

Inaugural – Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich – Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht – Karls – Universität
Heidelberg

vorgelegt von
M.Sc. Christine Margarete Katharina Tucher
aus: Nürnberg
Tag der mündlichen Prüfung: 10. August 2020

Charakterisierung extrazellulärer Vesikel und Analyse ihrer Bedeutung als Regulatoren der Immunantwort

Gutachter: Prof. Dr. Alexander Dalpke
Prof. Dr. Volker Lohmann

Charakterisierung extrazellulärer Vesikel und Analyse ihrer Bedeutung als Regulatoren der Immunantwort

Molecular characterization of extracellular vesicles and analysis
of their influence as regulators in immune responses

Rheumatologie der
Medizinischen Klinik V
des Universitätsklinikums Heidelberg
Prof. Dr. Hanns-Martin Lorenz

Betreuer:
Prof. Dr. Alexander Dalpke

Inhaltsverzeichnis

1 Summary	7
2 Zusammenfassung	8
3 Einleitung	10
3.1 Programmierter Zelltod	10
3.2 Systemischer Lupus Erythematoses	12
3.3 Extrazelluläre Vesikel	13
3.3.1 Mikrovesikel	14
3.3.2 Exosomen	14
3.4 Extrazelluläre Vesikel als Transporter von Informationen in der interzellulären Kommunikation	14
3.5 Fragestellungen	16
4 Material und Methoden	17
4.1 Material	17
4.1.1 Materialien	17
4.1.2 Geräte	18
4.1.3 Chemikalien	19
4.1.4 Puffer und Lösungen	20
4.1.5 Charakteristik von Patienten	22
4.1.6 Größenstandard für Gelelektrophorese	23
4.1.7 Verwendete Zelltypen, Zellkulturmedien und Zellkulturzusätze	24
4.1.8 Zytokine, unkonjugierte und konjugierte Antikörper	24
4.1.9 Programme/ Software	27
4.1.10 Statistik	27
4.2 Methoden	28
4.2.1 Isolation von PBMZ	28
4.2.2 Generierung von aktivierten T-Zellen	29
4.2.3 Isolation von extrazellulären Vesikeln	29
4.2.4 <i>Nanoparticle tracking analysis</i>	30
4.2.5 Lyse von T-Zellen/ EV und Proteinbestimmung von Lysaten für SDS-PAGE	30
4.2.6 SDS-PAGE und Western Blot	31
4.2.7 <i>Two dimensional difference gel electrophoresis</i> (DIGE)	32
4.2.8 Massenspektrometrie	33
4.2.9 Transmissionselektronenmikroskopie	34
4.2.10 Proteasom/ Rho-Kinase-Inhibitor Assays	35
4.2.11 Generierung von DZs	35

4.2.12 Stimulation von DZ mit EV	36
4.2.13 Extrazelluläre Durchflusszytometrie-Färbung	36
4.2.14 <i>Cytometric Bead Array</i>	36
5 Ergebnisse	38
5.1 Charakterisierung extrazellulärer Vesikel von gesunden Normal Spendern	38
5.1.1 Morphologische Charakterisierung extrazellulärer Vesikel primärer humaner T-Zellen	38
5.1.2 Proteinprofil von GEV und KEV aktivierter und apoptotischer humaner T-Zellen	44
5.1.3 Das Proteasom reguliert zum Teil die Freisetzung von GEV	56
5.2 Einfluss extrazellulärer Vesikel auf antigenpräsentierende Zellen	59
5.3 Charakterisierung extrazellulärer Vesikel von Patienten (SLE, VAS, RA) .	67
6 Diskussion	79
7 Ausblick	84
8 Veröffentlichungen	86
8.1 Wissenschaftliche Originalveröffentlichungen	86
8.2 Posterpräsentationen	86
9 Literatur	87
10 Abkürzungsverzeichnis	102
11 Abbildungsverzeichnis	106
12 Tabellenverzeichnis	107
13 Danksagung	108

1 Summary

Extracellular vesicles (EVs) are released from nearly all mammalian cells. Therefore, different EV populations have been described in the literature. Microvesicles represent large EVs (LEVs) released from the cellular surface, while exosomes are small EVs (SEVs) released from an intracellular compartment. The pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE) is characterized by a dysregulation of apoptosis. Hallmarks are an increased apoptosis combined with a diminished clearance. Thus, an accumulation of apoptotic cell remnants and autoantigens occurs, yet, it is still unclear how autoimmunity arises. A hallmark of apoptosis is the release of EVs, but also cell activation leads to EV release. These contrary release factors are promoting the hypothesis that different stimuli are responsible for the release of diverse EV subpopulations.

This work investigated the systemic characterization of EVs from T-cells considering the different release stimuli (activation vs. apoptosis induction). Moreover, it was analysed which influence EV exert on dendritic cells (DCs) and including their role in the pathogenesis of SLE.

The analysis confirmed that isolated EVs from human T-cells could be separated into two EV populations (SEVs ≤ 200 nm; LEVs 200 until 1000 nm). Apoptosis induction caused a massive release of LEVs, while activation leads to considerably lower amounts of released SEVs and LEVs. Protein expression patterns of LEVs and SEVs were different depending on the release stimulus. Stimulation of naive DCs with LEVs and SEVs, isolated from activated or apoptotic T-cells lead to a maturation of DCs (upregulation: CD83, CD80, CD86, CD274), but to a downregulation of MHC- class II (strongest through stimulation with LEVs). The secreted cytokine pattern displayed no clearly inflammatory or anti inflammatory profile. EVs, isolated from cultivated T-cells of SLE patients, showed differences in the amount of released vesicles as well as in the protein profile compared with those from normal healthy donors and further controls. Additionally, the disease level (SLEDAI ≥ 6) played a role as well.

Taken together it was observed, (1) that two EV subpopulations could be detected (LEVs, SEVs), which are differing in sizes and protein expression patterns, (2) that differential protein expressions in EV are related to the release stimulus, (3) that released EVs influence DC-maturation and cytokine secretion (strongly inhibited expression of MHC- class II), (4) that comparing samples from SLE patients vs. healthy individuals, a far lower release of LEVs and SEVs occur in SLE patients. Moreover, protein analyses from SLE patients compared to healthy individuals show differences in the protein cargo of distinct EV subpopulations.

2 Zusammenfassung

Extrazelluläre Vesikel (EV) werden von nahezu allen Säugerzellen freigesetzt. Dabei sind verschiedene EV-Populationen in der Literatur bereits beschrieben worden. Mikrovesikel stehen für große Vesikel (GEV), die von der Plasmamembran freigesetzt werden, wohingegen Exosomen kleine Vesikel (KEV) sind, die von einem intrazellulären Kompartiment freigesetzt werden. In der Pathogenese des Systemischen Lupus Erythematoses (SLE) liegt eine dysregulierte Apoptose vor, die sich in einer erhöhten Apoptoserate kombiniert mit einer verringerten *Clearance* darstellt. Dabei akkumulieren apoptotische Zellreste und Autoantigene, wobei noch ungeklärt ist, weswegen die Autoimmunität ausbricht. Ein Kennzeichen der Apoptose ist die Freisetzung von Vesikeln, wobei Zell-Aktivierung ebenso zur Freisetzung von Vesikeln führt. Diese gegensätzlichen Freisetzungstimuli lassen vermuten, dass verschiedene Stimuli die Freisetzung diverser EV-Populationen verursachen.

Diese Arbeit widmete sich der Charakterisierung von EV, die von T-Zellen freigesetzt wurden, unter Einbeziehung des Freisetzungstimulus (Zell-Aktivierung vs. Apoptose-Induktion). Außerdem wurde untersucht welchen Einfluss EV auf dendritische Zellen (DZ) ausüben sowie der Frage, ob und welche Rolle EV in der Pathogenese des SLE einnehmen.

Die Analyse zeigt, dass EV, isoliert von humanen T-Lymphozyten, zwei voneinander trennbare EV-Populationen ($KEV \leq 200$ nm; GEV 200 bis 1000 nm) aufweisen. Apoptose-Induktion führte zu einer massiven Freisetzung von GEV, die Zell-Aktivierung hingegen zu deutlich geringeren Mengen an GEV und KEV. Auch die Proteinexpressionsmuster von GEV und KEV unterschieden sich je nach Freisetzungstimulus. Die Stimulation von naiven DZ mit GEV und KEV, isoliert von aktivierten bzw. apoptotischen T-Zellen, führte zu einer Ausreifung der DZ (Hochregulierung: CD83, CD80, CD86, CD274), jedoch zu einer Herabregulation von MHC- Klasse II (am deutlichsten durch Stimulation mit GEV). Das sezernierte Zytokinmuster spiegelte kein eindeutiges Inflammations-/Suppressionsprofil wieder. EV, isoliert aus kultivierten T-Zellen von SLE-Patienten, zeigten deutliche Unterschiede verglichen mit denen von Normalspendern und weiteren Kontrollen, in der Freisetzungsmenge als auch im Proteinprofil. Dabei spielte auch die Krankheitsaktivität ($SLEDAI \geq 6$) eine Rolle.

Zusammengefasst konnte in der hier vorliegenden Arbeit gezeigt werden, (1) dass sich zwei EV-Populationen (GEV, KEV) in Größe und Proteinexpressionsmuster unterscheiden, (2) dass die differentielle Proteinexpressionen in EV abhängig vom Freisetzungstimulus sind, (3) dass freigesetzte EV die DZ-Reifung und das von den DZ sezernierte Zytokinprofil beeinflussen können (deutliche Inhibition der MHC- Klasse II-Expression), (4) dass beim Vergleich der Proben von SLE-Patienten vs. gesunder Individuen eine

deutlich reduzierte Freisetzung von GEV und KEV bei SLE-Patienten auftritt. Außerdem zeigen Proteinanalysen von SLE-Patienten verglichen mit denen gesunder Individuen Unterschiede in der Proteinbeladung der verschiedenen EV-Subpopulationen.

3 Einleitung

3.1 Programmierter Zelltod

Der programmierte Zelltod, die Apoptose, ist in mehrzelligen Organismen ein überlebenswichtiger Mechanismus, da tagtäglich Millionen von Zellen beseitigt werden müssen, um eine Homöostase in diesen Organismen aufrecht zu erhalten [27, 36, 69, 75, 97]. Durch Apoptose können beispielsweise Zellen des Immunsystems, welche im Rahmen einer Immunantwort proliferiert sind, sicher, schnell und insbesondere antiinflammatorisch beseitigt werden. Dabei kann die Apoptose über einen i) intrinsischen, ii) extrinsischen Weg oder iii) zellvermittelt eingeleitet werden [27].

Beim i) intrinsischen Signalweg nimmt die Zelle Stressfaktoren in ihrer extrazellulären Umgebung wahr, die den "Selbstentschluss" der Zelle, die Apoptose einzuleiten, bewirken: Äußerliche Stressfaktoren wie Strahlung, Hypoxie oder Toxine führen zu Veränderungen bzw. Schädigungen in der Zelle [1, 27]. Nach Schädigung der Mitochondrien, meist einhergehend mit dem Verlust des mitochondrialen Potentials, bilden sich Apoptosomen und führen schließlich zur Caspase9-Aktivierung [27].

Beim ii) extrinsischen Signalweg interagieren Liganden mit Membranrezeptoren wie beispielsweise Tumornekrosefaktor und -rezeptor oder Fas-Ligand und Fas-Rezeptor (*fatty acid synthetase* (Fas)), deren Signal über Adaptoren zur Caspase8-Aktivierung führen [1, 27]. Neben diesen beiden Signalwegen kann die Apoptose auch iii) durch zytotoxische T-Zellen oder natürliche Killerzellen vermittelt werden [27, 36]. Dabei werden von diesen Zellen die Enzyme Perforin und GranzymB freigesetzt, die in die Zielzelle eindringen und dort zur Caspase10-Aktivierung führen [1, 27].

Alle drei Initiatorcaspasen (9, 8, 10) münden in die Aktivierung von Caspase3, die letztendlich zu den augenscheinlichen, apoptotischen Veränderungen der Zellen führt [27, 36]. Die offensichtlichsten Veränderungen an Zellen, die apoptotisch sterben, sind das Schrumpfen der Zelle, Chromatin-Verdichtung und Zerkleinern des Zellkerns, Blasenbildung an der Zellmembran, die sich als Membranvesikel von dieser abschnüren, und die Bildung von apoptotischen Körpern [1, 27, 36, 69].

Damit sich apoptotisches Material nicht anhäuft, muss es schnell von anderen Zellen, sogenannten Fresszellen wie beispielsweise Makrophagen, beseitigt werden. Dieses Erkennen erfolgt über die außenseitige Exposition von bestimmten Oberflächenmarkern, wie beispielsweise Scavenger-Rezeptoren, modifizierten Zuckerstrukturen oder Phosphatidylserin, welches unter normalen Umständen bei vitalen Zellen nach Innen gerichtet ist [1, 27, 31, 69]. Durch die extrazelluläre Position der Oberflächenmarker bewirken sie in Fresszellen ein Phagozytosesignal und locken Makrophagen und andere Fress-

zellen an, die für eine lückenlose Beseitigung des apoptotischen Materials sorgen, ohne dabei eine Inflammation auszulösen [31, 36].

Diese lückenlose Beseitigung ist ganz entscheidend, da sonst apoptotisches Material autoreaktiven Immunzellen zur Erkennung vorliegt (Autoantigene) und bei Erkennung eine Inflammation in der Ausprägung einer Autoimmunreaktion auslöst (Bildung von Autoantikörpern) [6, 77]. Um eine Autoimmunreaktion zu vermeiden, nutzen Zellen Vesikel, um problematisches Material wie Autoantigene, aber auch Gefahrenmoleküle wie das *high mobility group box 1 protein* (HMGB1) sicher einzuschließen und so den Organismus vor einer Hyperinflammation und / oder Autoimmunität zu schützen [53]. Diese Vesikel werden von Zellen in den extrazellulären Raum entlassen, daher werden diese Vesikel auch extrazelluläre Vesikel (EV) genannt. Die EV können nach Freisetzung von anderen Zellen aufgenommen werden [107]. In den meisten Fällen scheint dies über Phagozytose zu geschehen, aber auch Makropinozytose oder Membranfusionierung scheinen alternierende Möglichkeiten zu bieten [18, 29, 62, 70, 96, 107]. Anhäufung nicht-beseitigten, apoptotischen Materials tritt bei einer fehlregulierten Apoptose auf, wo "zu viel Apoptose" und bzw. oder eine "beeinträchtigte Beseitigung" vorliegt [53, 56]. Eine fehlregulierte Apoptose findet sich in vielen Krankheitsbildern wie z.B. bei Krebs, bei viralen Infektionen, bei Autoimmunerkrankungen wie Hepatitis oder Systemischem Lupus erythematoses oder degenerativen Erkrankungen wie Alzheimer oder Parkinson, aber auch AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*) [75, 97]. Dabei kann sich die Fehlregulation in einer verstärkten oder beeinträchtigten Apoptose ausprägen [75].

3.2 Systemischer Lupus Erythematoses

Bei der Krankheit Systemischer Lupus Erythematoses (SLE) handelt es sich um eine heterogene Autoimmunerkrankung, die sich in vielen Facetten unterschiedlich stark ausgeprägt zeigen kann [71]. 1972 wurden die Merkmale zur Klassifizierung dieser Krankheit erstmals zusammengestellt:

Diese Klassifizierung wurde mehrmals überarbeitet unter Einbeziehung immer größerer Patientenkohorten, um die definierten Merkmale so sensitiv und spezifisch als möglich zu machen [35]. Die neueste Überarbeitung beschreibt 21 Merkmale zur Klassifizierung, die in Tabelle 1 zusammengestellt sind:

Tabelle 1: Merkmale zur Klassifizierung des Systemischen Lupus Erythematoses (SLE) aus [93] (entnommen und vereinfacht dargestellt)

Merkmal
(1) Antinukleare Antikörper von HEp-2 (Immunofluoreszenz \geq 1:80)
(2) niedriges C3 und/oder niedriges C4
(3) Fieber
(4) Rötungen
(5) Alopezie
(6) Verletzungen an den Mundschleimhäuten des harten Gaumen
(7) akuter kutaner Lupus
(8) chronischer kutaner Lupus
(9) Arthritis
(10) Zentrales-Nervensystem-Manifestationen (Anfälle, Psychosen, Veitstanz Myelitis, optische Neuritis, Schlaganfall, oder akuter konfusionaler Zustand)
(11) Serositis (pleurale oder perikardiale Ergüsse), Pleuritis, Perikarditis abdominale Serositis
(12) Leukopenie (weiße Blutkörperchen $<$ 4000/ μ l bei zwei oder mehrmaligen Auftreten)
(13) Thrombozytopenie $<$ 100000/ μ l
(14) autoimmune hämolytische Anämie
(15) Lupus Nephritis (Nierenbiopsie mit Anhäufung von Immunkomplexen)
(16) persistente Proteinurie ($>$ 0,5 Gramm/Tag)
(17) aktives Urinsediment (ohne Harnwegsinfektion)
(18) Antiphospholipidantikörper
(19) Anti-dsDNS-Antikörper, Anti-Smith-Antikörper
(20) Auftreten multipler Autoantikörper
(21) Komplement Verminderung: Geringes C3 oder geringes C4 bzw. geringes C3 und geringes C4

Voraussetzung für die Klassifikation als SLE ist der Nachweis von erhöhten antinukleären Antikörpern (ANA) [93].

Eine erhöhte Apoptoserate von Zellen und bzw. oder die unvollständige Beseitigung davon führen zur Akkumulation von apoptotischen Überresten, einer Quelle für Autoantigene im SLE [53, 56, 60, 64, 85]. Apoptotisches Material kann von professionellen Fresszellen nicht schnell genug oder ungenügend beseitigt werden, wodurch sich Autoantigene anhäufen. Diese Autoantigenansammlung wird noch weiter verstärkt durch das Bilden von neutrophilen Netzen, die bei der Netose entstehen, einer speziellen Form des Absterbens von Neutrophilen [56, 71]. Durch den Bruch der Selbsttoleranz wird autoreaktiven B-Zellen ein Überangebot von Autoantigenen dargeboten, die zu einer Überproduktion an Autoantikörpern führen [56]. Spezifische SLE-Autoantikörper sind dabei Antikörper gegen doppelsträngige DNS und gegen Sm-Antigen [91, 93].

Gebildete Immunkomplexe präzipitieren sich in lebenswichtigen Organen wie Nieren oder Lymphknoten und beeinträchtigen dadurch deren Funktion bis hin zur irreversiblen Schädigung [41, 71, 84]. Zusätzlich kommt es zu einer Aktivierung des Komplementsystems [31, 56, 71], und es wird auch massiv IFN- α sezerniert, was dieses zum Marker-Zytokin für diese Krankheit macht [64].

Seitdem von der Arbeitsgruppe Schiller und Kollegen veröffentlicht wurde, dass SLE-spezifische Autoantigene und das Protein HMGB1, ein Gefahren-Signal-Molekül, in EV akkumulieren und verpackt werden [81, 83], stellt sich die Frage, ob und welche Rolle EV in der Pathogenese des SLE spielen.

3.3 Extrazelluläre Vesikel

Extrazelluläre Vesikel (EV) können von einer Vielzahl von Säugerzellen freigesetzt werden. Diese Vesikel können einerseits anhand ihrer Größe andererseits über ihre molekulare Zusammensetzung unterschieden werden. Bis heute sind zwei EV Hauptpopulationen bekannt: Zum einen eine Population mit großen EV (GEV), die von der Plasmamembran freigesetzt werden, zum anderen eine Population mit kleinen EV (KEV), die über einen intrazellulären bzw. endosomalen Pfad, über multivesikuläre Körper, freigesetzt werden. Diese EV Populationen wurden benannt als Mikrovesikel (bezogen auf GEV) und Exosomen (bezogen auf KEV).

Des Weiteren wurde berichtet, dass EV neben Proteinen, auch DNS und verschiedene RNS beinhalten, wodurch es ihnen möglich ist spezifisch-kodierte Informationen von Zelle zu Zelle zu übertragen [12, 20, 37, 39, 81, 82, 83]. Daher werden EV immer mehr als Mediatoren der interzellularen Kommunikation gesehen [9, 33, 50, 76] und ihre Rolle in der Pathogenese bei Autoimmunerkrankungen oder Tumorwachstums wird diskutiert [14, 28, 52, 54, 61, 89, 90].

3.3.1 Mikrovesikel

Mikrovesikel sind große Vesikel von variierender Größe von 200 nm bis zu 1000 nm im Durchschnitt. Diese Vesikel tragen Rezeptoren und Oberflächenmoleküle der Ursprungszelle [3, 25, 54, 57, 59, 74]. Mikrovesikel werden durch Reorganisation des Aktin-Myosin Zytoskeletts freigesetzt in Folge des direkten Abschnürens von der äußeren Zellmembran [22, 24, 104].

3.3.2 Exosomen

Exosomen hingegen sind sehr viel kleinere Vesikel (≤ 200 nm) und werden über einen intrazellulären, endosomalen Pfad freigesetzt, sogenannte multivesikuläre Körper [26, 74]. Durch ihren endosomalen Ursprung tragen sie endosomal-assoziierte Proteine wie Rab GTPasen, Alix oder *tumor susceptibility* 101 (TSG101) [44, 95, 101]. Exosomen und ihre molekulare Zusammensetzung wurden intensiv erforscht und dabei etablierten sich TSG101, das 70-kDa Hitzeschockprotein (HSP70) und Tetraspanine, wie CD81 und CD63, als geeignete Nachweisproteine für Exosomen [2, 42, 87, 105, 108, 110].

3.4 Extrazelluläre Vesikel als Transporter von Informationen in der interzellulären Kommunikation

EV beinhalten nach Freisetzung eine Vielzahl an nukleären wie auch zytosolischen Proteinen der Ursprungszelle. Diese EV können leicht von anderen Zellen aufgenommen werden, wie unterschiedliche Arbeitsgruppen zeigen konnten. Dabei können Informationen extrazellulär wie auch intrazellulär weitergegeben werden.

Bei ihrer extrazellulären Weitergabe können Membranrezeptoren der Vesikel an die Oberflächenrezeptoren anderer Zellen direkt binden [58]. Andererseits können aber auch freie Proteasen die Oberflächenmoleküle von der Vesikelmembran abtrennen, so dass sie als freie Liganden verfügbar sind und erst dann an die Oberflächenrezeptoren anderer Zellen binden [58]. In beiden Fällen kann so die Aktivierung von Signalkaskaden in anderen Zellen vermittelt werden [58].

Bei der intrazellulären Vermittlung werden zunächst die Vesikel an sich von anderen Zellen aufgenommen. Dies kann über Phagozytose oder durch Fusionieren der Vesikelmembran mit der Plasmamembran der aufnehmenden Zelle geschehen [58]. So können intrazelluläre Proteine der EV direkt übertragen werden.

Wie bereits angedeutet, kann sich die Übertragung solcher Information auch physiologisch auf die aufnehmende Zelle auswirken. Höchst interessant dabei ist, dass sich

unter der Gesamtproteinbeladung der Vesikel auch funktionell aktive Proteine befinden. So konnten beispielsweise funktionell aktive miRNAs oder voll funktionsfähige 20S-Proteasome über Mikrovesikel auf andere Zellen übertragen werden [8, 20].

Daher ist es denkbar, dass EV in der Pathogenese von Krankheiten eine große Rolle spielen [37]. Je nachdem aus welcher Mutterzelle EV isoliert wurden, können sie verstärkt krankheitsaktivierende Proteine besitzen, die auch Tumorwachstum und Krankheitsaktivität begünstigen [14, 61, 90]. Es konnte sogar gezeigt werden, dass EV die Funktion einer Zelle direkt beeinflussen können: Unter Nutzung eines Cre-LoxP-Systems konnte gezeigt werden, wie EV, die von malignen Tumorzellen freigesetzt wurden, sowohl von weniger malignen Tumorzellen als auch von gesunden Nicht-Tumorzellen aufgenommen wurden [110]. In beiden Fällen wurde das Tumorwachstum und die Bildung von Metastasen vorangetrieben [110].

Aufgrund ihrer funktionellen Beschaffenheit (geringe Größe, membranumschlossene Vesikel, Beinhalt von Proteinen) denkt man auch über therapeutische und diagnostische Ansätze nach [72]. Sharma und Kollegen berichten über den möglichen Einsatz von EV, die von mesenchymalen Stammzellen (MSZ) isoliert wurden, um den SLE zu therapieren [86]. Dabei sollen die antiinflammatorischen Eigenschaften der MSZ genutzt werden, um die anhaltende Inflammation des SLE zu behandeln [86]. Bei der vergleichenden Analyse von EV, die aus dem Urin von gesunden Individuen als auch von Patienten mit Prostatakrebs isoliert wurden, wurden verschiedene Verteilungen von miRNA-Verhältnissen in unterschiedlichen EV-Fractionen gezeigt, die eine sehr hohe Spezifität und Sensitivität aufwiesen, weshalb man in diesem Kontext über einen diagnostischen Ansatz bei Urin-EV nachdenkt [11]. Unter dem Aspekt als zirkulierende Biomarker aber auch als Therapeutikum genutzt werden zu können, bieten EV neue diagnostische und therapeutische Einsatzmöglichkeiten bei Patienten mit Krebserkrankungen [25]. Ob ähnliche Ansätze auch bei Autoimmunerkrankungen greifen könnten, ist unklar.

3.5 Fragestellungen

Aus den Vordaten der Arbeitsgruppe ging hervor, dass SLE-typische Autoantigene in freigesetzten extrazellulären Vesikeln (EV) akkumulieren [81]. Des Weiteren konnte bewiesen werden, dass freigesetzte Vesikel die Immunzellen der angeborenen Immunität stimulieren: Dendritische Zellen, die aus Monozyten generiert wurden, zeigten eine Hochregulation der Oberflächenmoleküle CD83, CD80 und CD86, wobei MHC-II herabreguliert wurde. Daneben konnte eine negative Korrelation zwischen MHC-II-Expression und der Krankheitsaktivität bei SLE-Patienten nachgewiesen werden [28]. Plasmazytoide dendritische Zellen wurden über endosomale *toll-like* Rezeptoren aktiviert [82]. Eine weitere Arbeit legte offen, dass MikroRNAs über freigesetzte Vesikel auf Immunzellen der angeborenen Immunität, hier Monozyten, übertragen wurden [20].

