
Referenz	Mischung aus Curcumin, Demethoxycurcumin, Bisdemethoxycurcumin 1 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$	5 µl	
Entwicklung	Horizontalkammer		
Fließmittel	2 VT Eisessig		
	8 VT Toluol		
Laufstrecke	60 mm		
Wellenlänge	420 nm		
TLC-Scanner			

*je 100 µl lyophilisiert und nach Ansäuern mit 5 µl Ameisensäure (optional) ad 50 µl in Ethylacetat aufgenommen.

TBS Tris-gepufferte Salzlösung pH 8.0; VIB Vesikelisolationspuffer pH 5.5; VT Volumenteil

Nach der Entwicklung der Platte wurde ein Absorptionsspektrum der Curcuminoide aufgenommen und die Detektionswellenlänge des Scanners anhand des Maximums (vgl. Abb. 4.29) auf 420 nm festgelegt. Das in Abb. 4.30 dargestellte Chromatogramm bestätigt das eingangs beschriebene Konzept der Verwendung unterschiedlicher Puffer für entsprechend sauer oder alkalisch reagierende Analyten. Da sich die Curcuminoide ohne Zusatz von Ameisensäure im Ethylacetat lösen, müssen sie im sauren VIB zumindest teilweise ungeladen vorgelegen haben. Im Vergleich dazu waren praktisch keine Curcuminoide nachweisbar, wenn zu den Nanovesikeln in TBS keine Säure zugesetzt worden war. Hier muss die vinyloge Carbonsäure deprotoniert vorgelegen haben. Durch Zugabe von Säure wurden die Anionen wieder protoniert und die Curcuminoide lösten sich im Extraktionsmittel.

Die semiquantitative Bewertung der Ergebnisse verdeutlicht, dass die Curcuminoide unter den gewählten Bedingungen in den Nanovesikeln im Vergleich zum Überstand S I angereichert waren. Es bleibt fraglich, ob gerichtete Prozesse in der lebenden Pflanze dazu geführt haben, oder ob dieses Resultat ein Artefakt aus Trocknung, Verarbeitung und Lagerung darstellt. Sollten sich bei der pharmazeutischen Anwendung pflanzlicher Nanovesikel günstige Effekte zeigen, wäre es allerdings nicht von Belang, wie der Inhaltsstoff in die Vesikel gelangt ist, solange Qualität, Wirksamkeit und Unbedenklichkeit sichergestellt sind.

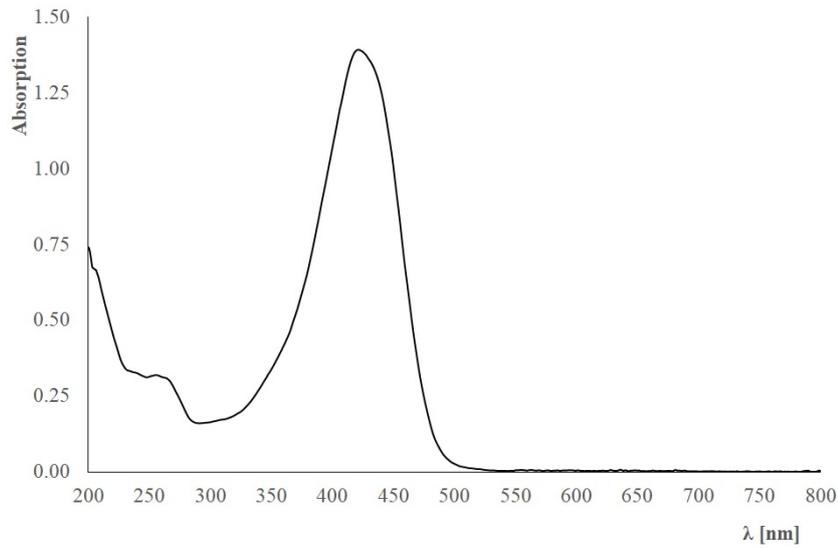


Abbildung 4.29: Absorptionsspektrum eines Gemisches der Curcuminoide Curcumin, Demethoxycurcumin und Bisdemethoxycurcumin mit einem Maximum bei 420 nm.

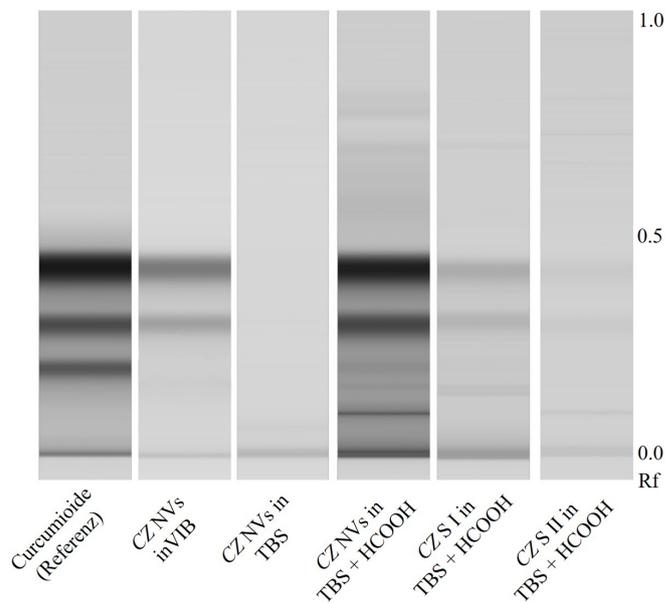


Abbildung 4.30: TLC-Scan von Nanovesikeln (NVs) und Überständen der Hochgeschwindigkeitszentrifugation vor (S I) und nach (S II) Waschschrift aus *Curcumae zanthorrhizae rhizoma* (CZ) bei 420 nm. *R_f* Retentionsfaktor; TBS Tris-gepufferte Salzlösung pH 8.0; VIB Vesikelisolationspuffer pH 5.5

Das Chromatogramm in Abb. 4.30 zeigt ebenfalls, dass der Waschschrift der differentiellen Zentrifugation lösliche Begleitstoffe effizient abtrennte. Die Curcuminoide waren in S II so stark reduziert, dass deren Konzentration nur noch knapp über der Nachweisgrenze lag.

Zur Untersuchung des Vorkommens von Alkaloiden in pflanzlichen Nanovesikeln wurden exemplarisch *N. tabacum* und *A. napellus* auf das Vorhandensein von Nicotin, respektive Aconitin überprüft. Die Isolation wurde unter Verwendung des leicht sauren VIB durchgeführt. Das Vorgehen für *A. napellus* wurde bereits detailliert in Abschnitt 3.4.6 erläutert. Die Parameter des verwendeten HPTLC-Systems für *N. tabacum* sind in Tab. 4.6 zusammengefasst. Zusätzlich wurde ein Tabakblatt nach erfolgter APF-Isolation im Mörser homogenisiert, mit NaOH-Lösung und Ethylacetat versetzt, durch einen hydrophoben Filter filtriert und der so gewonnene Blattextrakt ebenfalls mit auf die HPTLC-Platte aufgetragen. Der Blattextrakt diente der Überprüfung, ob in den Blättern tatsächlich Nicotin enthalten und die Methode entsprechend geeignet war.

Tabelle 4.6: Parameter der HPTLC von extrazellulären Vesikeln (EVs) und Überständen der Hochgeschwindigkeitszentrifugation vor (S I) und nach (S II) Waschschrift aus apoplastischem Fluid von *Nicotiana tabacum*.

		Auftrags- volumen
Proben*	<i>N. tabacum</i> EVs	10 µl
	<i>N. tabacum</i> S I	
	<i>N. tabacum</i> S II	
	<i>N. tabacum</i> Blattextrakt	
Referenz	Nicotin 1 $\frac{\mu\text{l}}{\text{ml}}$	10 µl
Entwicklung	automatische Mehrfachentwicklungskammer AMD 2	
Fließmittel & Laufstrecke	mehrstufiger Gradient (wie für Aconitin, vgl. Tab. 3.2)	
Wellenlänge TLC-Scanner	260 nm	

*je 200 µl lyophilisiert, mit 5 µl 10 M NaOH-Lösung alkalisiert und ad 50 µl in Ethylacetat aufgenommen.

Das zugehörige Chromatogramm (s. Abb. 4.31) zeigte, dass Nicotin sowohl im Blattextrakt, als auch im APF (*NT* S I) enthalten waren und unter den gewählten Bedingungen extrahiert und chromatographisch detektiert werden konnte. S II war praktisch frei von Nicotin, es wurde demnach effektiv von den EVs abgetrennt. In den EVs selbst konnte kein Nicotin identifiziert werden. Eine zusätzlich durchgeführte Derivatisierung der Platte mit Dragendorff-Reagenz bestätigte die Resultate aus dem TLC-Scan.

Daraufhin wurden EVs und Medium aus der Calluskultur von *N. tabacum* untersucht. Dabei zeigte sich, dass die wenig differenzierten Zellen kein Nicotin produzierten und somit auch in den EVs keine Alkaloide enthalten waren. Weiterführende Untersuchungen dahingehend würden Anpassungen der Calluskultur erfordern, die (bislang) nicht im Fokus des Kollaborationspartners stehen.

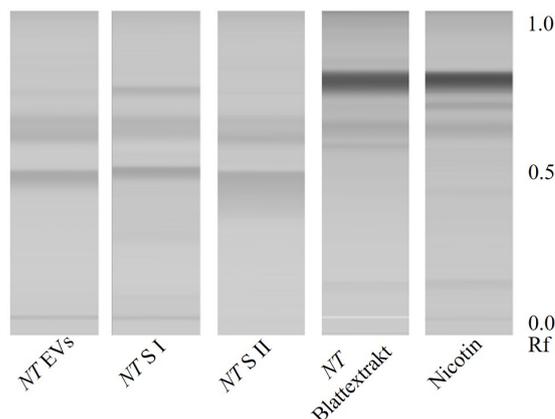


Abbildung 4.31: TLC-Scan von extrazellulären Vesikeln (EVs) aus apoplastischem Fluid, den Überständen der Hochgeschwindigkeitszentrifugation vor (S I) und nach (S II) Waschschrift und einem Blattextrakt aus *Nicotiana tabacum* (NT) bei 260 nm. *Rf* Retentionsfaktor

Da v.a. der Materialaufwand für die Isolation der Tabak-EVs aus APF oder Calluskultur verglichen mit der Isolation von Nanovesikeln aus Drogen sehr hoch ist, wurde als zweites Alkaloid Aconitin in Nanovesikeln aus *Aconiti tuber* untersucht. In einem ersten Versuch mit Nanovesikeln aus 50 g Drogenmaterial wurde kein Aconitin in den Nanovesikeln identifiziert. Allerdings war auch im S I, der einem Kaltmazerat der Droge gleichkommt, kein Aconitin zu finden. Unter Verwendung von Dragendorff-Reagenz wurden allerdings drei Alkaloide mit anderem *Rf* detektiert (s. Abb. 4.32). Um diese zu identifizieren wurde zunächst, wie in Abschnitt 3.4.6 beschrieben, ein

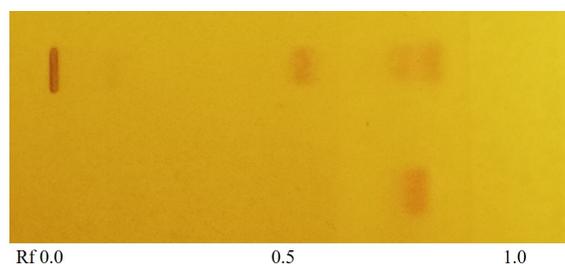


Abbildung 4.32: HPTLC von einem *Aconitum napellus* Kaltmazerat (oben) und Aconitin (unten) nach Detektion mit Dragendorff-Reagenz. *Rf* Retentionsfaktor

weiteres Kaltmazerat hergestellt, durch Festphasenextraktion aufgereinigt und konzentriert, sowie anschließend mittels HPTLC aufgetrennt. Die Analyse mittels TLC-Scanner und der Abgleich der Absorptionsspektren der Substanzen mit dem des Aconitins zeigte, dass zwei der drei Alkaloide beinahe identische Absorptionsspektren aufwiesen wie das Aconitin selbst. Das dritte Spektrum zeigte ebenfalls große Ähnlichkeit zum Referenzspektrum (vgl. Abb. 4.33). Es handelte sich demnach sehr wahrscheinlich um Derivate des Aconitins.

Zur Aufreinigung wurden die Flecken von der HPTLC-Platte abgekratzt, rückextrahiert und erneut einzeln chromatographiert. Die anschließende massenspektrometrische Bestimmung der Gesamtmassen bestätigte die Identität der Positivkontrolle (Aconitin) und damit die Eignung der Methode. Weiterhin wurde die Annahme, dass es sich bei den drei Alkaloiden um Aconitinderivate handelte, bestätigt. Neben Spuren anderer Aconitinderivate¹³ wurden folgende Substanzen identifiziert:

¹³ Indaconitin, Bikhaconitin, Pseudoaconitin

- Rf 0.52 Hypaconitin
- Rf 0.74 Hypaconitin
- Rf 0.81 Mesaconitin (und Aconitin)

Die Betrachtung der Fragmentierung der o.g. Komponenten bestätigte sowohl deren Identität durch die Identifizierung charakteristischer Bruchstücke [223], als auch das Auftreten von Hypaconitin mit zwei verschiedenen Rf-Werten. Die Produktionenspektren der Fragmentierung sind in den Abb. A.2 und A.3 im Anhang dargestellt.

- Aconitin m/z 646 \rightarrow 586
- Mesaconitin m/z 632 \rightarrow 572
- Hypaconitin m/z 616 \rightarrow 556,

Dass Hypaconitin in zwei Flecken mit verschiedenen Rf-Werten identifiziert wurde, ist ungewöhnlich. Eine mögliche Erklärung ist, es sich bei der Substanz mit dem kleineren Rf-Wert (0.52) um ein Oxidationsprodukt des Hypaconitins gehandelt haben könnte. Da sich Hypaconitin von Aconitin und Mesaconitin durch eine fehlende Hydroxylgruppe unterscheidet, die sich in räumlicher Nähe zum tertiären Amin befindet, wäre es möglich, dass diese Hydroxylgruppe bei Aconitin und Mesaconitin eine intramolekulare Wasserstoffbrücke zum Stickstoff ausbildet. Der Stickstoff des Hypaconitins kann keine solche Wasserstoffbrücke ausbilden, könnte jedoch zumindest teilweise zum Aminoxid reagieren. Dieses „Hypaconitin-N-oxid“ würde den kleinen Rf-Wert und das leicht bathochrom verschobene Absorptionsmaximum erklären und könnte bei der Ionisierung in der Massenspektrometrie wieder zu Hypaconitin zerfallen sein. Eine Wasserstoffbrücke in Aconitin und Mesaconitin würde auch den höheren Rf-Wert im Vergleich zum Hypaconitin erklären. Da die Analytik in Nanovesikeln aus 50 g *Aconiti tuber* ergebnislos verlief, wurde ein zweiter Ansatz aus insgesamt 200 g Droge angefertigt. Dafür wurden an vier aufeinanderfolgenden Tagen Nanovesikel aus jeweils 50 g Droge isoliert und im Waschschrift zusammengeführt. Als S I wurde eine Mischung aus gleichen Teilen der vier Überstände untersucht. Für die Analytik der Nanovesikel aus *Aconiti tuber* wurde zusätzlich zur HPTLC auch die HPLC genutzt. Die Ergebnisse der HPTLC sind in Abb. 4.34, sowie im Anhang (Abb. A.4) und die der HPLC in Abb. A.5, ebenfalls im Anhang, aufgeführt.

Die Chromatogramme zeigen, dass mit der durchgeführten Methode die massenspektrometrisch identifizierten Aconitinderivate Hypaconitin und Mesaconitin im S I nachgewiesen werden konnten¹⁴. Die Positivkontrolle lieferte in beiden Chromatographiesystemen deutliche Signale. Auf dieser Grundlage wurde die Nachweisgrenze auf $\approx 10 \frac{\mu\text{g Aconitin}}{\text{ml Isolat}}$ geschätzt. In den Nanovesikeln selbst wurden die Aconitinderivate allenfalls in Spuren detektiert und in deutlich geringerer Menge als in S I und S II. In Anbetracht der eingesetzten Menge ist davon auszugehen, dass die untersuchten *Aconitum*-Nanovesikel praktisch kein Aconitin bzw. dessen Derivate enthielten, sondern die detektierten Substanzmengen eher Anhaftungen darstellten, als dass sie von der Pflanze gezielt in die Vesikel verpackt worden sein könnten.

¹⁴ Die Korrelation der Absorptionsspektren mit dem Referenzspektrum von Aconitin betrug 97.6 % bzw. 98.9 %.

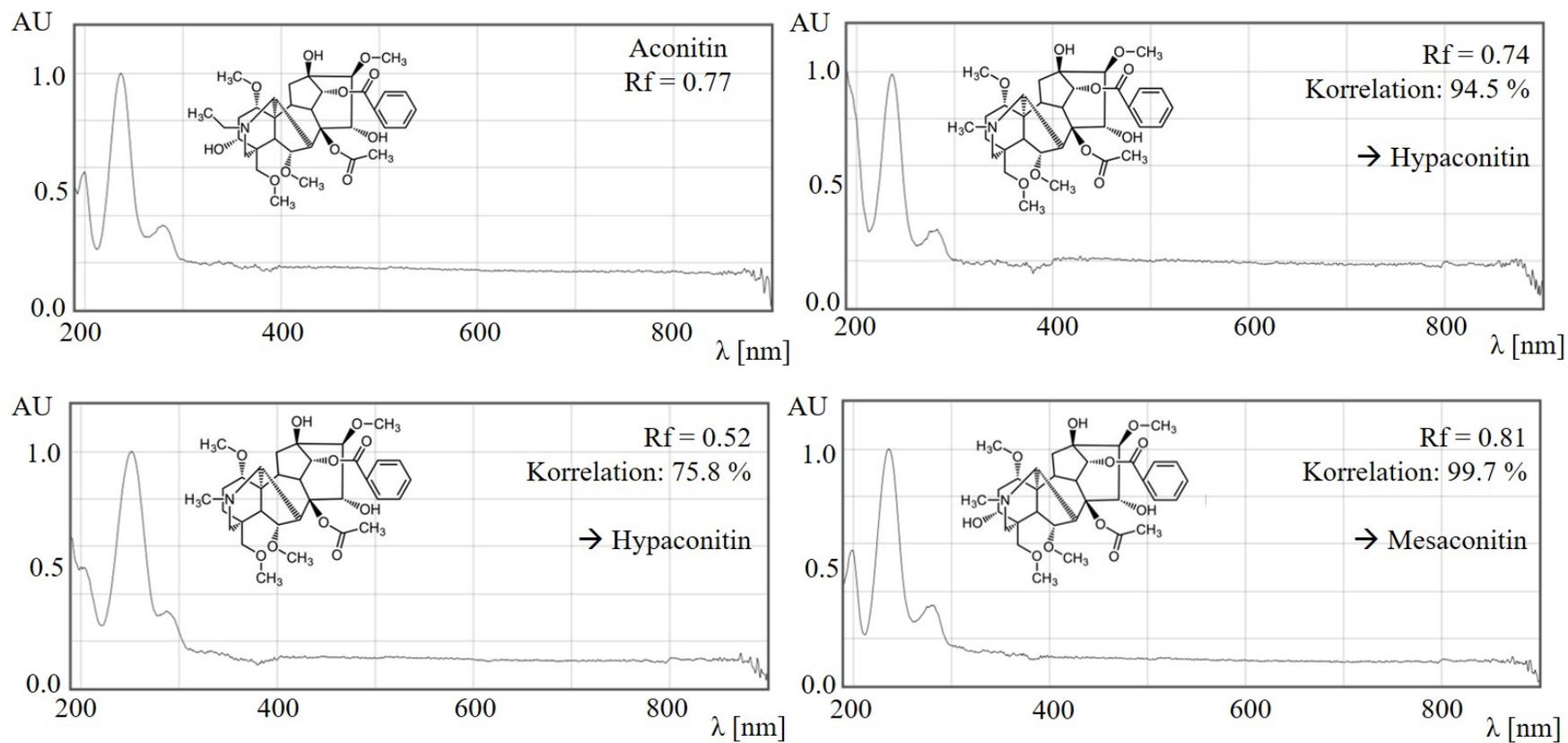


Abbildung 4.33: Absorptionsspektren und Strukturformeln von Aconitin und den drei identifizierten Aconitinderivaten, einschließlich Korrelation mit dem Referenzspektrum von Aconitin. *Strukturformeln nach Lai et al. 2019 [223]. AU Absorptionseinheit; Rf Retentionsfaktor*

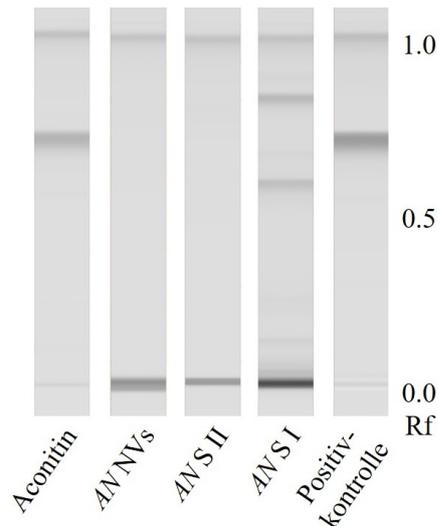


Abbildung 4.34: TLC-Scan von Nanovesikeln (NVs) und Überständen der Hochgeschwindigkeitszentrifugation vor (S I) und nach (S II) Waschschrift aus *Aconiti tuber* (AN), sowie der Positivkontrolle ($0.1 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ Aconitin in VIB lyophilisiert) bei 236 nm. Auftragsvolumen: $10 \mu\text{l}$; Rf Retentionsfaktor VIB Vesikelisolationspuffer

Um abschätzen zu können, ob die Curcuminoide evtl. nur aufgrund ihrer Lipophilie in den Vesikelisolaten gefunden worden waren, wurden Nanovesikel weiterer Pflanzen auf das Vorkommen saurer Sekundärmetaboliten hin untersucht. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Sekundärstoffanalytik von Nanovesikeln aus *C. plantagineum* Calluskultur, sowie aus den Drogen *Betulae folium* und *Uvae-ursi folium* erörtert. Tab. A.1 im Anhang fasst die HPTLC-Parameter zusammen. Während in S I des Isolates aus Bärentraubenblättern beträchtliche Mengen Arbutin und Gallussäure nachgewiesen wurden, waren die Nanovesikel praktisch frei von diesen Sekundärmetaboliten (s. Abb. 4.35). Die Substanzen wurden den Referenzen anhand von übereinstimmenden Rf-Werten und darüber hinaus mittels Absorptionsspektren eindeutig zugeordnet (vgl. Tab. 4.7).

Tabelle 4.7: Korrelation der Absorptionsspektren der HPTLC von Nanovesikeln (NV) und Überständen der Hochgeschwindigkeitszentrifugation vor (S I) und nach (S II) Waschschrift aus *Uvae-ursi folium* (AU).

Probe	Rf	Referenzspektrum	Korrelation
AU S I	0.359	Arbutin (Rf 0.370)	93.1 %
AU S II	0.363		67.7 %
AU NVs	0.363		61.6 %
AU S I	0.749	Gallussäure (Rf 0.755)	99.9 %
AU S II	0.768		91.8 %
AU NVs	0.767		83.4 %

Rf Retentionsfaktor

Während das Chromatogramm von S II keine Signale für Arbutin oder Gallussäure lieferte, zeigte das Absorptionsspektrum am entsprechenden Rf-Wert eine Korrelation von über 90 % mit dem Spektrum von Gallussäure, was darauf hindeutet, dass dort noch Spuren von Gallussäure vorlagen. Im Chromatogramm der Vesikelprobe wurde ebenfalls kein Signal identifiziert und die Überein-

stimmung der Spektren sank nochmals. Wie auch bei den *Aconitum*-Nanovesikeln ist damit davon auszugehen, dass allenfalls Spuren der untersuchten Phenole in den Nanovesikeln von *Uvae-ursi folium* vorhanden waren und diese vermutlich nicht aktiv in die Vesikel gelangt sind.

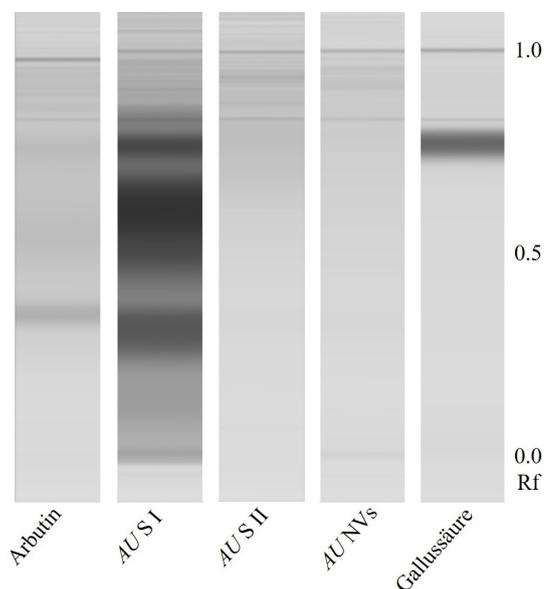


Abbildung 4.35: TLC-Scan von Nanovesikeln (NVs) und Überständen der Hochgeschwindigkeitszentrifugation vor (S I) und nach (S II) Waschschriff aus *Uvae-ursi folium* (AU) bei 280 nm. *Rf* Retentionsfaktor

Weniger eindeutige Ergebnisse lieferte das Dünnschichtchromatogramm zur Untersuchung von Nanovesikeln aus *C. plantagineum* Calluskultur und getrockneten Birkenblättern (s. Abb. 4.36). Während blau fluoreszierende Zonen auf das Vorhandensein von Kaffeesäurederivaten in *C. plantagineum*-Nanovesikeln hindeuteten, fehlten derartige Zonen im Chromatogramm der Nanovesikel aus Birkenblättern, obwohl im S I vergleichbare blaue Fluoreszenzen beobachtet werden konnten. Die charakteristisch rot fluoreszierenden Zonen mit hohen *Rf*-Werten in den Birkenblätterproben sind mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Chlorophylle zurückzuführen. Zu beobachten ist, dass diese sich besonders in der Vesikelprobe wiederfanden, genau wie sich DiOC₆ auch in den Nanovesikeln aus der Calluskultur anreichterte, in den Überständen jedoch nicht detektierbar war. Chlorophyll liegt in der lebenden Pflanzenzelle vorwiegend in Chloroplasten vor. Da diese in der Regel etwa 5 µm groß sind [166], wurden sie vor der Hochgeschwindigkeitszentrifugation von den Nanovesikeln abgetrennt. Eine unbeabsichtigte Ko-Isolation von Chloroplasten und Nanovesikeln kann ausgeschlossen werden. Durch Trocknen und Mahlen der Birkenblätter wurde die Kompartimentierung der Zellen jedoch zerstört und damit auch Chloroplasten. Vermutlich reichert sich die Chlorophylle während der Mazeration der gepulverten Droge in den Membranen von Zellresten und Nanovesikeln an.

Widersprüchlich erschienen damit zunächst die beobachteten blau fluoreszierenden Zonen im Chromatogramm der *C. plantagineum*-Nanovesikel. Zu erwarten wäre, dass strukturell ähnliche Substanzen in den Nanovesikeln beider in Abb. 4.36 untersuchten Spezies vorkommen würden, oder aber in keiner von beiden. Auf Nachfrage beim Kollaborationspartner, welchen pH-Wert das verwendete Zellkulturmedium aufweist, zeigte sich, dass hierin eine mögliche Erklärung für die Unstimmigkeit liegen kann. In der Calluskultur wurde ein Medium mit dem pH-Wert 5.8 verwen-

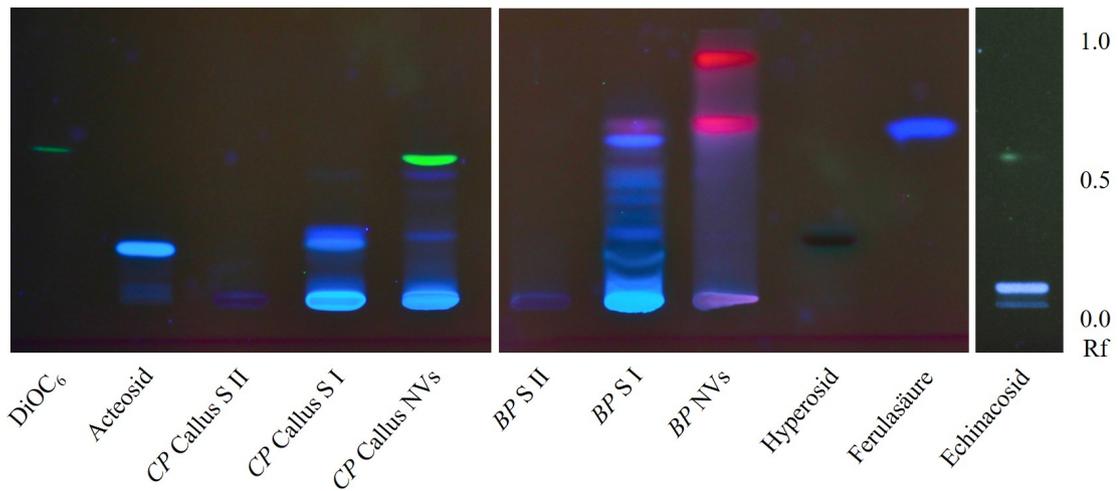


Abbildung 4.36: HPTLC von Nanovesikeln (NVs) und Überständen der Hochgeschwindigkeitszentrifugation vor (S I) und nach (S II) Waschschritt aus *Betulae folium* (BP) und *Craterostigma plantagineum* (CP) Callus. Eigenfluoreszenz bei 366 nm. *Rf* Retentionsfaktor

det. Ausgehend vom pK_s -Wert von Kaffeesäure (4.62 [224]) würden die relevanten Sekundärmetaboliten im Medium zu ca. 93 % als Anion vorliegen. Damit ist der Anteil undissoziierter Säure so hoch, dass diese durch passive Diffusion nach und nach in die Vesikel gelangen kann, bis ein Gleichgewicht eingestellt ist.

Bestätigt wurde diese Annahme durch den Vergleich der Chromatogramme von Nanovesikeln aus Birkenblättern, die im leicht alkalischen TBS isoliert wurden, mit solchen, die im leicht sauren VIB präpariert worden sind (s. Abb. 4.37). Während aus dem alkalischen Isolat neben Chlorophyll keine weiteren Substanzen extrahiert werden konnten (sondern ausschließlich in S I), wurden in dem Extrakt der sauer isolierten Nanovesikel neben den Chlorophyllen auch hellblaue Fluoreszenzen (R_f 0.78 und 0.91) sichtbar, die auf das Vorhandensein von Phenylpropanderivaten hindeuteten. Die Derivatisierung mit 1 % Diphenylboryloxyethylamin in Methanol zeigte zudem, dass möglicherweise Quercetin (gelbe Fluoreszenz bei R_f 0.81) in den sauer isolierten Nanovesikeln enthalten war. Bemerkenswert sind hierbei die hohen R_f -Werte, die darauf hinwiesen, dass es sich um Aglyka handeln könnte und eher nicht um Glykoside der Sekundärmetaboliten.

Eine weitere Möglichkeit zur Klärung des Sachverhalts wäre die Kultivierung des Callus in einem Medium mit neutralem pH-Wert, denn darin wäre ein Übergang vom Medium in die Vesikel nicht mehr möglich. So könnte ebenfalls untersucht werden, ob sich Glykoside und Aglyka unterschiedlich verhalten.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass sich besonders lipophile Strukturen wie Curcuminoiden und Chlorophylle in den Nanovesikeln wiederfanden. Dass sich auch geladene Moleküle in der Membran anreichern können, zeigt das Verhalten des Farbstoffes DiOC₆, der aufgrund seiner lipophilen Strukturanteile trotz positiver Ladung (s. Abb. 4.16) eine hohe Affinität zu den Vesikeln aufwies. Eine tatsächliche Passage der Membran ist allerdings unwahrscheinlich, denn eine Anreicherung in der Membran ist nur möglich, wenn die lipophilen Anteile die hydrophilen deutlich überwiegen. Somit würden sich derartige Substanzen im wässrigen Milieu nicht wieder von der Membran lösen.

Die festgestellte Tendenz zur Abwesenheit von charakteristischen Sekundärmetaboliten wie Fla-

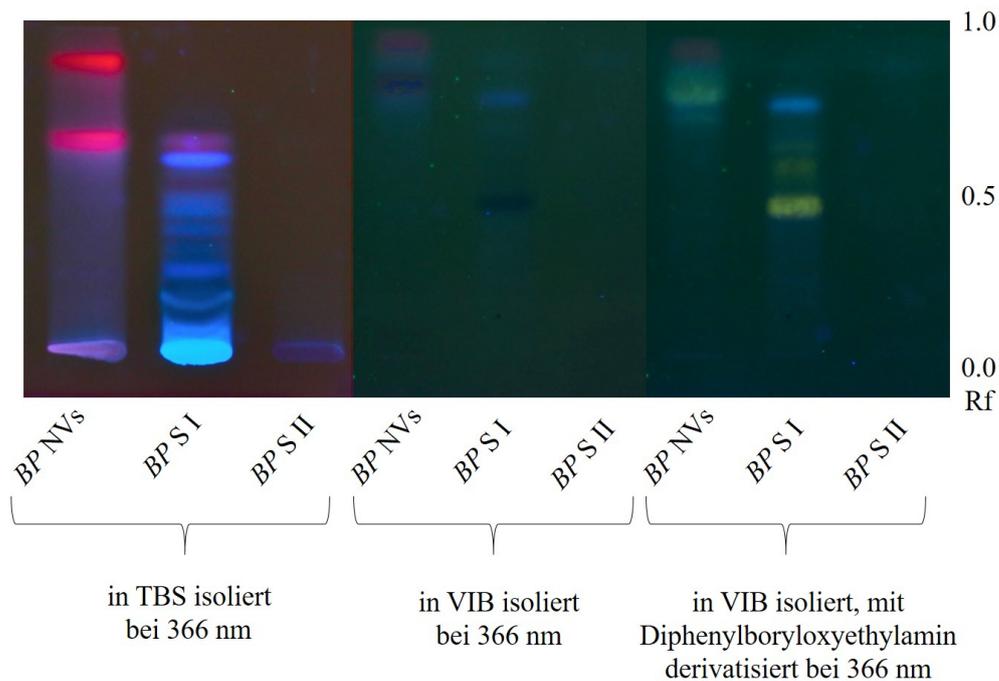


Abbildung 4.37: Vergleich der Chromatogramme von Nanovesikeln (NVs) und Überständen der Hochgeschwindigkeitszentrifugation vor (S I) und nach (S II) Waschschriff aus *Betulae folium* (BP), die in saurem Vesikelisolationspuffer (VIB, pH 5.5) bzw. alkalischer Tris-gepufferter Salzlösung (TBS, pH 8.0) isoliert worden sind. Je 200 μ l Probe wurden lyophilisiert, mit 5 μ l Ameisensäure angesäuert anschließend mit Ethylacetat ad 50 μ l extrahiert.

vonoiden, Kaffeesäurederivaten, Phenolen und Alkaloiden in den Nanovesikeln verschiedener Pflanzenspezies deutet insgesamt darauf hin, dass diese keine typische Fracht der pflanzlichen Nanovesikel darstellen. Nach aktuellem Kenntnisstand ist davon auszugehen, dass die in der Vesikelfraktion gefundenen Curcuminoiden und Chlorophylle nicht gerichtet in die Nanovesikel gelangt sind, sondern sich dort passiv, aufgrund ihrer Lipophilie, anreicherten.

Dass Naringin und Naringenin in Nanovesikeln aus Grapefruits [44] und Shogaol in Ingwer-Nanovesikeln [108] gefunden wurden, kann mit der hier aufgestellten Hypothese ebenfalls in Einklang gebracht werden. Während Shogaol strukturell eng mit den Curcuminoiden verwandt ist, liegen die Flavanone im sauren pH-Wert der Grapefruit-Früchte ungeladen vor. Damit können sich diese Substanzen in bzw. an der Membran der untersuchten Vesikel angereichert haben (Strukturformeln s. Abb. 4.38).

Auch in Anbetracht der evolutionären Entwicklung sind die aufgestellten Vermutungen nachvollziehbar: Aufgrund der hohen evolutionären Konservierung der Aussendung von EVs in allen Domänen ist davon auszugehen, dass sich dieser Mechanismus vor der Bildung von Sekundärmetaboliten im pflanzlichen Stoffwechsel etabliert hatte. Zur Überprüfung der Hypothese können umfassendere Untersuchungen der Nanovesikel diverser Pflanzenspezies, sowie Vergleiche des Metaboloms von Vesikelisolaten aus frischen und getrockneten Pflanzen in Betracht gezogen werden.

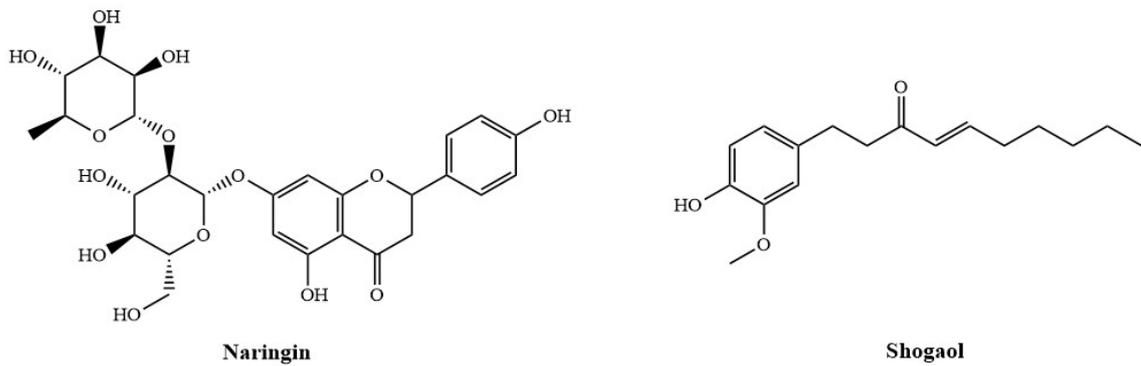


Abbildung 4.38: Strukturformeln von Naringin und Shogaol.

4.3.6.2 Phospholipide

Glycerolipide, Sphingolipide und Sterole bauen pflanzliche Biomembranen auf [46]. Die Lipidprofile der Nanovesikel unterschiedlicher Pflanzen können sich dabei erheblich unterscheiden. Eine Untergruppe der Glycerolipide sind die Phospholipide, die vermutlich eine elementare Rolle, nicht nur für die Bildung und Stabilität pflanzlicher Nanovesikel, sondern wahrscheinlich auch für die Adressierung von Zielzellen spielen (vgl. Abschnitt 1.1.1.2).

Zur Untersuchung der Lipidprofile pflanzlicher Nanovesikel wurde zunächst eine instrumentelle HPTLC-Methode etabliert. Dabei konnte unter Verwendung der automatischen Mehrfachentwicklungskammer AMD 2 eine effiziente Trennung der Phospholipide erzielt werden. Die Chromatogramme von 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin und 2-Oleoyl-1-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin zeigten dabei, dass sich unterschiedliche Fettsäurereste unter den gewählten Bedingungen nicht auf den Rf-Wert auswirkten (s. Abb. 4.39).