In diesen Studien und auch sonst im großen Forschungsfeld für EV wurden keinerlei Daten erhoben, die große EV (GEV - im Allgemeinen Mikrovesikel, die sich von der Plasmamembran abschnüren) und kleine EV (KEV - zumeist Exosomen, die über intrazelluläres Kompartiment freigesetzt werden) systematisch im Vergleich charakterisiert haben. Hinweise aus Vordaten legten nahe, dass die Zusammensetzung von GEV als auch KEV, je nach Freisetzungstimulus, sich erheblich unterscheiden. Daraus ergab sich die erste Fragestellung, ob und wie sich GEV und KEV je nach Freisetzungstimulus voneinander unterscheiden. Neben dieser Fragestellung sollte die Dissertation klären, wie welche Vesikel in der interzellulären Kommunikation wirken und wie sie dabei das Immunsystem beeinflussen. Zuletzt wollte ich untersuchen, ob die Unterschiede eine pathogenetische Relevanz im SLE haben könnten.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Materialien

Tabelle 2: Materialienliste

Geräte	Bezugsquelle
175 cm ² Nunklon delta behandelte Flaschen	Thermo Fisher Scientific
Zellkulturschalen (Falcon #353003)	BD Bioscience
Zellsieb 30 μm	Sysmex
1,2 μm Filter	Neolab
0,2 μm Filter	Miltenyi
6-Loch-Platten	Greiner Bio-One
12-Loch-Platten	Greiner Bio-One
24-Loch-Platten	Greiner Bio-One
96-Loch-Platten	Greiner Bio-One
Amersham Hyperfilm TM ECL	GE Healthcare
Neubauer-Zählkammer (0,0025mm ²)	Marienfeld
Falcons (15 ml;50 ml)	Greiner Bio-One
PVDF-Membran	Merck
Whatman-Papier (GB003)	Neolab
LS-Säulen (Midi)	Miltenyi Biotec
Dry Strip Gel pH 3-10	VWR
Ultrazentrifugenröhrchen (#355654)	Beckman Coulter

4.1.2 Geräte

Tabelle 3: Geräteliste

Geräte	Bezugsquelle
Laborfuge 400R	Heraeus
Zentrifuge 5414R	Eppendorf
Inkubator BB 6220 CU	Heraeus
Sterilbank Hera safe KS 9	Heraeus
NanoSight NS300	Malvern Instruments
Semi-Phor	Hoefer Scientific Instruments
Mini-Protean Tetra System	Bio-Rad
Agarosegelkammer	Febikon Labortechnik
Power Pac Basis	Bio-Rad
Microcomputer Elektrophoresis-Power Supply- Consort E455	LMS Consult
AGFA Curix60	AGFA Healthcare
FACS XL-MCL	Beckman Coulter
Mikroskop MC80	Carl Zeiss Microscopy
Schüttler Swip KL-2	Edmund Bühler
Rollmischer RM5	Ingenieurbüro CAT, M.Zipperer
Vortexer SU1900	Sustainable Lab Instruments
Thermostat 5320	Eppendorf
Pipetgirl	Integra Biosciences
UV-Tisch TFX-35MC	Vilber Lourmat
Magnetrührer RCH	IKA Werke
pH-Meter pH211	Hanna Instruments
Waage 822-37	Kern & Sohn
LSR II Flow Cytometer	BD Biosciences
Colibri Spectrometer	Berthold Detection Systems
Multiscanspectrum	Thermo Electron Corporation
Optima-L-90k	Beckman Coulter
Ultrazentrifugenrotor (Typ 70Ti)	Beckman Coulter
DIGE DeCyder	GE Healthcare
Ettan SpotPicker	Ge Healthcare
Biophotometer	Eppendorf
Wasserbad Thermomix BU	B.Braun
Multipipette	Eppendorf
Pipetten	Gilson
BioDocAnalyze	Biometra
CCD-Kamera	Cell Biosciences

4.1.3 Chemikalien

Falls nicht anders angegeben, wurden Chemikalien von Invitrogen, Merck, Roche, Roth oder Sigma-Aldrich bezogen.

Tabelle 4: Chemikalienliste

Chemikalien	Chemikalien
Acrylamid-Bis-Solution	Natriumacetat
Agarose	N,N,N',N',-Tetra-Methyl-Ethylen-Diamin (TEMED)
Ammoniumpersulfat (APS)	Natriumazid (Na ₃ N)
Aqua ad injectabilis (B.Braun)	Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)
Bortezomib	Natriumchlorid (NaCl)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	0,9%-NaCl-Lösung
Bromphenolblau	Natriumdodecylsulfat (SDS)
Coomassieblau	Natriumfluorid (NaF)
Di-Kaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Natriumhydroxid (NaOH)
Dithiothreitol (DTT)	Natriumpyruvat
Essigsäure	Natriumvanadat (NaVO ₃)
Ethanol (EtOH)	Nicht-Essentielle-Aminosäuren (NEAA)
Fötales Kälberserum (FKS, Gibco)	Penizillin G/Streptomycin/L-Glutamin
FACS-Lösungen (Flow, Cleanse, Rinse)	Phenyl-Methyl-Sulfonylfluorid (PMSF)
GelRed Nucleic Acid Stain (x10000)	Ponceaurot
Glukose	Propidiumjodid (PJ)
Glycerol	Proteinkase K
Glycin	Rho-Kinaseinhibitor (Y27632)
Heparin (B.Braun)	Rinder-Serum-Albumin (RSA, ccpro)
Hepes-Puffer 1M	Ringer-Lösung
Kaliumchlorid (KCl)	RIPA-Puffer (c-c-pro)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Salzsäure (HCl)
Kaliumhydrogenphosphat (KHCO ₃)	Tri(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)
LEGENDplex™ (BioLegend)	Trypanblau
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Tween ²⁰
2-Mercaptoethanol (β -Me)	Wasserstoffperoxid 30%
Methanol (MeOH)	

4.1.4 Puffer und Lösungen

Alle Puffer bzw. Lösungen wurden mit voll-entsalztem Wasser oder mit PBS (Sigma-Aldrich) hergestellt.

Tabelle 5: Allgemeine Puffer und Lösungen

Puffer	Inhaltsstoffe
MACS-Puffer	1 ml FKS 10 ml Humanes Spenderserum 39 ml PBS
Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE, 50)	242 g Tris 18,6 g EDTA CH ₃ COOH (Eisessig) pH 8,0 ad 1 l H ₂ O
TE-Puffer	10 mM Tris pH 8,5
Trypanblau	0,1 g Trypanblau 100 ml PBS 0,2 μm sterilfiltriert

Tabelle 6: Puffer für Zellyse, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot

Puffer	Inhaltsstoffe
Proteaseinhibitormix (25x)	1 Tablette Complete Mini 400 μ l PBS
RIPA+	40 μ l 25x Proteaseinhibitormix 960 μ l RIPA-Puffer
Ladepuffer (5x)	2,5 ml Tris-HCl pH 6,8 1 g SDS (10%) 5 ml Glycerol (50%) 0,5 ml β -Mercaptoethanol 0,1 g Bromphenolblau 2 ml dH ₂ O
10% APS	1 g Ammoniumpersulfat 10 ml dH ₂ O 0,2 μ m sterilfiltriert
Laufpuffer (10x)	144 g Glycin 30,3 g Tris 10 g SDS ad 1 l H ₂ O
Towbin-Puffer (1x)	14,4 g Glycin 3,025 g Tris 200 ml MeOH
Coomassieblau	0,2 g Brilliant Blau in 90 % EtOH
Ponceau S	1,25 g Ponceau S 2,5 ml Essigsäure ad 250 ml H ₂ O
Blockierungspuffer	0,25 g RSA 50 ml PBS
Antikörperlösung	0,2 g RSA 10 Tropfen Tween ²⁰ 50 ml PBS
Waschpuffer	500 ml 10 x PBS 10 ml Tween ²⁰ ad 4,5 l dH ₂ O
ECL-Lösung 1	2 ml 1 M Tris-HCl pH 8,5 90 μ l Kumarinsäure 20 μ l Luminol ad 18 ml dH ₂ O
ECL-Lösung 2	2 ml 1 M Tris-HCl pH 8,5 20 μ l Wasserstoffperoxid 30 % ad 18 ml dH ₂ O

4.1.5 Charakteristik von Patienten

Tabelle 7: Charakteristika der SLE-Patienten

Geschlecht	Alter	Immunsuppressiva	SLEDAI	C3c[g/l]	dsDNS-Ak[IU/ml]
F	20	Prednison 5mg/d Quensyl 200mg/d Dekristol 1000mg/d Ciclosporin 100mg/d	6	0,480	31
F	20	Prednison 5mg/d Quensyl 200mg/d Dekristol 1000mg/d Ciclosporin 100mg/d	6	0,44	n.d.
F	36	n.d.	10	n.d.	184
F	35	Quensyl 200mg/d Dekristol 1000iE/d Azathioprin 125mg/d	n.d.	≥0,9	≤40
F	18	Quensyl 200mg/d	12	0,270	1266
M	37	Quensyl 400mg/d CyclosporinA 300mg/d	6	0,740	n.d.
F	22	Mycophenolat 2000mg/d Quensyl 200mg/d Prednison 10mg/d	4	0,770	62
F	49	Quensyl 200mg	0	0,990	20
F	58	Quensyl 300mg Dekristol 20000/w	0	1,130	16
F	52	Hydroxychloroquin 300mg/d Prednison 2,5mg/d	2	1,070	6
F	21	Ofatumumab 1g/d CellCept 1000mg/d Prednisolon 3,75mg/d	n.d.	0,880	n.d.
F	29	Dekristol 20000/2w CellCept 2000mg/d Quensyl 400mg/d	4	0,780	79

Tabelle 8: Charakteristika der Patienten mit Rheumatoider Arthritis

Geschlecht	Alter	Medikation	DAS28	RF [IU/ml]	Anti-CCP [IU/ml]	C3 [g/l]	dsDNS-Ak [IU/ml]	ANA	CRP [mg/l]
F	73	MTX 15mg/w Leflunomid 10mg/d	2,9	<25	<7	1,4	¡3	1:40	7,0
F	51	MTX 15mg/w Etanercept 50mg/w	3,3	<28	n.d.	0,93	55	1:320	5,9
M	67	MTX 25mg/w	2,6	58	1698	n.d.	n.d.	n.d.	18,1
F	22	MTX 15mg/w	1,3	42,3	71,8	n.d.	n.d.	1:160	<2

Tabelle 9: Charakteristika der Patienten mit Vaskulitis

Geschlecht	Alter	Medikation	PR3-Ak [U/ml]	CRP [mg/l]
F	38	Decortin 2,5mg/d Rituximab 2x 10/16 Azathioprin 125mg/d	<3,5	2,8
W	59	Leflunomid 10mg/d	n.d.	<2,0
M	45	Rituximab 2x 1g 10/17 Prednisolon 5mg/d	n.d.	11,8
M	75	Decortin 5mg/d	n.d.	17,0
F	70	MTX 15mg/w Prednison 7,5mg/d	n.d.	<2,0
F	54	RoActemra 162mg/w Azathioprin 100mg/d Prednison 5mg/d	n.d.	<2,0

4.1.6 Größenstandard für Gelelektrophorese

Tabelle 10: Molekularer Größen-Standard für Gelelektrophorese

Agarosegele 1 kb DNS-Standard [bp]	Proteingele Protein-Standard [kDa]
10000	
8000	
6000	250
5000	130
4000	95
3500	72
3000	55
2500	36
2000	28
1500	17
1000	11
750	
500	
250	

Der DNS-Standard (*1 kb DNS ladder gene ruler*) und der Protein-Standard (*pageruler plus prestained protein ladder*) wurden von Thermo Fisher Scientific bezogen.

4.1.7 Verwendete Zelltypen, Zellkulturmedien und Zellkulturzusätze

Die Medien und Zellkulturzusätze wurden, soweit nicht anders angegeben, von Life Science Technologies, Gibco-BRL und Sigma bezogen.

Tabelle 11: Zelltypen und Zellkulturmedien

Zelltyp	Kurze Definition	Zellkulturmedium
PBMZ	Mononukläre Zellen des peripheren Blutes	RPMI1640 ohne L-Glutamin 10 % Fötales Kälberserum (FKS) 1 % Penicillin/Streptomycin/L-Glutamin 1 % 1 M HEPES Puffer
T-Zellen	CD8 ⁺ und CD4 ⁺ Mononukläre Zellen des peripheren Blutes	RPMI1640 ohne L-Glutamin 10 % FKS 1 % Penicillin/Streptomycin/L-Glutamin 1 % 1 M HEPES Puffer 1 µg/ml Phytohämagglutinin ¹ 500 U/ml IL-2 (Roche) ²
Monozyten	CD14 ⁺ und CD16 ⁺ Mononukläre Zellen des peripheren Blutes	RPMI1640 ohne L-Glutamin 10 % FKS 1 % Penicillin/Streptomycin/L-Glutamin 1 % 1 M HEPES Puffer 1000 IU/ml GM-CSF
DZ	aus Monozyten generiert	RPMI1640 ohne L-Glutamin 10 % FKS 1 % Penicillin/Streptomycin/L-Glutamin 1 % 1 M HEPES Puffer 1000 U/ml GM-CSF 500 U/ml IL-4

1,2 zur Aktivierung

4.1.8 Zytokine, unkonjugierte und konjugierte Antikörper

Zytokine und Stimulantien wurden mit PBS (Sigma-Aldrich) auf angegebene Endkonzentrationen eingestellt.

Tabelle 12: Humane Zytokine zur Kultivierung von T-Zellen und DZ

Zytokin	Konzentration	Reinheit	Firma
Rekombinantes IL-2	500 IU/ml	> 95 %	Roche
Rekombinantes IL-4	100 IU/ml	≥ 98 %	Immunotools
Phytohämagglutinin	1 µg/ml	> 95 %	Sigma
GM-CSF	200 IU/ml	≥ 98 %	Sigma

Tabelle 13: Stimulantien

Stimulus	Konzentration	Reinheit	Firma
Lipopolysaccharid (LPS)	1 μ g/ml	n.d.	Sigma
Bortezomib	1 nM/ml	\geq 98 %	Santa Cruz
Rho-Kinaseinhibitor (Y27632)	10 μ M/ml	\geq 98 %	Merck

Alle verwendeten Antikörper für Durchflusszytometrie (s. Tabelle 13), Western Blot (s. Tabelle 14) und DIGE (s. Tabelle 15) sind nachfolgend aufgeführt:

Tabelle 14: Durchflusszytometrie-Antikörper

Spezifität	Konjugat	Host	Klon	Verdünnung	Firma
α -humanes CD3	PE	Maus	UCHT1	1:50	Beckman Coulter (#A07747)
α -humanes CD4	FITC	Maus	13B8.2	1:50	Beckman Coulter (#A07750)
α -humanes CD11b	FITC	Maus	Bear1	1:50	Beckman Coulter (#IM0530)
α -humanes CD11c	PE	Maus	BU15	1:50	Beckman Coulter (#IM1760)
α -humanes CD14	PE	Maus	RMO52	1:50	Beckman Coulter (#A07764)
α -humanes CD80	PE	Maus	MAB104	1:50	Beckman Coulter (#IM1976U)
α -humanes CD83	FITC	Maus	HB15a	1:50	Beckman Coulter (#IM2410U)
α -humanes CD86	PE	Maus	HA5.2B7	1:50	Beckman Coulter (#IM2729U)
α -humanes CD274	PE	Maus	MIH1	1:50	eBioscience (#15207667)
α -humanes HLA-DR	FITC	Maus	Immu-357	1:50	Beckman Coulter (#IM1638U)
α -humanes PS (AxV)	FITC	n.d.	n.d.	1:1000	Roche (#11828681001)

Tabelle 15: Western Blot-Antikörper

Spezifität (1.AK)	Konjugat	Host	Klon	Verdünnung	Firma
Aktin	-	Kaninchen	poly ³	1:4000	Sigma
ENO1	-	Kaninchen	N3C3	1:1000	Biozol
ERK1 (K-23)	-	Kaninchen	poly	1:2000	Santa Cruz
H2A	-	Kaninchen	poly	1:1000	Upstate Biotechnology
HMGB1	-	Kaninchen	poly.	1:2000	Becton Dickinson
HSP90	-	Kaninchen	poly	1:1000	Santa Cruz
LAT	-	Kaninchen	poly	1:3000	Upstate Biotechnology
PSMA1	-	Kaninchen	N1C3	1:1000	Biozol
STRAP	-	Kaninchen	N1C3	1:500	Biozol
ZAP70	-	Kaninchen	poly	1:1000	Epitomics
Ezrin (C-19)	-	Ziege	poly	1:500	Santa Cruz
Gelsolin (N-18)	-	Ziege	poly	1:500	Santa Cruz
PSMB10	-	Ziege	poly	1:1000	Bio-Techne
pERK (E-4)	-	Maus	IgG _{2a}	1:300	Santa Cruz
EHD3	-	Maus	RR-L	1:500	Santa Cruz
HSP70 (3A3)	-	Maus	IgG ₁	1:1000	Santa Cruz
Ub (P4D1)	-	Maus	IgG ₁	1:1000	Santa Cruz
LCK	-	Maus	28	1:1000	BD Pharmingen
TSG101	-	Maus	4A10	1:1000	Bio-Techne
PSMB9	-	Maus	792520	1:1000	Bio-Techne

Spezifität (2.AK)	Konjugat	Host	Klon	Verdünnung	Firma
Kaninchen	HRP	Ziege	IgG	1:20000	Dianova
Ziege	HRP	Affe	IgG	1:10000	Santa Cruz
Maus	HRP	Ziege	IgG	1:10000	Dianova

3 polyklonaler Antikörper

Tabelle 16: DIGE-Farbstoffe

Farbstoff	Verdünnung	Firma
CyDye DIGE Fluor Cy2	1:50	VWR
CyDye DIGE Fluor Cy3	1:50	VWR
CyDye DIGE Fluor Cy5	1:50	VWR

4.1.9 Programme/ Software

Tabelle 17: Verwendete Programme/ Software

Software	Verwendung
FlowJo V 10	Auswertung von Durchflusszytometriemessungen
LEGENDplex™ Data Analysis V 8.0	Auswertung von Multiplex Zytokin Array
Microsoft Exel 2016	Auswertung von Daten
Graph Pad Prism 5.0	Erstellen von Graphen
Corel Draw X6 (grüne Version) 2012	Erstellen von Abbildungen
Microsoft Power Point 2016	Erstellen von Abbildungen
DIGE DeCyder software V 7.0	Auswertung der DIGE-Analysen

4.1.10 Statistik

Für statistische Analysen wurde der gepaarte Studentische T-Test durchgeführt. Alle statistischen Analysen, ausgenommen DIGE-Analysen, wurden mit dem Statistik-Programm Graph Pad Prism V 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) berechnet. Bei den DIGE-Analysen wurden statistische Signifikanzen mittels DIGE De-Cyber Software V 7.0 ermittelt (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland). Der statistische Signifikanzlevel wurde bei einem p-Wert $\leq 0,05$ festgesetzt.

4.2 Methoden

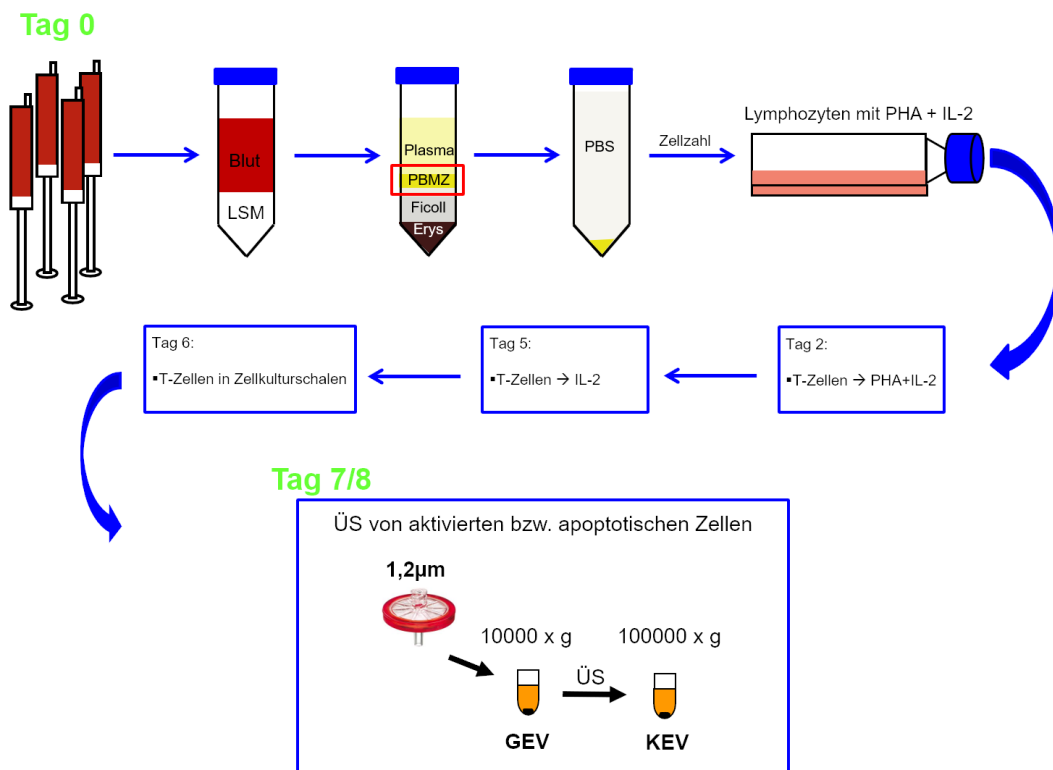


Abbildung 1: **Bildliche Darstellung der Arbeitsabläufe der Punkte 4.2.1 - 4.2.3.** LSM: Lymphozyten-Separationsmedium; PBMZ: Mononukleare Zellen des peripheren Blutes; Erys: Erythrozyten; PBS: *phosphate buffered saline*, Phosphat-gepufferte Salzlösung; PHA: Phytohemagglutinin; IL-2: Interleukin-2; ÜS: Überstand; GEV: Große extrazelluläre Vesikel; KEV: Kleine extrazelluläre Vesikel.

4.2.1 Isolation von PBMZ

Patienten (s. Punkt 4.1.5, Tabelle 6), die die beschriebenen Kriterien des Amerikanischen Kollegs für Rheumatologie für die SLE-Klassifizierung von 1982 erfüllten [91], sowie Patienten mit Vaskulitis (VAS), Patienten mit Rheumatoider Arthritis (RA) (s. Punkt 4.1.5, Tabelle 7+8) und gesunde Normalspender nahmen an dieser Studie teil. Die Studie wurde vom Ethik-Komitee der Universität Heidelberg genehmigt (S-374/2008, S-168/2013) und wurde nach den Richtlinien unserer Institution und den Richtlinien der Deklaration von Helsinki durchgeführt.

Patienten und Normalspender wurden vor der Blutentnahme über Ziel und Zweck der Studie und über die Verwendung ihres Blutes aufgeklärt. Nach deren Zustimmung und schriftlichem Einverständnis wurden 80 ml venöses Blut entnommen und mit 0,05% Heparin versetzt. Mononukleare Zellen des peripheren Blutes (PBMZ) wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation (Leukozyten Separationsmedium (LSM) 1.077, Merk)

aufgereinigt. Anschließend wurden die PBMZ zweimal in 50 ml PBS (Sigma) gewaschen und in 20 ml RPMI 1640 (Life Science Technologies) resuspendiert, welches mit 10 % (v/v) hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FKS, Gibco-BRL), 10 mM HEPES-Puffer, 4 mM L-Glutamin und Penicillin-Streptomycin versetzt wurde. Die Vitalität der Zellen wurde durch den Trypanblau-Ausschlusstests überprüft.

4.2.2 Generierung von aktivierten T-Zellen

Um aktivierte T-Lymphozyten zu generieren, wurde die Gesamtzellzahl der aufgereinigten PBMZ mittels Neubauer-Zählkammer (Marienfeld) ermittelt, in eine 175 cm² Nunklon delta behandelte Flasche (T175 Zellkulturflasche (ZKF), Thermo Fisher Scientific) in RPMI 1640 mit 1 ml/ 1 x 10⁶ Zellen ausgesät und mit 1 µg/ml Phytohämagglutinin (PHA, Sigma) und 500 U/ml IL-2 (Roche) stimuliert. Die Zellen in der T175 ZKF wurden im Brutschrank (Thermo Fisher Scientific) bei 37 °C, 5 % CO₂ für fünf Tage inkubiert. Dies führte zur Aktivierung und Proliferation von Lymphozyten. Aktivierte PHA/IL-2 Lymphozyten waren 95 % CD3 positiv und damit T-Zellen [4, 13, 46, 68, 73, 81]. Anschließend wurden die Zellen in RPMI 1640 gewaschen und weitere zwei Tage mit zusätzlichem 500 U/ml IL-2 bei 37 °C, 5 % CO₂ stimuliert, um eine größere Expansion der T-Zellen zu erreichen.

4.2.3 Isolation von extrazellulären Vesikeln

Zunächst wurde Zellkulturmedium, welches frei von extrazellulären Vesikeln (EV) oder anderen Verunreinigungen (wie z.B. Thrombozyten) ist, hergestellt, indem EV aus dem FKS entfernt wurden. Dazu wurde hitzeinaktiviertes FKS bei 100000 x g in einem 70Ti Rotor (Beckman Coulter, 16 h, 4 °C) zentrifugiert, bevor es mit anderen Zellkulturzusätzen verwendet wurde, um EV-freies Zellkulturmedium herzustellen. Um EV zu isolieren, wurden aktivierte T-Zellen zunächst mit PBS gewaschen und in Zellkulturschalen (Ø 100 mm, Falcon #353003) mit 1 x 10⁸ T-Zellen pro 30 ml EV-freies Zellkulturmedium ausgesät. Entweder wurden T-Zellen aktiviert in Anwesenheit von IL-2 oder es erfolgte die Induktion von Apoptose mittels UV-B Bestrahlung (30 s, 90 J/cm², UV-Tisch TFX-35MC). Im Anschluss wurden T-Zellen 20 h kultiviert. Nach der Kultivierungsphase wurde die T-Zell-Vitalität durch AnnexinV-Färbung (AxV, Roche) und Propidiumjodid-Färbung (PJ, Sigma) überprüft. Zur Überprüfung der T-Zell-Vitalität wurden 10⁵ aktivierte oder apoptotische T-Zellen in 200 ng AxV-FITC und 500 PJ in 500 µl Ringerlösung inkubiert (30 min, 4 °C) und mittels Durchflusszytometrie an einem EPICS XLTM Durchflusszytometer (Beckman Coulter) analysiert. Danach erfolgte die Isolation der EV mittels differentieller Ultrazentrifugation: Um ganze Zellen oder apoptotische Zellreste vor der EV-Isolation zu entfernen, wurde die Zellsuspension 5 min bei 300 x g zentrifugiert und der Überstand durch einen 1,2 µm hydrophilen Spritzenfilter in sterile Ultrazentri-

genröhrchen (Beckman Coulter) überführt. Anschließend erfolgte die differentielle Ultrazentrifugation. Dafür wurden die Ultrazentrifugenröhrchen in einem 70Ti Rotor zunächst bei 10000 x g (45 min, 10 °C) zentrifugiert, um große extrazelluläre Vesikel (GEV) zu isolieren. Der resultierende Überstand wurde dann bei 100000 x g (45 min, 10 °C) zentrifugiert, um kleine extrazelluläre Vesikel (KEV) zu pelletieren. Die Pellets wurden dann entweder in 50 μ l sterilem PBS für *nanoparticle tracking analysis* (NTA) aufgenommen oder in 10 μ l RIPA-Puffer (c-c-pro) lysiert für nachfolgende Proteinanalysen.