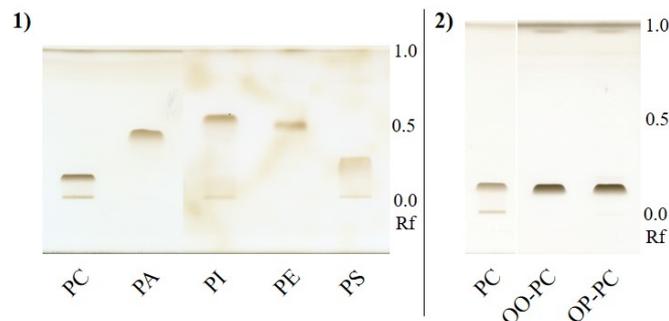


Abbildung 4.39: HPTLC-Chromatogramme der Phospholipide im Tageslicht nach Derivatisierung mit $\text{CuSO}_4\text{-H}_3\text{PO}_4$ -Lösung und Verkohlung. **1)** Die Phospholipide Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidsäure (PA), Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylserin (PS) wurden bei der stufenweisen Entwicklung mit einem Fließmittelgradienten voneinander getrennt. **2)** Phosphatidylcholin*, 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (OO-PC) und 2-Oleoyl-1-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (OP-PC) wiesen gleiche Rf-Werte (0.14) auf. *substituierte Fettsäurereste der Referenz waren nicht deklariert; Rf Retentionsfaktor

Trotz des Waschens aller HPTLC-Platten vor Verwendung mit Methanol zeigten sich häufig Verunreinigungen an der Laufmittelfront ($R_f = 1$). Diese könnten minimiert werden, indem die Platte vor Verwendung mit der letztlich verwendeten Fließmittelzusammensetzung gewaschen würden. Allerdings waren die Verunreinigungen gut von den Phospholipiden abgetrennt, sodass der nöti-

ge Aufwand den Nutzen überstiegen hätte und die Ablagerungen an der Laufmittelfront in Kauf genommen wurden.

Obwohl die Verwendung von Plastik-Reaktionsgefäßen für die Referenzen unproblematisch war, stellte die Adsorption der Vesikel-Lipide an deren hydrophobe Oberfläche eine mögliche Fehlerquelle dar [225]. Nachdem die Analysen einiger Chloroform-Methanol-Extrakte aus Nanovesikeln verschiedener Pflanzen ergebnislos verblieben waren, wurden die Nanovesikel aus *Aconiti tuber* und *Curcuma longae rhizoma* in Glasgeräten mit dem Methanol-Chloroform-Gemisch versetzt. Die HPTLC dieser Extrakte zeigte, dass die Nanovesikel aus *C. longae rhizoma* sehr wahrscheinlich Phosphatidylcholin und Phosphatidylinositol enthielten (s. Abb. 4.40). Da die Phospholipide keine charakteristischen Absorptionsspektren aufwiesen, bzw. generell keine Absorption gemessen werden konnte, war ein zusätzlicher Abgleich der Spektren wie bei den Sekundärmetaboliten nicht möglich.

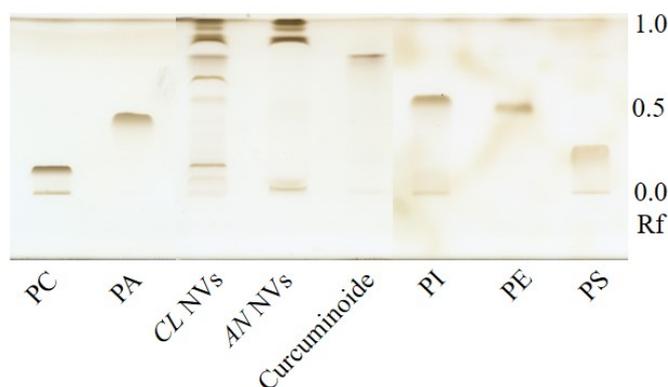


Abbildung 4.40: Phospholipid-HPTLC von Nanovesikeln (NVs) aus *Aconiti tuber* (AN) und *Curcuma longae rhizoma* (CL) nach Derivatisierung mit $\text{CuSO}_4\text{-H}_3\text{PO}_4$ -Lösung und Verkohlung im Tageslicht. PC Phosphatidylcholin; PA Phosphatidsäure; PI Phosphatidylinositol; PE Phosphatidylethanolamin; PS Phosphatidylserin; Rf Retentionsfaktor

Dem Lipidprofil von *Aconitum*-Nanovesikeln konnte keines der untersuchten Phospholipide zugeordnet werden. Die ausgeprägte Zone mit einem Rf von annähernd 1 deutete jedoch auf einen hohen Anteil an Sterolen hin (s. Abb. 4.40). β -Sitosterol und Stigmasterol wurden in dem HPTLC-System ebenfalls untersucht. Diese beiden Substanzen konnten nicht voneinander getrennt werden und wiesen bei allen untersuchten Laufmittelzusammensetzungen Rf-Werte von beinahe 1 auf.

Auffällig an der Phospholipid-HPTLC von EVs und Nanovesikeln aus diversen Pflanzenspezies in Abb. 4.41 ist, dass vergleichsweise große Mengen ($\approx \frac{5 \text{ mg Protein}}{\text{ml Extrakt}}$) eingesetzt werden mussten, damit Lipidprofile detektiert werden konnten. Diese Feststellung deckt sich mit den in der Literatur angegebenen Mengen, die zur Lipidanalytik bzw. -isolation eingesetzt wurden [30, 50]. Die Phospholipide der Referenzlösung waren bei je 1–2 μg aufgetragener Substanz sichtbar. Zunächst wurde die HPTLC mit 40 mm Laufmittelfront entwickelt. Dabei wurden jedoch nur vier der fünf verwendeten Phospholipide der Referenzlösung sichtbar. Daraufhin wurde der Versuch mit 50 mm Laufmittelfront wiederholt. Obwohl PE und PI nicht klar voneinander getrennt waren, sondern eine breite Zone ausbildeten, konnten erste Rückschlüsse auf die Lipidprofile einiger Nanovesikel gezogen werden. So wurden den Proben anhand der Rf-Werte folgende Phospholipide zugeordnet:

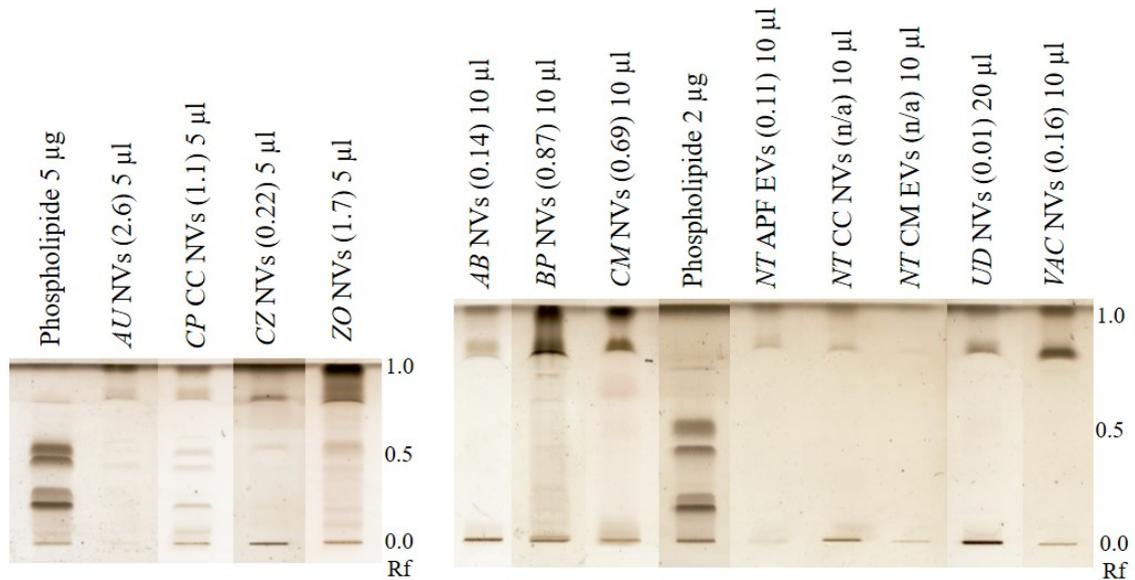


Abbildung 4.41: Phospholipid-HPTLC von extrazellulären Vesikeln (EVs) und Nanovesikeln (NVs) diverser Pflanzenspezies im Tageslicht nach Derivatisierung mit $\text{CuSO}_4\text{-H}_3\text{PO}_4$ -Lösung und Verkohlungs. Angegeben sind die Drogen bzw. Spezies, aus denen die Vesikel isoliert worden sind, in Klammern die eingesetzte Menge Protein (in mg), die mit 200 μl des Methanol-Chloroform-Gemisches extrahiert wurden, sowie das Auftragsvolumen. Als Referenz wurden 2 μl eines Gemisches aus je 1 $\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}}$ Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin, Phosphatidsäure, Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylinositol (nach aufsteigendem Rf-Wert) aufgetragen. Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylinositol waren nicht eindeutig voneinander abgetrennt, sondern bildeten sich überlappende Zonen. **Links:** Laufmittelfront 40 mm. **Rechts:** Laufmittelfront 50 mm. *AB* *Belladonnae folium*; *AU* *Uvae ursi foliu*; *BP* *Betulae folium*; *CM* *Chelidonii herba*; *CP* *Craterostigma plantagineum*; *CZ* *Curcumae zanthorrhizae rhizoma*; *NT* *Nicotiana tabacum*, *UD* *Urticae herba*; *VAC* *Agni-casti fructus*; *APF* *apolastisches Fluid*, *CC* *Callus-Zellen*; *CM* *Callus-Medium* Rf *Retentionsfaktor*

- *Uvae-ursi folium* Nanovesikel: PA
- *C. plantagineum* Callus Nanovesikel: PC, PA und PE
- *C. zanthorrhizae rhizoma* Nanovesikel: PI
- *Zingiberis rhizoma* Nanovesikel: PA, PE und PI

Die Etablierung eines geeigneten HPTLC-Systems und die Analytik von Nanovesikeln und EVs aus verschiedenen Spezies kann perspektivisch die Grundlage für ein besseres Verständnis der Resorption und Adressierung von Nanovesikeln oder vergleichbaren Pharmaka bilden. Sollten sich bestimmte Lipidprofile als besonders geeignet für die Aufnahme in einzelne Zelltypen erweisen, könnten diese bevorzugt mit Arzneistoffen für genau diese Zellen beladen werden und eine gerichtete Therapie ermöglichen. Arzneistoffdosierungen könnten so reduziert und das Nutzen-Risiko-Verhältnis verbessert werden. Für einige Arzneistoffe könnte ein solches Verfahren zusätzlich ökonomisch relevant sein.

4.3.7 Inhibition der Pankreaslipase durch pflanzliche Nanovesikel

Wie genau die gastrointestinale Resorption pflanzlicher Nanovesikel in tierischen Organismen abläuft, wurde bislang nicht geklärt. Doch beobachtete systemische Effekte legen nahe, dass sie *de facto* stattfindet (s. Abschnitt 1.2.1.2).

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation durchgeführte Untersuchungen deuteten darauf hin, dass die Lipide der Vesikel eine zentrale Rolle für deren Stabilität einnehmen. Die Inhibition von Verdauungsenzymen, speziell der Pankreaslipase, könnte demnach entscheidend zur gastrointestinalen Stabilität der Nanovesikel beitragen.

Zur Bestimmung der Lipaseaktivität wurde zunächst ein absorptionsphotometrischer Assay durchgeführt. Dafür wurden eine geeignete Rutinkonzentration als Positivkontrolle und der Einfluss von 10 % DMSO (Lösungsmittel für Rutin) auf die Lipaseaktivität ermittelt. Bei diesen Untersuchungen, sowie bei denen mit Nanovesikeln aus getrockneten Birkenblättern zeigte sich jedoch, dass die Eigenfärbung der Untersuchungslösungen die Empfindlichkeit des Assays herabsetzte. Daraufhin wurde für weitere Versuche der empfindlichere fluorimetrische Assay mit dem Substrat 4-Methylumbelliferyloleat genutzt. Auch hier wurden Lösemittelleffekte ausgeschlossen und Rutin als Positivkontrolle stets mitgeführt. Die Durchführung der Untersuchungen erfolgte durch Frau Zhang im Rahmen ihrer Masterarbeit [214]. In Abb. 4.42 sind repräsentative Ergebnisse zusammengefasst.

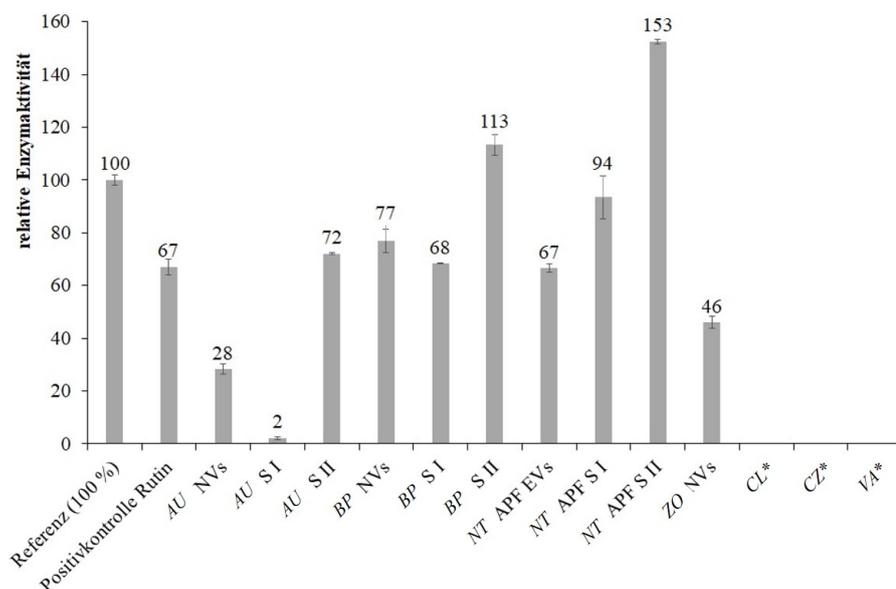


Abbildung 4.42: Übersicht der Lipaseinhibition im Verhältnis zur Referenz (100 %) durch extrazelluläre Vesikel (EVs), Nanovesikel (NVs) und Überstände der Hochgeschwindigkeitszentrifugation vor (S I) und nach (S II) Waschschrift ($n = 3$). Die Proben wurden in Konzentrationen von jeweils $\approx 500 \frac{\mu\text{g Protein}}{\text{ml}}$ (bzw. geringer bei S II) mit Pankreatin inkubiert, anschließend das Substrat zugesetzt. Autokatalytische Effekte wurden nivelliert. AU *Uvae-ursi folium*; BP *Betulae folium*; NT *Nicotiana tabacum*; ZO *Zingiberis rhizoma*; APF *apoplastisches Fluid*. *Für die untersuchten Proben von *Curcuma longae rhizoma* (CL), *Curcuma zanthorrhizae rhizoma* (CZ) und *Visci herba* (VA) war keine zuverlässige Bestimmung der Lipaseinhibition möglich.

Wie in Abb. 4.42 dargestellt, zeigten die untersuchten Nanovesikel durchaus inhibitorische Effekte auf die Pankreaslipase. Die Ergebnisse der durchgeführten Assays waren jedoch inkonsistent, da einige der untersuchten Vesikel-Proben selbst esterhydrolytische Aktivität aufwiesen, die zum Teil

so stark ausgeprägt war, dass eine Bestimmung der lipasekatalysierten Umsetzung nicht möglich war. So konnten die Daten für *Curcuma*- und *Viscum*-Nanovesikel nicht ausgewertet werden. Die daraufhin durchgeführte Literaturrecherche zeigte, dass in den Nanovesikeln verschiedener *Citrus*-Spezies bereits Esterasen nachgewiesen worden sind, darunter die putative Carboxylesterase 5, Pektinesterasen, Palmitoyl-protein-thioesterase, Kaffeoylshikimatesterase u.a. [33, 34]. Eine oder mehrere dieser oder ähnlicher Esterasen ist bzw. sind wahrscheinlich in der Lage die Esterbindung des 4-Methylumbelliferyloleats zu spalten. Damit erscheint der gewählte Assay im Nachhinein für die untersuchten Proben unter den gewählten Bedingungen ungeeignet zu sein. Konzipiert wurde der Assay von Frau Dr. Buchholz [205] für die Testung methanolischer Pflanzenextrakte, sowie wässriger Extrakte, die längere Zeit zum Sieden erhitzt, anschließend getrocknet und lyophilisiert wurden. Probleme aufgrund autokatalytischer Effekte durch die Proben berichtete Dr. Buchholz nicht. Durch ihre Art der Extraktion wurden etwaige im Ausgangsmaterial vorhandene Enzyme weitestgehend denaturiert. Die Nanovesikel auf gleiche Art und Weise zu behandeln, würde zunächst die Untersuchung der Stabilität der Nanovesikel unter derartigen Bedingungen erfordern. Unabhängig davon, ob die Vesikel selbst oder die Begleitstoffe für die gefundenen inhibitorischen Effekte verantwortlich waren, werden pflanzliche Nanovesikel bei der Nahrungsaufnahme, anders als im durchgeführten Experiment, nicht in gereinigter Form aufgenommen. Sie gelangen gemeinsam mit dem gesamten Inhaltsstoffspektrum der Pflanze in den Gastrointestinaltrakt. Damit sind dort bei der Aufnahme pflanzlicher Nahrungsmittel in der Regel auch Polyphenole vorhanden, deren Lipaseinhibition sowohl im Rahmen der vorliegenden Dissertation und der Masterarbeit von Frau Zhang für Rutin bestätigt wurde, als auch allgemein anerkannt ist [205, 226, 227]. Für eine eventuelle perorale Applikation nanovesikelbasierter Pharmaka könnte die Beibringung von Polyphenolen zur Erhöhung der gastrointestinalen Stabilität der Formulierung in Erwägung gezogen werden.

Weiterführende Untersuchungen zur Bedeutung der vesikulären Hülle für Stabilität und Resorption könnten ein intestinales Resorptionsmodell umfassen. Der Vergleich der Resorption von Nanovesikeln, Nanovektoren aus Vesikel-Lipiden und freier miRNA könnte wichtige Erkenntnisse hierzu liefern.

4.4 *In vitro* Untersuchungen

Welche konkreten Vorteile die Applikation pflanzlicher Nanovesikel gegenüber der Anwendung konventioneller Extrakte hat, ist der zentrale Aspekt der Kollaboration mit dem Institut de Médecine Régénératrice et Biothérapies und soll den Grundstein für die pharmazeutische Nutzung pflanzlicher Nanovesikel bilden. Im Zuge dessen wurde der Einfluss von Nanovesikeln aus *C. zanthorrhizae rhizoma* auf mesenchymale Stammzellen getestet. Erste Ergebnisse zeigten, dass Vesikelkonzentrationen im Bereich von einigen µg Gesamtprotein pro ml die Zellzahl nach zwei Tagen nicht signifikant und nach sieben Tagen nur geringfügig reduzierte. Die Bestimmung der Apoptoserate mittels Caspase Glo Assay zeigte nach zwei Tagen einen leichten Anstieg und nach sieben Tagen eine leichte, konzentrationsabhängige Reduktion des Anteils apoptotischer Zellen.

Weitergehende Untersuchungen laufen.

4.5 Anmerkungen und Fazit

Ausbeute und Reinheit stellten bei den durchgeführten Untersuchungen an pflanzlichen EVs und Nanovesikeln konträre Parameter dar. Aus APF konnten EVs mittels differentieller Zentrifugation isoliert werden. Eine zusätzliche Aufreinigung der Proben mit weiteren Verfahren wäre insbesondere für die Proteinanalytik vorteilhaft gewesen, ging jedoch stets mit neuen Problemen wie Aggregation, Adsorption oder einem so großen Probenverlust einher, dass anschließend keine Analytik mehr möglich war.