4.2.4 Nanoparticle tracking analysis

Um die isolierten EV-Populationen (GEV, KEV) zu untersuchen, wurde die Suspension der EV mit Hilfe eines Malvern Nanosight NS300 Instruments (NS300, Malvern) analysiert. Je nach Gerätekonfiguration können mit dem NS300 Vesikel oder Partikel in einer Größe von 10 bis 1000 nm analysiert und vermessen werden. Die Größenverteilung und die Vesikelkonzentration wird hierbei über die Lichtstreuung sowie die Brownsche Molekularbewegung ermittelt. Ein Laserstrahl (405 nm) wird durch die Messzelle geleitet. Vesikel/Partikel, die sich in dessen Strahlungsbahn befinden, streuen das Laserlicht. Die Lichtstreuung wird über ein Mikroskop detektiert, an dem eine Kamera angeschlossen ist. Die Kamera erzeugt eine Videodatei (30 Bilder pro Sekunde) der Vesikel/Partikel, die sich in Brownscher Bewegung befinden. Mittels der integrierten Software kann die Partikelgröße mit Hilfe der Stokes-Einstein-Gleichung berechnet werden. Es wurden folgende Kameraeinstellungen benutzt: Fokus 13/14, Blende 1,0 und als Schwellwert 6. Für die Messung einer Probe wurde ein EV-Pellet in 50 μ l sterilem PBS aufgenommen und eine 1 ml Verdünnungslösung mit PBS je nach isoliertem Vesikeltyp hergestellt. Folgende Verdünnungen wurden genutzt: Für aktivierte GEV 1:100, aktivierte KEV 1:200, apoptotische GEV 1:500 und apoptotische KEV 1:100. Für jede einzelne Probe wurde eine Schnellmessung von 60 s durchgeführt, um den richtigen Verdünnungsfaktor und Kameraeinstellungen zu gewährleisten. Im Folgenden wurden dann jeweils drei Videos a 60 s von verschiedenen Abschnitten der jeweiligen Probe aufgezeichnet und mittels Software (Nanosight NS300 NTA) analysiert.

4.2.5 Lyse von T-Zellen/ EV und Proteinbestimmung von Lysaten für SDS-PAGE

EV-Pellets und 5×10^6 T-Zellen wurden in 20 μ l RIPA-Puffer, welcher mit Proteaseinhibitoren (*complete Mini*, Böhlinger) versetzt wurde, resuspendiert und anschließend für 30 min auf Eis lysiert. Lysate wurden bei 16000 x g (10 min, 4 °C) zentrifugiert und der Probenüberstand in ein jeweils neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die Proteinkonzentration mittels Pierce^R BCA Protein Assay Kit (Life Technologies) nach Angaben des Herstellers ermittelt.

4.2.6 SDS-PAGE und Western Blot

Jeweils 15 μg Proteinprobe wurde mit 5 μl 5-fach SDS-Ladepuffer vermischt und 3 min bei 96 °C im Thermoblock (Eppendorf) aufgeköcht. Nach kurzem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die zu analysierenden Proteinproben abzentrifugiert (Tischzentrifuge Eppendorf) und über ein 12,5%-iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Dazu wurden nacheinander ein Trenngel und ein Sammelgel gegossen, deren Inhaltsstoffe in (s. Punkt 4.1.3, Tabelle 4) und die Zusammensetzung in Tabelle 18 eingesehen werden können. Danach wurden die Proteine in einer Vier-Gel-Kammer (Biorad) bei 80 V, 240 mA bzw. 120 V, 240 mA aufgetrennt. Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden in einem Semi-Dry-Blot-Verfahren [34] auf zuvor in 100%-igen Methanol aktivierten PVDF-Membranen (Merck) mit 42 V, 35 mA pro innenliegender Membran, 90 min im Semi-Phor (Hoefer Scientific Instruments) transferiert. Diese wurde anschließend für 1 h bei RT in Blockierungspuffer (s. Punkt 4.1.4, Tabelle 6) inkubiert, dreimalig 10 min mit PBS/0,02 %-Tween²⁰ gewaschen und mit einem Primärantikörper gegen ein nachzuweisendes Protein (s. Punkt 4.1.8, Tabelle 15) über Nacht bei 4 °C auf einer Wippe (Schüttler Swip KL-2, Edmund Bühler) inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Primärantikörper abgenommen und die Membran viermalig 15 min mit PBS/0,02 %-Tween²⁰ gewaschen. Daraufhin erfolgte eine einstündige Inkubation bei RT mit einem spezie-spezifischen, *horseradish-peroxidase* (HRP)-gekoppelten Sekundärantikörper entsprechend zum vorherigen Primärantikörper. Danach wurde der Blot viermalig 15 min mit PBS/0,02 %-Tween²⁰ gewaschen, 1 min in 2 ml *Enhanced Chemiluminescence* (ECL)-Lösung (Amersham Biosciences) geschwenkt und das Fluoreszenzsignal entweder durch Auflegung eines Röntgenfilms (Hyperfilm, GE Healthcare) oder durch Aufnahme mit einer CCD-Kamera (Cell Biosciences) aufgenommen.

Tabelle 18: Zusammensetzung eines 12,5% SDS-Gels

Trenngel	
Substanz	Menge [ml]
1,88 mM TRIS	1,8 ml
0,5% SDS	1,8 ml
H ₂ O	1,65 ml
Acrylamid-Bis	3,75 ml
TEMED	0,01 ml
APS	0,05 ml
Sammelgel	
Substanz	Menge [ml]
0,625 M TRIS	0,8 ml
0,5% SDS	0,8 ml
H ₂ O + Bromphenolblau	1,74 ml
Acrylamid-Bis	0,66 ml
TEMED	0,01 ml
APS	0,025 ml

4.2.7 Two dimensional difference gel electrophoresis (DIGE)

Isolierte EV, die von aktivierten oder apoptotischen T-Zellen freigesetzt wurden, wurden in insgesamt 100 μ l THC-Puffer lysiert, welcher mit jeweils 1 μ g/ml Aproptonin, Leupeptin, Pepstatin und 200 mM PMSF (Merk) versetzt worden war.

Die DIGE-Analysen wurden von Dominik Stammeler und Konrad Bode am Department für Infektionskrankheiten, Medizinische Mikrobiologie und Hygieneinstitut des Universitätsklinikums Heidelberg durchgeführt. Grundlegend wurde die Publikation von C. Rupp und Kollegen [78] verwendet. Lysate wurden zweimal bei 4 °C sonifiziert (Programm: 1 s Impuls und 5 s Pause, 3 min, Amplitude: 90 %, Ultraschallreiniger) und anschließend bei 20000 rpm (15 min, 4 °C (Tischzentrifuge Eppendorf)) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration mittels Bradford Assay quantifiziert [10]. Danach wurde jede Probe in drei gleiche Teile zu je 5 μ g Protein aufgeteilt. Jeder Teil wurde mit 200 pmol eines speziellen Fluoreszenzfarbstoffes für DIGE-Präparationen, eines amino-reaktiven Cyaninfarbstoffes (CYEDYE DIGE Farbstoff CY3/ CY5/ CY2, GE Healthcare), gefärbt. Ein interner Standard wurde dadurch generiert, dass 5 μ g jeder Probe zu einer Mischung zusammengegeben wurden und mit dem Farbstoff CY2 (GE Healthcare) gefärbt wurden. Die Färbung basiert auf einer kovalenten Bindung der quartären Ammoniumstruktur des Cyaninfarbstoffes mit den einzelnen Aminogruppen des vorliegenden Proteingemisches des jeweiligen Probenteiles [23, 78] und wurde nach Herstellerangaben für minimale CYE-

DYE-Färbungen durchgeführt (GE Healthcare). Zur Auftrennung der Proteine nach isoelektrischem Punkt (1. Dimension) wurden die Proben nach den Färbungen auf 24 cm lange IPG-pH-Streifen geladen, mit einem pH 3-11, und die Auftrennung wurde mittels dem IPGphor II Gerät bei 45 kVh und 20 °C durchgeführt. Anschließend wurden IPG-Streifen zweimal für je 15 min bei RT in Equilierungspuffer equilibriert: zunächst mit 0,5 % DTT und dann mit 4,5 % Iodoacetamide. Zur Auftrennung nach Molekulargewicht (2. Dimension) wurden die equilibrierten IPG-pH-Streifen unverzüglich auf vorbereitete 12 %-ige SDS-PAGE-Gele adaptiert. Die Gele liefen zunächst 30 min bei 100 V und dann ca. 5 h bei 350 V. Nach dem Gellauf wurden die bidimensionalen Gele mit dem Typhoon Bilder Scanner (IPGphor3, GE Healthcare) digitalisiert und mittels ImageQuant-Software für Einzel- bzw. Duo-Farbaufnahmen analysiert.

Für die Experimente wurden Proteinlysate von drei verschiedenen, gesunden Normal Spendern verwendet und jedes Experiment wurde in Triplikaten durchgeführt, woraus insgesamt 36 bidimensionale Gele resultierten. Um Unterschiede der ermittelten Proteinpunkte aus den bidimensionalen Gelen weiter zu untersuchen, wurden die ImageQuant-Daten mit Hilfe der DIGE-DeCyderSoftware V7.0 (GE Healthcare) ausgewertet.

4.2.8 Massenspektrometrie

Die Auswertung der Proteinpunkte mittels DIGE-DeCyderSoftware führte zu 24 Proteinpunkten, die durch Massenspektrometrie identifiziert werden sollten. Die Proteinpunkte wurden nach folgenden Kriterien ausgewählt: 1) Proteine, die sich in deren Expression in verschiedenen EV-Populationen signifikant ($p \leq 0,05$) unterschieden. 2) Proteine, die nach Zellaktivierung oder nach Induktion von Apoptose differentiell in verschiedenen EV-Populationen reguliert wurden. 3) Proteine, die mit mindestens 70 % in allen Analysen vorhanden waren. Ausgesuchte Proteinpunkte wurden mit einem *spot picker* (Ettan, GE Healthcare) aus den SDS-Gelen herausgestanzt und mittels Massenspektrometrie untersucht. Die Massenspektrometrieanalyse wurde an der *Core Facility for Mass Spectrometry* am Zentrum für Biologie in Heidelberg wie folgend durchgeführt. Ausgestanzte Proben wurden zunächst mittels DTT reduziert, mit Iodoacetamide alkyliert und schließlich mittels Trypsin (Thermo Scientific) verdaut. Der Verdauvorgang geschah nach einem speziellen Verdauungssystem für Massenspektrometrie wie im Protokoll von Catreinet und Kollegen [15] beschrieben. Die verdauten Peptide jeder Probe wurden anschließend mit 50 % Acetonitril/0,1 % TFA aus den Gelstückchen herausgelöst, durch Trocknung in einer SpeedVac Vakkumzentrifuge aufkonzentriert und jeweils in 30 μ l 0,1 % TFA aufgenommen. 20 μ l jeder Probe wurden mittels *nanoAcquity nano HPLC System* (Waters) analysiert, welches an einer LTQ-Orbitrap XL Massenspektrometer (Thermo Scientific) gekoppelt war. Dazu wurden die Proben auf eine C18-Auffangssäule geladen (*nano Acquity UPLC 2G-VM Trap*, Symmetrie C18, 5 μ m, 180 μ m

i.d. x 20 mm, Waters) mittels 0,1 % TFA-Ladepuffer mit einer Fließgeschwindigkeit von 15 $\mu\text{l/s}$. Peptide wurden eluiert und separiert auf einer C18-Analytiksäule (*nano Acquity UPLC* Säule, BEH130 C18, 1,7 μm , 75 μm i.d. x 250 mm, Waters) mit einer Fließgeschwindigkeit von 300 nl/min in einem 23-minütigen Gradienten aus Puffer A und Puffer B mit ansteigender Konzentration von 3 auf 40 % von Puffer B. Einer Orbitrap Umfrageskan (Skanweite: 400 – 1500 m/z, Resolution: 60000, AGC-Ziel: 5×10^5 , max. Füllzeit: 500 ms) folgten 15 informationsabhängige Produkt-Ionen-Skans in der LTQ Ionen-Falle (normale Skanweite, AGC-Ziel: 1×10^4 , max. Füllzeit: 100 ms). 2+, 3+ and 4+ geladenen Ionen wurden ausgewählt für datenabhängige CID-Fragmentierung (norm. koll. Energie: 35 %, act. q = 0,25, act. Zeit = 30 ms) mit erlaubtem dynamischen Ausschluss (Ausschlussdauer: 60 s, Messgenauigkeit: 20 ppm).

Das Tandem-Massenspektrometer wurde, ohne im Vorherein zu gruppieren oder zu glätten, mittels Mascot Daemon extrahiert und mittels Mascot analysiert (Matrix Science; version 2.4.1). Mascot suchte im ersten Schritt aus einer manuell kompilierten Datenbank das "Ziel-Protein" heraus und glied in einem zweiten Schritt zwei verknüpfte Aminosäuresequenzen des "Ziel-Proteins" ab. Dabei wurde Trypsin als Protease angegeben mit einer 50 %-igen Spaltungsspezifität, resultierend in einer Massentoleranz von fragmentierten Ionen von 0,50 Da und ganzer Ionen von 20 ppm. Die Carbamidomethylierung der Cysteine wurde als Fix-Modifikation gesetzt, wohingegen Deaminierung von Asparagin und Glutamin und Methionin-Oxidierung als variable Modifikationen angesehen wurden. Mittels Scaffold (Version Scaffold.4.0.3, Proteome Software Inc., Portland, OR) wurden die MS/MS-basierten Peptide und Proteinidentifikationen bestätigt. Peptid-Identifizierungen wurden nur angenommen, wenn sie bei einer Wahrscheinlichkeit $\geq 95\%$ des Peptid-Prophet-Algorithmus [40] übereinstimmten mit einer Scaffold Delta-Massen-Korrektur. Protein-Identifizierungen wurden nur angenommen wenn sie mit einer Wahrscheinlichkeit $\geq 99\%$ mindestens zwei identifizierte Peptide enthielten. Proteinwahrscheinlichkeiten wurden durch den Protein-Prophet-Algorithmus [67] festgesetzt.

4.2.9 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Transmissionselektronenmikroskopie wurde von Andrea Hellwig in der Neurobiologie der Universität Heidelberg durchgeführt in Anlehnung an die Veröffentlichung von R. Bauerfeind und Kollegen [5]. Isolierte und pelletierte EV wurden in 200 μl Glutaraldehyd-Natriumkakodylat-Gemisch (2 % Glutaraldehyd in 100 mM Natriumkakodylat-Puffer (pH 7,2)) über Nacht fixiert. Nach dem Waschen mit Natriumkakodylat-Puffer und anschließender einstündiger Fixation in 200 μl Osmium-Tetroxid (2 %) und $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1,5 %) wurden die fixierten EV 30 min in 500 μl einer Kontrastlösung aus 1,5 %-igen Uranylacetat in Wasser vollständig eingeschlossen inkubiert. Danach wurden die Proben mittels einer ansteigenden Ethanolkonzentration dehydriert und schließlich in 300 μl Glycid-

Ether-Harz eingebettet. Ultradünne Schnitte wurden mit einem Ultramikrotom (Reichert Ultracut S, Leica Microsystems) hergestellt und mit einem Transmissionselektronenmikroskop (Zeiss EM10 CR) analysiert.

4.2.10 Proteasom/ Rho-Kinase-Inhibitor Assays

2×10^6 aktivierte T-Zellen wurden in 2 ml R10-Medium in einer 12-Loch-Platte ausgesät und für 30 s (90 J/cm^2) mit UVB-Strahlung bestrahlt, um Apoptose in diesen Zellen zu induzieren. Dies geschah in An- und Abwesenheit von 1 nM Bortezomib (Santa Cruz) oder $10 \mu\text{M}$ Y27632 (Merk). Bortezomib ist ein Inhibitor des 26S Proteasomes. Y27632 inhibiert spezifisch die Aktivität der *rho-associated coil* Kinase (ROCK) und hemmt die Reorganisation des Zytoskeletts und somit die Freisetzung von EVs von der äußeren Zellmembran. Nach 20-stündiger Inkubation wurde die Menge der freigesetzten GEV mittels Durchflusszytometrie (Granularität gegen Größe mit Fokussierung auf Vesikel $< 1 \mu\text{m}$) an einem EPICS XLTM Durchflusszytometer quantifiziert. Zur Auswertung wurden jeweils 5×10^5 Vesikel aufgenommen. Die Zellvitalität wurde mittels AxV/PJ-Färbung überprüft (s. Punkt 4.2.3).

4.2.11 Generierung von DZs

Zur Generierung von dendritischen Zellen (DZ) aus Monozyten wurden CD14⁺ Monozyten aus PBMZ isoliert. Die Isolation erfolgte durch magnetische, an einen CD14-Antikörper gekoppelte-Mikrobeads (*magnet activated cell sorting*, MACS, Kitnr.:130-050-201, Miltenyi Biotech) nach Herstellerangaben. Die Reinheit isolierter Monozyten wurde anschließend durchflusszytometrisch (Durchflusszytometer EPICS XLTM) überprüft. Es ergab sich in diesen Versuchen eine Reinheit $> 95\%$. Für die Differenzierung von CD14⁺ Monozyten in phänotypische unreife DZ lag folgende publizierte Differenzierungsmethode zu Grunde [79]: CD14⁺ Monozyten wurden direkt nach Isolierung in 24-Loch-Platten ausgesät mit 5×10^5 Zellen pro Loch in 1 ml RPMI 1640. Pro Loch wurden 1000 IU/ml GM-CSF und 500 IU/ml IL-4 hinzugefügt und die Zellen über 6 Tage kultiviert. Am Tag 7 wurden die Zellen geerntet, in 10 ml R10-Medium gewaschen und ein Aliquot von 1×10^5 Zellen zur Überprüfung des Differenzierungsstatus abgenommen. Die Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie (Granularität gegen Größe mit Fokussierung auf lebende DZ) auf die Expression der Oberflächenmarker CD11c, CD83, CD80 und CD86 überprüft. Zur Auswertung wurden 1×10^4 lebende Zellen an einem EPICS XLTM Durchflusszytometer vermessen. Die Zellen zeigten eine 100%ige Expression des Markers CD11c, eine 40-50%-ige Expression der Marker CD80 und CD86 und eine einprozentige Expression des Reifemarkers CD83. Dieses Expressionsprofil entspricht dem unreifer, ausdifferenzierter DZ. Die restlichen DZ wurden nun zu Stimulationsversuchen mit EV eingesetzt.

4.2.12 Stimulation von DZ mit EV

An Tag 7 wurden unreife DZ gewaschen und 10^6 Zellen in 1 ml EV-depletiertem Zellkulturmedium in einer 24-Loch-Platte ausgesät. Anschließend wurden DZ entweder mit 200 ng LPS oder mit 75 μg aktiven oder apoptotischen GEV bzw. KEV stimuliert. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C, 5% CO₂ wurden die Zellen geerntet und 5 min bei 2200 rpm (Zentrifuge 5414R, Eppendorf) bei RT abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert, in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren. Das DZ-Pellet wurde auf 1×10^6 Zellen/ml in Zellkulturmedium eingestellt, extrazellulär gegen die Oberflächenmoleküle CD83, CD80, CD86, CD274 und HLA-DR gefärbt (s. Punkt 4.2.13) und mittels Durchflusszytometrie (Granularität gegen Größe mit Fokussierung auf lebende DZ) an einem EPICS XLTM Durchflusszytometer analysiert.

4.2.13 Extrazelluläre Durchflusszytometrie-Färbung

Pro Durchflusszytometrie-Röhrchen wurden 1×10^5 primäre humane DZ in 100 μl Zellkulturmedium eingesetzt, mit 2 μl entsprechendem Antikörper (s. Punkt 4.1.8, Tabelle 13) versetzt und 30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 500 μl PBS gewaschen (5 min, 4 °C, 1600 rpm (Laborfuge 400R, Heraeus)), der Überstand abgenommen, die Zellen in 500 μl Ringer-Lösung aufgenommen und mittels eines EPICS XLTM Durchflusszytometers analysiert. Hierbei wurde nach Auftragung Granularität gegen Größe auf die Zielpopulation (DZ) fokussiert. Für die Auswertung wurden 2×10^4 Zellen aufgenommen.

4.2.14 Cytometric Bead Array

Zur Analyse der von EV-stimulierten DZ sezernierten Zytokine wurde ein *Cytometric Bead Array* durchgeführt. Benutzt wurde hierzu ein LEGENDplexTM-System der Firma BioLegend, welches im Nachweis dem eines Sandwich-ELISAs gleicht. Dieses System beruht auf der Nutzung von *Beads*, die sich in ihrer Größe und ihrer Fluoreszenzstärke voneinander klar unterscheiden. Genutzt werden zwei *Beads*: Ein kleiner *Bead* (A), der in sechs unterschiedlichen Fluoreszenzstärken genutzt werden kann, und ein großer *Bead* (B), der in sieben verschiedenen Fluoreszenzstärken erhältlich ist, bilden ein Nachweissystem, in dem 13 unterschiedliche Zytokine gleichzeitig nachgewiesen werden können. Jeder *Bead* ist mit einem spezifischen Antikörper gegen sein Target-Zytokin gekoppelt (*Capture-Beads*). Diese *Capture-Beads* werden dann mit der Probe zusammengegeben. Nach Inkubation (2 h, RT, schütteln) und Waschen werden dann spezifische, biotinylierte Antikörper zugegeben, die wiederum das Target-Zytokin erkennen können (*Detection-Antikörper*) und nochmals inkubiert (1 h, RT, schütteln),

bevor ein Streptavidin-Phycoerythrin-Antikörper zugegeben wird, um die *Bead*-Konstellationen im Durchflusszytometer analysieren zu können [51]. Ein vorbereiteter (kundenorientierter) *Bead-Mix* wurde von der Firma zusammengestellt, in dem die Zytokine IL-1 β , IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-6, IL-8, IFN- γ und TNF- α untersucht werden konnten. Der *Cytometric Bead Array* erfolgte nach Herstellerangaben, in der *Bead A* mit 6 unterschiedlichen Fluoreszenzstärken und *Bead B* mit sieben unterschiedlichen Fluoreszenzstärken eingesetzt wurde. Die Analyse wurde an einem LSRII-Durchflusszytometer (BD) durchgeführt. Hierbei wurde nach Auftragung Granularität gegen Größen zunächst auf die beiden Zielpopulationen *Bead A* und *Bead B* fokussiert und im Weiteren auf die verschiedenen Fluorophore innerhalb der *Bead*-Populationen A bzw. B. Zur Auswertung wurden zwischen 500-1000 "Events" pro Probe aufgenommen und mittels LEGENDplex Software V8.0 (Biolegend) analysiert.

5 Ergebnisse

5.1 Charakterisierung extrazellulärer Vesikel von gesunden Normal Spendern

Seit ihrer Entdeckung wurden die Morphologie wie auch die molekulare Zusammensetzung extrazellulärer Vesikel (EV) intensiv untersucht. Dabei wurden bislang für die Vesikelpräparation unterschiedliche Zellkulturmodelle verwendet und unterschiedliche Stimulantien eingesetzt, um eine Freisetzung von EV zu erzeugen [37, 102]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Zusammensetzung verschiedener EV-Populationen erstmals auch im Hinblick auf den der Vesikelfreisetzung zugrunde liegenden Stimulus (Zell-Aktivierung vs. Apoptose-Induktion) analysiert.

Diesem Abschnitt liegt die Veröffentlichung [99] zu Grunde.

5.1.1 Morphologische Charakterisierung extrazellulärer Vesikel primärer humaner T-Zellen

Zur Bestimmung der Morphologie und der nachfolgenden Analysen von EV zur Charakterisierung wurden diese aus primären humanen T-Zellen isoliert. Dazu wurden mononukleare Zellen des peripheren Blutes (PBMZ) eines gesunden Normal spenders über einen Ficoll mit anschließender Dichtegradientenzentrifugation isoliert und mittels Phytohemagglutinin (PHA, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und Interleukin-2 (IL-2, 0,5 U/ml) über sechs Tage hinweg zu aktivierten T-Zellen stimuliert. An Tag 6 wurden 1×10^8 aktivierte T-Zellen in 30 ml EV-freiem Zellkulturmedium in Anwesenheit von IL-2 ausgesät. Für die Generierung von aktivierten großen extrazellulären Vesikeln (GEV) oder kleinen extrazellulären Vesikeln (KEV) wurden aktivierte T-Zellen nach dem Aussäen für 20 h im Brutschrank kultiviert. Für den Erhalt von apoptotischen T-Zellen und daraus resultierenden apoptotischen GEV/KEV wurden aktivierte T-Zellen nach dem Aussäen 30 s bei $90 \text{ J}/\text{cm}^2$ mittels UVB-Strahlung bestrahlt, um die Apoptose in den Zellen zu induzieren, und anschließend für 20 h im Brutschrank kultiviert. Am nächsten Tag wurden aktivierte/apoptotische GEV bzw. KEV durch Filtration mit nachfolgender differentieller Ultrazentrifugation ($10000 \times g$ für GEV und $100000 \times g$ für KEV) aufgereinigt [106]. Gesammelte EV wurden mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM), *nanoparticle tracking analysis* (NTA) und BCA Assay analysiert. In dieser Arbeit bezeichnen "aktivierte GEV/KEV" EV, die von aktivierten T-Zellen freigesetzt und isoliert wurden, und "apoptotische GEV/KEV" EV, die von apoptotischen T-Zellen freigesetzt und isoliert wurden.

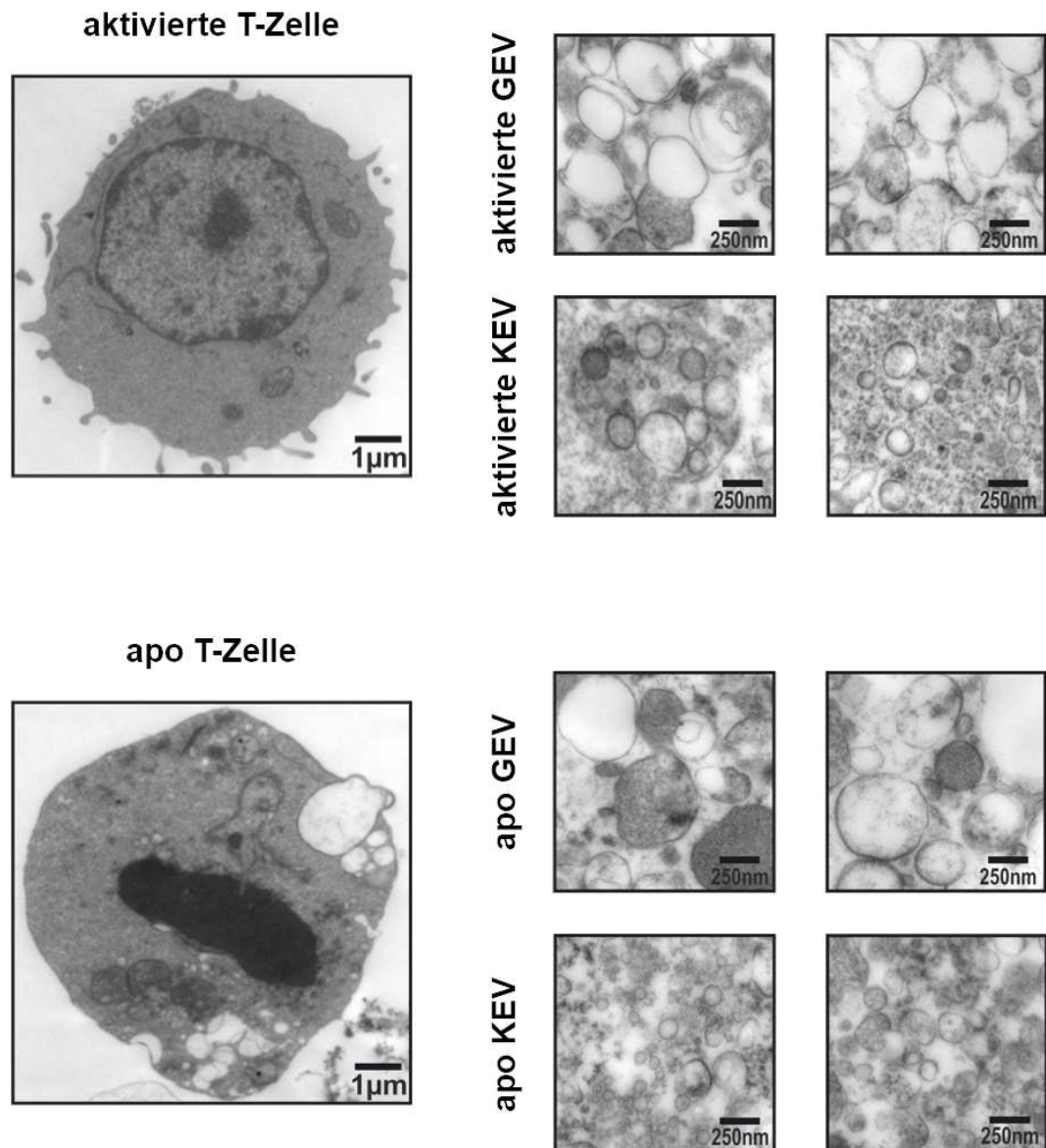


Abbildung 2: **Morphologie von GEV und KEV.** Isolierte, aktivierte/apoptotische EV wurden transelektronenmikroskopisch untersucht. Die großen TEM-Bilder auf der linken Seite zeigen jeweils eine repräsentative T-Zelle: im aktivierten Zustand (oberes Bild) und im apoptotischen Zustand (unteres Bild), mit angezeigtem Maßstabsbalken 1 μm . Die dazugehörigen TEM-EV-Aufnahmen sind auf der rechten Seite dargestellt (aktivierte GEV/KEV: GEV/KEV freigesetzt von aktivierten T-Zellen; apo GEV/KEV: GEV/KEV freigesetzt von apoptotischen T-Zellen), mit angezeigtem Maßstabsbalken 250 nm. TEM: Transmissionselektronenmikroskopie; EV: extrazelluläre Vesikel; GEV: große extrazelluläre Vesikel; KEV: kleine extrazelluläre Vesikel.

Die TEM-Präparationen in Abbildung 2 zeigen jeweils eine repräsentative T-Zelle im aktivierten Zustand (links oben) und im apoptotischen Zustand (links unten). Zudem

befindet sich bei beiden Aufnahmen in der linken unteren Ecke ein Größenindex in Form eines schwarzen Balkens mit $1\ \mu\text{m}$, um die Größe der dargestellten Zellen besser einschätzen zu können. Rechts neben der jeweiligen repräsentativen T-Zelle sind zwei Aufnahmen von den zugehörigen freigesetzten EV (oben: aktivierte GEV/KEV; unten: apoptotische GEV/KEV). Auch bei den freigesetzten EV befindet sich in der linken unteren Ecke ein schwarzer Balken als Größenindex, allerdings hier mit $250\ \text{nm}$. Die elektronenmikroskopischen Bilder zeigten GEV, die von aktivierten als auch apoptotischen T-Zellen freigesetzt wurden, als ovale membranumhüllte Vesikel im Durchschnitt von $200\text{-}1000\ \text{nm}$ Größe. KEV, die ebenso von aktivierten als auch apoptotischen T-Zellen freigesetzt wurden, erschienen ebenso als ovale, rundliche, membranumschlossene Vesikel, aber unterschieden sich sehr deutlich in ihrer Größe mit einer durchschnittlichen Größe von $50\text{-}200\ \text{nm}$.

Isolierte EV wurden auch mittels NTA untersucht (s. Abbildung 3). Für jede untersuchte Kondition (aktivierte GEV, aktivierte KEV, apoptotische GEV, apoptotische KEV) sind drei repräsentative unabhängige Experimente dargestellt. Dabei besteht jeder Graph aus drei unterschiedlichen Einzelmessungen einer experimentellen Probe. Die NTA-Software kumuliert die gemessenen Einzelmessungen und erstellt einen Graphen mit einer gemittelten Größenverteilung (dünne schwarze Linie) und angezeigten Abweichungen (rote "Wolke" um schwarze Linie).

Bei den repräsentativen Experimenten ergaben die Messungen für aktivierte GEV eine durchschnittliche Größe von $329,8\ \text{nm}$ bei einer vorliegenden Konzentration von $3,12 \times 10^6$ Vesikel/ml, $329,0\ \text{nm}$ mit einer Konzentration von $2,41 \times 10^6$ Vesikel/ml und schließlich $337,8\ \text{nm}$ mit einer Konzentration von $1,66 \times 10^6$ Vesikel/ml. Aktivierte KEV zeigten sich in einer durchschnittlichen Größe von $186,6\ \text{nm}$ mit einer Konzentration von $2,75 \times 10^6$ Vesikel/ml, $172,2\ \text{nm}$ mit einer Konzentration von $1,50 \times 10^6$ Vesikel/ml und schließlich $214,3\ \text{nm}$ mit einer Konzentration von $1,52 \times 10^6$ Vesikel/ml.

Apoptotische GEV erschienen in einer durchschnittlichen Größe von $420,4\ \text{nm}$ bei einer Konzentration von $1,56 \times 10^6$ Vesikel/ml, $387,4\ \text{nm}$ mit einer Konzentration von $3,50 \times 10^6$ Vesikel/ml und schließlich $366,4\ \text{nm}$ mit einer Konzentration von $3,51 \times 10^6$ Vesikel/ml. Im Gegensatz dazu zeigten sich apoptotische KEV kleiner mit einer durchschnittlichen Größe von $212,8\ \text{nm}$ mit einer Konzentration von $1,56 \times 10^6$ Vesikel/ml, $224,1\ \text{nm}$ mit einer Konzentration von $5,86 \times 10^6$ Vesikel/ml und schließlich $248,5\ \text{nm}$ mit einer Konzentration von $4,93 \times 10^6$ Vesikel/ml.

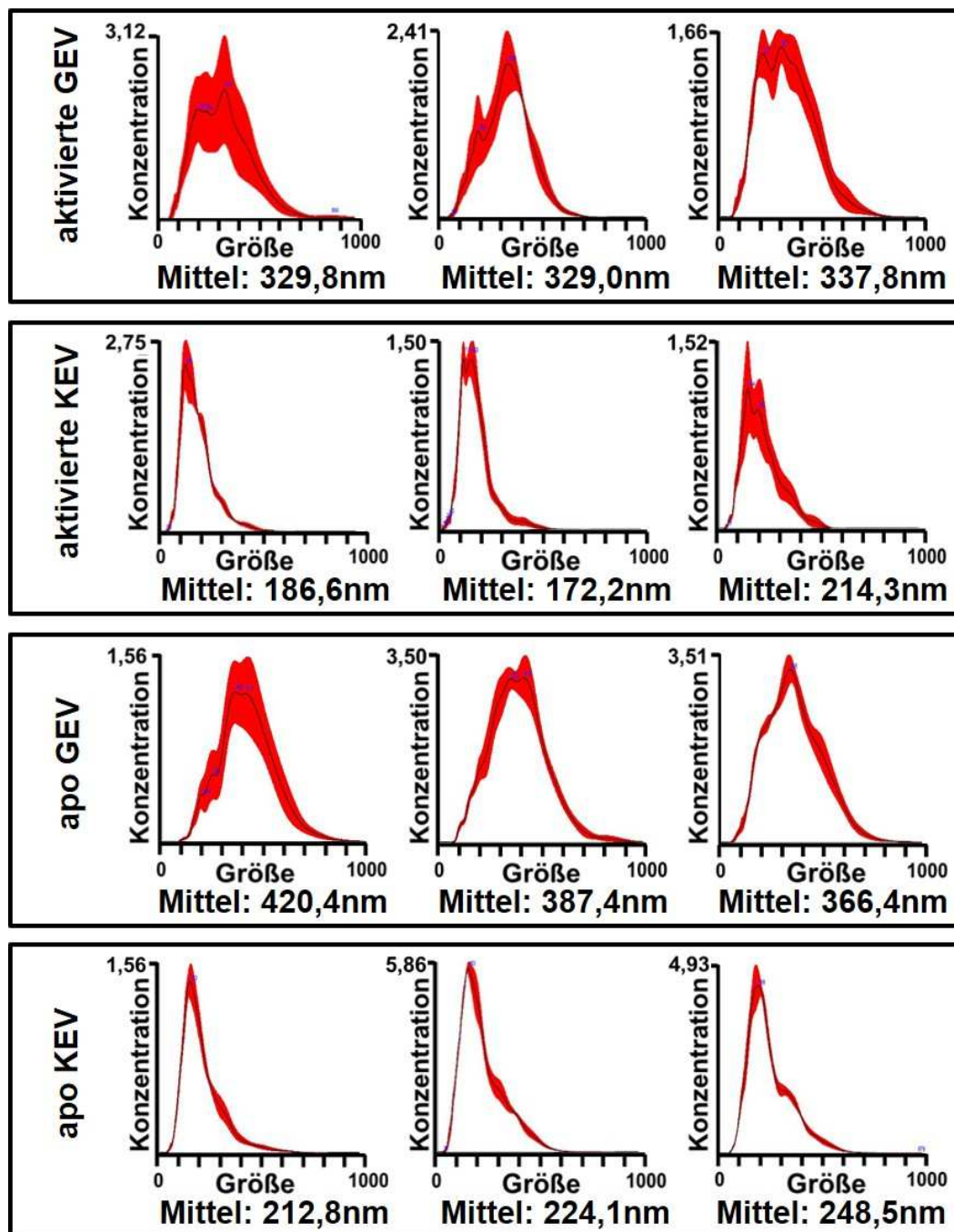


Abbildung 3: **NTA-Aufnahmen von GEV und KEV.** Isolierte, aktivierte/apoptotische EV wurden mittels NTA untersucht. Für jede untersuchte Variante sind drei repräsentative Größenverteilungsgraphen mit dazugehörigen Mittelwerten gezeigt, die durch die NTA-Messungen generiert wurden. Die X-Achse zeigt die Größenverteilung der Vesikel in nm, die Y-Achse zeigt die Vesikelkonzentration (10^6 Vesikel/ml). NTA: *nanoparticle tracking analysis*; EV: extrazelluläre Vesikel; GEV: große extrazelluläre Vesikel; KEV: kleine extrazelluläre Vesikel; apo: apoptotisch.

Zur Verdeutlichung der NTA-Ergebnisse wurden zehn unabhängige Experimente in einem Balkendiagramm zusammengefasst (s. Abbildung 4A+B). Für GEV, die von aktivierten T-Zellen isoliert wurden, zeigte sich eine durchschnittliche Größe von 330 nm (hellgrüner Balken), wobei GEV, die von apoptotischen T-Zellen isoliert wurden, im Durchschnitt etwas größer waren mit 390 nm (s. Abbildung 4A, dunkelgrüner Balken). Im Gegensatz dazu erschienen KEV, die von aktivierten T-Zellen freigesetzt wurden, als kleinere Vesikel in einer durchschnittlichen Größe von 190 nm (s. Abbildung 4A, hellblauer Balken). Wieder waren jedoch KEV, die von apoptotischen T-Zellen freigesetzt wurden, etwas größer als solche von aktivierten T-Zellen (s. Abbildung 4A, dunkelblauer Balken). Es zeigte sich, dass sich KEV von GEV unabhängig des Freisetzungstimulus (Aktivierung vs. Apoptose) deutlich in ihrer Größe von einander abgrenzen lassen ($p < 0,05$).

Nebenbei wurde die Menge der freigesetzten Vesikel (GEV und KEV) sowohl nach zellulärer Aktivierung als auch nach Apoptose-Induktion verglichen. Es fiel auf, dass GEV extrem verstärkt nach Apoptose-Induktion freigesetzt wurden, wodurch sich die GEV-Konzentration verzehnfachte, nämlich von 38 auf $388 \cdot 10^9$ Vesikel/ml ($p < 0,05$, s. Abbildung 4B, dunkelgrüner Balken). Des Weiteren konnte ein leichter Anstieg von KEV beobachtet werden, die von apoptotischen T-Zellen freigesetzt wurden ($p < 0,05$, s. Abbildung 4B, dunkelblauer Balken). Zudem schien es so, dass im Vergleich mehr GEV von aktivierten T-Zellen freigesetzt wurden als KEV ($p < 0,05$, s. Abbildung 4B). Parallel dazu wurde der Proteingehalt mittels BCA Assay innerhalb der verschiedenen Vesikelpopulationen analysiert und dabei ähnliche Ergebnisse erzielt (s. Abbildung 4C).

Ebenso wurde ein Protein/Vesikelkonzentrations-Verhältnis kalkuliert durch Division von Proteingehalt durch die Vesikelkonzentration (s. Abbildung 4D). Der höchste Protein-/Vesikelkonzentrations-Verhältniswert wurde in KEV gefunden, die von aktivierten T-Zellen freigesetzt wurden (Verhältniswert=4,5, s. Abbildung 4D, hellblauer Balken). Apoptotische KEV und aktivierte GEV zeigten ein ähnliches Verhältnis (Verhältniswert=2,3 dunkelblauer Balken und 2,1 hellgrüner Balken, s. Abbildung 4D). Das niedrigste Verhältnis wiesen apoptotische GEV auf (Verhältniswert=1,2, s. Abbildung 4D dunkelgrüner Balken).

Zur Kontrolle, dass es sich bei aktivierten GEV/KEV um EV handelte, die von aktivierten T-Zellen freigesetzt wurden und respektiv apoptotische GEV/KEV, die von apoptotischen T-Zellen freigesetzt wurden, wurde vor Beginn der Vesikelisolierung die Zellviabilität der aktivierten/apoptotischen T-Zellen mittels Annexin V (AxV)/Propidiumjodid (PJ)-Färbung durchflusszytometrisch überprüft (s. Abbildung 4E). Aktivierte Zellen (AxV-/PJ-) zeigten sich zu 90 % vital mit einem geringen Anteil apoptotischer Zellen (AxV+/PJ-, 8 %) und nekrotischer Zellen (AxV+/PJ+, 2 %). Nach der Apoptose-Induktion stieg die

Menge der AxV+ positiven und PJ- negativen T-Zellen (Apoptose) von 13% auf 73% an ($p < 0,05$, s. Abbildung 4E). Der Prozentsatz der nekrotischen T-Zellen nahm durch die Apoptose-Induktion nur leicht um 8,7% zu ($p < 0,05$, s. Abbildung 4E). Gezeigte Daten wurden aus fünf unabhängigen Experimenten ermittelt.

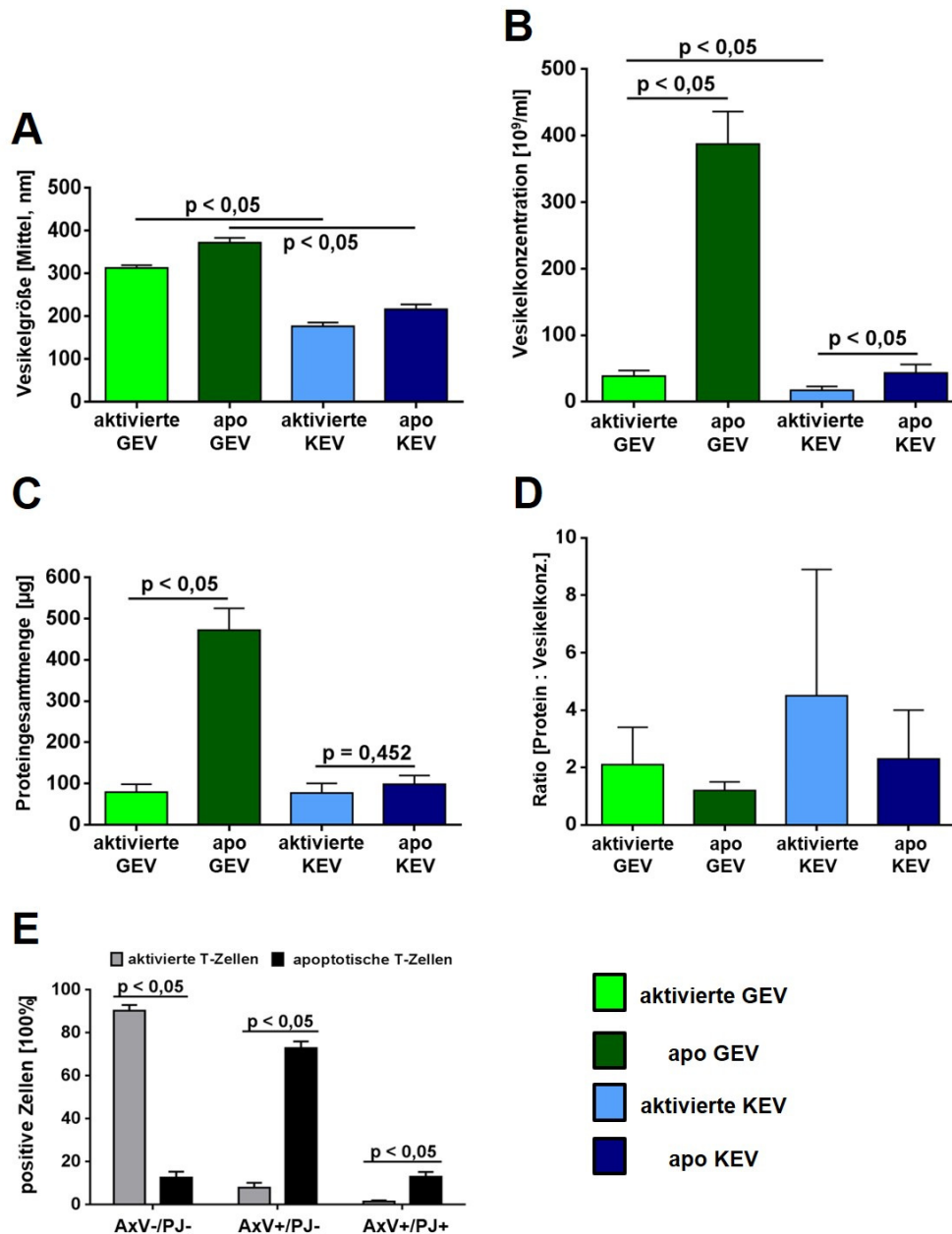


Abbildung 4: **Vesikelkonzentration und Proteingehalt von GEV und KEV.** GEV und KEV wurden nach T-Zell-Aktivierung oder Apoptose-Induktion isoliert (aktivierte

GEV/KEV: GEV/KEV freigesetzt von aktivierten T-Zellen; apo GEV/KEV: GEV/KEV freigesetzt von apoptotischen T-Zellen). (A) Der Graph zeigt die gemittelten Größenverteilungen von 10 unabhängigen Experimenten (NTA-Analysen). Dargestellt sind die Mittelwerte mit dazugehörigen SEM. Die statistische Signifikanz ($p \leq 0,05$) wurde mit dem Studentischen T-Test berechnet. (B) Die Vesikelkonzentration der isolierten EV wurde mittels NTA quantifiziert. (C) Gezeigt ist die Proteingesamtmenge von isolierten EV. Die Graphen bilden die Mittelwerte + SEM aus 8 unabhängigen Experimenten ab. Statistische Signifikanz ($p \leq 0,05$) wurde mit dem Studentischen T-Test berechnet. (D) Der Graph zeigt die Ratio, berechnet durch die Division von Proteingehalt durch Vesikelkonzentration (Proteingehalt [μg] geteilt durch Vesikelkonzentration [10^9 Vesikel/ml]). Aktivierte GEV: Verhältniswert=2,1; aktivierte KEV: Verhältniswert=4,5; apo GEV: Verhältniswert=1,2; apo KEV: Verhältniswert=2,3. (E) Der Graph zeigt die prozentuale Verteilung lebender (AxV-/PJ-), apoptotischer (AxV+/PJ-) und nekrotischer T-Zellen (AxV+/PJ+). Aktivierte oder apoptotische T-Zellen (durch UV-B Strahlung) wurden nach AxV/PJ-Färbung mittels Durchflusszytometrie analysiert, wobei Daten aus fünf unabhängigen Experimenten zugrunde liegen (Mittelwerte + SEM). NTA: *nanoparticle tracking analysis*; GEV: große extrazelluläre Vesikel; KEV: kleine extrazelluläre Vesikel; AxV: Annexin V; PJ: Propidiumjodid.

5.1.2 Proteinprofil von GEV und KEV aktivierter und apoptotischer humaner T-Zellen

Nach der morphologischen Charakterisierung lag der Fokus auf den enthaltenen Proteinen in diesen verschiedenen Vesikelpopulationen (GEV, KEV). Um dieser Frage nachzugehen, wurden EV mittels *two dimensional difference gel electrophoresis* (DIGE) und Western Blot untersucht. Für die DIGE-Analyse wurden KEV und GEV von aktivierten als auch apoptotischen T-Zellen isoliert. Gezeigt wird in Abbildung 5A je ein repräsentatives Gel für jede Kondition: Aktivierte GEV (hellgrüner Rahmen), apoptotische GEV (dunkelgrüner Rahmen), aktivierte KEV (hellblauer Rahmen) und apoptotische KEV (dunkelblauer Rahmen). Durch die DIGE DeCyder 2D Software konnten 11364 Proteinpunkte (100 %) kartiert werden. Es wurden 9583 Proteinpunkte identifiziert (84,33 %, s. Abbildung 5B graues Kreissegment), die sich nicht signifikant in ihren Expressionsniveaus unterschieden. Jedoch zeigten 1781 Proteinpunkte (15,67 %, s. Abbildung 5B schwarzes+weißes Kreissegment) entweder ein unterschiedliches Expressionsniveau in KEV und GEV oder eine signifikante Expressionsänderung nach Apoptose-Induktion. Um dieses Expressionsprofil in einer detaillierteren Art aufzuschlüsseln zu können, wurden die Proteinpunkte in zwei Hauptgruppen unterteilt:

(1) Proteinpunkte, die ein unterschiedliches Expressionsniveau zeigten beim Vergleich von GEV mit KEV. Basierend auf einem p-Wert $\leq 0,05$ konnten 930 Proteinpunkte ausgemacht werden, die in GEV signifikant höher exprimiert wurden (8,20 %, s. Abbildung 5B schwarzes Kreissegment), wohingegen 846 Proteinpunkte deutlich höher in KEV exprimiert wurden (7,47 %, s. Abbildung 5B weißes Kreissegment).

(2) Proteinpunkte, die hoch- oder herabreguliert wurden innerhalb der verschiedenen EV-Populationen nach Apoptose-Induktion. Beim Vergleich von GEV mit KEV fanden sich Proteinpunkte, die entweder in gleicher oder gegensätzlicher Weise reguliert wurden. Dabei zeigten 701 Proteinpunkte eine parallel ablaufende Hochregulation in GEV und KEV (39,85 %, s. Abbildung 5B pinkes Kreissegment), während 580 Proteinpunkte gleichzeitig eine Herabregulation in beiden Vesikelpopulationen aufwiesen (32,97 %, s. Abbildung 5B lilanes Kreissegment). 142 Proteinpunkte zeigten eine gegenläufige Regulation, wobei in GEV hoch- und KEV herabreguliert wurde (8,13 %, s. Abbildung 5B oranges Kreissegment). Weitere 335 Proteinpunkte zeigten eine gegenläufige Regulation (GEV herab- und in KEV hochreguliert, 19,04 %, s. Abbildung 5B gelbes Kreissegment).

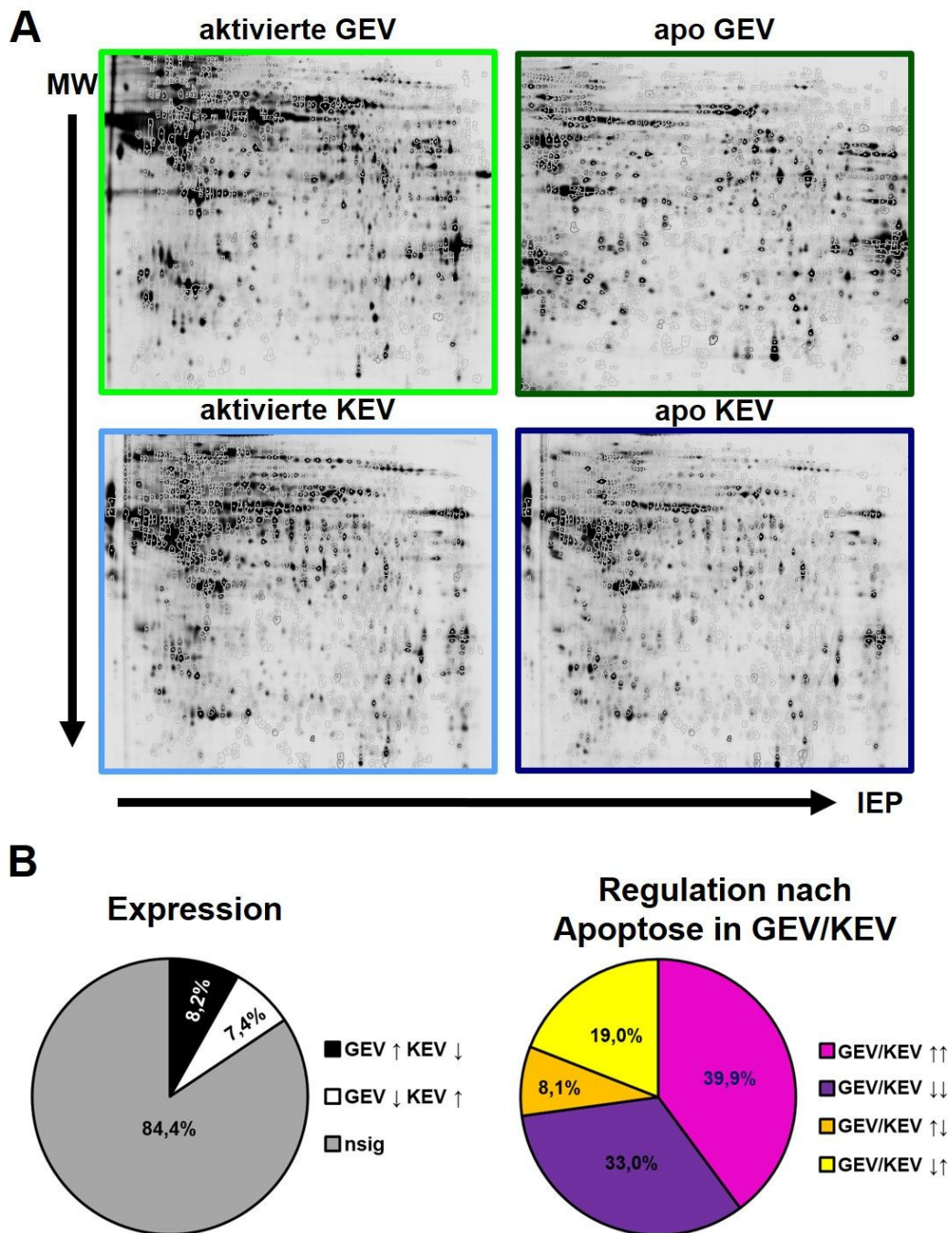


Abbildung 5: **Proteinexpression und Regulationsmuster in GEV und KEV nach Apoptose-Induktion.** GEV und KEV wurden nach T-Zell-Aktivierung oder Apoptose-Induktion isoliert und mittels bidimensionaler Gelelektrophorese analysiert (aktivierte GEV/KEV: GEV/KEV freigesetzt von aktivierten T-Zellen; apo GEV/KEV: GEV/KEV freigesetzt von apoptotischen T-Zellen). (A) Gezeigt wird je ein repräsentatives bidimensionales Gelelektrophoresebild von aktivierten und apoptotischen GEV und KEV. (B) Das linke, schwarz-weiße Kreisdiagramm bildet die prozentuale Proteinverteilung der unterschiedlichen Expressionsniveaus in GEV und KEV ab. GEV *hoch* und KEV *niedrig* wird dargestellt in Schwarz (8,20 %), während umgekehrte Expressionsniveaus in Weiß angezeigt werden (7,47 %, GEV *niedrig* und KEV *hoch*). Proteine, die keine signifikante

Expressionsänderung innerhalb der EV aufweisen, sind in Grau dargestellt (84,33 %). Das rechte, farbige Kreisdiagramm zeigt die prozentuale Verteilung der Proteine, die unterschiedlich innerhalb der EV reguliert wurden, nach zellulärer Aktivierung oder Apoptose-Induktion. Folgende Vergleiche sind gezeigt: GEV *hoch*/KEV *hoch* gezeigt in Pink (39,85 %); GEV *niedrig*/KEV *niedrig* gezeigt in Lila (32,97 %); GEV *hoch*/KEV *niedrig* gezeigt in Orange (8,13 %); GEV *niedrig*/KEV *hoch* gezeigt in Gelb (19,04 %); Ergebnisse wurden berechnet aus drei unabhängigen Experimenten und die statistische Signifikanz ($p \leq 0,05$) mittels Studentischen T-Test ermittelt. GEV: große extrazelluläre Vesikel; KEV: kleine extrazelluläre Vesikel; EV: extrazelluläre Vesikel.