Auch ergaben sich aus den unterschiedlichen Aspekten, die untersucht werden sollten, nicht selten Interferenzen. Beispielsweise war die Verwendung bestimmter Puffer oder der Zusatz von Proteaseinhibitoren problematisch für die Proteinquantifizierung, besonders mit dem empfindlichen Bradford-Nanoquant-Assay. Die Proteinquantifizierung mittels BCA-Assay ist zwar robuster, es muss jedoch auch mehr Probenmaterial eingesetzt werden. Das verbrauchte Probenmaterial fehlte dann z.B. bei der 2D-GE. Wie in diesem Beispiel musste häufig abgewogen werden, welche Untersuchungen mit dem begrenzten Probenmaterial durchgeführt werden sollten. Die Analytik von Nanovesikeln aus getrockneten Pflanzen war zwar aufgrund der größeren Ausbeuten grundsätzlich gut geeignet um Methoden zu etablieren, ging jedoch auch mit dem Auftreten neuer Problematiken wie Artefaktbildung durch Trocknung, Lagerung, Aufarbeitung etc. einher.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden Methoden etabliert, um EVs bzw. Nanovesikel verschiedener Pflanzenarten zuverlässig zu isolieren, visualisieren und analysieren. Auch wenn bislang keine Markerproteine pflanzlicher EVs identifiziert werden konnten, so bilden die gewonnenen Erkenntnisse der Proteinanalytik, wie auch die der chromatographischen Untersuchungen eine solide Grundlage für tiefer gehende Untersuchungen. Zudem wurden unvorhergesehene Erkenntnisse erlangt. So konnten erstmals intakte Nanovesikel aus getrocknetem Pflanzenmaterial und aus Calluskultur isoliert werden, die perspektivisch neue Quellen für revolutionäre Ansätze in der pharmazeutischen Technologie darstellen. Weiterhin wurden verschiedene Kollaborationen initiiert, die die Basis für weitergehende Charakterisierungen von Exosome-like Nanopartikeln pflanzlichen Ursprungs bilden.

Die Zukunft des Forschungsgebietes EVs und Nanovesikel entwickelt sich vielversprechend – nicht zuletzt da es sich immer breiter auffächert. EVs aus allen biologischen Reichen können perspektivisch für verschiedene Anwendungen genutzt werden: humane EVs können einerseits kurative Effekte haben, andererseits als Diagnostikum dienen; mykotische und bakterielle EVs bieten innovative Ansätze für neuartige Impfstoffe; pflanzliche Nanovesikel zeigten neben kurativen Effekten im Tierversuch auch, dass sie nach aktuellem Kenntnisstand eine Quelle für gut verträgliche Pharmaka und aufgrund ihrer antimykotischen Wirkung auch die Grundlage für biokompatible und biologisch abbaubare Pflanzenschutzmittel bilden können. Das Grundprinzip der nativen EVs, kleine Mengen Biomoleküle so zu verpacken, dass sie vor Diffusion und äußeren Einflüssen geschützt ein bestimmtes Ziel adressieren, ist ein zentraler Ansatzpunkt des gerichteten Arzneistofftransports in der pharmazeutischen Technologie. Jeder Schritt zu einem besseren Verständnis der geschilderten Vesikelspezies ist mittelfristig auch ein Schritt zur Verbesserung der Pharmakotherapie.

5 Zusammenfassung & Abstract

Bei der Betrachtung von „Exosome-like Nanopartikeln“ eröffnet sich zunächst die Frage: Was sind Exosomen? Als eine Klasse extrazellulärer Vesikel (EVs) gewannen sie in den vergangenen zwei Dekaden zunehmend an Bedeutung. Die Bildung und Freisetzung von EVs ist ein Prozess, der bei praktisch jedem Lebewesen und jeder Zelle aller Domänen stattfindet. Die physiologische Bedeutung von EVs wurde lange Zeit unterschätzt und bis heute nicht umfassend verstanden. Dass die Bildung und Sekretion auf verschiedenen, zum Teil redundanten Mechanismen basieren kann, deutet auf ihre enorme Wichtigkeit hin. Auch wenn die Fracht, insbesondere kleine nichtkodierende RNA (sRNA), eine zentrale Rolle für die Funktionalität der EVs spielt, so handelt sich doch um komplexe und hochfunktionale Gebilde, bei denen alle Komponenten aufeinander abgestimmt sind. Der Hülle kommen dabei offenbar ebenfalls zentrale Aufgaben zu, denn sie schützt nicht nur die teils fragile Fracht, sondern adressiert auch die Zielzelle, kann mit ihr interagieren und ermöglicht die Aufnahme.

Pflanzliche Exosome-like Nanopartikel wurden in praktisch allen Organen und Zellen – egal ob lebend, getrocknet oder im Labor kultiviert – gefunden. Es ist anzunehmen, dass sie vielfältige Funktionen erfüllen, darunter interzellulärer Informationsaustausch im Sinne der Homöostase und Abwehr pathogener Mikroorganismen. Das verwendete Ausgangsmaterial bzw. die Isolationsstechnik ist entscheidend für die Nomenklatur der Exosome-like Nanopartikel, denn wird das Pflanzengewebe homogenisiert, stammen diese „Nanovesikel“ nicht ausschließlich aus dem extrazellulären Raum. Ob und wie sich pflanzliche Nanovesikel von „echten“ EVs unterscheiden, ist und bleibt ungeklärt. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnten aus Calluskulturen EVs und Nanovesikel isoliert werden. Das schafft nicht nur eine wichtige Grundlage für zukünftige Untersuchungen, sondern auch für eine Produktion von pflanzlichen Nanovesikeln für den pharmazeutischen Einsatz unter gut definierbaren Bedingungen. Da gezeigt werden konnte, dass Nanovesikel die Trocknung von Pflanzenmaterial überstehen können, stellen pflanzliche Drogen ebenso eine mögliche Quelle für neue Vehikel zum Arzneistofftransport dar.

Aus einer Auswahl verschiedener Isolationsmethoden zeigte sich die differentielle Hochgeschwindigkeitszentrifugation für die Anreicherung der untersuchten Vesikel als besonders geeignet, obwohl sie mit weniger aufwändigen Techniken konkurrierte. Die morphologischen Eigenschaften der häufig zwischen 100 und 500 nm kleinen Strukturen wurden in der Regel am Transmissions-elektronenmikroskop (TEM) begutachtet und von EVs aus *Nicotiana tabacum* L. zusätzlich am Kryo-TEM. Die Partikelgrößenbestimmung der pflanzlichen Nanovesikel war nur eingeschränkt möglich und die Aggregation der Vesikel machte eine zusätzliche Aufarbeitung notwendig, führte dann jedoch gemeinsam mit den elektronenmikroskopischen Aufnahmen zu einer nicht unrealistischen Einschätzung der Partikelgrößen und zu dem Schluss, dass jede Pflanzenspezies Vesikel individueller Größe produziert. Ebenso individuell waren die Ausbeuten an isolierten Vesikeln. Sie hingen sowohl von der Spezies, als auch vom verwendeten Ausgangsmaterial ab, wobei aus allen untersuchten Pflanzenteilen Nanovesikel isoliert werden konnten. Zur Einschätzung der Menge an isolierten Vesikeln diente die Proteinkonzentration als Surrogatparameter. Während der Membranfarbstoff 3,3'-Dihexyloxycarbocyaniniodid (DiOC₆) die Ausbeute erhöhte, konnte er nicht zur Vesikelquantifizierung nutzbar gemacht werden.

Die Proteinanalytik von Nanovesikeln aus Drogen zeigte, dass das Proteom bei einigen (nicht allen) Drogen während der Trocknung erheblichen Veränderungen unterlag. Elektronenmikroskopisch konnten dennoch morphologisch intakte Vesikel beobachtet werden, was auf eine zentrale Rolle der Lipide für die Membranintegrität hindeutete. Die massenspektrometrische Identifizierung ausgewählter Proteine zeigte, dass zusätzlich zu der etablierten Isolation durch differentielle Zentrifugation weitere Reinigungsschritte notwendig sind. Es konnte nachgewiesen werden, dass sich die Agarose-Gelelektrophorese grundsätzlich für diesen Zweck einsetzen lässt und die Nanovesikel mithilfe von DiOC₆ gleichzeitig im Gel visualisiert werden können, auch wenn die Effizienz bei der Rückgewinnung der Vesikel aus dem Agarosegel noch Optimierung bedarf.

Chromatographische Untersuchungen ergaben ein heterogenes Bild bezüglich des Vorkommens von Sekundärmetaboliten. Dass vorwiegend lipophile Substanzen in den Nanovesikeln angereichert waren, deutete darauf hin, dass diese von der Pflanze nicht aktiv in die Nanovesikel eingebracht worden sind. Mit der Etablierung eines HPTLC-Systems zur Analytik der Phospholipide wurden erste Schritte zur Aufklärung von deren Bedeutung für die Hülle der untersuchten Nanovesikel unternommen. Diese scheint für die intestinale Resorption eine wesentliche Rolle zu spielen. Obwohl erste Daten zeigten, dass pflanzliche Nanovesikel meist nur ein geringes inhibitorisches Potential gegenüber der Pankreaslipase aufwiesen, gelangen diese bei einer vielseitigen Ernährung in der Regel in Kombination mit potenten Inhibitoren verschiedener Verdauungsenzyme in das Duodenum. Damit ist es wahrscheinlich, dass ein relevanter Anteil der ingestierten Vesikel aus Nahrungsmitteln resorbiert werden und deren Fracht so ihre Wirkung auf den humanen Metabolismus entfalten kann.

Insgesamt handelt es sich bei Untersuchungen zur Charakterisierung und zu biologischen Wirkungen von Exosome-like Nanopartikeln pflanzlichen Ursprungs um ein vielschichtiges Gebiet mit dem Potential neue Ansätze für die Pharmakotherapie zu entwickeln, dessen Facettenreichtum noch einige offene Fragen bereithält.

The first question coming up, dealing with „exosome-like nanoparticles“ would appear: What are exosomes? As a class of extracellular vesicles (EVs), they attracted increasing attention during the past two decades. Formation and release of EVs is a process that apparently comes to pass in every living organism or cell of all domains of life. The physiological role of EVs has been underestimated for a long term and it has not yet been comprehensively understood. Formation and release of EVs is based on different, partially redundant mechanisms, indicating their great importance. Even though cargo, especially small noncoding RNA (sRNA), plays a key role in EVs' functionality, these vesicles are highly complex structures with well-coordinated mixtures of bio-molecules. The envelope appears to be responsible for crucial tasks like protecting and addressing the cargo, interaction with and uptake to targeted cells.

Plant derived exosome-like nanoparticles have been found in practically every organ and cell – no matter if living, dried or lab-cultivated. It is assumed, that they accomplish a diverse set of tasks like inter-cellular information exchange in the manner of homeostasis and defense against pathogenic microorganisms. Nomenclature of exosome-like nanoparticles depends on the used raw material and isolation technique. If „nanovesicles“ are isolated from homogenates, they do not necessarily originate from extracellular space but if and how they are different from „genuine“ EVs remains puzzling. During the thesis project at hand, EVs and nanovesicles have been firstly isolated from callus cultures, building a sound foundation not only for further characterization but for the production of plant nanovesicles for pharmaceutical purposes under controlled conditions. Additionally, it has been proven that nanovesicles overcome the drying process of plant material. Herbal drugs can therefore stand as sources of vehicles for drug transport and targeting.

Among the repertory of possible isolation techniques, differential high performance centrifugation was especially suitable, although less laborious alternatives were available. Transmission electron microscopy (TEM) was the means of choice for assessing morphological properties of the usually 100 to 500 nm small structures. EVs from *Nicotiana tabacum* L. also have been visualized using a Kryo-TEM device. Although vesicle aggregates troubled particle size analysis, combining data with TEM results, realistic estimations revealed individual sizing of nanovesicles from different plant species. Likewise, yields of isolated vesicles were individual, depending on species as well as on raw material used. Thereby, nanovesicles could be isolated from all investigated plant organs. Protein concentration stood surrogate for vesicle amounts. 3,3'-Dihexyloxycarbocyaniniodid (DiOC₆) could not be utilized to quantify vesicles, but helped increasing yields.

Proteomics of nanovesicles from herbal drugs demonstrated severe protein alteration in some, not all, dried plants. Nevertheless, TEM images displayed morphologically undamaged nanovesicles indicating a crucial role of lipids for the integrity of vesicle membranes. Mass spectrometric protein identification showed the necessity of further purification after differential centrifugation. Agarose gel electrophoresis can be exploited for this purpose and adding DiOC₆ enables a simultaneous visualization of nanovesicles within the gel. Merely the efficiency of vesicle recovery needs some further improvement.

Chromatographic explorations revealed a heterogenic array regarding the occurrence of secondary metabolites. Since mainly lipophilic molecules were found to be enriched within the vesicle fraction, it appears plants do not actively package secondary metabolites into nanovesicles. With the

establishment of a HPTLC procedure for phospholipid profiling, first steps towards the elucidation of the vesicle envelope's importance have been made. The envelope is assumed to be essential for intestinal resorption. Although first data showed only slight inhibitory potential for plant derived nanovesicles on pancreatic lipase, in a diversified diet food-derived nanovesicles are usually taken up together with potent inhibitors of distinct digestive enzymes, making it likely that a relevant portion of the ingested vesicles may be absorbed and allow their cargo to impact human metabolism.

Conclusively, investigations on characterization and biological effects of exosome-like nanoparticles of plant origin comprise complex issues with the potential of developing new approaches for pharmacotherapy. This topic's multifaceted nature holds ready a couple of unresolved questions.

Literatur

- [1] R. Sager und G. E. Palade, *J. Cell Biol.*, 1957, **3**, 463–488.
- [2] J. R. Sotelo und K. R. Porter, *J. Cell Biol.*, 1959, **5**, 327–342.
- [3] S. N. De, *Nature*, 1959, **183**, 1533–1534.
- [4] K. Chatterjee, N. D. Gupta und M. De, *Exp. Cell. Res.*, 1959, **18**, 521–527.
- [5] W. A. Jensen, *J. Ultrastruct. Res.*, 1965, **13**, 112–128.
- [6] K. Takeo, I. Uesaka, K. Uehira und M. Nishiura, *J. Bacteriol.*, 1973, **113**, 1442–1448.
- [7] C. Harding, J. Heuser und P. Stahl, *J. Cell Biol.*, 1983, **97**, 329–339.
- [8] B.-T. Pan, K. Teng, C. Wu, M. Adam und R. M. Johnstone, *J. Cell Biol.*, 1985, **101**, 942–948.
- [9] R. M. Johnstone, M. Adam, J. R. Hammond, L. Orr und C. Turbide, *J. Biol. Chem.*, 1987, **262**, 9412–9420.
- [10] G. Raposo, H. W. Nijman, W. Stoorvogel, R. Leijendekker, C. V. Harding, C. J. M. Melief und H. J. Geuze, *J. Exp. Med.*, 1996, **183**, 1161–1172.
- [11] D. Schatz und A. Vardi, *Curr. Opin. Microbiol.*, 2018, **43**, 148–154.
- [12] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=extracellular+vesicle>, 25.03.2020.
- [13] E. Woith, G. Fuhrmann und M. F. Melzig, *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, **20**, 5695.
- [14] J. Kowal, M. Tkach und C. Théry, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2014, **29**, 116–125.
- [15] C. Théry, K. W. Witwer und 380 weitere Autoren, *J. Extracell. Vesicles*, 2018, **7**, 1535750.
- [16] S. Elmore, *Toxicol. Pathol.*, 2007, **35**, 495–516.
- [17] D. Gustafson, S. Veitch und J. E. Fish, *Front. Cardiovasc. Med.*, 2017, **4**, 71.
- [18] Y. Chen, G. Li und M.-L. Liu, *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2018, **16**, 50–62.
- [19] G. van Niel, G. D'Angelo und G. Raposo, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2018, **19**, 213–228.
- [20] S. Keller, M. P. Sanderson, A. Stoeck und P. Altevogt, *Immunol. Lett.*, 2006, **107**, 102–108.
- [21] L. Mashouri, H. Yousefi, A. R. Aref, A. M. Ahadi, F. Molaei und S. K. Alahari, *Mol. Cancer*, 2019, **18**, 75.
- [22] E. F. A. Yeates und G. Tesco, *J. Biol. Chem.*, 2016, **291**, 15753–15766.
- [23] M. J. Kennedy und M. D. Ehlers, *Neuron*, 2011, **69**, 856–875.
- [24] N. P. Hessvik und A. Llorente, *Cell. Mol. Life Sci.*, 2018, **75**, 193–208.

- [25] M. Dickman, B. Williams, Y. Li, P. de Figueiredo und T. Wolpert, *Nat. Plants*, 2017, **3**, 773–779.
- [26] Q. An, A. J. E. van Bel und R. Hückelhoven, *Plant Signal. Behav.*, 2007, **2**, 4–7.
- [27] P. Pérez-Bermúdez, J. Blesa, J. M. Soriano und A. Marcilla, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2017, **98**, 40–50.
- [28] S. Rome, *Food Funct.*, 2019, **10**, 529–538.
- [29] M. Record, *Mol. Ther.*, 2013, **21**, 1294–1296.
- [30] J. Mu, X. Zhuang, Q. Wang, H. Jiang, Z.-B. Deng, B. Wang, L. Zhang, S. Kakar, Y. Jun, D. Miller und H.-G. Zhang, *Mol. Nutr. Food Res.*, 2014, **58**, 1561–1573.
- [31] J. Xiao, S. Feng, X. Wang, K. Long, Y. Luo, Y. Wang, J. Ma, Q. Tang, L. Jin, X. Li und M. Li, *PeerJ.*, 2018, **6**, e5186.
- [32] Z. Zhao, S. Yu, M. Li, X. Gui und P. Li, *J. Agric. Food. Chem.*, 2018, **66**, 2749–2757.
- [33] G. Pocsfalvi, L. Turiák, A. Ambrosone, P. Del Gaudio, G. Puska, I. Fiume, T. Silvestre und K. Vékey, *J. Plant Physiol.*, 2018, **229**, 111–121.
- [34] S. Raimondo, F. Naselli, S. Fontana, F. Monteleone, A. L. Dico, L. Saieva, G. Zito, A. Flugy, M. Manno, M. A. D. Bella, G. D. Leo und R. Alessandro, *Oncotarget*, 2015, **6**, 19514–19527.
- [35] N. Carpita, D. Sabularse, D. Montezinos und D. P. Delmer, *Science*, 1979, **205**, 1144–1147.
- [36] M. McCann, B. Wells und K. Roberts, *J. Cell Sci.*, 1990, **96**, 323–334.
- [37] B. Rutter und R. W. Innes, *Plant Physiol.*, 2017, **175**, 728–741.
- [38] M. Regente, G. Corti-Monzón, A. M. Maldonado, M. Pinedo, J. Jorrín und L. de la Canal, *FEBS Lett.*, 2009, **583**, 3363–3366.
- [39] E. Woith und M. F. Melzig, *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, **20**, 357.
- [40] L. Walker, P. Sood, M. D. Lenardon, G. Milne, J. Olson, G. Jensen, J. Wolf, A. Casadevall, J. Adler-Moore und N. A. R. Gow, *mBio*, 2018, **9**, e02383–17.
- [41] N. Prado, J. de Dios Alché, J. Casado-Vela, S. Mas, M. Villalba, R. Rodríguez und E. Bata-nero, *Mol. Plant*, 2014, **7**, 573–577.
- [42] M. Regente, M. Pinedo, H. S. Clemente, T. Balliau, E. Jamet und L. de la Canal, *J. Exp. Bot.*, 2017, **68**, 5485–5495.
- [43] S. Ju, J. Mu, T. Dokland, X. Zhuang, Q. Wang, H. Jiang, X. Xiang, Z.-B. Deng, B. Wang, L. Zhang, M. Roth, R. Welti, J. Mobley, Y. Jun, D. Miller und H.-G. Zhang, *Mol. Ther.*, 2013, **21**, 1345–1357.