Dann wurden die "stärksten" Proteinpunkte zur massenspektrometrischen Bestimmung ausgewählt, insgesamt 24 an der Zahl. Diese wiesen entweder eine sehr starke Expressionsänderung nach Apoptose-Induktion oder eine signifikant unterschiedliche Expression in verschiedenen Vesikelpopulationen auf. Ausgewählte Proteinpunkte wurden mittels Massenspektrometrie identifiziert (s. Abbildung 7A bis Abbildung 7D). Abbildung 6 zeigt exemplarisch die 3D-Darstellung und Auswertung des Proteins *nascent-polypeptide-associated complex alpha polypeptide* (NACA), das durch Apoptose-Induktion in GEV als auch KEV herunterreguliert wurde. In den eingerahmten 3D-Bildern (orange+blau) wurde das Protein NACA mit einem pinken Kreis markiert. Im orangen Bild ist das Proteinniveau in aktivierten GEV dargestellt und im blauen Bild nach Apoptose-Induktion in apoptotischen GEV. Der Graph daneben zeigt durch die farbigen Punkte das jeweilige Expressionsniveau von NACA in aktivierten GEV (oranger Punkt, s. Abbildung 6) und in apoptotischen GEV (blauer Punkt, s. Abbildung 6). Es ist deutlich in den 3D-Bildern wie auch im Graphen zu sehen, dass das Protein durch Apoptose-Induktion an Expressionsstärke verliert (s. Abbildung 6).

Im Folgenden soll kurz der Graph des exemplarischen Proteins NACA (s. Abbildung 6) beschrieben werden, um die folgenden Graphen der massenspektrometrisch ermittelten Proteine besser verstehen zu können (s. Abbildung 7A bis Abbildung 7D): Die x-Achse trägt die Beschriftung "⊗" für aktivierte EV und "UV" für apoptotische EV. Die y-Achse stellt die logarithmisch standardisierte Abundanz des Expressionsmaximums (+0,65) und Expressionsminimums (-0,55) des Proteins NACA dar (s. Abbildung 6). Der Graph hat "dünne" und "dicke" Linien. Die dünnen Linien zeigen eine Messung eines bidimensionalen Geles, das die Expressionsänderung des Proteins auf Basis der Cy3-respektive Cy5-Färbung angibt. Die dicken Linien zeigen schematisch den errechneten Mittelwert der Proteinregulation in der jeweiligen Vesikelpopulation (GEV/KEV) basierend auf dem Freisetzungstimulus Aktivierung bzw. Apoptose-Induktion.

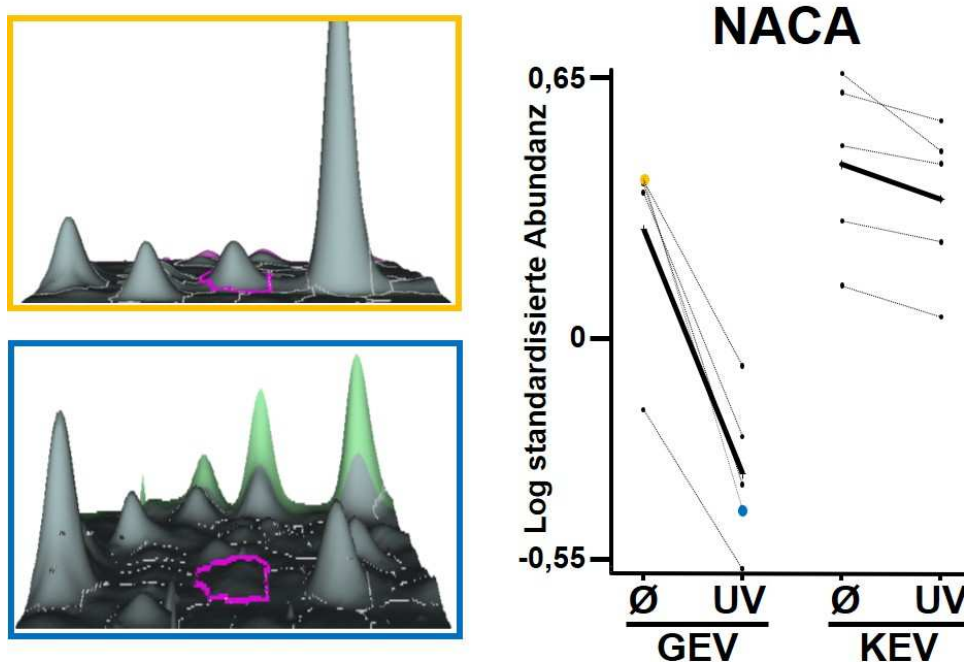


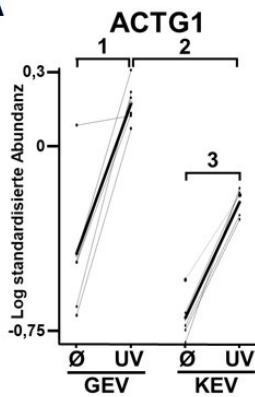
Abbildung 6: **Bildliche 3D-Darstellung des Proteinexpressionsmusters des Proteins NACA.** GEV und KEV wurden nach T-Zell-Aktivierung oder Apoptose-Induktion isoliert und mittels bidimensionaler Gelelektrophorese analysiert (Ø :aktivierte GEV/KEV freigesetzt von aktivierten T-Zellen; UV: apoptotische GEV/KEV freigesetzt von apoptotischen T-Zellen). Eingerahmte 3D-Bilder zeigen das Protein NACA (pinker Kreis) mit hohem Expressionsniveau (oranger Rahmen bzw. Punkt im Graph) in aktivierten GEV und mit niedrigem Expressionsniveau (blauer Rahmen bzw. Punkt im Graph) in apoptotischen GEV. Jede dünne Linie im Graph repräsentiert ein bidimensionales Gel und die Steigung die Proteinregulation basierend auf der Cy3/Cy5-Färbung. Die dicken Linien zeigen jeweilige durchschnittliche Proteinregulation in GEV/KEV abhängig vom Freisetzungsstimulus Aktivierung bzw. Apoptose-Induktion. GEV: große extrazelluläre Vesikel; KEV: kleine extrazelluläre Vesikel.

Abbildung 7 A bis Abbildung 7D fasst die massenspektrometrisch-ermittelten Proteine nach dem Schema, wie bereits in Abbildung 5B gezeigten farbigen Kreisdiagramm, zusammen. Abbildung 7A zeigt die Proteine, die in GEV und KEV nach Apoptose-Induktion hochreguliert wurden: Das Protein Gamma-Aktin (ACTG1), das Protein Beta-Aktin (ACTB), das Protein 14-3-3 theta (YWHAQ), das Stress-induzierte Phosphoprotein 1 (STIP1), die Untereinheit H des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors 3 (EIF3H) und die schwere Kette 9 des Myosinproteins (MYH9). Die Proteine - die regulatorische Untereinheit 7 der Phosphatase 1 (PPP1R7), das Major Vault Protein (MVP) und das *eps 15 homology domain-containing* Protein 3 (EHD3) - wurden ebenso nach

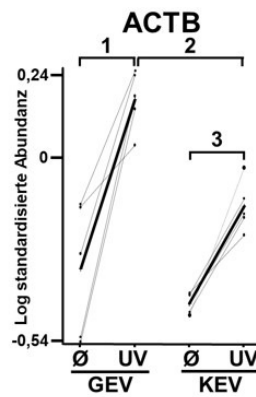
Apoptose-Induktion hochreguliert, wiesen jedoch unterschiedliche Expressionsniveaus auf im Vergleich von GEV zu KEV (s. Abbildung 7A). Jeder Graph zeigt drei ermittelte p-Werte (Studentischer T-Test) mit der dazugehörigen Differenz-Ratio (D-Ratio) der Expressionsniveaus in den gegeneinander getesteten EV-Populationen.

Abbildung 7B zeigt Proteine, die in GEV und KEV nach Apoptose-induktion herunterreguliert wurden: Die Untereinheit beta Typ-4 des Proteasoms (PSMB4), die Enoyl-CoA Hydratase 1 (ECH1), Septin9 (SEPT9), *voltage-dependent anion selective channel 1* (VDAC1), das 60 kDa Hitzeschock-Protein1 (HSPD1), *nascent-polypeptide-associated complex alpha polypeptide* Protein (NACA) und das Protein *guanine nucleotide-binding protein subunit beta2-like1* (GNB2L1).

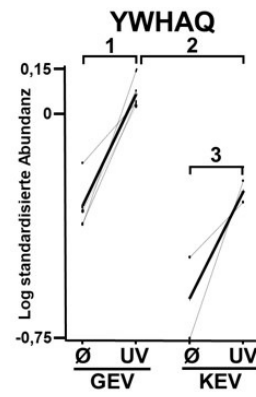
Abbildung 7C+D zeigen Proteine, die "nicht eindeutig gleich" oder unterschiedlich reguliert und exprimiert wurden, beim Vergleich von GEV zu KEV nach Apoptose-Induktion. In Abbildung 7C sind folgende Proteine wurden zusammengefasst: Die Untereinheit alpha Typ-1 des Proteasoms (PSMA1), die Alpha-Enolase (ENO1), die Phosphoglyceratkinase 1 (PGK1), die Adenosylhomocysteinase (AHCY) und die Leucin-Aminopeptidase 3 (LAP3). Die Proteine - das DNS *damage-binding* Protein 1 (DDB1), Gelsolin (GSN), das 40S ribosomale Protein SA (RPSA) - sind in der Abbildung 7D gruppiert.

A

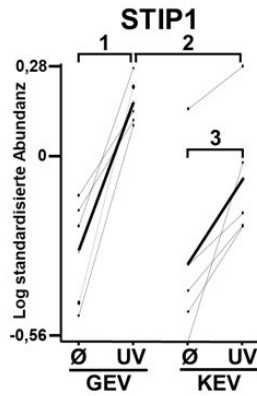
1: $p=0,0036$; D-Ratio: +3,4
 2: $p=0,00055$; D-Ratio: -2,55
 3: $p=0,029$; D-Ratio: +2,92



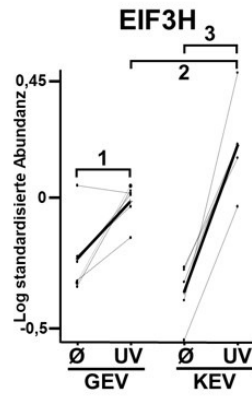
1: $p=0,0049$; D-Ratio: +2,96
 2: $p=0,0017$; D-Ratio: -2,07
 3: $p=0,029$; D-Ratio: +1,95



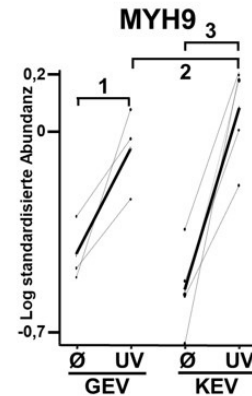
1: $p=0,00097$; D-Ratio: +2,34
 2: $p=0,0021$; D-Ratio: -2,12
 3: $p=0,79$; D-Ratio: +2,17



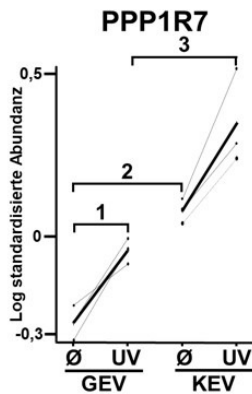
1: $p=0,0042$; D-Ratio: +2,75
 2: $p=0,022$; D-Ratio: -1,57
 3: $p=0,81$; D-Ratio: +1,67



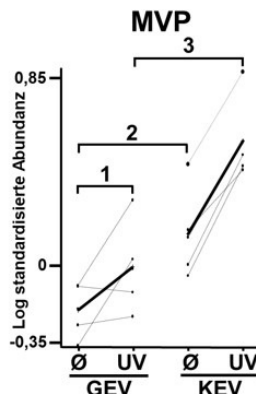
1: $p=0,014$; D-Ratio: +1,59
 2: $p=0,016$; D-Ratio: +1,75
 3: $p=0,084$; D-Ratio: -3,84



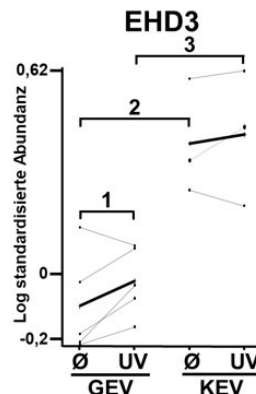
1: $p=0,03$; D-Ratio: +2,37
 2: $p=0,061$; D-Ratio: +1,41
 3: $p=0,055$; D-Ratio: -4,33



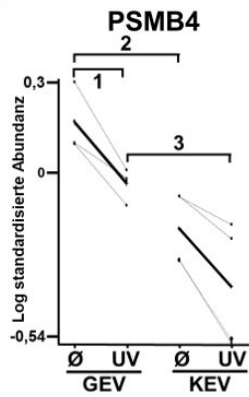
1: $p=0,011$; D-Ratio: +1,66
 2: $p=0,022$; D-Ratio: +2,2
 3: $p=0,01$; D-Ratio: +2,55



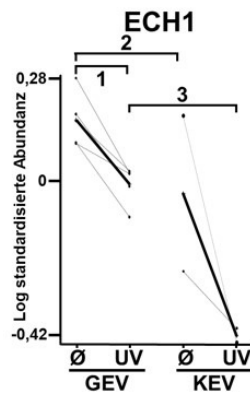
1: $p=0,056$; D-Ratio: +1,66
 2: $p=0,068$; D-Ratio: +2,35
 3: $p=0,0033$; D-Ratio: +3,71



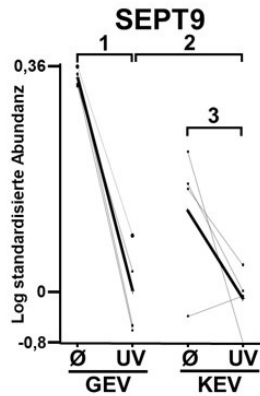
1: $p=0,12$; D-Ratio: +1,16
 2: $p=0,054$; D-Ratio: +3,16
 3: $p=0,0072$; D-Ratio: +2,94

B

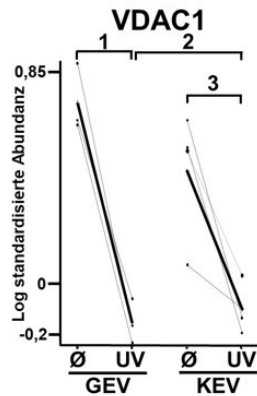
1: $p=0,016$; D-Ratio: -1,62
 2: $p=0,044$; D-Ratio: -2,22
 3: $p=0,014$; D-Ratio: -2,01



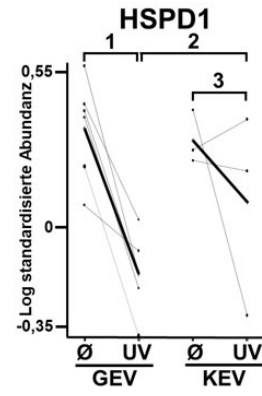
1: $p=0,0074$; D-Ratio: -1,51
 2: $p=0,19$; D-Ratio: -1,43
 3: $p=0,0013$; D-Ratio: -2,61



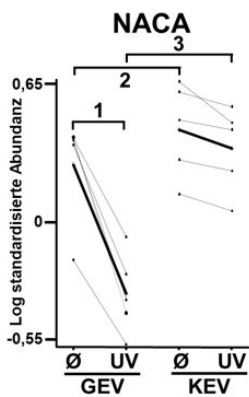
1: $p=0,0017$; D-Ratio: -2,16
 2: $p=0,12$; D-Ratio: -1,03
 3: $p=0,66$; D-Ratio: +1,41



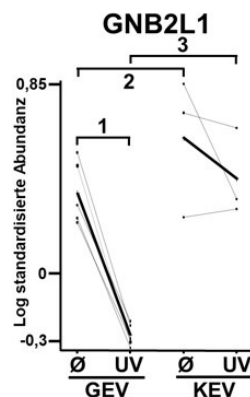
1: $p=0,0045$; D-Ratio: -7,7
 2: $p=0,085$; D-Ratio: +1,14
 3: $p=0,34$; D-Ratio: +3,89



1: $p=0,0026$; D-Ratio: -3,33
 2: $p=0,043$; D-Ratio: +2,09
 3: $p=1$; D-Ratio: +1,38

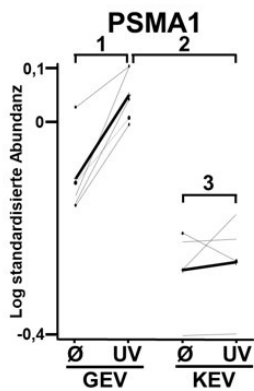


1: $p=0,0078$; D-Ratio: -4,19
 2: $p=0,25$; D-Ratio: +1,45
 3: $p=0,0022$; D-Ratio: +4,85

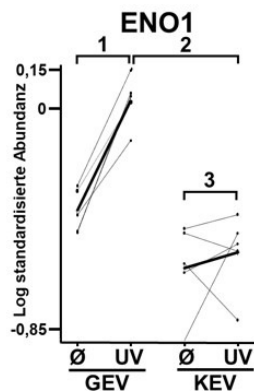


1: $p=0,00097$; D-Ratio: -4,51
 2: $p=0,02$; D-Ratio: +1,96
 3: $p=0,0015$; D-Ratio: +5,38

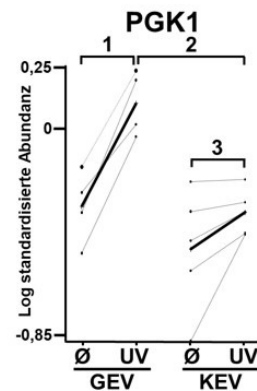
C



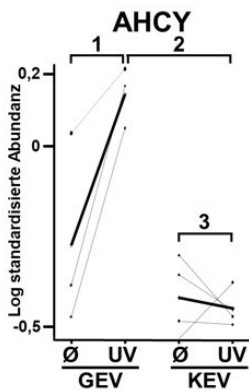
1: $p=0,012$; D-Ratio: +1,43
 2: $p=0,002$; D-Ratio: -2,04
 3: $p=0,079$; D-Ratio: -1,49



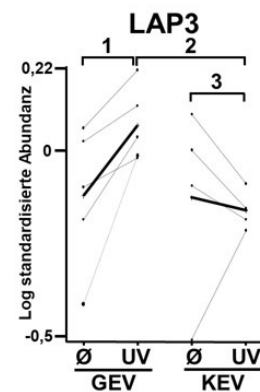
1: $p=0,0017$; D-Ratio: +2,67
 2: $p=0,0011$; D-Ratio: -3,75
 3: $p=0,11$; D-Ratio: -1,58



1: $p=0,012$; D-Ratio: +2,64
 2: $p=0,0022$; D-Ratio: -2,86
 3: $p=0,23$; D-Ratio: -1,39

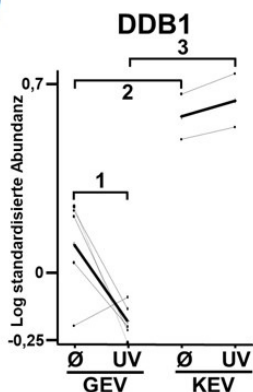


1: $p=0,044$; D-Ratio: +2,31
 2: $p=0,0011$; D-Ratio: -3,96
 3: $p=0,27$; D-Ratio: -1,57

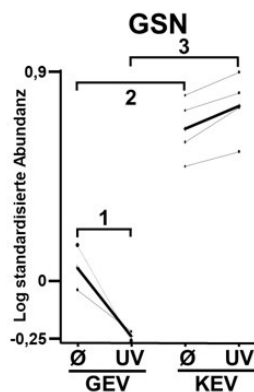


1: $p=0,052$; D-Ratio: +1,48
 2: $p=0,0063$; D-Ratio: -1,72
 3: $p=0,41$; D-Ratio: +1,04

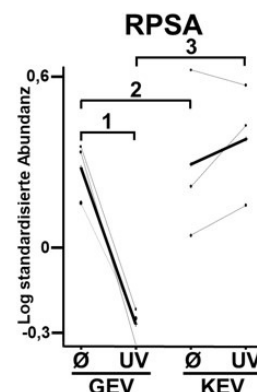
D



1: $p=0,018$; D-Ratio: -2,04
 2: $p=0,095$; D-Ratio: +2,84
 3: $p=0,0011$; D-Ratio: +6,69



1: $p=0,056$; D-Ratio: -2,03
 2: $p=0,062$; D-Ratio: +4,02
 3: $p=0,0026$; D-Ratio: +10,23



1: $p=0,006$; D-Ratio: -3,61
 2: $p=0,4$; D-Ratio: +1,19
 3: $p=0,008$; D-Ratio: +4,81

Abbildung 7: Differentielles Expressionsmuster der massenspektrometrisch-ermittelten Proteine in GEV und KEV. GEV und KEV wurden nach T-Zell-Aktivierung oder Apoptose-Induktion isoliert und mittels 2D-Gelen, DIGE DeCyder Maschine + Software analysiert (x-Achse: \odot : aktivierte GEV/KEV freigesetzt von aktivierten T-Zellen; UV: apoptotische GEV/KEV freigesetzt von apoptotischen T-Zellen; y-Achse: Log standardisierte Proteinabundanz). Basierend aus dieser Analyse wurden 24 Proteinpunkte gepickt und massenspektrometrisch identifiziert. Alle Graphen zeigen dünne und dicke Linien: dünne Linien repräsentieren jeweils ein bidimensionales Gel und die Steigung die Proteinregulation basierend auf der Cy3/Cy5-Färbung; dicke Linien zeigen jeweilige durchschnittliche Proteinregulation in GEV/KEV abhängig vom Freisetzungstimulus (Aktivierung/Apoptose-Induktion). Zusätzlich zeigen alle Graphen drei statistisch ermittelte p-Werte mit zugehöriger D-Ratio (Expressionsniveaus der gegeneinander getesteten EV-Populationen). (A) Proteine, die in GEV und KEV nach Apoptose-Induktion hochreguliert wurden. (B) Proteine, die in GEV und KEV nach Apoptose-Induktion herunterreguliert wurden. (C+D) Proteine, die in GEV und KEV nach Apoptose-Induktion nicht eindeutig gleich oder gegenläufig reguliert wurden. Gezeigt wurden Ergebnisse eruiert aus drei unabhängigen Experimenten. Statistische Signifikanz wurde mittels Studentischen T-Test berechnet. GEV: große extrazelluläre Vesikel; KEV: kleine extrazelluläre Vesikel; Log: logarithmisch; D-Ratio: Differenz-Ratio; EV: extrazelluläre Vesikel. Proteine: ACTG1: Protein Gamma-Aktin (ACTG1); ACTB: Protein Beta-Aktin; YWHAQ: Protein 14-3-3 theta; STIP1: Stress-induzierte Phosphoprotein 1; EIF3H: Untereinheit H des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors 3; MYH9: schwere Kette 9 des Myosinproteins; PPP1R7: regulatorische Untereinheit 7 der Phosphatase 1; MVP: Major Vault Protein; EHD3: *eps 15 homology domain-containing* Protein 3; PSMB4: Untereinheit beta Typ-4 des Proteasoms; ECH1: Enoyl-CoA Hydratase 1; SEPT9: Septin9; VDAC1: *voltage-dependent anion selective channel1*; HSPD1: 60 kDa Hitzeschock-Protein1; NACA: *nascent-polypeptide-associated complex alpha polypeptide* Protein; GNB2L1: *guanine nucleotide-binding protein subunit beta2-like1*; PSMA1: Untereinheit Alpha Typ-1 des Proteasoms; ENO1: Alpha-Enolase; PGK1: Phosphoglyceratkinase 1; AHCY: Adenosylhomocysteinase; LAP3: Leucin-Aminopeptidase3; DDB1: *DNS damage-binding* Protein1; GSN: Gelsolin; RPSA: 40S ribosomale Protein SA.

Diese Ergebnisse demonstrieren, dass die Proteinzusammensetzung in verschiedenen EV-Populationen reguliert wird und dabei auch vom Stimulus abhängig ist, unter dem die Vesikel freigesetzt wurden. Dabei spielt die Apoptose-Induktion eine sehr große Rolle und hat zudem einen sehr starken Einfluss darauf, welche Proteine in welche Vesikelpopulationen verpackt werden. Zum Beispiel zeigten einige Proteine wie DDB1, EHD3 und GSN eine hohe und stabile Expression in KEV unabhängig des Stimulus der Apoptose-Induktion.

Daraus könnte man ableiten, dass sich eindeutige Proteine für den Nachweis von speziellen EV-Typen eignen könnten; im Speziellen EHD3 und GSN für KEV. Andererseits konnten Proteine identifiziert werden, die sich ausschließlich in Vesikeln befinden, die

von apoptotischen T-Zellen freigesetzt wurden. Diese Proteine könnten als Marker für EV apoptotischer Zellen genutzt werden. Im Speziellen sind dies die Proteine ACTG1, ACTB und MYH9.

Um dieser Vermutung nachzugehen, wurden mehrere Proteine mittels Western Blot untersucht, um die Ergebnisse der Massenspektrometrie zu bestätigen. Dabei wurden zum einen membranassoziierte Proteine der T-Zell-Rezeptor-Signalkaskade (TZR-Signaling) untersucht: Im Speziellen die Proteine *linker for activation of T cell* (LAT), die Tyrosinkinasen *lymphocyte kinase* (LCK) und *zeta-associated protein 70* (ZAP70) und die Kinasen *extracellular signal-regulated kinase 1* (ERK1), *extracellular signal-regulated kinase 2* (ERK2) und die phosphorylierte Form der ERKs (pERK, s. Abbildung 8A). Des Weiteren wurden Proteine des Aktin-Myosin-Zytoskeletts mit Aktin und Ezrin (s. Abbildung 8B) und Proteine des Proteasoms wie PSMA1, PSMB9 und PSMB10 analysiert (s. Abbildung 8E). Der Hintergrund für die Analyse von Proteasomuntereinheiten (PUE) ging auf die Ergebnisse aus den DIGE-Experimenten mit anschließender Massenspektrometrie zurück. Aus diesen Analysen stammten die PUE PSMA1 und PSMB4, deren Expression stärker war als in KEV. Daraufhin wurden mehrere PUE mittels Western Blot analysiert. PSMA1 wurde hauptsächlich in GEV detektiert und dies sogar verstärkt nach Apoptose-Induktion (s. Abbildung 8E). Dieses Western Blot Expressionsmuster ist im Einklang mit den erzielten DIGE-Ergebnissen. Die PUE beta-9 (PSMB9) und beta-10 (PSMB10) wurden nur in GEV nachgewiesen, die von apoptotischen T-Zellen isoliert wurden. Alle erwähnten Proteine zeigten sich sehr deutlich in GEV exprimiert, mit der Ausnahme von ZAP70, ERK1+2 und PSMA1, die zumeist zusätzlich in apoptotischen KEV detektiert wurden. Dennoch könnte man sagen, dass Proteine des TZR-Signaling, des Zytoskeletts wie auch die Proteasomuntereinheiten relativ spezifisch für GEV zu sein scheinen. Ein weiteres Protein, welches nur in GEV detektiert werden konnte, die von apoptotischen T-Zellen freigesetzt wurde, ist das *high mobility group box* Protein B1 (HMGB1). HMGB1 ist ein Protein, das an der strukturellen Organisation der DNS beteiligt ist. Dieses Protein kann von nekrotischen Zellen oder nach zellulärer Aktivierung freigesetzt werden. Nach seiner Freisetzung in den extrazellulären Raum wirkt es dort als Entzündungsmediator [80]. Interessanterweise konnte HMGB1 nahezu ausschließlich in GEV detektiert werden, die von apoptotischen T-Zellen stammten und scheint in anderen EV-Populationen nicht zu akkumulieren (s. Abbildung 8E).

Schließlich wurden zytosolische und endosomale Proteine mittels Western Blot analysiert, die klassischerweise bei der Identifizierung von Vesikeln als KEV benötigt werden (sogenannte Exosomenmarker [37, 45, 88]). Deshalb wurden die Proteine *tumor susceptibility gene 101 protein* (TSG101), *heat shock protein 70* (HSP70) und die Ubiquitinierung (Ubi) von Proteinen untersucht. Bei der Analyse von KEV, die von aktivier-

ten T-Zellen freigesetzt wurden, zeigten sich die Proteine TSG101 und HSP70 und auch die Protein-Ubiquitinierung als spezifisch für eben diese KEV-Population. Jedoch wurden nach Apoptose-Induktion die Proteine TSG101 und HSP70 hauptsächlich in GEV nachgewiesen, wobei die Protein-Ubiquitinierung in beiden Vesikelpopulationen (GEV und KEV) detektiert werden konnte (s. Abbildung 8C). Diese Ergebnisse belegen, dass TSG101 und HSP70 eben nur in lebenden Zellen als Exosomenmarker genutzt werden können und bisher auch wurden. In den DIGE-Analysen konnte bereits eine spezifische Expression der Mikrotubuli-assoziierten Proteine GSN und EHD3 in KEV beobachtet werden, die sowohl von aktivierten als auch apoptotischen T-Zellen freigesetzt wurden. Diese Ergebnisse konnten per Western Blot bestätigt werden (s. Abbildung 8D), was bestätigt, dass diese Proteine zur Identifikation von KEV genutzt werden können, unabhängig vom Freisetzungstimulus.

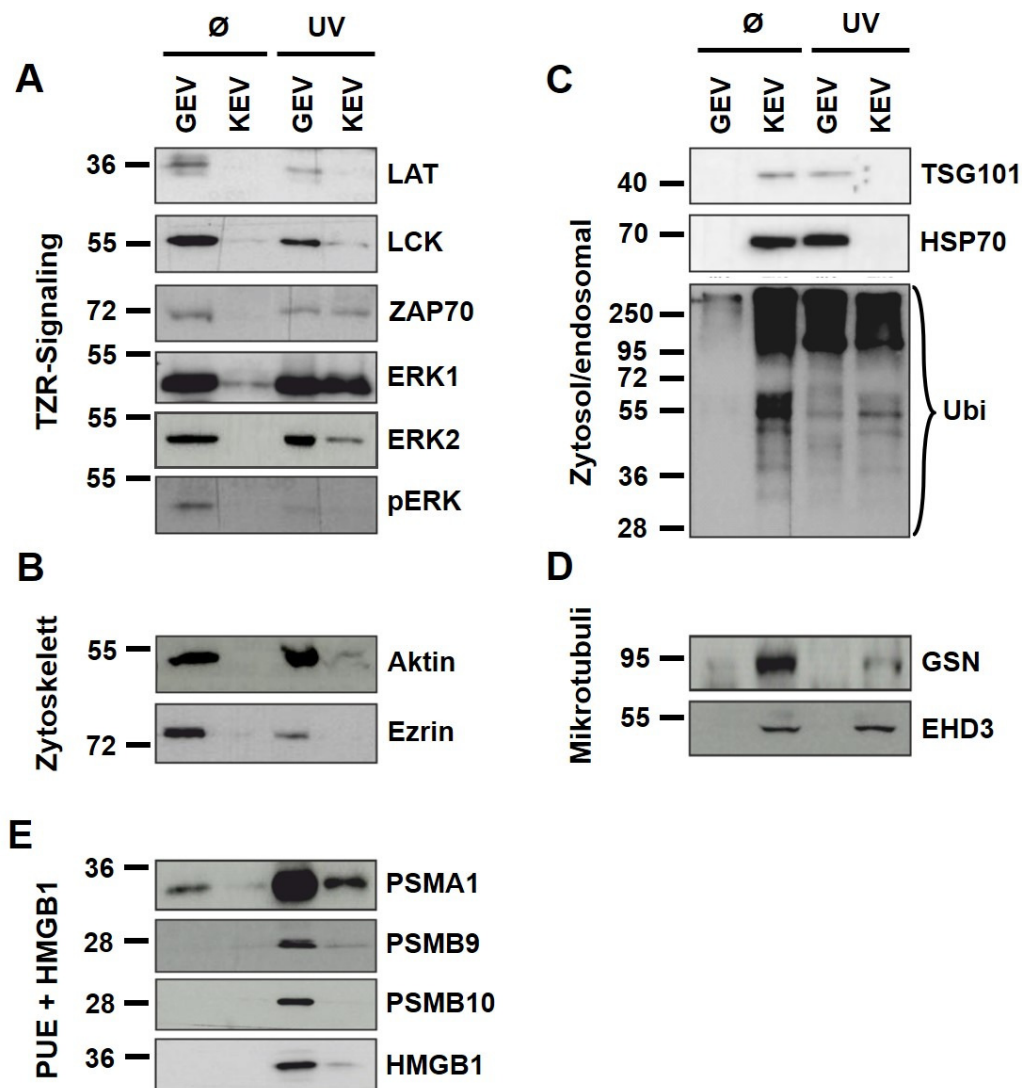


Abbildung 8: **Western Blot Analyse von Proteinen in verschiedenen EV-Populationen.** GEV und KEV wurden von aktivierten T-Zellen (\emptyset) und apoptotischen T-Zellen (UV) isoliert, lysiert und mittels BCA-Assay quantifiziert. 15 μ g pro Probe wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Für jedes nachgewiesene Protein wurde die Membran mit einem spezifischen Erstantikörper gegen das nachzuweisende Protein über Nacht bei 4 °C inkubiert und anschließend mit einem spezifischen HRP-konjugierten Sekundärantikörper, der die Spezies des Erstantikörper erkennt, für 1 h bei RT inkubiert. Die Detektion wurde mittels ECL und Röntgenfilmaufnahme durchgeführt. Analytierte Proteine sind, wie folgt, gruppiert: (A) Proteine, die zum TZR-Signaling gehören, (B) zytoskelettale Proteine, (C) zytosolische und endosomale Proteine, (D) Mikrotubuli zugehörige Proteine und (E) PUE und HMGB1. Gezeigt ist eines aus vier repräsentativen Experimenten. GEV: große extrazelluläre Vesikel; KEV: kleine extrazelluläre Vesikel; UV: UV-B Bestrahlung; BCA: *bicinchoninic acid*; PVDF: Polyvinylidendifluorid; RT: Raumtemperatur; ECL: *enhanced chemiluminescence*; HRP: *horseradish-peroxidase*; PUE: Proteasomuntereinheiten. Proteine: LAT: *linker for activation of T cell*; LCK: *lymphocyte kinase*; ZAP70: *zeta-associated protein 70*; ERK1+2: *extracellular signal-regulated kinase 1+2*; pERK: phosphoryliertes ERK; PSMA1: PUE alpha 1; PSMB9: PUE beta 9; PSMB10: PUE beta 10; HMGB1: *high mobility group box Protein B1*; TSG101: *tumor susceptibility gene 101 protein*; HSP70: *heat shock protein 70*; Ubi: Ubiquitinierung; GSN: Gelsolin; EHD3; *eps 15 homology domain-containing Protein 3*.

5.1.3 Das Proteasom reguliert zum Teil die Freisetzung von GEV

Wie zuvor bereits erwähnt konnten die PUE PSMA1 und PSMB4 in GEV detektiert werden. Des Weiteren konnten die funktionellen, katalytischen PUE PSMB9 und PSMB10 ausschließlich in GEV nachgewiesen werden, die nach Apoptose-Induktion freigesetzt wurden (s. Abbildung 8E). Daher stellte sich die Frage, inwieweit das Proteasom bei dem Freisetzungsmechanismus von GEV apoptotischer T-Zellen beteiligt ist. Um dies zu untersuchen, wurde in T-Zellen Apoptose in Anwesenheit des Proteasominhibitors Bortezomib (bz) induziert. Die Anzahl der freigesetzten GEV wurde dann mittels Durchflusszytometrie analysiert. Gleichzeitig wurde die GEV-Freisetzung apoptotischer T-Zellen untersucht, die mit Y27632 behandelt wurden. Y27632 ist ein Rho-Kinaseinhibitor, von dem bekannt ist, dass es das Abschnüren von Vesikeln an der Plasmamembran blockiert und dadurch die GEV-Freisetzung beeinträchtigt [16, 81]. Durchflusszytometrieanalysen zeigten einen signifikanten Anstieg der GEV-Freisetzung nach Apoptose-Induktion. Dies konnte durch den Einsatz von Bortezomib (s. Abbildung 9A) wie auch durch Y27632 (s. Abbildung 9B) inhibiert werden. Wichtig dabei war, dass die Anzahl an apoptotischen T-Zellen (AxV+/PJ-) durch die Behandlung von Bortezomib nicht beeinträchtigt wurde ($p = 0,07$, s. Abbildung 9C). Ebenso konnte auch keine Veränderung bei der Anzahl der nekrotischen T-Zellen (AxV+/PJ+) beobachtet werden ($p = 0,4$, s. Abbildung 9D). Daraus kann man folgern, dass durch Blockade des Pro-

teasoms die GEV-Freisetzung apoptotischer T-Zellen verringert wurde.

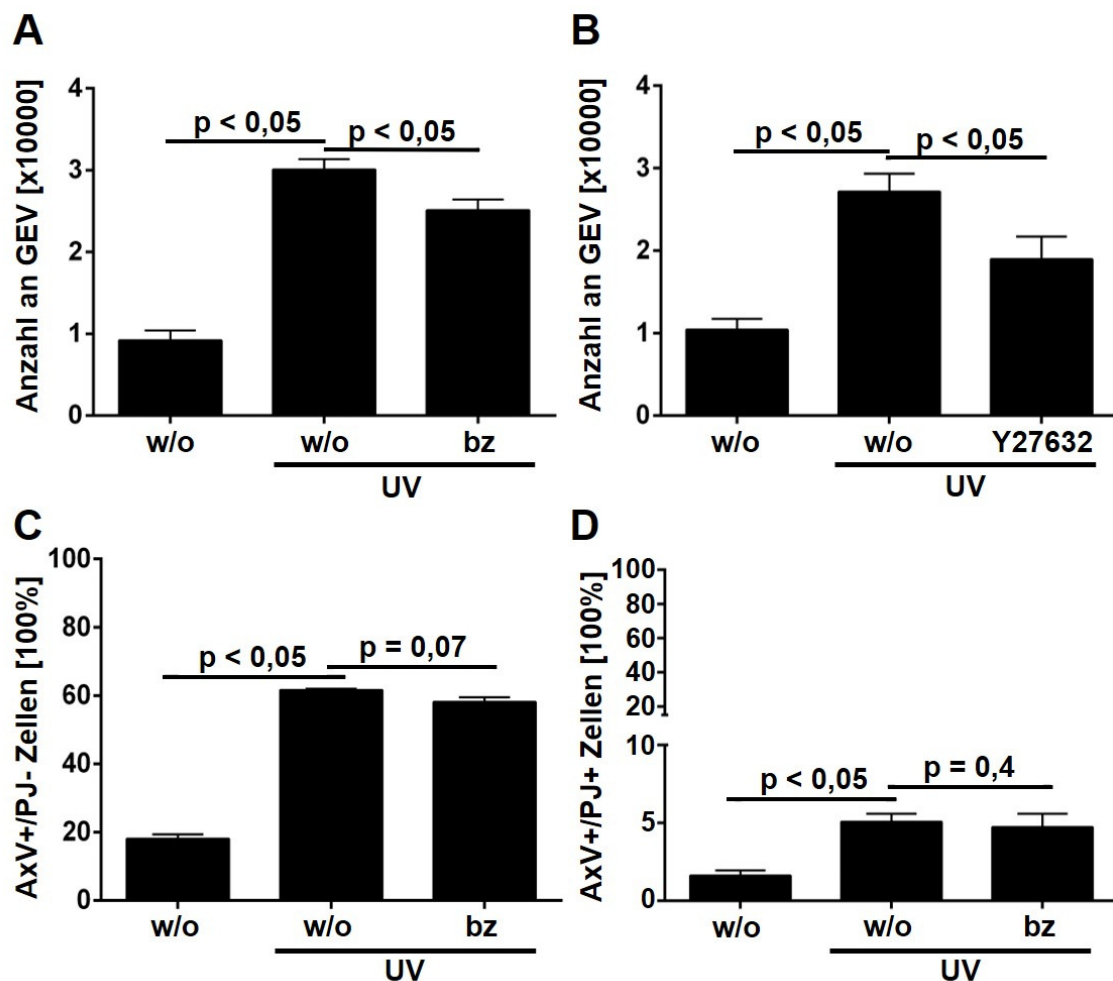


Abbildung 9: Die Freisetzung von GEV wird durch Proteasominhibitor Bortezomib beeinträchtigt. 2×10^6 aktivierte T-Zellen wurden in 2 ml R10-Medium in einer 12-Loch-Platte ausgesät und für 30 s (90 J/cm^2) mit UVB-Strahlung bestrahlt (Apoptose-Induktion) in An-/Abwesenheit von 1 nm bz respektiv $10 \mu\text{M}$ Y27632. Zellen wurden 20 h bei 37°C , 5% CO_2 inkubiert und freigesetzte Vesikel ($< 1 \mu\text{m}$) im Durchflusssystem mit Fokussierung auf Granularität gegen Größe vermessen. Zur Quantifizierung wurden 5×10^5 Vesikel aufgenommen. (A+B) Menge an freigesetzten Vesikeln; Vesikelfreisetzung wurde durch (A) bz bzw. (B) Y27632 blockiert. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM. (C+D) Prozentuale Verteilung (C) apoptotischer (AxV+/PJ-) bzw. (D) nekrotischer T-Zellen (AxV+/PJ+), die mittels AxV/PJ-Färbung quantifiziert wurden. Ergebnisse wurden aus vier unabhängigen Experimenten generiert und die statistische Signifikanz wurde durch den Studentischen T-Test berechnet. GEV: große extrazelluläre Vesikel; bz: Bortezomib; Y27632: *rho-associated coil* Kinase-Inhibitor; AxV: Annexin V; PJ: Propidiumjodid.

Zusammenfassend lässt sich über die Charakterisierung extrazellulärer Vesikel festhalten:

(1) Es handelt sich um zwei klar von einander abgrenzbare Vesikelpopulationen, nämlich GEV und KEV. Morphologisch betrachtet besitzen GEV und KEV eine ovale bis runde Form, zeigen sich als membranumschlossene Vesikel und unterscheiden sich deutlich in ihrer Größe (GEV: 100-530 nm; KEV: 50-220 nm). Der Freisetzungstimulus Apoptose bewirkt sowohl bei GEV als auch bei KEV eine geringe Größenzunahme. Zusätzlich initiiert die Apoptose-Induktion einen richtigen "Boost" in der Vesikelfreisetzung (apoptotische GEV). Betrachtet man den Proteingehalt in den Vesikeln, so gleicht diese der Verteilung der Vesikelkonzentration der freigesetzten Vesikel, wobei im Verhältnis aktivierte KEV am meisten Protein tragen.

(2) Das Proteinexpressionsprofil ist von Vesikeltyp zu Vesikeltyp verschieden. Auch wenn 85% aller untersuchten Proteine keine signifikante Änderung in ihrem Expressionsprofil in Bezug auf ihren Freisetzungstimulus haben (Zell-Aktivierung vs. Apoptose-Induktion), so zeigen 15% signifikante Unterschiede. Aus DIGE-/ Western-Blot-Analysen konnten mögliche Markerproteine für einzelne Vesikeltypen bzw. Vesikelpopulationen identifiziert werden.

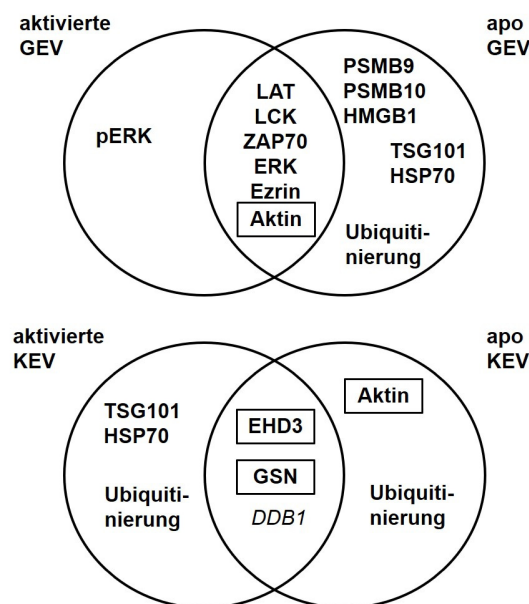


Abbildung 10: **Charakterisierung von EV-Subtypen durch verschiedene Proteinprofile.** Das obere Diagramm zeigt die Verteilung der Proteine charakteristisch für GEV vergleichend für sowohl aktivierte als auch apoptotische GEV. Das Diagramm darunter beschreibt die charakteristische Proteinverteilung für aktivierte und apoptotische KEV. Proteine, die mittels Western Blot identifiziert wurden, sind fett dargestellt, Proteine identifiziert mittels Western Blot und Massenspektrometrie fett und eingerahmt, Proteine identifiziert mittels Massenspektrometrie in kursiv.

5.2 Einfluss extrazellulärer Vesikel auf antigenpräsentierende Zellen

Im Folgenden wurde untersucht, ob EV antigenpräsentierende Zellen in deren Funktion beeinflussen. Dazu wurden aus humanen, primären Monozyten durch Zugabe entsprechender Zytokine (Interleukin-4 (IL-4), *granulocyte macrophage-colony stimulating factor* (GM-CSF)) naive, unreife, dendritische Zellen (DZ) generiert [79]. Diese wurden dann mit EV stimuliert, die entweder aus dem Überstand von aktivierten oder apoptotischen, humanen T-Zellen isoliert wurden. Nach 24 h wurde der DZ-Phänotyp durch Analyse verschiedener Oberflächenmoleküle mittels Durchflusszytometrie betrachtet und die Funktionalität der DZ durch Analyse der sezernierten Zytokine untersucht. Die Zytokinanalyse erfolgte mittels *cytometric bead array* (CBA).

Durchflusszytometrieanalysen, bei denen DZ mit aktivierten EV, freigesetzt von aktivierten T-Zellen, stimuliert wurden, zeigten einen deutlichen Expressionsanstieg für das Oberflächenmolekül CD83 (s. Abbildung 11), den klassischen Reifungsmarker für DZ. Sowohl KEV- als auch GEV-Stimulation bewirkten einen signifikanten Anstieg der CD83-Expression (KEV: $p < 0,05$; GEV: $p < 0,05$). Ferner bedingte KEV im Vergleich mit GEV einen stärkeren Anstieg der CD83-Expression ($p < 0,05$). Des Weiteren wurden die kostimulatorischen Oberflächenmoleküle CD80 und CD86 wie auch der Oberflächenmarker CD274, *programmed death-ligand 1* (PD-L1) analysiert. Durch KEV- als auch GEV-Stimulation stieg die CD80-Expression signifikant an (KEV: $p < 0,05$ (hellblauer Balken); GEV: $p < 0,05$ (hellgrüner Balken), s. Abbildung 11). Dennoch bewirkten KEV im Vergleich mit GEV keinen stärkeren Anstieg der CD80-Expression ($p = 0,06$). Für CD86 konnte sowohl durch KEV- als auch GEV-Stimulation ein signifikanter Expressionsanstieg beobachtet werden (KEV: $p < 0,05$ (hellblauer Balken); GEV: $p < 0,05$ (hellgrüner Balken), s. Abbildung 11). Dabei bewirkten KEV im Vergleich mit GEV einen stärkeren Anstieg der CD86-Expression ($p < 0,05$). Bei der Analyse des Oberflächenmarkers CD274 bewirkte die KEV- als auch GEV-Stimulation einen äquivalent signifikanten Anstieg der CD274-Expression (KEV: $p < 0,05$ (hellblauer Balken); GEV: $p = 0,052$ (hellgrüner Balken), s. Abbildung 11). Zudem zeigten KEV im Vergleich mit GEV keinen signifikanten Expressionsanstieg für CD274 ($p = 0,16$). Die beobachteten Expressionsanstiege für CD83, CD80, CD86 und CD274 waren jedoch geringer als der von DZ, die mit Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert wurden (s. Abbildung 11). LPS ist ein mikrobieller Stimulus, der zur Induktion der Reifung von konventionellen, naiven DZ eingesetzt wird. Interessanterweise zeigten DZ, die mit aktivierten EV stimuliert wurden, eine deutliche Reduktion in der Expression des Oberflächenmoleküls *major histocompatibility complex class II* (MHC-Klasse II, s. Abbildung 11, HLA-DR). Dabei zeigte die GEV-Stimulation eine signifikante Reduktion der MHC-Klasse II-Antigendichte {*mean fluorescence intensity* (MFI) $p < 0,05$; hellgrüner Balken, s. Abbildung 11}. Die Herabregulation nach KEV-Stimulation war

statistisch nicht signifikant ($p = 0,42$; hellblauer Balken, s. Abbildung 11) und deutlich geringer im Vergleich zu GEV ($p < 0,05$). MHC-Klasse II wird normalerweise in Folge der DZ-Reifung (Expressionsanstieg von CD83, CD80 und CD86) hochreguliert und ist an der Antigenpräsentation beteiligt, indem es prozessierte Antigene eines Pathogens auf reifen DZ naiven T-Zellen präsentiert [94]. Dadurch wird eine spezifische und zielgerichtete T-Zellantwort für das vorliegende Pathogen ausgelöst [94].