- [44] B. Wang, X. Zhuang, Z.-B. Deng, H. Jiang, J. Mu, Q. Wang, X. Xiang, H. Guo, L. Zhang, G. Dryden, J. Yan, D. Miller und H.-G. Zhang, *Mol. Ther.*, 2014, **22**, 522–534.
- [45] Q. Cai, L. Qiao, M. Wang, B. He, F.-M. Lin, J. Palmquist, S.-D. Huang und H. Jin, *Science*, 2018, **360**, 1126–1129.
- [46] F. Furt, F. Simon-Plas und S. Mongrand, *The Plant Plasma Membrane*, Springer Berlin Heidelberg, 2010, S. 3–30.
- [47] R. A. Blackwood, J. E. Smolen, A. Transue, R. J. Hessler, D. M. Harsh, R. C. Brower und S. French, *Am. J. Physiol.*, 1997, **272**, C1279–C1285.
- [48] M. Zhang, E. Viennois, C. Xu und D. Merlin, *Tissue Barriers*, 2016, **4**, e1134415.
- [49] M. Zhang, X. Wang, M. K. Han, J. F. Collins und D. Merlin, *Nanomedicine*, 2017, **12**, 1927–1943.
- [50] X. Wang, M. Zhang, S. R. Flores, R. R. Woloshun, C. Yang, L. Yin, P. Xiang, X. Xu, M. D. Garrick, S. Vidyasagar, D. Merlin und J. F. Collins, *Mol. Ther.*, 2019.
- [51] L. S. Joffe, L. Nimrichter, M. L. Rodrigues und M. D. Poeta, *mSphere*, 2016, **1**, e00099–16.
- [52] J. M. Wolf und A. Casadevall, *Curr. Opin. Microbiol.*, 2014, **22**, 73–78.
- [53] A. Sharon, A. Finkelstein, N. Shlezinger und I. Hatam, *FEMS Microbiol. Rev.*, 2009, **33**, 833–854.
- [54] R. Peres da Silva, R. Puccia, M. L. Rodrigues, D. L. Oliveira, L. S. Joffe, G. V. César, L. Nimrichter, S. Goldenberg und L. R. Alves, *Sci. Rep.*, 2015, **5**, 7763.
- [55] S. de Toledo Martins, P. Szwarc, S. Goldenberg und L. R. Alves, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, Springer Berlin Heidelberg, 2018.
- [56] G. Vargas, J. D. B. Rocha, D. L. Oliveira, P. C. Albuquerque, S. Frases, S. S. Santos, J. D. Nosanchuk, A. M. O. Gomes, L. C. A. S. Medeiros, K. Miranda, T. J. P. Sobreira, E. S. Nakayasu, E. A. Arigi, A. Casadevall, A. J. Guimaraes, M. L. Rodrigues, C. G. F. de Lima, I. C. Almeida und L. Nimrichter, *Cell. Microbiol.*, 2015, **17**, 389–407.
- [57] P. C. Albuquerque, E. S. Nakayasu, M. L. Rodrigues, S. Frases, A. Casadevall, R. M. Zancope-Oliveira, I. C. Almeida und J. D. Nosanchuk, *Cell. Microbiol.*, 2008, **10**, 1695–1710.
- [58] M. C. Vallejo, E. S. Nakayasu, L. V. G. Longo, L. Ganiko, F. G. Lopes, A. L. Matsuo, I. C. Almeida und R. Puccia, *PLoS ONE*, 2012, **7**, e39463.
- [59] S. Raj, S. Nazemidashtarjandi, J. Kim, L. Joffe, X. Zhang, A. Singh, V. Mor, D. Desmarini, J. Djordjevic, D. P. Raleigh, M. L. Rodrigues, E. London, M. D. Poeta und A. M. Farnoud, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 2017, **1859**, 2224–2233.
- [60] S. B. Levery, M. Momany, R. Lindsey, M. S. Toledo, J. A. Shayman, M. Fuller, K. Brooks, R. L. Doong, A. H. Straus und H. K. Takahashi, *FEBS Lett.*, 2002, **525**, 59–64.

- [61] W. R. Rittenour, M. Chen, E. B. Cahoon und S. D. Harris, *PLoS ONE*, 2011, **6**, e19385.
- [62] Y. Liu, K. A. Y. Defourny, E. J. Smid und T. Abee, *Front. Microbiol.*, 2018, **9**, 1502.
- [63] A. Goes und G. Fuhrmann, *ACS Infect. Dis.*, 2018, **4**, 881–892.
- [64] M. Renelli, V. Matias, R. Y. Lo und T. J. Beveridge, *Microbiology*, 2004, **150**, 2161–2169.
- [65] A. J. McBroom und M. J. Kuehn, *EcoSal Plus*, 2005, **1**, 0.
- [66] E. Schulz, A. Goes, R. Garcia, F. Panter, M. Koch, R. Müller, K. Fuhrmann und G. Fuhrmann, *J. Control. Release*, 2018, **290**, 46–55.
- [67] C. Arigita, W. Jiskoot, J. Westdijk, C. van Ingen, W. E. Hennink, D. J. Crommelin und G. F. Kersten, *Vaccine*, 2004, **22**, 629–642.
- [68] P. Dauros Singorenko, V. Chang, A. Whitcombe, D. Simonov, J. Hong, A. Phillips, S. Swift und C. Blenkiron, *J. Extracell. Vesicles*, 2017, **6**, 1324731.
- [69] A. Kulp und M. J. Kuehn, *Annu. Rev. Microbiol.*, 2010, **64**, 163–184.
- [70] N. Orench-Rivera und M. J. Kuehn, *Cell. Microbiol.*, 2016, **18**, 1525–1536.
- [71] D. Prangishvili, I. Holz, E. Stieger, S. Nickell, J. K. Kristjansson und W. Zillig, *J. Bacteriol.*, 2000, **182**, 2985–2988.
- [72] A. F. Ellen, S.-V. Albers, W. Huibers, A. Pitcher, C. F. V. Hobel, H. Schwarz, M. Folea, S. Schouten, E. J. Boekema, B. Poolman und A. J. M. Driessen, *Extremophiles*, 2009, **13**, 67–79.
- [73] R. Rachel, I. Wyschkony, S. Riehl und H. Huber, *Archaea*, 2002, **1**, 9–18.
- [74] M. Gaudin, E. Gaudiard, S. Schouten, L. Houel-Renault, P. Lenormand, E. Marguet und P. Forterre, *Environ. Microbiol. Rep.*, 2013, **5**, 109–116.
- [75] S. Erdmann, B. Tschitschko, L. Zhong, M. J. Raftery und R. Cavicchioli, *Nat. Microbiol.*, 2017, **2**, 1446–1455.
- [76] A. F. Ellen, O. V. Rohulya, F. Fusetti, M. Wagner, S.-V. Albers und A. J. M. Driessen, *J. Bacteriol.*, 2011, **193**, 4380–4387.
- [77] M. Gaudin, M. Krupovic, E. Marguet, E. Gaudiard, V. Cvirkaite-Krupovic, E. L. Cam, J. Oberto und P. Forterre, *Environ. Microbiol.*, 2014, **16**, 1167–1175.
- [78] C. R. Woese, O. Kandler und M. L. Wheelis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1990, **87**, 4576–4579.
- [79] N. Soler, E. Marguet, J.-M. Verbavatz und P. Forterre, *Res. Microbiol.*, 2008, **159**, 390–399.
- [80] M. Mallocci, L. Perdomo, M. Veerasamy, R. Andriantsitohaina, G. Simard und M. C. Martínez, *Antioxid. Redox. Signal.*, 2019, **30**, 813–856.

- [81] H. Valadi, K. Ekström, A. Bossios, M. Sjöstrand, J. J. Lee und J. O. Lötval, *Nat. Cell Biol.*, 2007, **9**, 654–659.
- [82] K. Otsuka, Y. Yamamoto, R. Matsuoka und T. Ochiya, *Mol. Nutr. Food Res.*, 2018, **62**, 1700080.
- [83] A. V. Vlassov, S. Magdaleno, R. Setterquist und R. Conrad, *Biochim. Biophys. Acta*, 2012, **1820**, 940–948.
- [84] M. Simons und G. Raposo, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2009, **21**, 575–581.
- [85] J. Zemleni, A. Aguilar-Lozano, M. Sadri, S. Sukreet, S. Manca, D. Wu, F. Zhou und E. Mutai, *J. Nutr.*, 2016, **147**, 3–10.
- [86] M. Jiang, X. Sang und Z. Hong, *Bioessays*, 2012, **34**, 280–284.
- [87] A. H. Buck, G. Coakley, F. Simbari, H. J. McSorley, J. F. Quintana, T. L. Bihan, S. Kumar, C. Abreu-Goodger, M. Lear, Y. Harcus, A. Ceroni, S. A. Babayan, M. Blaxter, A. Ivens und R. M. Maizels, *Nat. Commun.*, 2014, **5**, 5488.
- [88] Y. Koga, M. Yasunaga, Y. Moriya, T. Akasu, S. Fujita, S. Yamamoto und Y. Matsumura, *J. Gastrointest. Oncol.*, 2011, **2**, 215–222.
- [89] P. Joshi, L. Benussi, R. Furlan, R. Ghidoni und C. Verderio, *Int. J. Mol. Sci.*, 2015, **16**, 4800–4813.
- [90] Y. Chen, Y. Xiao, Z. Lin, X. Xiao, C. He, J. C. Bihl, B. Zhao, X. Ma und Y. Chen, *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.*, 2015, **24**, 2313–2320.
- [91] S. Fais, L. O’Driscoll, F. E. Borrás, E. Buzas, G. Camussi, F. Cappello, J. Carvalho, A. C. da Silva, H. D. Portillo, S. E. Andaloussi, T. F. Trček, R. Furlan, A. Hendrix, I. Gursel, V. Kralj-Iglic, B. Kaeffler, M. Kosanovic, M. E. Lekka, G. Lipps, M. Logozzi, A. Marcilla, M. Sammar, A. Llorente, I. Nazarenko, C. Oliveira, G. Pocsfalvi, L. Rajendran, G. Raposo, E. Rohde, P. Siljander, G. van Niel, M. H. Vasconcelos, M. Yáñez-Mó, M. L. Yliperttula, N. Zarovni, A. B. Zavec und B. Giebel, *ACS Nano*, 2016, **10**, 3886–3899.
- [92] D. Turpin, M.-E. Truchetet, B. Faustin, J.-F. Augusto, C. Contin-Bordes, A. Brisson, P. Blanco und P. Duffau, *Autoimmun. Rev.*, 2016, **15**, 174–183.
- [93] S. Katsiogiannis, *For. Immunopathol. Dis. Therap.*, 2015, **6**, 163–170.
- [94] S. C. Ferrante, E. P. Nadler, D. K. Pillai, M. J. Hubal, Z. Wang, J. M. Wang, H. Gordish-Dressman, E. Koeck, S. Sevilla, A. A. Wiles und R. J. Freishtat, *Pediatr. Res.*, 2014, **77**, 447–454.
- [95] A. L. S. Revenfeld, R. Bæk, M. H. Nielsen, A. Stensballe, K. Varming und M. Jørgensen, *Clin. Ther.*, 2014, **36**, 830–846.
- [96] L. Zitvogel, A. Regnault, A. Lozier, J. Wolfers, C. Flament, D. Tenza, P. Ricciardi-Castagnoli, G. Raposo und S. Amigorena, *Nat. Med.*, 1998, **4**, 594–600.

- [97] W. Guo, Y. Gao, N. Li, F. Shao, C. Wang, P. Wang, Z. Yang, R. Li und J. He, *Oncol. Rep.*, 2017, **38**, 665–675.
- [98] R. Sullivan, G. Maresh, X. Zhang, C. Salomon, J. Hooper, D. Margolin und L. Li, *Front. Endocrinol.*, 2017, **8**, 194.
- [99] Q. B. Zha, Y. F. Yao, Z. J. Ren, X. J. Li und J. H. Tang, *Tumor Biology*, 2017, **39**, 101042831769118.
- [100] N. Bastos, C. F. Ruivo, S. da Silva und S. A. Melo, *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2018, **78**, 13–21.
- [101] P. Kurywchak, J. Tavormina und R. Kalluri, *Genome Med.*, 2018, **10**, 23.
- [102] M. K. McDonald, Y. Tian, R. A. Qureshi, M. Gormley, A. Ertel, R. Gao, E. A. Lopez, G. M. Alexander, A. Sacan, P. Fortina und S. K. Ajit, *Pain*, 2014, **155**, 1527–1539.
- [103] O. P. B. Wiklander, M. Á. Brennan, J. Lötvall, X. O. Breakefield und S. E. Andaloussi, *Sci. Transl. Med.*, 2019, **11**, eaav8521.
- [104] P. Lai, J. Weng, L. Guo, X. Chen und X. Du, *Biomarker Res.*, 2019, **7**, 6.
- [105] L. Kordelas, V. Rebmann, A.-K. Ludwig, S. Radtke, J. Ruesing, T. R. Doeppner, M. Eppler, P. A. Horn, D. W. Beelen und B. Giebel, *Leukemia*, 2014, **28**, 970–973.
- [106] R. C. Lai, F. Arslan, M. M. Lee, N. S. K. Sze, A. Choo, T. S. Chen, M. Salto-Tellez, L. Timmers, C. N. Lee, R. M. E. Oakley, G. Pasterkamp, D. P. de Kleijn und S. K. Lim, *Stem Cell Res.*, 2010, **4**, 214–222.
- [107] S. Palazzolo, S. Bayda, M. Hadla, I. Caligiuri, G. Corona, G. Toffoli und F. Rizzolio, *Curr. Med. Chem.*, 2018, **25**, 4224–4268.
- [108] X. Zhuang, Z.-B. Deng, J. Mu, L. Zhang, J. Yan, D. Miller, W. Feng, C. J. McClain und H.-G. Zhang, *J. Extracell. Vesicles*, 2015, **4**, 28713.
- [109] Q. Wang, X. Zhuang, J. Mu, Z.-B. Deng, H. Jiang, L. Zhang, X. Xiang, B. Wang, J. Yan, D. Miller und H.-G. Zhang, *Nat. Commun.*, 2013, **4**, 1867.
- [110] Y. Teng, Y. Ren, M. Sayed, X. Hu, C. Lei, A. Kumar, E. Hutchins, J. Mu, Z. Deng, C. Luo, K. Sundaram, M. K. Sriwastva, L. Zhang, M. Hsieh, R. Reiman, B. Haribabu, J. Yan, V. R. Jala, D. M. Miller, K. V. Keuren-Jensen, M. L. Merchant, C. J. McClain, J. W. Park, N. K. Egilmez und H.-G. Zhang, *Cell Host Microbe*, 2018, **24**, 637–652.e8.
- [111] L. Zhang, D. Hou, X. Chen, D. Li, L. Zhu, Y. Zhang, J. Li, Z. Bian, X. Liang, X. Cai, Y. Yin, C. Wang, T. Zhang, D. Zhu, D. Zhang, J. Xu, Q. Chen, Y. Ba, J. Liu, Q. Wang, J. Chen, J. Wang, M. Wang, Q. Zhang, J. Zhang, K. Zen und C.-Y. Zhang, *Cell Res.*, 2012, **22**, 107–126.
- [112] X. Zhuang, Y. Teng, A. Samykutty, J. Mu, Z. Deng, L. Zhang, P. Cao, Y. Rong, J. Yan, D. Miller und H.-G. Zhang, *Mol. Ther.*, 2016, **24**, 96–105.

- [113] Y. Teng, J. Mu, X. Hu, A. Samykutty, X. Zhuang, Z. Deng, L. Zhang, P. Cao, J. Yan, D. Miller und H.-G. Zhang, *Oncotarget*, 2016, **7**, 25683–25697.
- [114] Z. Tang, Y. Jun, Y. Lv, Y. Li, Z. Zhang, M. Tao, X. Chen, J. He, L. Zhang und Q.-L. Wang, *J. Drug Targeting*, 2019, **28**, 186–194.
- [115] M. Zhang, B. Xiao, H. Wang, M. K. Han, Z. Zhang, E. Viennois, C. Xu und D. Merlin, *Mol. Ther.*, 2016, **24**, 1783–1796.
- [116] M. Wang, A. Weiberg, F.-M. Lin, B. P. H. J. Thomma, H.-D. Huang und H. Jin, *Nat. Plants*, 2016, **2**, 16151.
- [117] J. S. Schorey, Y. Cheng und P. P. S. V. L. Smith, *EMBO Rep.*, 2014, **16**, 24–43.
- [118] A. Yoneda und T. L. Doering, *Mol. Biol. Cell*, 2006, **17**, 5131–5140.
- [119] J. Panepinto, K. Komperda, S. Frases, Y.-D. Park, J. T. Djordjevic, A. Casadevall und P. R. Williamson, *Mol. Microbiol.*, 2009, **71**, 1165–1176.
- [120] M. C. Vallejo, A. L. Matsuo, L. Ganiko, L. C. S. Medeiros, K. Miranda, L. S. Silva, E. Freymüller-Haapalainen, R. Sinigaglia-Coimbra, I. C. Almeida und R. Puccia, *Eukaryot. Cell*, 2011, **10**, 343–351.
- [121] S.-H. Huang, C.-H. Wu, Y. C. Chang, K. J. Kwon-Chung, R. J. Brown und A. Jong, *PLoS ONE*, 2012, **7**, e48570.
- [122] J. M. Wolf, J. Espadas, J. Luque-Garcia, T. Reynolds und A. Casadevall, *Eukaryot. Cell*, 2015, **14**, 745–754.
- [123] U. Gehrman, K. R. Qazi, C. Johansson, K. Hultenby, M. Karlsson, L. Lundeberg, S. Gabrielsson und A. Scheynius, *PLoS ONE*, 2011, **6**, e21480.
- [124] D. L. Oliveira, C. G. F. de Lima, J. D. Nosanchuk, A. Casadevall, M. L. Rodrigues und L. Nimrichter, *Infect. Immun.*, 2010, **78**, 1601–1609.
- [125] J. L. Kadurugamuwa und T. J. Beveridge, *J. Bacteriol.*, 1995, **177**, 3998–4008.
- [126] J. M. Bomberger, D. P. MacEachran, B. A. Coutermarsh, S. Ye, G. A. O'Toole und B. A. Stanton, *PLoS Pathog.*, 2009, **5**, e1000382.
- [127] J. L. Kadurugamuwa und T. J. Beveridge, *J. Bacteriol.*, 1996, **178**, 2767–2774.
- [128] S. R. Schooling und T. J. Beveridge, *J. Bacteriol.*, 2006, **188**, 5945–5957.
- [129] A. J. McBroom und M. J. Kuehn, *Mol. Microbiol.*, 2006, **63**, 545–558.
- [130] O. Ciofu, T. J. Beveridge, J. Kadurugamuwa, J. Walther-Rasmussen und N. Høiby, *J. Anti-microb. Chemother.*, 2000, **45**, 9–13.
- [131] M. K. Chattopadhyay und M. V. Jaganandham, *Front. Microbiol.*, 2015, **6**, 758.