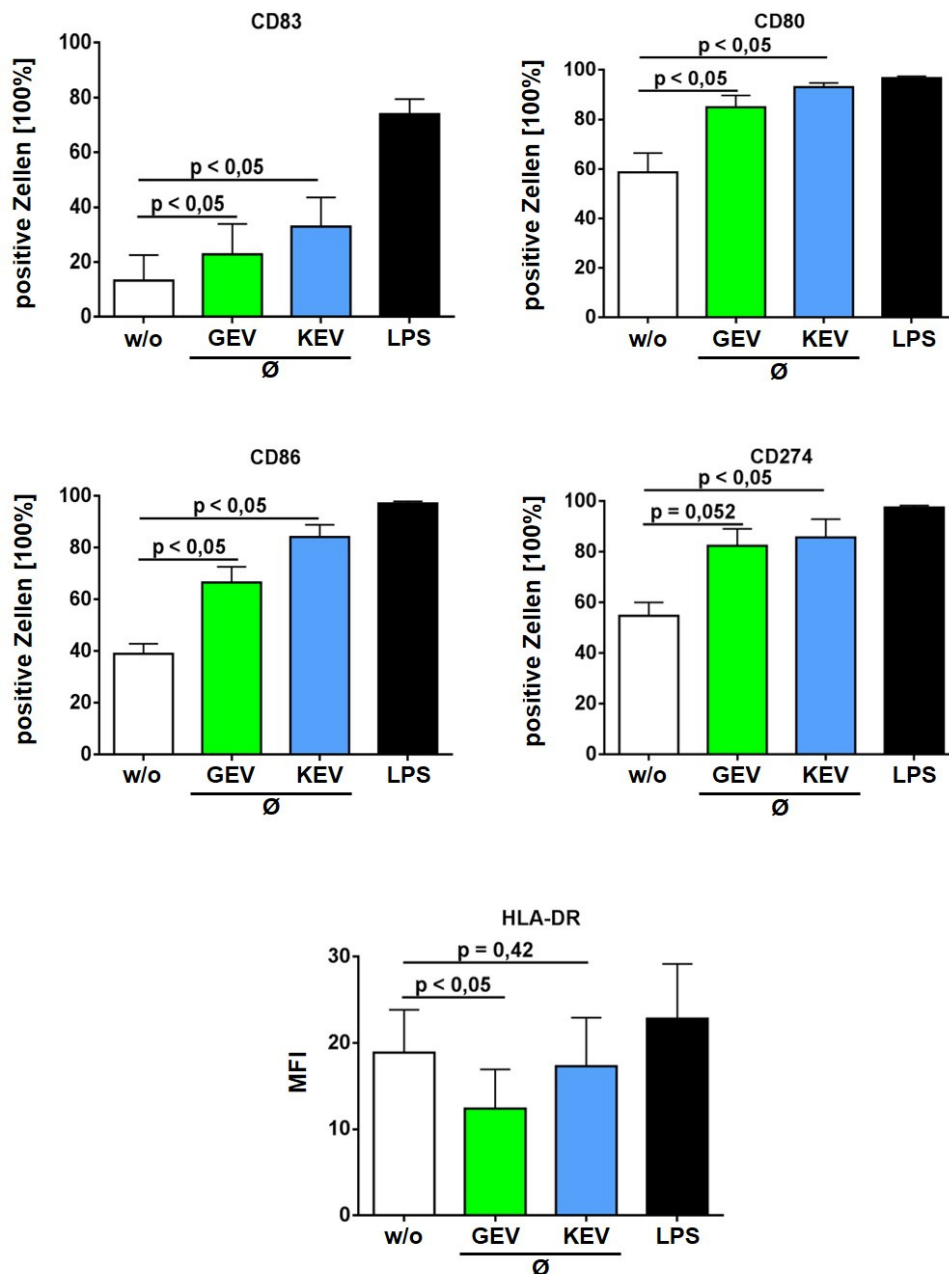


Abbildung 11: **Aktivierte GEV/KEV führen zu einer moderaten DZ-Reifung.** Naive, unreife DZ wurden aus primären Monozyten über 6 Tage durch Stimulation mit IL-4

(500 IU/ml) und GM-CSF (1000 IU/ml) generiert. Aktivierte GEV und KEV (\emptyset) wurden 20 h nach T-Zell-Aktivierung mittels differentieller UZ isoliert. 10^6 unreife, naive DZ (w/o) wurden in 1 ml EV-depletiertem R10-Medium in einer 24-Loch-Platte ausgesät und entweder mit 200 ng LPS (in Schwarz, Positivkontrolle) oder mit 75 μ g aktivierten GEV (in Hellgrün)/KEV (in Hellblau) 24 h, 37 °C, 5% CO₂ inkubiert. Stimulierte DZ wurden per Durchflusszytometrie auf Oberflächenmarker (CD83, CD80, CD86, CD274, HLADR) untersucht (Auswertung: 1×10^4 lebende Zellen). Für CD83, CD80, CD86 und CD274 wurde der prozentuale Anteil für das jeweilige Oberflächenmolekül positiver Zellen dargestellt, sowie der geometrische Mittelwert für HLA-DR. Daten wurden aus acht unabhängigen Experimenten generiert (Mittelwerte + SEM). Die statistische Signifikanz wurde durch den Studentischen T-Test berechnet. GEV: große extrazelluläre Vesikel; KEV: kleine extrazelluläre Vesikel; DZ: dendritische Zellen; IL-4: Interleukin-4; GM-CSF: *granulocyte macrophage-colony stimulating factor*; UZ: Ultrazentrifugation; w/o: unbehandelte, naive, unreife DZ; EV: extrazelluläre Vesikel; LPS: Lipopolysaccharid; HLA-DR: *human leukocyte antigen-DR = MHC-Klasse II (major histocompatibility complex class II)*; MFI: *mean fluorescence intensity*.

Im Vergleich dazu wurden DZ mit EV, die von apoptotischen T-Zellen freigesetzt wurden, stimuliert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Ähnlich wie zuvor bei der Stimulation mit aktivierten EV, ließen sich auch hier deutliche Expressionszunahmen für CD83, CD80, CD86 und CD274 beobachten, jedoch geringer als wenn DZ mit LPS stimuliert wurden (s. Abbildung 12). Somit bewirkten sowohl KEV- als auch GEV-Stimulation einen signifikanten Anstieg der CD83-Expression (KEV: $p < 0,05$ (dunkelblauer Balken); GEV: $p < 0,05$ (dunkelgrüner Balken), s. Abbildung 12). Des Weiteren beeinflussten KEV im Vergleich mit GEV einen stärkeren Anstieg der CD83-Expression ($p < 0,05$). Auch für CD80 stieg die Expression durch Stimulation mit GEV an ($p = 0,056$, dunkelgrüner Balken), wohingegen Stimulation mit KEV zu einem deutlicheren und signifikanten Expressionsanstieg von CD80 führte ($p < 0,05$, dunkelblauer Balken, s. Abbildung 12). Ferner bewirkten KEV im Vergleich mit GEV einen stärkeren Anstieg der CD80-Expression ($p < 0,05$). Für CD86 konnte sowohl durch KEV- als auch GEV-Stimulation ein signifikanter Expressionsanstieg beobachtet werden (KEV: $p < 0,05$ (dunkelblauer Balken); GEV: $p < 0,05$ (dunkelgrüner Balken), s. Abbildung 12), wobei KEV im Vergleich zu GEV die CD86-Expression nicht signifikant beeinflussten ($p = 0,051$). Bei der Analyse des Oberflächenmarkers CD274 bewirkte die KEV- als auch GEV-Stimulation keinen signifikanten Anstieg der CD274-Expression (KEV: $p = 0,07$ (dunkelblauer Balken); GEV: $p = 0,058$ (dunkelgrüner Balken), s. Abbildung 12). Zudem zeigten KEV im Vergleich mit GEV keinen signifikanten Expressionsanstieg für CD274 ($p = 0,4$). Auch hier konnte eine deutliche Reduktion in der MHC-Klasse II-Antigendichte (MFI) nachgewiesen werden. Diese war signifikant reduziert nur nach GEV-Stimulation und nicht nach KEV-Stimulation (GEV: $p < 0,05$ (dunkelgrüner Bal-

ken); KEV: $p = 0,05$ (dunkelblauer Balken), s. Abbildung 12). Ferner bewirkten GEV im Vergleich zu KEV eine deutlich stärkere MHC-Klasse II-Reduktion ($p < 0,05$).

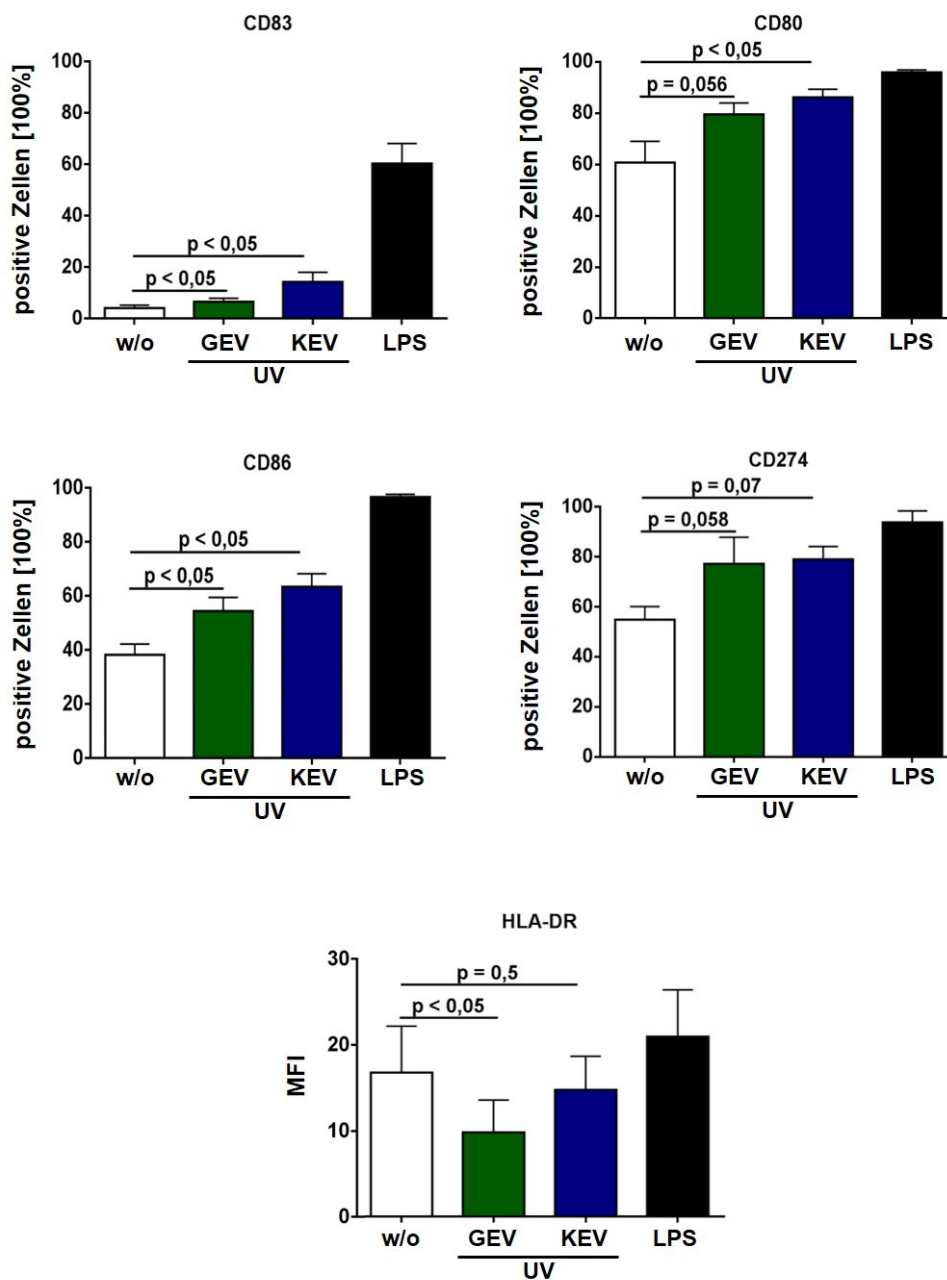


Abbildung 12: **Apoptotische GEV/KEV führen zu einer moderaten DZ-Reifung.** Naive, unreife DZ wurden aus primären Monozyten über 6 Tage durch Stimulation mit IL-4 (500 IU/ml) und GM-CSF (1000 IU/ml) generiert. Aktivierte T-Zellen wurden 30 s (90 J/cm^2) mit UVB-Strahlung bestrahlt (Apoptose-Induktion) um apoptotische GEV bzw. KEV (UV) zu erhalten. Nach 20-stündiger Inkubation wurden apoptotische GEV/KEV mittels differentieller UZ isoliert. 10^6 unreife, naive DZ (w/o) wurden in 1 ml EV-depletiertem R10-Medium in einer 24-Loch-Platte ausgesät und entweder mit

200 ng LPS (in Schwarz, Positivkontrolle) oder mit 75 μ g apoptotischen GEV (in Dunkelgrün)/KEV (in Dunkelblau) 24 h, 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Stimulierte DZ wurden per Durchflusszytometrie auf Oberflächenmarker (CD83, CD80, CD86, CD274, HLADR) untersucht (Auswertung: 1 x 10⁴ lebende Zellen). Für CD83, CD80, CD86 und CD274 wurde der prozentuale Anteil für das jeweilige Oberflächenmolekül positiver Zellen dargestellt, sowie der geometrische Mittelwert für HLA-DR. Daten wurden aus acht unabhängigen Experimenten generiert (Mittelwerte + SEM). Die statistische Signifikanz wurde durch den Studentischen T-Test berechnet. GEV: große extrazelluläre Vesikel; KEV: kleine extrazelluläre Vesikel; DZ: dendritische Zellen; IL-4: Interleukin-4; GM-CSF: *granulocyte macrophage-colony stimulating factor*; UZ: Ultrazentrifugation; w/o: unbehandelte, naive, unreife DZ; EV: extrazelluläre Vesikel; LPS: Lipopolysaccharid; HLA-DR: *human leukocyte antigen-DR* = MHC-Klasse II (*major histocompatibility complex class II*); MFI: *mean fluorescence intensity*.

Über die Stimulation von DZ mit EV mit Bezug auf die Expression der untersuchten Oberflächenmoleküle konnte festgestellt werden, dass EV einen Einfluss auf DZ ausüben. Dieser Einfluss zeigte sich in einem Anstieg der Expression der kostimulatorischen Oberflächenproteine, jedoch jeweils geringer als bei der Positivkontrolle. Am interessantesten war die Herunterregulation von MHC-Klasse II-Molekülen. Ebenfalls zeigte sich, dass es keinen Unterschied machte, ob mit aktivierten EV oder apoptotischen EV stimuliert wurde.

Nach der Stimulation mit EV oder LPS sezernierten DZ proinflammatorische Zytokine wie beispielsweise Interleukin-6 (IL-6), Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) oder Interferon-gamma (IFN- γ). Proinflammatorische Zytokine werden von Zellen freigesetzt, um weitere Responderzellen zu beeinflussen [47, 100]. Dabei spielt bei den DZ die Sekretion des Zytokins Interleukin-12p70 (IL-12p70) eine entscheidende Rolle bei nachfolgenden T-Zell-Aktivierungsprozessen [109]. Für die Analyse des Zytokinprofils der DZ, die entweder mit aktivierten bzw. apoptotischen EV oder mit LPS stimuliert wurden, wurde eine CBA-Multiplex-Analyse (*cytometric bead array*, CBA) durchgeführt. Das Zytokinprofil der stimulierten DZ gab Aufschluss über die funktionellen Eigenschaften dieser DZ. Analysiert wurden in den Zellkulturüberständen der stimulierten DZ die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-12p40, IL-12p70, IL-6, IL-8, TNF- α und IFN- γ , sowie das antiinflammatorische Zytokin IL-10. Die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6, TNF- α und IFN- γ zeigten eine deutliche Zunahme durch LPS-Stimulation bei DZ, im Vergleich zu unstimulierten DZ (s. Abbildung 13). Ebenso führte die LPS-Stimulation zu einer erhöhten Freisetzung des Zytokins IL-12p70 und seiner Vorstufe IL-12p40.

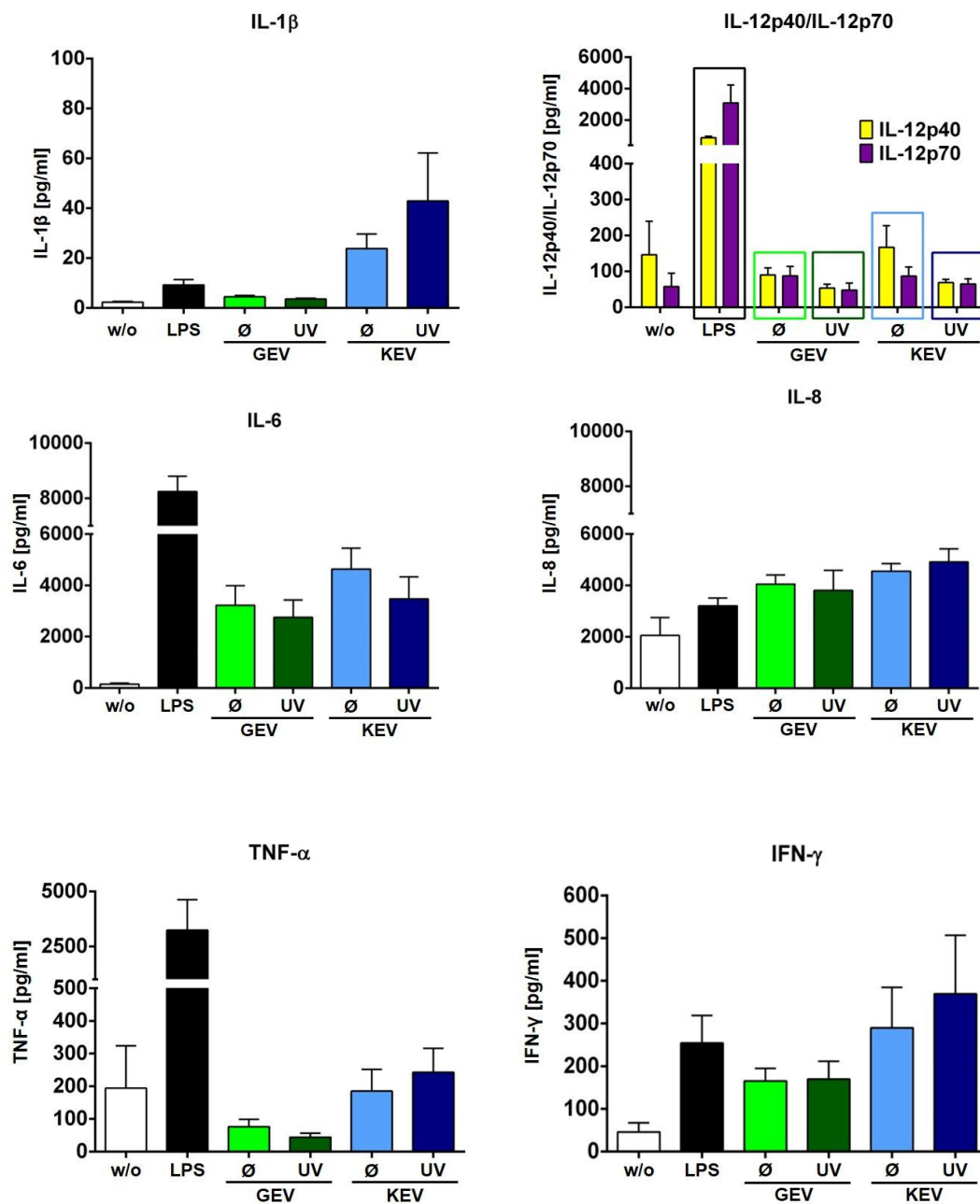


Abbildung 13: **Proinflammatorisches Zytokinprofil von EV-stimulierten DZ.** Naive, unreife DZ wurden aus primären Monozyten über 6 Tage durch Stimulation mit IL-4 (500 IU/ml) und GM-CSF (1000 IU/ml) generiert. Aktivierte GEV/KEV wurden von aktivierten T-Zellen, hingegen apoptotische GEV/KEV wurden von apoptotischen T-Zellen (Apoptose-Induktion durch UV-B Bestrahlung: 30 s, 90 J/cm²) isoliert. Nach 20-stündiger Inkubation wurden aktivierte bzw. apoptotische GEV/KEV mittels differentieller UZ isoliert. 10⁶ unreife, naive DZ (w/o) wurden in 1 ml EV-depletiertem R10-Medium in einer 24-Loch-Platte ausgesät und entweder mit 200 ng LPS (in Schwarz, Positivkontrolle) oder mit 75 µg aktivierter GEV (in Hellgrün)/KEV (in Hellblau) oder apoptotischer GEV (in Dunkelgrün)/KEV (in Dunkelblau) 24 h, 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert.

Stimulierte DZ wurden vom ÜS per Zentrifugation (2000 rpm, 5 min, RT) getrennt und der ÜS mittels CBA-Multiplexanalyse an einem LSR-Durchflusszytometer quantifiziert (Auswertung: 500-1000 "Events" pro Probe aufgenommen). Daten wurden aus acht unabhängigen Experimenten generiert (Mittelwerte + SEM). Die statistische Signifikanz wurde durch den Studentischen T-Test berechnet. EV: extrazelluläre Vesikel; GEV: große extrazelluläre Vesikel; KEV: kleine extrazelluläre Vesikel; DZ: dendritische Zellen; IL-4: Interleukin-4; GM-CSF: *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*; UZ: Ultrazentrifugation; w/o: unbehandelte, naive, unreife DZ; LPS: Lipopolysaccharid; ÜS: Überstand von stimulierten DZ; RT: Raumtemperatur; CBA: *cytometric bead array*. Zytokine: IL-1 β : Interleukin-1 β ; IL-12p40/p70: Interleukin-12p40/p70; IL-6: Interleukin-6; IL-8: Interleukin-8; TNF- α : Tumornekrosefaktor- α ; IFN- γ : Interferon- γ .

Die Stimulation mit aktivierten als auch apoptotischen EV führte zu keiner Änderung der basalen Sekretion von IL-12p40 als auch IL-12p70 (s. Abbildung 13). Die Sekretion von IL-1 β blieb durch Stimulation mit GEV (grüne Kästen) unverändert verglichen mit unstimulierten DZ und zeigte sich durch Stimulation mit KEV stärker beeinflusst (blaue Kästen, s. Abbildung 13). Bei der Analyse des Zytokins IL-6 zeigte sich eine Zunahme verglichen mit dem Mock (w/o-Kontrolle, weißer Balken, s. Abbildung 13), wenn mit aktivierten als auch apoptotischen EV stimuliert wurde. Das Zytokin IL-8 wies eine Konzentrationszunahme auf verglichen mit unstimulierten als auch LPS-stimulierten DZ. Bei der Analyse des Zytokins TNF- α zeigte sich keine Zunahme verglichen mit unstimulierten DZ. Das Zytokin IFN- γ wies keinen Sekretionsunterschied beim Vergleich von DZ auf, die mit Vesikeln oder LPS stimuliert wurden (s. Abbildung 13).

Das antiinflammatorische Zytokin IL-10 wurde verstärkt nach Stimulation mit LPS sezerniert. Die Stimulation mit aktivierten als auch apoptotischen Vesikeln führte zu keiner Veränderung der Sekretion verglichen mit unstimulierten DZ (s. Abbildung 14).

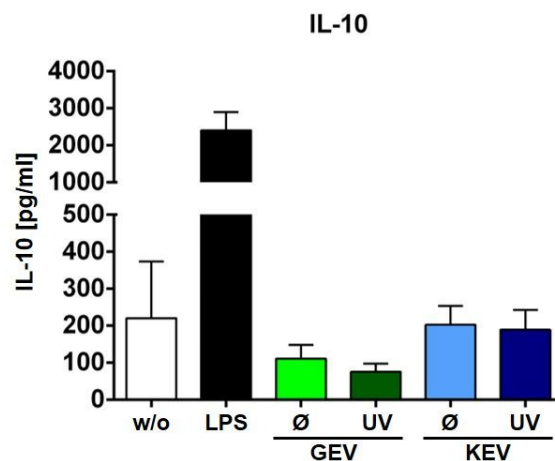


Abbildung 14: Antiinflammatorisches Zytokinprofil von EV-stimulierten DZ. Naive, unreife DZ wurden aus primären Monozyten über 6 Tage durch Stimulation mit IL-4 (500 IU/ml) und GM-CSF (1000 IU/ml) generiert. Aktivierte GEV/KEV wurden von aktivierten T-Zellen, hingegen apoptotische GEV/KEV wurden von apoptotischen T-Zellen (Apoptose-Induktion durch UV-B Bestrahlung: 30 s, 90 J/cm²) isoliert. Nach 20-stündiger Inkubation wurden aktivierte bzw. apoptotische GEV/KEV mittels differentieller UZ isoliert. 10⁶ unreife, naive DZ (w/o) wurden in 1 ml EV-depletiertem R10-Medium in einer 24-Loch-Platte ausgesät und entweder mit 200 ng LPS (in Schwarz, Positivkontrolle) oder mit 75 µg aktivierter GEV (in Hellgrün)/KEV (in Hellblau) oder apoptotischer GEV (in Dunkelgrün)/KEV (in Dunkelblau) 24 h, 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Stimulierte DZ wurden vom ÜS per Zentrifugation (2000 rpm, 5 min, RT) getrennt und der ÜS mittels CBA-Multiplexanalyse an einem LSR-Durchflusszytometer quantifiziert (Auswertung: 500-1000 "Events" pro Probe aufgenommen). Daten wurden aus acht unabhängigen Experimenten generiert (Mittelwerte + SEM). Die statistische Signifikanz wurde durch den Studentischen T-Test berechnet. EV: extrazelluläre Vesikel; GEV: große extrazelluläre Vesikel; KEV: kleine extrazelluläre Vesikel; DZ: dendritische Zellen; IL-4: Interleukin-4; GM-CSF: *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*; UZ: Ultrazentrifugation; w/o: unbehandelte, naive, unreife DZ; LPS: Lipopolysaccharid; ÜS: Überstand von stimulierten DZ; RT: Raumtemperatur; CBA: *cytometric bead array*; IL-10: Interleukin-10.

Über die Zytokinsekretion der stimulierten DZ konnte beobachtet werden, dass auch hier ein Einfluss der EV auf DZ ersichtlich war. Vor allem bei den proinflammatorischen Zytokinen zeigten sich zum Teil deutliche Einflüsse, aber nicht bei allen untersuchten Zytokinen. Dabei machte es einen Unterschied, mit welcher Vesikelpopulation, also GEV oder KEV, aber keinen Unterschied, ob mit aktivierten oder apoptotischen Vesikeln stimuliert wurde. Da nicht alle proinflammatorischen Zytokine eine Aktivierung durch Stimulation aufwiesen, kann man nicht von einem proinflammatorischen Zytokinprofil sprechen.

5.3 Charakterisierung extrazellulärer Vesikel von Patienten (SLE, VAS, RA)

Bisher konnte gezeigt werden, dass die Freisetzung von EV sowohl durch die Aktivierung von Zellen als auch durch Apoptose-Induktion in diesen eingeleitet werden kann. Dabei wurde deutlich, dass durch Apoptose-Induktion signifikant mehr Vesikel freigesetzt wurden im Vergleich zur Aktivierung (s. Punkt 5.1 Abbildung 4B). Für die Entstehung des Systemischen Lupus erythematoses (SLE) sind eine fehlregulierte Apoptose und eine verminderte Beseitigung apoptotischer Zellen zentrale pathogene Faktoren [31, 60, 71]. Daher schien es interessant, die Freisetzung der EV auch bei SLE-Patienten zu untersuchen. Um die erhobenen Analysen richtig interpretieren zu können, wurden neben EV, isoliert von T-Zellen aus dem Blut von SLE-Patienten, auch solche von Patienten mit Rheumatoider Arthritis (RA), Vaskulitis (VAS) als auch von gesunden Spendern (*normal healthy donors*, NHD) analysiert. Der Vergleich von SLE-Patienten mit anderen Patienten, bei denen eine systemische Inflammation vorliegt, ist insbesondere wichtig, um zu erkennen, ob beobachtete Phänomene spezifisch für den SLE sind (und nicht Ausdruck der systemischen Entzündung).

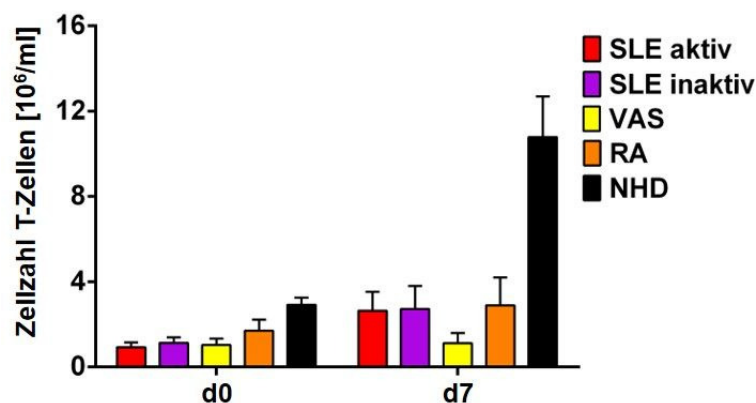


Abbildung 15: **T-Zellzahlen von SLE, VAS, RA und Normalspender an d0 und d7.** PBMZ wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation aus humanem Primärblut von SLE-,VAS-,RA-Patienten und NHD isoliert. Die Zellen wurden mittels 1 μ g/ml PHA- und 500 U/ml IL-2-Stimulation für 7 d zu aktivierten T-Zellen expandiert. Zellzahlen wurden an d0 und d7 mittels Trypanblau-Ausschluss-Färbung ermittelt. Aktive SLE-Patienten wiesen eine hohe Krankheitsaktivität auf (SLEDAI \geq 6); inaktive SLE-Patienten wiesen eine niedrige Krankheitsaktivität auf oder waren in Remission (SLEDAI \leq 4). Gezeigt sind die Mittelwerte + SEM von 6 unabhängigen Experimenten (RA=4). SLE: Systemischer Lupus erythematoses; VAS: Vaskulitis; RA: Rheumatoide Arthritis; PBMZ: periphere, mononukleare Zellen des Blutes; NHD: Normalspender; PHA: Phytohämagglutinin; IL-2: Interleukin-2; SLEDAI: *systemic lupus erythematosus disease activation index*.