- [132] S. Wang, J. Gao und Z. Wang, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.*, 2018, **11**, e1523.
- [133] A. Goes, P. Lapuhs, T. Kuhn, E. Schulz, R. Richter, F. Panter, C. Dahlem, M. Koch, R. Garcia, A. K. Kiemer, R. Müller und G. Fuhrmann, *Cells*, 2020, **9**, 194.
- [134] H. Siomi und M. C. Siomi, *Nature*, 2009, **457**, 396–404.
- [135] Y. Peng und C. M. Croce, *Sig. Transduct. Target. Ther.*, 2016, **1**, 15004.
- [136] W. Xie, A. Weng und M. Melzig, *Planta Med.*, 2016, **82**, 1153–1162.
- [137] W. Xie und M. Melzig, *Molecules*, 2018, **23**, 919.
- [138] D. E. Murphy, O. G. de Jong, M. Brouwer, M. J. Wood, G. Lavieu, R. M. Schiffelers und P. Vader, *Exp. Mol. Med.*, 2019, **51**, 32.
- [139] D. P. Bartel, *Cell*, 2004, **116**, 281–297.
- [140] S. R. Baier, C. Nguyen, F. Xie, J. R. Wood und J. Zempleni, *J. Nutr.*, 2014, **144**, 1495–1500.
- [141] K. M. Howard, R. Jati Kusuma, S. R. Baier, T. Friemel, L. Markham, J. Vanamala und J. Zempleni, *J. Agric. Food. Chem.*, 2015, **63**, 588–592.
- [142] T. Chen, M.-Y. Xie, J.-J. Sun, R.-S. Ye, X. Cheng, R.-P. Sun, L.-M. Wei, M. Li, D.-L. Lin, Q.-Y. Jiang, Q.-Y. Xi und Y.-L. Zhang, *Sci. Rep.*, 2016, **6**, 33862.
- [143] N. Kosaka, H. Izumi, K. Sekine und T. Ochiya, *Silence*, 2010, **1**, 7.
- [144] M. Tong und L. W. Chamley, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 2015, **5**, a023028.
- [145] C. Lässer, V. S. Alikhani, K. Ekström, M. Eldh, P. T. Paredes, A. Bossios, M. Sjöstrand, S. Gabriellsson, J. Lötvall und H. Valadi, *J. Transl. Med.*, 2011, **9**, 9.
- [146] M. I. Zonneveld, A. R. Brisson, M. J. C. van Herwijnen, S. Tan, C. H. A. van de Lest, F. A. Redegeld, J. Garssen, M. H. M. Wauben und E. N. M. N.-'. Hoen, *J. Extracell. Vesicles*, 2014, **3**, 24215.
- [147] M. L. Rodrigues, L. Nimrichter, D. L. Oliveira, J. D. Nosanchuk und A. Casadevall, *Lipid Insights*, 2008, **2**, 27–40.
- [148] E. Bielska, M. A. Sisquella, M. Aldeieg, C. Birch, E. J. O'Donoghue und R. C. May, *Nat. Commun.*, 2018, **9**, 1556.
- [149] T. N. Ellis und M. J. Kuehn, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2010, **74**, 81–94.
- [150] A. T. Jan, *Front. Microbiol.*, 2017, **8**, 1053.
- [151] T. Wolf, S. R. Baier und J. Zempleni, *J. Nutr.*, 2015, **145**, 2201–2206.
- [152] D. Bernal, M. Trelis, S. Montaner, F. Cantalapiedra, A. Galiano, M. Hackenberg und A. Marcilla, *J. Proteomics*, 2014, **105**, 232–241.

- [153] S. Yaron, G. L. Kolling, L. Simon und K. R. Matthews, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, **66**, 4414–4420.
- [154] A. Weiberg, M. Wang, F.-M. Lin, H. Zhao, Z. Zhang, I. Kaloshian, H.-D. Huang und H. Jin, *Science*, 2013, **342**, 118–123.
- [155] A. Weiberg und H. Jin, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2015, **26**, 87–94.
- [156] M. Wang, A. Weiberg, E. Dellota, D. Yamane und H. Jin, *RNA Biol.*, 2017, **14**, 421–428.
- [157] I. A. MacDonald und M. J. Kuehn, *J. Bacteriol.*, 2013, **195**, 2971–2981.
- [158] J. Rivera, R. J. B. Cordero, A. S. Nakouzi, S. Frases, A. Nicola und A. Casadevall, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2010, **107**, 19002–19007.
- [159] M. Kaparakis, L. Turnbull, L. Carneiro, S. Firth, H. A. Coleman, H. C. Parkington, L. L. Bourhis, A. Karrar, J. Viala, J. Mak, M. L. Hutton, J. K. Davies, P. J. Crack, P. J. Hertzog, D. J. Philpott, S. E. Girardin, C. B. Whitchurch und R. L. Ferrero, *Cell. Microbiol.*, 2010, **12**, 372–385.
- [160] P. Deo, S. H. Chow, I. D. Hay, O. Kleifeld, A. Costin, K. D. Elgass, J.-H. Jiang, G. Ramm, K. Gabriel, G. Dougan, T. Lithgow, E. Heinz und T. Naderer, *PLoS Pathog.*, 2018, **14**, e1006945.
- [161] K. Koeppen, T. H. Hampton, M. Jarek, M. Scharfe, S. A. Gerber, D. W. Mielcarz, E. G. Demers, E. L. Dolben, J. H. Hammond, D. A. Hogan und B. A. Stanton, *PLoS Pathog.*, 2016, **12**, e1005672.
- [162] M. Codemo, S. Muschiol, F. Iovino, P. Nannapaneni, L. Plant, S. N. Wai und B. Henriques-Normark, *mBio*, 2018, **9**, e00559–18.
- [163] C. Admyre, S. M. Johansson, K. R. Qazi, J.-J. Filén, R. Lahesmaa, M. Norman, E. P. A. Neve, A. Scheynius und S. Gabrielsson, *J. Immunol.*, 2007, **179**, 1969–1978.
- [164] M. Samuel, M. Bleackley, M. Anderson und S. Mathivanan, *Front. Plant Sci.*, 2015, **6**, 766.
- [165] G. Lohaus, K. Pennewiss, B. Sattelmacher, M. Hussmann und K. Hermann Muehling, *Physiol. Plant.*, 2001, **111**, 457–465.
- [166] P. Schopfer und A. Brennicke, in *Pflanzenphysiologie*, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 7th edn, 2010.
- [167] B. M. O’Leary, A. Rico, S. McCraw, H. N. Fones und G. M. Preston, *J. Vis. Exp.*, 2014, **94**, e52113.
- [168] S. Bhatia, *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*, Elsevier, 2015, S. 31–107.
- [169] T. Murashige und F. Skoog, *Physiol. Plant.*, 1962, **15**, 473–497.

- [170] J. A. Teixeira da Silva, B. Winarto, J. Dobránszki und S. Zeng, *Folia Hortic.*, 2015, **27**, 3–14.
- [171] *Arabidopsis Protocols*, Ed. J. Salinas und J. J. Snachez-Serrano, Humana Press, Totowa, New Jersey, 2006.
- [172] J. Svozil, W. Gruissem und K. Baerenfaller, *Front. Plant Sci.*, 2016, **7**, 1701.1–8.
- [173] B. Mateescu, E. J. K. Kowal, B. W. M. van Balkom, S. Bartel, S. N. Bhattacharyya, E. I. Buzás, A. H. Buck, P. de Candia, F. W. N. Chow, S. Das, T. A. P. Driedonks, L. Fernández-Messina, F. Haderk, A. F. Hill, J. C. Jones, K. R. V. Keuren-Jensen, C. P. Lai, C. Lässer, I. di Liegro, T. R. Lunavat, M. J. Lorenowicz, S. L. N. Maas, I. Mäger, M. Mittelbrunn, S. Momma, K. Mukherjee, M. Nawaz, D. M. Pegtel, M. W. Pfaffl, R. M. Schiffelers, H. Tahara, C. Théry, J. P. Tosar, M. H. M. Wauben, K. W. Witwer und E. N. M. N. 't Hoen, *J. Extracell. Vesicles*, 2017, **6**, 1286095.
- [174] M. A. Livshits, E. Khomyakova, E. G. Evtushenko, V. N. Lazarev, N. A. Kulemin, S. E. Semina, E. V. Generozov und V. M. Govorun, *Sci. Rep.*, 2015, **5**, 17319.
- [175] H. Schiffter und A. Ziegler, in *Formelsammlung Pharmazie*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 1st edn, 2012.
- [176] Beckman Coulter, Inc., Palo Alto, CA, USA, *JA-25.50 Fixed Angle Rotor Manual*, 2002.
- [177] A. Cvjetkovic, J. Lötvall und C. Lässer, *J. Extracell. Vesicles*, 2014, **3**, 23111.
- [178] R. Kornilov, M. Puhka, B. Mannerström, H. Hiidenmaa, H. Peltoniemi, P. Siljander, R. Seppänen-Kaijansinkko und S. Kaur, *J. Extracell. Vesicles*, 2018, **7**, 1422674.
- [179] A. N. Böing, E. van der Pol, A. E. Grootemaat, F. A. W. Coumans, A. Sturk und R. Nieuwland, *J. Extracell. Vesicles*, 2014, **3**, 23430.
- [180] S. Mori und H. G. Barth, in *Size Exclusion Chromatography*, Springer Berlin Heidelberg, 1999.
- [181] <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4478359#/4478359>, 13.03.2020.
- [182] W. J. Koros, Y. H. Ma und T. Shimidzu, *Pure Appl. Chem.*, 1996, **68**, 1479–1489.
- [183] G. H. Michler, in *Kompakte Einführung in die Elektronenmikroskopie*, Springer Spektrum, 2019.
- [184] R. T. Borlinghaus, in *Konfokale Mikroskopie in Weiß*, Springer-Verlag GmbH, 2016.
- [185] R. Erni, M. D. Rossell, C. Kisielowski und U. Dahmen, *Phys. Rev. Lett.*, 2009, **102**, 096101.
- [186] R. Szatanek, M. Baj-Krzyworzeka, J. Zimoch, M. Lekka, M. Siedlar und J. Baran, *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, **18**, 1153.
- [187] J. Dubochet, M. Adrian, J.-J. Chang, J.-C. Homo, J. Lepault, A. W. McDowell und P. Schultz, *Q. Rev. Biophys.*, 1988, **21**, 129.

- [188] G. J. Lauth und J. Kowalczyk, in *Einführung in die Physik und Chemie der Grenzflächen und Kolloide*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2016.
- [189] C. Gardiner, Y. J. Ferreira, R. A. Dragovic, C. W. Redman und I. L. Sargent, *J. Extracell. Vesicles*, 2013, **2**, 19671.
- [190] <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/brochures/Exosomes-brochure.pdf>, 01.12.2017.
- [191] P. Smith, R. Krohn, G. Hermanson, A. Mallia, F. Gartner, M. Provenzano, E. Fujimoto, N. Goeke, B. Olson und D. Klenk, *Anal. Biochem.*, 1985, **150**, 76–85.
- [192] M. M. Bradford, *Anal. Biochem.*, 1976, **72**, 248–254.
- [193] <https://www.carlroth.com>, Art.Nr. K880.2, 01.05.2020.
- [194] C. R. Parish, *Immunol. Cell Biol.*, 1999, **77**, 499–508.
- [195] diverse Autoren, in *Gentechnische Methoden*, Ed. M. Jansohn und S. Rothhämel, Spektrum Akademischer Verlag, 2012.
- [196] V. Neuhoff, N. Arold, D. Taube und W. Ehrhardt, *Electrophoresis*, 1988, **9**, 255–262.
- [197] S. C. Carpentier, E. Witters, K. Laukens, P. Deckers, R. Swennen und B. Panis, *Proteomics*, 2005, **5**, 2497–2507.
- [198] A. Shevchenko, M. Wilm, O. Vorm und M. Mann, *Anal. Chem.*, 1996, **68**, 850–858.
- [199] D. Suckau, A. Resemann, M. Schuerenberg, P. Hufnagel, J. Franzen und A. Holle, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003, **376**, 952–965.
- [200] Y. Sun, K. Sriramajayam, D. Luo und D. J. Liao, *J. Cancer*, 2012, **3**, 93–95.
- [201] D. Csupor, B. Borcsa, B. Heydel, J. Hohmann, I. Zupkó, Y. Ma, U. Widowitz und R. Bauer, *Pharm. Biol.*, 2011, **49**, 1097–1101.
- [202] R. M. Deranieh, A. S. Joshi und M. L. Greenberg, *Methods in Molecular Biology*, Humana Press, 2013, S. 21–27.
- [203] <https://avantilipids.com/tech-support/physical-properties/ionization-constants>, 24.03.2020.
- [204] M. A. Churchward, D. M. Brandman, T. Rogasevskaia und J. R. Coorssen, *J. Chem. Biol.*, 2008, **1**, 79–87.
- [205] T. Buchholz, *Pflanzliche Sekundärprodukte als Inhibitoren von ausgewählten Verdauungsenzymen*, Dissertation, Freie Universität Berlin, 2017.
- [206] K. Raschke, *Plant Physiol.*, 1970, **45**, 415–423.
- [207] J. Schanz, *Biochemische Charakterisierung extrazellulärer Vesikel pflanzlichen Ursprungs*, Masterarbeit, Universität Basel und Freie Universität Berlin, 2019.

- [208] R. Linares, S. Tan, C. Gounou, N. Arraud und A. R. Brisson, *J. Extracell. Vesicles*, 2015, **4**, 29509.
- [209] R. Szatanek, J. Baran, M. Siedlar und M. Baj-Krzyworzeka, *Int. J. Mol. Med.*, 2015, **36**, 11–17.
- [210] C. Y. Zheng, G. Ma und Z. Su, *Electrophoresis*, 2007, **28**, 2801–2807.
- [211] C. Théry, S. Amigorena, G. Raposo und A. Clayton, *Curr. Protoc. Cell Biol.*, 2006, **3**, 3.22.1–3.22.29.
- [212] D. Zabeo, A. Cvjetkovic, C. Lässer, M. Schorb, J. Lötvall und J. L. Höög, *J. Extracell. Vesicles*, 2017, **6**, 1329476.
- [213] M. W. Jornitz, R. V. Levy, R. E. Madsen, T. H. Meltzer und O. W. Reif, in *Sterile Filtration*, Ed. M. W. Jornitz, Springer-Verlag, 2006.
- [214] X. Zhang, *Morphological and Biological Characterization of Plant-derived Nanovesicles and their Secondary Metabolites*, Masterarbeit, Freie Universität Berlin, in Bearbeitung.
- [215] S. Bosch, L. de Beaurepaire, M. Allard, M. Mosser, C. Heichette, D. Chrétien, D. Jegou und J.-M. Bach, *Sci. Rep.*, 2016, **6**, 36162.
- [216] J. A. Raven, *New Phytol.*, 2013, **198**, 1–3.
- [217] <https://www.carlroth.com>, technische Information zu Art.Nr. 6367, 08.01.2020.
- [218] N. Sierro, J. N. Battey, S. Ouadi, N. Bakaher, L. Bovet, A. Willig, S. Goepfert, M. C. Peitsch und N. V. Ivanov, *Nat. Commun.*, 2014, **5**, 3833.
- [219] Š. Alič, T. Naglič, M. Tušek-Žnidarič, M. Ravnikar, N. Rački, M. Peterka und T. Dreo, *Front. Microbiol.*, 2017, **8**, 1870.
- [220] B. Ma, M. E. Hibbing, H.-S. Kim, R. M. Reedy, I. Yedidia, J. Breuer, J. Breuer, J. D. Glasner, N. T. Perna, A. Kelman und A. O. Charkowski, *Phytopathology*, 2007, **97**, 1150–1163.
- [221] L. Guerra-Guimarães, A. Vieira, I. Chaves, C. Pinheiro, V. Queiroz, J. Renaut und C. P. Ricardo, *J. Proteomics*, 2014, **104**, 128–139.
- [222] H.-K. Kwon, R. Yokoyama und K. Nishitani, *Plant Cell Physiol.*, 2005, **46**, 843–857.
- [223] Y.-C. Lai, C.-J. Tai, M. El-Shazly, Y.-C. Chuang, S.-T. Chiang, Y.-H. Tsai, D. Csüpor, J. Hohmann, Y.-C. Wu und F.-R. Chang, *Nat. Prod. Commun.*, 2019, **14**, 1934578X1988154.
- [224] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Caffeic-acid#section=Decomposition>, 26.05.2020.
- [225] *Sample Preparation in LC-MS Bioanalysis*, Ed. W. Li, W. Jian und Y. Fu, Wiley, 2019, Kapitel: Key Pre-analytical Considerations in LC-MS Bioanalysis, S. 257.

- [226] T. Buchholz und M. Melzig, *Planta Medica*, 2015, **81**, 771–783.
- [227] S. N. C. Sridhar, G. George, A. Verma und A. T. Paul, *Natural Bio-active Compounds*, Springer Singapore, 2019, S. 149–191.

Tabellenverzeichnis

1.1	Übersicht zur Terminologie ausgewählter Vesikelspezies.	6
1.2	Proteine, die wiederholt in pflanzlichen Vesikelspezies identifiziert wurden. . . .	7
1.3	EV-vermittelte Interaktionen.	18
2.1	Auflistung der verwendeten Geräte.	21
2.2	Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien.	22
2.3	Auflistung der verwendeten Referenzen.	23
2.4	Auflistung der verwendeten Chemikalien und Enzyme.	24
2.5	Herkunft des verwendeten Pflanzenmaterials.	25
3.1	Zusammensetzungen der verwendeten Puffer.	31
3.2	Zusammensetzung und Laufstrecke des HPTLC-Gradienten für <i>Aconitum</i> -Alkaloide. 44	
3.3	Zusammensetzung des HPLC-Gradienten für <i>Aconitum</i> -Alkaloide.	44
3.4	Zusammensetzung und Laufstrecke des HPTLC-Gradienten für Phospholipide. .	46
4.1	Vergleich der APF-Ausbeuten mit und ohne Cellulase und Macerozym.	49
4.2	Übersicht der mittels DLS ermittelten Partikelgrößen.	63
4.3	Repräsentative Auswahl ermittelter Proteinkonzentrationen isolierter Nanovesikel und der Überstände der Hochgeschwindigkeitszentrifugation.	67
4.4	Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse der Banden aus Abb. 4.24. . .	77
4.5	Parameter der HPTLC von Nanovesikeln und Überständen der Hochgeschwindig- keitszentrifugation aus <i>Curcumae zanthorrhizae rhizoma</i>	81
4.6	Parameter der HPTLC von extrazellulären Vesikeln und Überständen der Hochge- schwindigkeitszentrifugation aus <i>Nicotiana tabacum</i>	83
4.7	Korrelation der Absorptionsspektren der HPTLC von Nanovesikeln und Überstän- den der Hochgeschwindigkeitszentrifugation aus <i>Uvae-ursi folium</i>	87
A.1	HPTLC-Parameter von Nanovesikeln und Überständen der Hochgeschwindigkeits- zentrifugation aus den Drogen <i>Uvae-ursi folium</i> , <i>Betulae folium</i> und aus <i>Crate- rostigma plantagineum</i> Callus.	125

Abbildungsverzeichnis

1.1	Anzahl der PubMed Publikationen unter dem Suchbegriff „ <i>extracellular vesicle</i> “.	1
1.2	Zeitstrahl der Forschung an extrazellulären Vesikeln aus allen Domänen.	2
1.3	Schema der Biogenese und Sekretion extrazellulärer Vesikel tierischer Zellen. . .	3
1.4	Übersicht charakteristischer Proteine, Lipide und Nukleinsäuren von Exosomen und Mikrovesikeln.	4
1.5	Biogenese und Sekretion von Exosomen.	5
1.6	EV vermittelte, bidirektionale Regulierung von Krebs.	11
1.7	Intestinale Resorption pflanzlicher Mikrosphären und Nanovesikel.	13
1.8	RNA-Interferenz durch microRNA und kleine interferierende RNA.	17
1.9	Wettrüsten durch extrazelluläre Vesikel zwischen Wirt und Pathogen.	19
3.1	Abdunkeln der Blattfarbe durch Vakuuminfiltration.	28
3.2	Calluskultur.	29

3.3	Aseptische Anzucht von <i>Nicotiana tabacum</i>	30
3.4	Vergleich von Festwinkel und Ausschwingrotor.	32
3.5	Fließschema der differentiellen Zentrifugation.	33
3.6	Beispiel für die Nanopartikel Verfolgungsanalyse.	37
3.7	Hypothese der 3,3'-Dihexyloxacarboyaniniodid-basierten Vesikelquantifizierung.	39
3.8	Vesikelrückgewinnung aus Agarosegelen.	43
3.9	Struktur der Phospholipide.	45
3.10	Schematische Darstellung des HPTLC-Gradienten zur Auftrennung von Phospho- lipiden.	46
3.11	Reaktionen der Assays zur Bestimmung der Lipaseaktivität.	47
4.1	Schematische Darstellung der Infiltration des apoplastischen Raumes.	50
4.2	Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Nanovesikeln aus Drogen.	52
4.3	Elektronenmikroskopische Aufnahmen von EVs und Nanovesikeln aus Calluskul- turen.	53
4.4	Fraktionen 7 – 13 der Größenausschlusschromatographie von <i>Citrus limon</i> Press- saft.	55
4.5	SDS-PAGE von Proben der polymerbasierten Vesikelpräzipitation, sowie der Tan- gentialflussfiltration.	56
4.6	TEM-Aufnahmen der Konzentrate aus der Tangentialflussfiltration.	57
4.7	Kryo-TEM Aufnahmen von <i>Nicotiana tabacum</i> EVs aus apoplastischem Fluid.	58
4.8	REM-Aufnahme einer nicht salzfreien Probe.	58
4.9	TEM-Aufnahmen eines Exosomen-Standards.	59
4.10	(Vorläufige) DLS-Ergebnisse von <i>Craterostigma plantagineum</i> EVs.	60
4.11	TEM-Aufnahmen von <i>Craterostigma plantagineum</i> EVs.	61
4.12	DLS-Ergebnisse von <i>Craterostigma plantagineum</i> EVs nach Ultraschallbehand- lung.	61
4.13	TEM-Aufnahmen von Nanovesikeln aus <i>Vincae minoris herba</i> und <i>Visci herba</i>	62
4.14	Kryo-TEM Aufnahmen von <i>Nicotiana tabacum</i> EVs.	62
4.15	Einfluss verschiedener Trehalosekonzentrationen auf die Aggregation von Nano- vesikeln aus <i>Betulae folium</i>	65
4.16	Struktur des Membranfarbstoffes 3,3'-Dihexyloxacarboyaniniodid.	66
4.17	Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der 3,3'-Dihexyloxacarboyaniniodid-Konzentration.	68
4.18	SDS-PAGE von APF aus Efeublättern.	69
4.19	SDS-PAGE von EVs und Überständen der Hochgeschwindigkeitszentrifugation aus APF von Tomatenblättern.	70
4.20	SDS-PAGE von Nanovesikeln und Überständen der Hochgeschwindigkeitszenti- fugation aus <i>Curcumae longae rhizoma</i> und <i>Curcumae zanthorrhizae rhizoma</i>	71
4.21	SDS-PAGE von Nanovesikeln aus verschiedenen Drogen.	72
4.22	1) TEM-Aufnahme von <i>Curcumae zanthorrhizae rhizoma</i> Nanovesikeln. 2) Sche- matische Darstellung der Proteolyse eines Membranproteins.	73

4.23	Zweidimensionale Gelelektrophorese von <i>Nicotiana tabacum</i> Callus EVs.	73
4.24	Ausgewählte Protein-Banden für den In-Gel-Verdau aus der SDS-PAGE von Nanovesikeln und EVs aus <i>Nicotiana tabacum</i>	75
4.25	TEM-Aufnahmen von Nanovesikeln aus getrocknetem Tabakkraut.	75
4.26	Agarose-Gelelektrophorese von Exosomen und Nanovesikeln.	78
4.27	Agarosegelelektrophorese mit angeschlossener SDS-PAGE.	79
4.28	Darstellung der Membranpassage von Sekundärmetaboliten in Abhängigkeit des pH-Wertes am Beispiel Curcumin.	80
4.29	Absorptionsspektrum eines Gemisches der Curcuminoide Curcumin, Demethoxycurcumin und Bisdemethoxycurcumin.	82
4.30	TLC-Scan von Nanovesikeln und Überständen der Hochgeschwindigkeitszentrifugation aus <i>Curcumae zanthorrhizae rhizoma</i>	82
4.31	TLC-Scan von EVs und Überständen der Hochgeschwindigkeitszentrifugation aus apoplastischem Fluid von <i>Nicotiana tabacum</i>	84
4.32	HPTLC von einem <i>Aconitum napellus</i> Kaltmazerat und Aconitin.	84
4.33	Absorptionsspektren und Strukturformeln von Aconitin und Aconitinderivaten.	86
4.34	TLC-Scan von Nanovesikeln und Überständen der Hochgeschwindigkeitszentrifugation aus <i>Aconiti tuber</i>	87
4.35	TLC-Scan von Nanovesikeln und Überständen der Hochgeschwindigkeitszentrifugation aus <i>Uvae-ursi folium</i>	88
4.36	HPTLC von Nanovesikeln und Überständen der Hochgeschwindigkeitszentrifugation <i>Betulae folium</i> und <i>Craterostigma plantagineum</i> Callus.	89
4.37	Vergleich der Chromatogramme von sauer bzw. basisch isolierten Nanovesikeln und Überständen der Hochgeschwindigkeitszentrifugation aus <i>Betulae folium</i>	90
4.38	Strukturformeln von Naringin und Shogaol.	91
4.39	HPTLC-Chromatogramme der Phospholipide.	91
4.40	Phospholipid-HPTLC von Nanovesikeln aus <i>Aconiti tuber</i> und <i>Curcumae longae rhizoma</i>	92
4.41	Phospholipid-HPTLC von extrazellulären Vesikeln und Nanovesikeln diverser Pflanzenspezies.	93
4.42	Übersicht der Lipaseinhibition durch extrazelluläre Vesikel, Nanovesikel und Überstände der Hochgeschwindigkeitszentrifugation.	94
A.1	SDS-PAGE der Tangentialflussfiltration von APF aus <i>Nicotiana tabacum</i>	120
A.2	Massenspektren der identifizierten Aconitinderivate 1/2.	121
A.3	Massenspektren der identifizierten Aconitinderivate 2/2.	122
A.4	Detaillierte Chromatogramme aus Abb. 4.34.	123
A.5	HPLC-Chromatogramme von Aconitin, Nanovesikeln und Überständen der Hochgeschwindigkeitszentrifugation aus <i>Aconiti tuber</i>	124

A Anhang

A.1 Methoden

A.1.1 Färbelösung mit kolloidalem Coomassie (SDS-PAGE)

0.1 % (m/V) Coomassie Brilliant Blau G-250

2 % (V/V) Phosphorsäure

10 % (m/V) Ammoniumsulfat

20 % (V/V) Methanol

in deionisiertem Wasser

A.1.2 Protokoll Silberfärbung (SDS-PAGE)

Verwendete Lösungen (in deionisiertem Wasser):

Fixierlösung: 50 % (V/V) Methanol, 5 % (V/V) Essigsäure

Waschlösung I: 50 % (V/V) Methanol

Waschlösung II: deionisiertes Wasser

Sensitizer: 0.02 % (m/V) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$

Silberreagenz: 0.1 % (m/V) Silbernitrat in kaltem (4°C) deionisiertem Wasser

Entwickler (0.04 % (m/V) Formaldehyd, 2 % (w/v) Na_2CO_3)

Stopplösung: 5 % (V/V) Essigsäure

Durchführung:

Fixierlösung, 20 min

Waschlösung I, 10 min

Waschlösung II, mind. 2 h oder über Nacht

Sensitizer, 1 min

Waschlösung II, zweimal je 1 min

Silberreagenz, 20 min bei 4°C

Waschlösung II, 1 min

Entwickler, dreimal ca. 5 min, Farbe des Entwicklers beobachten und wechseln, sobald der Entwickler nach gelb umschlägt

Stopplösung, nach 5 min wechseln, anschließend darin gelagert

A.1.3 Puffer der Isoelektrischen Fokussierung

A.1.3.1 Rehydratisierungspuffer

8 M Harnstoff

2 % (m/V) 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS)

2 % (m/V) Dodecyl- β -D-maltosid (DDM)

13 mM Dithiothreitol (DTT)

0.5 mM PMSF

0.5 % Servalyt pH 3 – 10 (für Servalyt Gel-Streifen pH 3 – 10)

A.1.3.2 Äquilibrierungspuffer

Stammlösung:

6 M Harnstoff

2 % (m/V) SDS

50 mM Tris-HCl pH 6.8

30 % Glycerol

0.01 % Bromphenolblau

Äquilibrierlösung I (frisch hergestellt):

10 ml Stammlösung + 100 mg DTT

Äquilibrierlösung II (frisch hergestellt):

wie Äquilibrierlösung I + 481 mg Iodacetamid

A.1.4 Protokoll In-Gel-Verdau

Puffer: 100 mM NH_4HCO_3 (frisch hergestellt aus 1 M Stammlösung¹⁵)

25 mM NH_4HCO_3 (aus 100 mM Puffer hergestellt und bei 4°C gelagert)

1. Entsprechende Gele wurden dokumentiert und über Nacht in Wasser gelagert.
2. Banden oder Spots wurden ausgeschnitten und zu etwa 1x1 mm kleinen Gelstücken zerkleinert und in einem 500 μl Eppendorfgefäß in 20 μl Acetonitril + 100 mM NH_4HCO_3 (1:1) bei Raumtemperatur unter Schütteln 15 min inkubiert
3. Der Überstand wurde abgenommen und durch 20 μl Acetonitril (100 %) ersetzt, bis die Gelstücke milchig weiß waren. Falls erforderlich wurde der Schritt mit frischem Acetonitril wiederholt, bis alle Gelstücke milchig weiß waren.
4. Der Überstand wurde abgenommen und die Gelstücke in der Vakuumzentrifuge für 10 min bei Raumtemperatur getrocknet.

¹⁵ Der pH-Wert der 100 mM NH_4HCO_3 - Lösung wurde gemessen und die Stammlösung frisch hergestellt, falls der pH-Wert < 7.9 oder > 8.5 war.

5. Zur reductiven Öffnung der Disulfidbrücken wurden die Gelstücke in 20 μl 100 mM DTT in 100 mM NH_4HCO_3 für 30 min bei 56°C unter Schütteln inkubiert.
6. Die Proben wurden kurz zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Volumen wurde hierbei mit der Pipette bestimmt und notiert.
7. Um den Überschuss an Reduktionsmittel zu entfernen wurde Schritt 3 wiederholt.
8. Um eine Rückbildung der Disulfidbrücken zu verhindern, wurden die Cysteine mit Iodacetamid carbamidomethyliert. Dafür wurde der Überstand abgenommen und die Gelstücke mit 20 μl 55 mM Iodacetamid in 100 mM NH_4HCO_3 bei Raumtemperatur im Dunklen und ohne Schütteln inkubiert.
9. Die Proben wurden kurz zentrifugiert und der Überstand abgenommen und mit 20 μl 100 mM NH_4HCO_3 gespült. Anschließend wurden die Proben erneut zentrifugiert und der Überstand abgenommen.
10. Die Gelstücke wurden zweimal mit 100 % Acetonitril für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, um überschüssiges Iodacetamid zu entfernen. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und die Gelstücke in der Vakuumzentrifuge für 10 min getrocknet.
11. Ein Aliquot der Trypsin-Stammlösung¹⁶ wurde aufgetaut und im Verhältnis 1:80 mit 25 mM NH_4HCO_3 gemischt (finale Trypsin-Konzentration 12.5 $\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}$) und auf Eis gelagert.
12. Die Trypsinlösung wurde entsprechend des unter 6. bestimmten Volumens (+ 5 μl) zu den Proben gegeben und die Proben sofort auf Eis gestellt. Nach 30 min Inkubationszeit auf Eis wurden die Proben über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert.
13. Am nächsten Morgen wurden die Proben kurz zentrifugiert und bei Raumtemperatur 30 min geschüttelt, dann erneut zentrifugiert und der **Verdauüberstand I** abgenommen und direkt vermessen oder bei -20°C gelagert. Der hohe Salzgehalt im Verdauüberstand I kann die Kristallisation stören, daher wurde wie folgt nachextrahiert:
14. Die Gelstücke wurden mit 10 μl 40 % Acetonitril + 0.1 % Trifluoressigsäure in demineralisiertem Wasser versetzt und bei Raumtemperatur mindestens 24 h geschüttelt.
15. Die Proben wurden kurz zentrifugiert, der **Verdauüberstand II** abgenommen und vermessen bzw. bei -20°C gelagert.

¹⁶ Trypsin für Massenspektrometrie 1 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ in 1 mM Salzsäure – zu 5 μl aliquotiert und bei -20°C gelagert

A.2 Ergebnisse und Diskussion

A.2.1 Tangentialflussfiltration pflanzlicher Nanovesikel

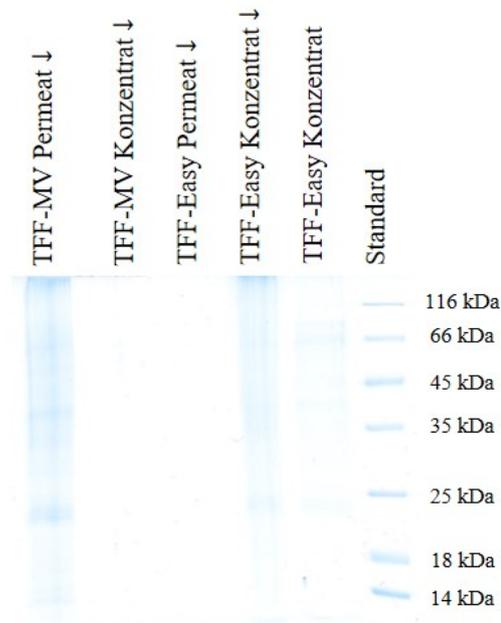


Abbildung A.1: SDS-PAGE der Tangentialflussfiltration von APF aus *Nicotiana tabacum*. Färbung: kolloidales Coomassie. *TFF-MV* Tangentialflussfilter für EVs > 150 nm; *TFF-Easy* Tangentialflussfilter für EVs < 150 nm; ↓ Proteine vor Denaturierung mit Trichloressigsäure gefällt.

A.2.2 Chromatographische Untersuchungen

A.2.2.1 Aconitin(derivate) in *Aconiti tuber* und deren Nanovesikeln

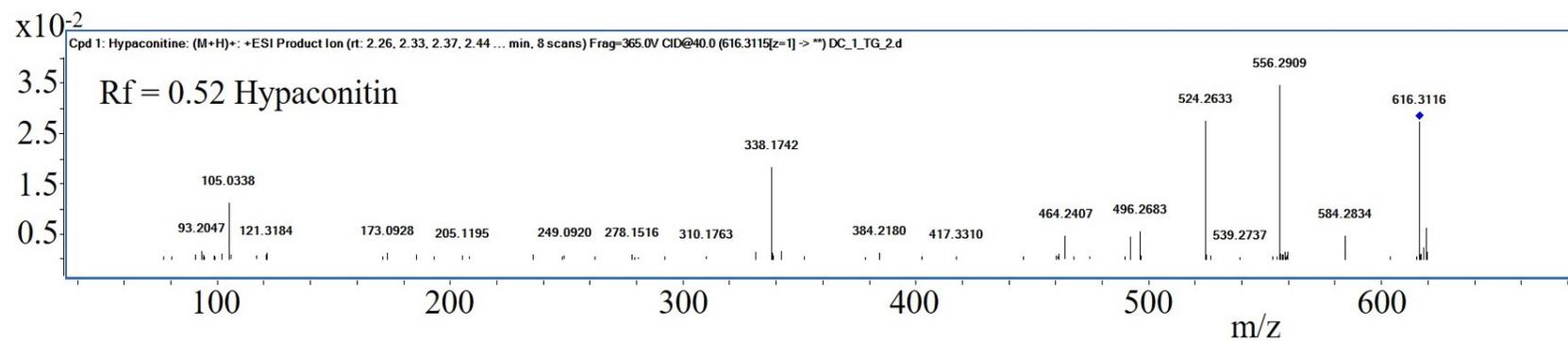
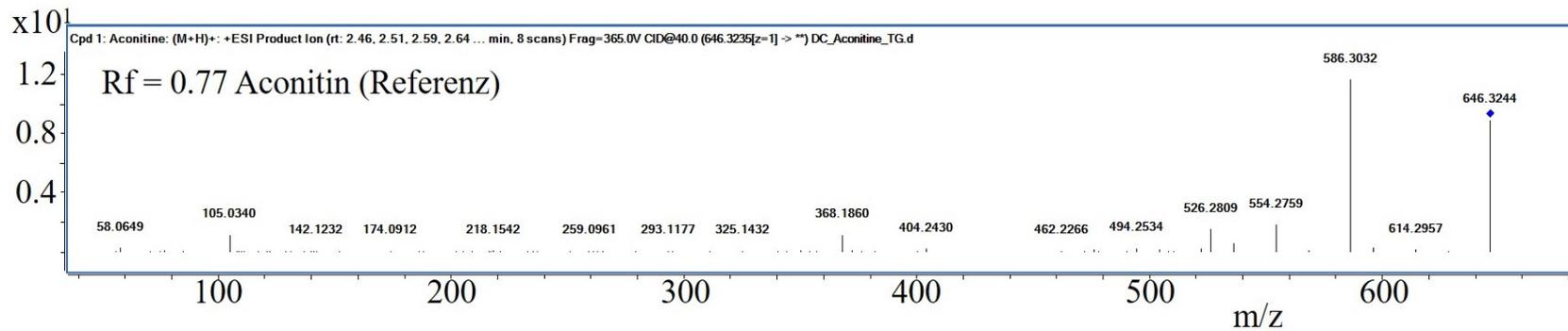


Abbildung A.2: Massenspektren der identifizierten Aconitinderivate (s. Abschnitt 4.3.6.1) 1/2.

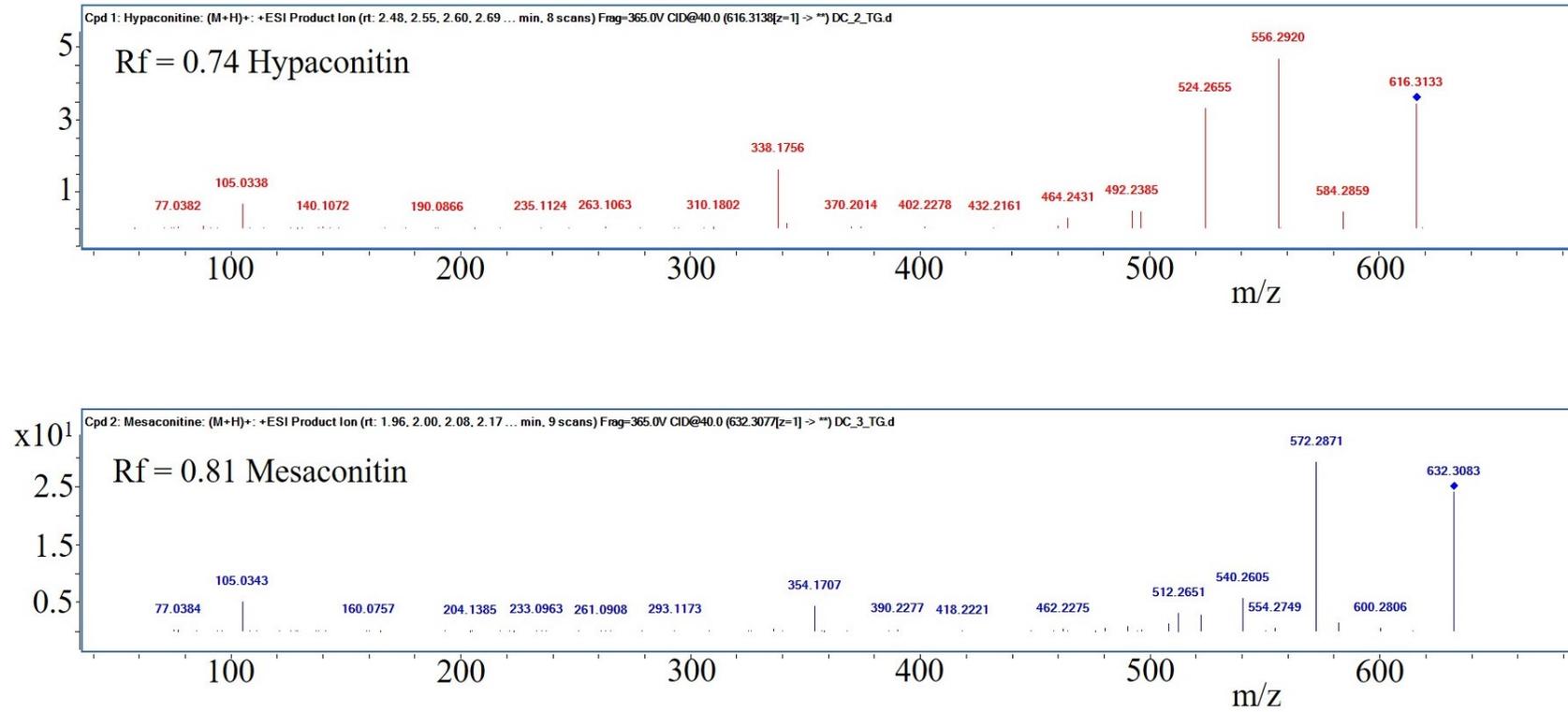


Abbildung A.3: Massenspektren der identifizierten Aconitinderivate (s. Abschnitt 4.3.6.1) 2/2.

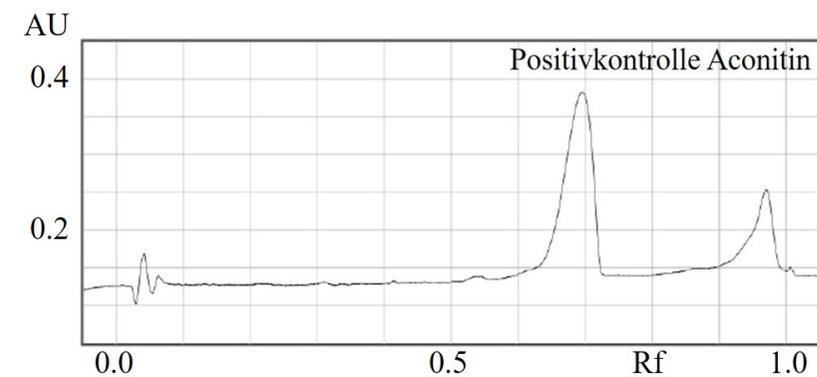
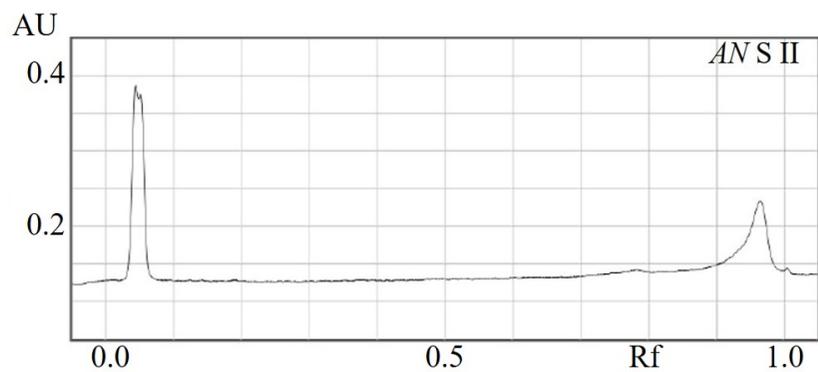
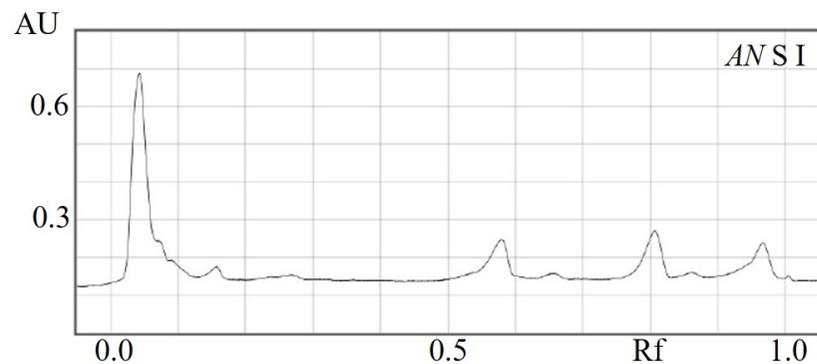
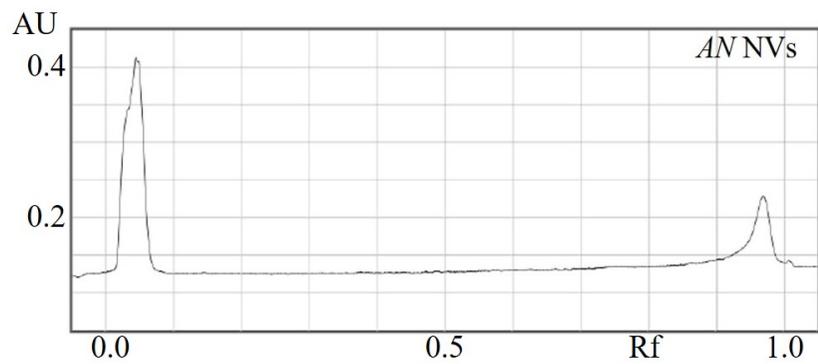


Abbildung A.4: Detaillierte Chromatogramme aus Abb. 4.34. AU Absorptionseinheit; Rf Retentionsfaktor

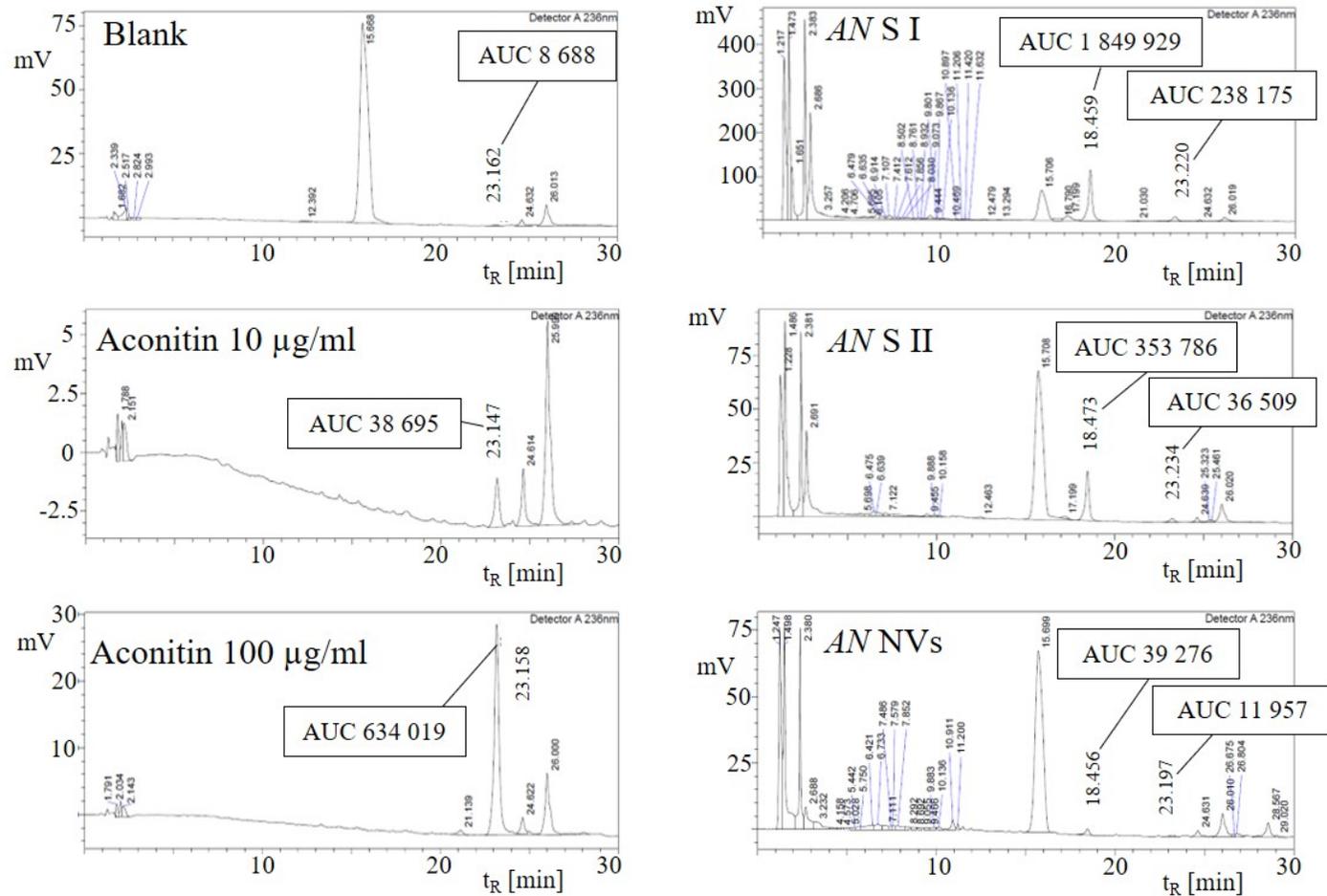


Abbildung A.5: HPLC-Chromatogramme von Aconitin, sowie Nanovesikeln (NVs) und Überständen der Hochgeschwindigkeitszentrifugation vor (S I) und nach (S II) Waschschritt aus *Aconiti tuber* (AN). Aconitin eluierte nach etwa 23.15 min, allerdings auch eine Verunreinigung in der Lösungsmittelkontrolle (Blank). Aufgrund der Signalstärke und der Peakflächen (AUC) eluierte Mesaconitin wahrscheinlich nach etwa 18.46 min und Hypaconitin nach 23.22 min. In dem Extrakt der Nanovesikel waren demnach vermutlich Spuren von Mesaconitin enthalten ($t_R = 18.456$ min). Das Signal bei 23.197 min unterscheidet sich kaum von der Verunreinigung in der Blank-Probe und wurde wahrscheinlich nicht durch Hypaconitin hervorgerufen. Eine Absicherung der Zuordnung der Retentionszeiten war nicht möglich, da die UV-Detektion der HPLC nicht empfindlich genug war, um die mittels HPTLC aufgetrennten und anschließend rückextrahierten Aconitinderivate zu detektieren. *Injektionsvolumen: 20 μl ; UV Detektion bei 236 nm*

A.2.2.2 HPTLC-Parameter (saure Sekundärmetaboliten)

Tabelle A.1: Parameter der HPTLC von Nanovesikeln (NVs) und Überständen der Hochgeschwindigkeitszentrifugation vor (S I) und nach (S II) Waschschrift aus den Drogen *Uvae-ursi folium* und *Betulae folium*, sowie aus *Craterostigma plantagineum* Callus.

	Phenole	Auftrags- volumen	Phenylpropane	Auftrags- volumen
Proben*	<i>Uvae-ursi folium</i> NVs	5 µl	<i>Betulae folium</i> NVs	5 µl
	<i>Uvae-ursi folium</i> S I		<i>Betulae folium</i> S I	
	<i>Uvae-ursi folium</i> S II		<i>Betulae folium</i> S II	
			<i>C. plantagineum</i> NVs	
			<i>C. plantagineum</i> S I	
			<i>C. plantagineum</i> S II	
Referenzen		5 µl	DiOC ₆ 1 mM	1 µl
	Arbutin 1 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$		Acteosid 1 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$	5 µl
	Gallussäure 1 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$		Hyperosid 1 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$	
			Ferulasäure 1 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$	
			Echinacosid 1 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$	
Entwicklung	Horizontalkammer		automatische Entwicklungskammer ADC 2	
Fließmittel	6 VT Ameisensäure 6 VT Wasser 88 VT Ethylacetat		10 VT Ameisensäure 10 VT Wasser 25 VT 2-Butanon 40 VT Ethylacetat 15 VT n-Hexan	
Laufstrecke	60 mm		50 mm	
Wellenlänge				
TLC- Scanner	280 nm		280 nm**	

*je 200 µl lyophilisiert, mit 5 µl HCOOH angesäuert, ad 50 µl Ethylacetat

**Aufgrund unterschiedlicher Absorptionsmaxima der Strukturen war die Detektion durch Eigenfluoreszenz bei 366 nm übersichtlicher.

VT Volumenteil

Publikationsverzeichnis

Veröffentlichungen in Fachzeitschriften

Woith, E.; Fuhrmann, G.; Melzig, MF. Extracellular Vesicles—Connecting Kingdoms. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 5695.

Woith, E.; Melzig, MF. Extracellular Vesicles from Fresh and Dried Plants—Simultaneous Purification and Visualization Using Gel Electrophoresis. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 357.

Sama S.; **Woith E.**; Walther W; Jerz G; Chen W; Hart S; Melzig MF; Weng A. Targeted suicide gene transfections reveal promising results in nu/nu mice with aggressive neuroblastoma. *J Control Release* 2018, 275, 208-216.

Woith, E.; Stintzing, F.; Melzig, MF. SOD activity and extremophilicity: a screening of various plant species. *Pharmazie.* 2017, 72, 490-496.

Sama S.; Jerz G.; Schmieder P.; **Woith E.**; Melzig MF.; Weng A. Sapofectosid - Ensuring non-toxic and effective DNA and RNA delivery. *Int. J. Pharm.* 2017, 534, 195-205

Poster

Woith E.; Jendretzki A.; von zur Gathen A.; Janik-Polanowicz A.; Melzig MF. Plant Extracellular Vesicle Lipids and Secondary Metabolites. 67th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA) in cooperation with the French Society of Pharmacognosy AFERP, Innsbruck 2019, *Planta Medica* 85

Woith E.; Melzig MF. Easy and quick detection and purification of extracellular vesicles. 66th Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA), Shanghai 2018

Woith E.; Stintzing F; Melzig MF. Investigations on SOD in extremophile and non-extremophile plants. 65th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA), Basel 2017, *Planta Medica* S01

Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. Matthias F. Melzig danken, der mir diese Arbeit nicht nur ermöglicht, sondern mich auch dazu ermutigt und dabei unterstützt hat. Gleich anschließen möchte ich meinen Dank an meine Familie- danke Mutti, dafür dass Du mich immer unterstützt, aufbaust und für so vieles mehr, was hier gar keinen Platz finden würde. Danke Opa, dafür dass Du mir schon so früh die Natur gezeigt und mein Interesse geweckt hast. Danke Arezou, dafür dass Du in mein Leben getreten bist und es sehr versüßt hast und danke für den einen oder anderen Tritt in den Hintern und vor allem für Deine Geduld mit mir ;) Danke Stefan, Tanja und Franzi für diverse Englischkorrekturen, naja so viele waren es ja nun auch wieder nicht... Meiner ganzen Familie möchte ich für die schönen und erholsamen gemeinsamen Momente und die eine oder andere finanzielle Zuwendung danken!

Der gesamten Arbeitsgruppe Melzig und ihren ehemaligen Mitgliedern möchte ich für die freundliche Aufnahme, Hilfsbereitschaft -beruflich wie privat- und das entgegengebrachte Vertrauen danken. Mein besonderer Dank geht an Flo, den ich irgendwie gar nicht mehr loszuwerden scheine, Stefan und Jakob für viele konstruktive Vorschläge, viele Blödeleien und nicht nur politisch unkorrekte Scherze...

Danken möchte ich auch Conny und Andreas für die Hilfe bei technischen Fragen aller Art. Danke Flo, Stefan, Tina, Sebastian, Jakob, Simko und Herrn Melzig für die nette Gesellschaft auf den Kongressreisen. Noch einmal möchte ich mich bei Herrn Melzig bedanken, für die vielen Denkanstöße, Korrekturen, Ergänzungen usw. die sich in der Zeit angesammelt haben. Danke auch für die vielen spannenden Gespräche, die entweder intellektuell oder kosmopolitisch immer anregend waren und Danke für die Unterstützung bei Organisatorischem und für die Erstellung des Gutachtens. Für das Gutachten von Herrn Prof. Dr. Burkhard Kleuser bin ich ebenfalls dankbar.

Den fleißigen Masteranden Janine Schanz und Xinting Zhang danke ich vor allem für ihre praktische Unterstützung und die Anregungen, die durch ge- aber auch misslungene Versuche zustande gekommen sind. Den (ehemals) Studierenden Frishta Shams, Heike Oechsner, Julia Müller, Julia Matthäi, Annika Gränert und Josepha Gliese möchte ich für ihre Zuarbeit und die Vorbereitung von Proben usw. danken. Simon Toppe danke ich für die Hilfe bei dem Versuch einen DiOC₆-basierten Assay zur Vesikelquantifizierung zu erstellen, Larissa Dittrich für die Hilfe bei der Untersuchung der Lipaseinhibition, sowie Annika Jendretzki und Annina von zur Gathen für die ersten Feldversuche mit den Sekundärmetaboliten aus Nanovesikeln und den ansprechenden Entwurf des Posters dazu. Nils Wadehn und Seleman Dehati, danke für die neue Aufgabe im Bio III Praktikum und für Euer Engagement. Euch allen wünsche ich viel Erfolg und allzeit gutes Gelingen.

Herrn PD Dr. Christoph Böttcher möchte ich für die tollen Kryo-TEM Aufnahmen danken und Anke Schindler v.a. für ihre Geduld bei den vielen vielen erfolglosen Messungen im ersten Jahr und natürlich auch für die superscharfen TEM-Aufnahmen! Der AG-Klinger danke ich dafür, dass ich immer spontan und unkompliziert am DLS Messungen machen konnte und dabei auch noch nett unterhalten wurde. Weiterhin bedanken möchte ich mich bei den Kollaborationspartnern Prof. Dr. Adam Matkowski und Dr. Agata Janik-Polanowicz der Medizinischen Universität Breslau für den spontanen und sehr netten Aufenthalt und natürlich für die Kultivierung des Tabak-Callus; bei Dr. Gea Guerriero vom Luxembourg Institute of Science and Technology für die nette Korre-

spondenz, den unkomplizierten Austausch von Proben und die Anzucht des *Craterostigma*-Callus. Den Kollegen vom Institut de Médecine Régénératrice et Biothérapies danke ich für die Expertise und Durchführung der Versuche in Zellkultur. Prof. Dr. Roger W. Innes, einem Pionier im Bereich der Erforschung von pflanzlichen EVs, sei auch dankend erwähnt – nicht nur für die exzellenten Publikationen, sondern auch für das detaillierte Protokoll für die Vorbereitung der TEM-Proben.

Den Experten der Massenspektrometrie möchte ich ebenfalls danken. Herrn Dr. Jan Joseph danke ich für die schnelle, unkomplizierte und vor allem auf Anhieb erfolgreiche Identifizierung der Aconitinderivate. Außerdem danke ich Herrn Dr. Christoph 'Chris' Weise, bei dem der Name Programm ist, für seine Geduld, die guten Erklärungen, das Hinterhersein und den einen oder anderen gemeinsam vertilgten Hopfen-Fluidextrakt.

Allen Kollegen im Institut, die mir auf die eine oder andere Weise geholfen, oder sich um alles Mögliche gekümmert haben, danke ich für die Unterstützung.

Nachdem nun hoffentlich alle wichtigen Helferlein erwähnt sind, möchte ich noch weitere Worte des Dankes an Andreas und Alexander richten. Euch beiden danke ich herzlich für die angenehme Zeit im Praktikum! Alexander, noch einmal danke für die Betreuung im Zuge der Weiterbildung und die vielen Anregungen.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen verwendet habe.

Berlin, den 16. August 2020

Eric Woith