Nach Generation von aktivierten T-Zellen (Lymphoblasten) [46, 81] zeigten sich deutliche Unterschiede in den T-Zellzahlen beim Vergleich von Patienten und gesunden Spendern (s. Abbildung 15). Normalspender (schwarze Balken) hatten bereits am Tag der Isolation (d0) zwei- bis dreimal so viele T-Zellen verglichen mit den Patienten SLE (rote/lilane Balken), RA (orange Balken) und VAS (gelbe Balken). Kurz vor Isolation der EV an d7 hatte sich die Zahl der T-Zellen bei Patienten nahezu verdreifacht (ausgenommen VAS-Patienten, gelbe Balken), während sich bei Normalspender eine Vervierfachung der T-Zellzahlen zeigte (schwarze Balken, s. Abbildung 15).

Die Isolation der EV von SLE-RA-VAS-Patienten und Normalspendern erfolgte wie bereits in Punkt 5.1.1 beschrieben, jedoch mit einer kleinen Anpassung. Bei gesunden Normalspendern war man bisher bei seinen erzielten Zellzahlen nicht limitiert, so dass die generierten Lymphoblasten ein normales Proliferationswachstum aufwiesen. Dies war bei den Lymphoblasten von Patienten nicht gegeben, wie bspw. bei VAS-Patienten (gelbe Balken, s. Abbildung 15). Zum Einen hatten Patienten durch ihre Erkrankung bzw. ihrer medikamentösen Therapie bereits zu Beginn geringere Zellzahlen, zum Anderen zeigten sich isolierte Zellen während der Kultivierung vermindert proliferativ (s. Abbildung 15). Um das beschriebene Isolationsschema von EV beizubehalten wurde ein zusätzlicher Aspekt mit einbezogen. Bisher wurden für die EV-Generierung 1×10^8 aktivierte T-Zellen in 30 ml EV-depletierten R10-Medium pro Zellkulturschale ausgesät auf einer Fläche von $63,62 \text{ cm}^2$. Das entsprach einer Zelldichte von $1,6 \times 10^6$ Zellen/ cm^2 . Durch Einbeziehung der Fläche war es möglich dieses Schema einheitlich auf alle generierten Lymphoblasten anzuwenden. So wurden unter anderem bei gleichbleibender Zelldichte auch $1,5 \times 10^7$ aktivierte T-Zellen in 5 ml EV-depletierten R10-Medium pro Loch in einer 6-Loch-Platte ausgesät oder 3×10^6 aktivierte T-Zellen in 1 ml pro Loch in einer 24-Loch-Platte. Da sich aktivierte T-Zellen im Vergleich zu apoptotischen T-Zellen während der Inkubationszeit von 20 h noch einmal verdoppelten, lag die Zelldichte bei der apoptotischen EV-Generierung bei $3,1 \times 10^6$ aktivierter T-Zellen (Aussaat: doppelte Zellzahl bei gleichbleibenden Volumen). Durch die einheitliche Zelldichte bei der Aussaat der EV-Generierung konnte so das Paradigma gleiche Menge EV aus gleicher Menge an T-Zellen gewährleistet und aufrecht erhalten werden.

Am Isolationstag (d7) wiesen alle humanen EV-Gruppen ein einheitliches Vitalitätsmuster der T-Zellen auf. Aktivierte T-Zellen zeigten sich zu nahezu 85 % AxV negativ und PJ negativ (AxV-/PJ-, s. Abbildung 16A). Der Anteil von apoptotischen T-Zellen (AxV+/PJ-) lag bei etwa 10 % und von nekrotischen T-Zellen bei circa 5 % (AxV+/PJ+, s. Abbildung 16A). Nach der Apoptose-Induktion versechsfachte sich die Menge der AxV positiven und PJ negativen T-Zellen (AxV+/PJ-, s. Abbildung 16B). Prozentual stieg die Zahl nekrotischer T-Zellen nur leicht um circa 0,9 % an (AxV+/PJ+ s. Abbildung 16B). Hier zeigten die Zellen aller Probanden ähnliche Ergebnisse.

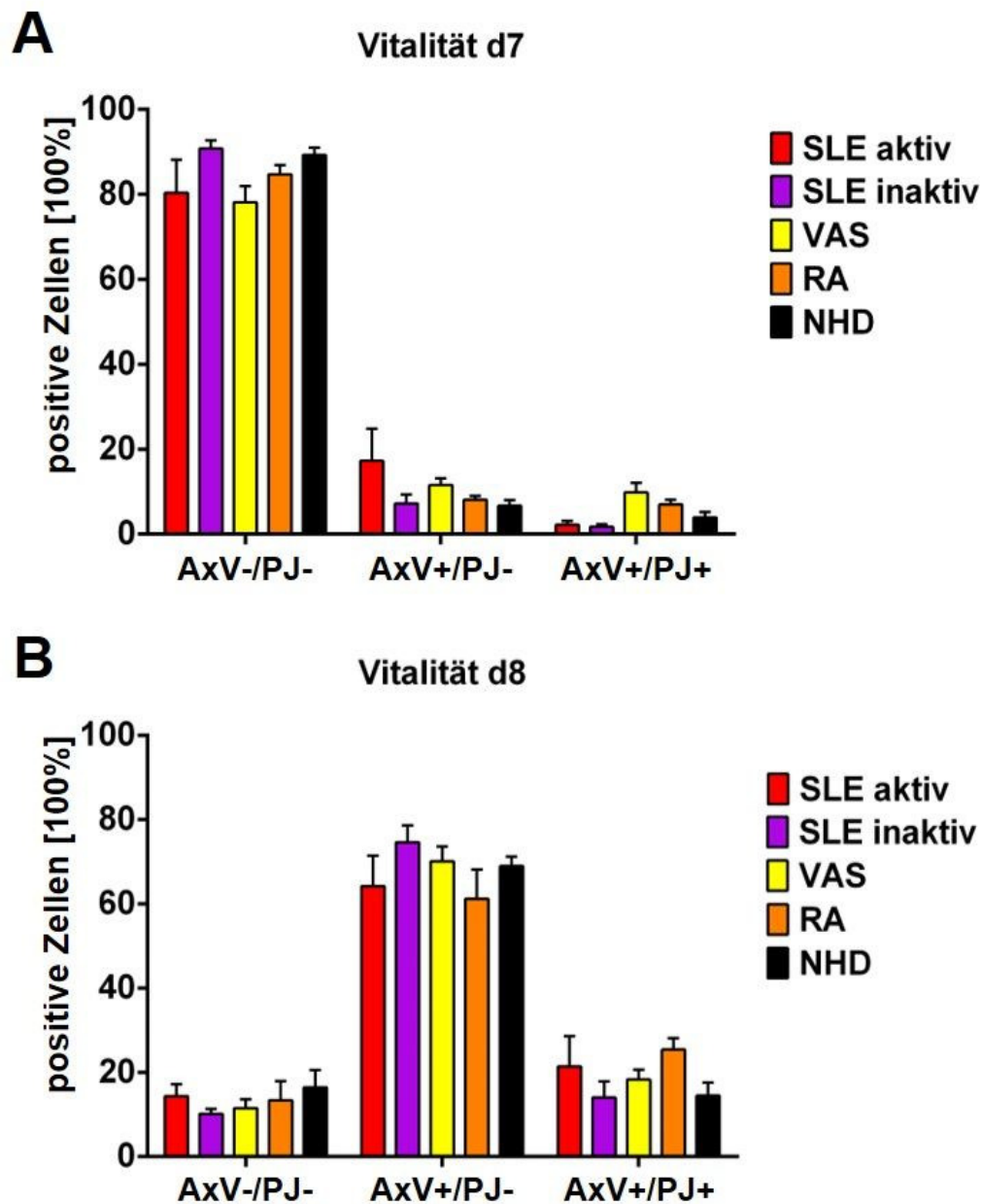


Abbildung 16: **T-Zellvitalität von SLE, VAS, RA und NHD.** PBMZ von SLE-, VAS-, RA-Patienten und NHD wurden mittels 1 $\mu\text{g/ml}$ PHA- und 500 U/ml IL-2-Stimulation für 7 d zu aktivierten T-Zellen expandiert. Aktivierte T-Zellen wurden an d7 mit UV-B Strahlen (90 J/cm^2 , 30 s) bestrahlt (Apoptose-Induktion). Vitalität der T-Zellen wurde an d7 (aktivierte T-Zellen) und an d8 (apoptotische T-Zellen), jeweils nach 20 h, 37°C , 5% CO_2 inkubiert, mittels AxV/PJ-Färbung und Durchflusszytometrie analysiert. Aktive SLE-Patienten wiesen einen (SLEDAI ≥ 6) auf, inaktive einen (SLEDAI ≤ 4). Gezeigt sind die Mittelwerte + SEM von 6 unabhängigen Experimenten (RA=4). SLE: Systemischer Lupus erythematosus; VAS: Vaskulitis; RA: Rheumatoide Arthritis; PBMZ: periphere, mononukleare Zellen des Blutes; NHD: Normalspender; PHA: Phytohämagglutinin; IL-2: Interleukin-2; SLEDAI: *systemic lupus erythematosus disease activation index*.

Gesammelte EV wurden mittels NTA und Western Blot analysiert. Abbildung 17 zeigt in jeder Zeile jeweils einen repräsentativen Größenverteilungsgraphen einer NTA-Analyse eines Patienten (SLE aktiv (rot) oder inaktiv (lila), RA (orange), VAS (gelb)) bzw. Normalspenders (schwarz) und in jeder Spalte die verschiedenen isolierten Vesikelpopulationen (aktivierte GEV in Hellgrün, apoptotische GEV in Dunkelgrün, aktivierte KEV in Hellblau und apoptotische KEV in Dunkelblau). Dabei besteht jeder Graph aus drei unterschiedlichen Einzelmessungen einer experimentellen Probe (= Spender bzw. Patient). Die NTA-Software kumuliert die gemessenen Einzelmessungen und erstellt einen Graphen mit einer gemittelten Größenverteilung (dünne schwarze Linie) und angezeigten Abweichungen (rote "Wolke" um schwarze Linie). Aktive SLE-Patienten zeigten eine hohe Krankheitsaktivität (SLEDAI ≥ 6) im Gegensatz zu inaktiven SLE-Patienten (SLEDAI ≤ 4).

Bei dem aktiven SLE-Patienten (rot) zeigten sich aktivierte GEV in einer durchschnittlichen Größe von 397,1 nm bei einer vorliegenden Konzentration von $3,68 \times 10^6$ Vesikel/ml, apoptotische GEV mit einer durchschnittlichen Größe von 414,1 nm bei einer vorliegenden Konzentration von $1,67 \times 10^6$ Vesikel/ml, aktivierte KEV in einer durchschnittlichen Größe von 267,3 nm bei einer vorliegenden Konzentration von $0,34 \times 10^6$ Vesikel/ml und apoptotische KEV mit einer durchschnittlichen Größe von 214,6 nm bei einer vorliegenden Konzentration von $3,01 \times 10^6$ Vesikel/ml (s. Abbildung 17, erste Zeile).

Bei dem inaktiven SLE-Patienten (lila) zeigten sich aktivierte GEV in einer durchschnittlichen Größe von 376,3 nm bei einer vorliegenden Konzentration von $2,23 \times 10^6$ Vesikel/ml, apoptotische GEV mit einer durchschnittlichen Größe von 376,6 nm bei einer vorliegenden Konzentration von $3,09 \times 10^6$ Vesikel/ml, aktivierte KEV in einer durchschnittlichen Größe von 191,8 nm bei einer vorliegenden Konzentration von $3,51 \times 10^6$ Vesikel/ml und apoptotische KEV mit einer durchschnittlichen Größe von 249,4 nm bei einer vorliegenden Konzentration von $6,21 \times 10^6$ Vesikel/ml (s. Abbildung 17, zweite Zeile).

Bei dem VAS-Patienten (gelb) zeigten sich aktivierte GEV in einer durchschnittlichen Größe von 405,9 nm bei einer vorliegenden Konzentration von $1,66 \times 10^6$ Vesikel/ml, apoptotische GEV mit einer durchschnittlichen Größe von 437,4 nm bei einer vorliegenden Konzentration von $0,72 \times 10^6$ Vesikel/ml, aktivierte KEV in einer durchschnittlichen Größe von 345,8 nm bei einer vorliegenden Konzentration von $2,04 \times 10^6$ Vesikel/ml und apoptotische KEV mit einer durchschnittlichen Größe von 297,2 nm bei einer vorliegenden Konzentration von $3,89 \times 10^6$ Vesikel/ml (s. Abbildung 17, dritte Zeile).

Bei dem RA-Patienten (orange) zeigten sich aktivierte GEV in einer durchschnittlichen Größe von 441,2 nm bei einer vorliegenden Konzentration von $1,22 \times 10^6$ Vesikel/ml, apoptotische GEV mit einer durchschnittlichen Größe von 465,5 nm bei einer vorliegenden Konzentration von $0,76 \times 10^6$ Vesikel/ml, aktivierte KEV in einer durchschnittlichen Größe von 342,5 nm bei einer vorliegenden Konzentration von $1,86 \times 10^6$ Vesikel/ml und apoptotische KEV mit einer durchschnittlichen Größe von 320,1 nm bei einer vorliegenden Konzentration von $2,43 \times 10^6$ Vesikel/ml (s. Abbildung 17, vierte Zeile).

Bei dem NHD-Spender (schwarz) zeigten sich aktivierte GEV in einer durchschnittlichen Größe von 332,7 nm bei einer vorliegenden Konzentration von $0,68 \times 10^6$ Vesikel/ml, apoptotische GEV mit einer durchschnittlichen Größe von 382,0 nm bei einer vorliegenden Konzentration von $1,53 \times 10^6$ Vesikel/ml, aktivierte KEV in einer durchschnittlichen Größe von 251,1 nm bei einer vorliegenden Konzentration von $3,25 \times 10^6$ Vesikel/ml und apoptotische KEV mit einer durchschnittlichen Größe von 249,9 nm bei einer vorliegenden Konzentration von $7,01 \times 10^6$ Vesikel/ml (s. Abbildung 17, letzte Zeile).

Für die NTA-Analysen der aktivierten wie auch apoptotischen GEV konnte bei den verschiedenen Patienten (SLE, VAS, RA) bzw. beim NHD keine großen Unterschiede in Größe und Verteilung der Vesikel beobachtet werden (s. Abbildung 17). Ganz anders hingegen zeigte es sich bei den KEV. Während sich die Ergebnisse des aktiven wie auch inaktiven SLE-Patienten mit dem des NHD in aktivierten und apoptotischen KEV deckten, wiesen VAS und RA eine ganz andere Größenverteilung auf. Vermutlich lag hier ein grundlegendes Problem vor. Zum Beispiel könnte die Vesikelfreisetzung der KEV durch Krankheit oder Medikamente beeinträchtigt sein. Des Weiteren könnte sich hier auch schon abbilden, dass VAS und RA keine guten Kontrollen zum SLE in Bezug auf das Thema EV darstellen.

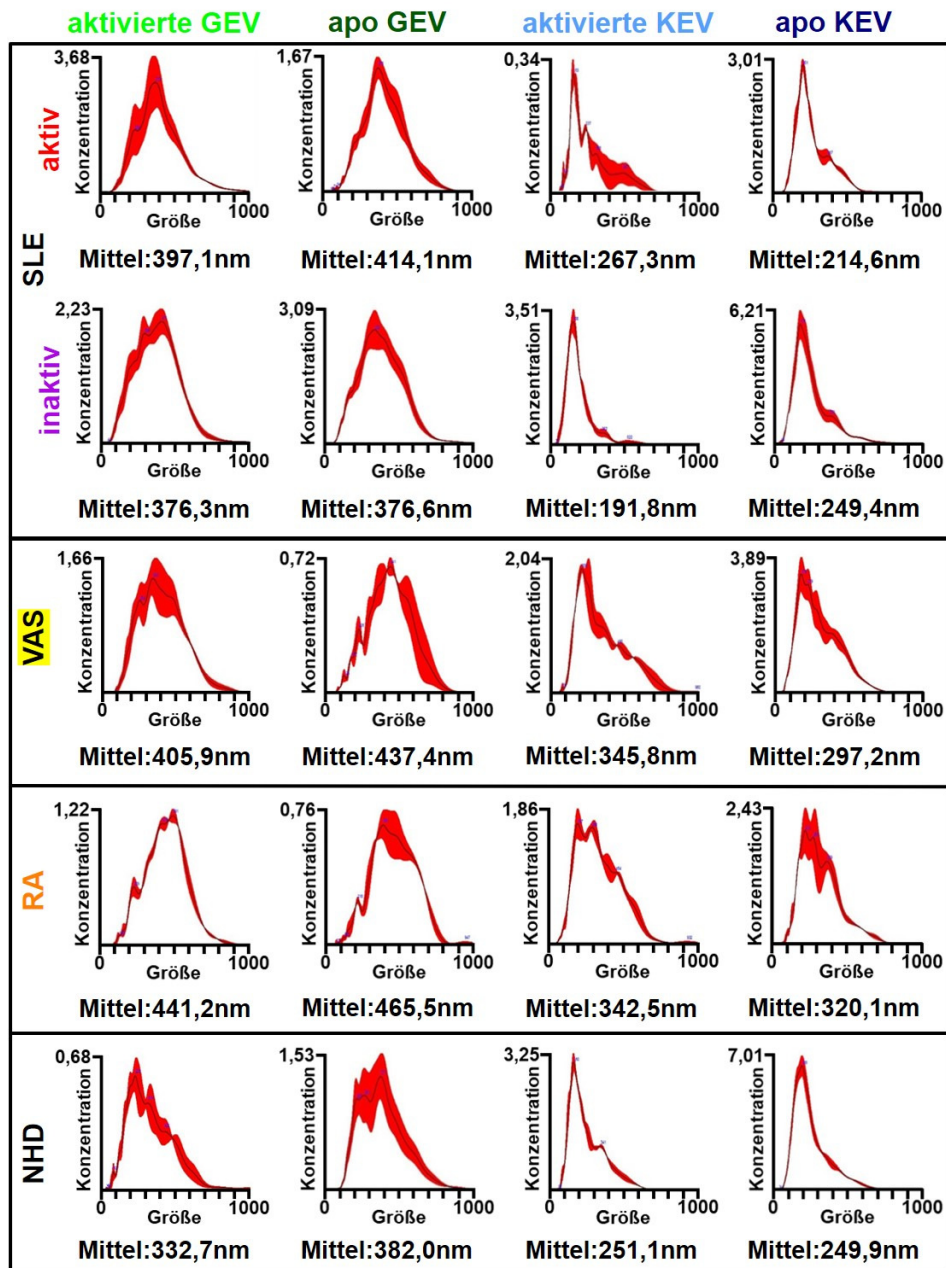


Abbildung 17: **Größenverteilung der EV bei SLE, VAS, RA und NHD.** Isolierte, aktivierte/apoptotische EV von aktivierten/apoptotischen T-Zellen {SLE aktiv (rot)/inaktiv (lila), VAS (gelb), RA (orange), NHD (schwarz)} wurden mittels NTA untersucht. Für jeden Spender/Patient (Zeile) ist ein repräsentativer Größenverteilungsgraph mit durchschnittlicher Vesikelgröße in nm, für jede untersuchte Vesikelpopulation {Spalte: aktivierte GEV (hellgrün), apoptotische GEV (dunkelgrün), aktivierte KEV (hellblau), apoptotische KEV (dunkelblau)} abgebildet. Die X-Achse zeigt die Größenverteilung der Vesikel in nm, die Y-Achse zeigt die Vesikelkonzentration (10^6 Vesikel/ml). Aktive SLE-Patienten wiesen einen (SLEDAI ≥ 6) auf, inaktive einen (SLEDAI ≤ 4). EV: extrazelluläre Vesikel; SLE: Systemischer Lupus erythematodes; VAS: Vaskulitis; RA: Rheumatoide Arthritis; NHD: Normalspender; NTA: *nanoparticle tracking analysis*; GEV: große extrazelluläre Vesikel; KEV: kleine extrazelluläre Vesikel; SLEDAI: *systemic lupus erythematosus disease activation index*.

Zur Verdeutlichung der NTA-Ergebnisse aus Abbildung 17 wurden sechs unabhängige Experimente bei SLE, VAS und NHD, jedoch bei RA nur vier unabhängige Experimente in einem Balkendiagramm zusammengefasst (s. Abbildung 18A+B).

Für aktivierte GEV, die von aktivierten T-Zellen isoliert wurden, zeigte sich eine durchschnittliche Größe von 324 nm bei aktiven SLE-Patienten (roter Balken), 372 nm bei inaktiven SLE-Patienten (lilauer Balken), 388 nm bei VAS-Patienten (gelber Balken), 412 nm bei RA-Patienten (oranger Balken) und 375 nm bei Normalspendern (schwarzer Balken, hellgrüner Kasten, s. Abbildung 18A).

GEV, die von apoptotischen T-Zellen isoliert wurden, zeigten sich im Durchschnitt etwas größer mit 362 nm bei aktiven SLE-Patienten (roter Balken), 411 nm bei inaktiven SLE-Patienten (lilauer Balken), 439 nm bei VAS-Patienten (gelber Balken), 395 nm bei RA-Patienten (oranger Balken) und 377 nm bei Normalspendern (schwarzer Balken, dunkelgrüner Kasten, s. Abbildung 18A).

Im Gegensatz dazu erschienen KEV von SLE-Patienten und Normalspendern deutlich kleiner. Für KEV, die von aktivierten T-Zellen freigesetzt wurden, zeigte sich eine durchschnittliche Größe von 265 nm bei aktiven SLE-Patienten (roter Balken), 241 nm bei inaktiven SLE-Patienten (lilauer Balken) und 280 nm bei Normalspendern (schwarzer Balken, hellblauer Kasten, s. Abbildung 18A).

Wieder zeigten sich jedoch KEV, die von apoptotischen T-Zellen freigesetzt wurden, etwas größer als solche von aktivierten T-Zellen aktive SLE-Patienten (roter Balken), inaktive SLE-Patienten (lilauer Balken), Normalspender (schwarzer Balken), dunkelblauer Kasten, s. Abbildung 18A. Aktivierte und apoptotische KEV von RA- und VAS-Patienten (orange bzw. gelbe Balken) zeigten sich etwas kleiner im Größenvergleich zu GEV aktive KEV: 371 nm (hellblauer Kasten), apo KEV: 353 nm (dunkelblauer Kasten), s. Abbildung 18A.

Danach wurde die Menge der freigesetzten Vesikel (GEV und KEV) sowohl nach zellulärer Aktivierung als auch nach Apoptose-Induktion verglichen (s. Abbildung 18B). Wie bereits unter Punkt 5.1.1 beschrieben, zeigte sich eine verstärkte Freisetzung von GEV bei NHD nach Apoptose-Induktion, wobei sich die GEV-Konzentration versechsfachte, nämlich von 32,17 auf $191,67 \cdot 10^9$ Vesikel/ml (schwarze Balken bei GEV, s. Abbildung 18B). Für aktivierte GEV ließ sich bei allen Donorgruppen eine durchschnittliche Vesikelkonzentration von $23,1 \cdot 10^9$ Vesikel/ml nachweisen (hellgrüner Kasten, s. Abbildung 18B).

Bei apoptotischen GEV zeigte sich ein leichter Konzentrationsanstieg von 4 % bei aktiven SLE-Patienten (roter Balken) und RA-Patienten (oranger Balken), wohingegen bei inaktiven SLE-Patienten eine Verdopplung der Konzentration (lilauer Balken) und bei VAS-Patienten ein Konzentrationsanstieg um 70 % beobachtet werden konnte (gelber Balken, dunkelgrüner Kasten, s. Abbildung 18B).

Für KEV von NHD ließ sich hier kein Unterschied in der Konzentration in Abhängigkeit des Freisetzungstimulus (Aktivierung, Apoptose) ermitteln (schwarze Balken in blauen Kästen, s. Abbildung 18B).

In starkem Kontrast dazu zeigten sich aktivierte KEV von aktiven SLE-Patienten (roter Balken, hellblauer Kasten, s. Abbildung 18B); diese wurden in deutlich geringerem Maße freigesetzt. Somit zeigten aktivierte T-Zellen von aktiven SLE-Patienten nahezu keine Freisetzung von KEV (4 % der aktiven NHD-KEV-Vesikelkonzentration).

Bei der Analyse von apoptotischen KEV, freigesetzt von apoptotischen Zellen, zeigte sich die geringste Freisetzung von KEV bei Zellen von aktiven SLE-Patienten (roter Balken, dunkelblauer Kasten, s. Abbildung 18B). Inaktive SLE-Patienten (lila Balken), VAS- und RA-Patienten (gelber und oranger Balken) wiesen eine leicht erhöhte Freisetzung von apoptotischen KEV auf im Vergleich zu aktivierten KEV (dunkelblauer Kasten, s. Abbildung 18B). Aktivierte T-Zellen von NHD setzten nach Induktion von Apoptose die meisten KEV frei (schwarze Balken, blaue Kästen, s. Abbildung 18B).

Über die Charakterisierung der Vesikelanalysen per NTA lässt sich festhalten: Bei Betrachtung der durchschnittlichen Vesikelgröße zeigte sich die Gruppe der aktivierten GEV verglichen mit der Gruppe apoptotischer GEV relativ homogen bezogen auf die verschiedenen Donorgruppen (Patienten/NHD). Bei aktivierten bzw. apoptotischen KEV gruppieren sich die SLE-Gruppen mit der Kontrolle NHD, wohingegen VAS- und RA-Patienten zwar auch eine Gruppe bildeten, aber keine Vesikelgrößenunterscheidung zwischen GEV und KEV zuließen.

Die Analyse der Vesikelkonzentrationen zeigte bis auf drei Ausnahmen ebenfalls eine relative Homogenität innerhalb der untersuchten Gruppen: (1) Die um ein Vielfaches erhöhte Vesikelfreisetzung apoptotischer GEV bei NHD, (2) die absolut minimierte Vesikelfreisetzung aktivierter KEV bei aktiven SLE-Patienten und (3) die etwas höhere Vesikelfreisetzung bei aktivierten/apoptotischen KEV bei NHD im Vergleich zu den Patientengruppen, bei denen die Erkrankung und bzw. oder die entsprechende Medikation eine Rolle spielen könnte.

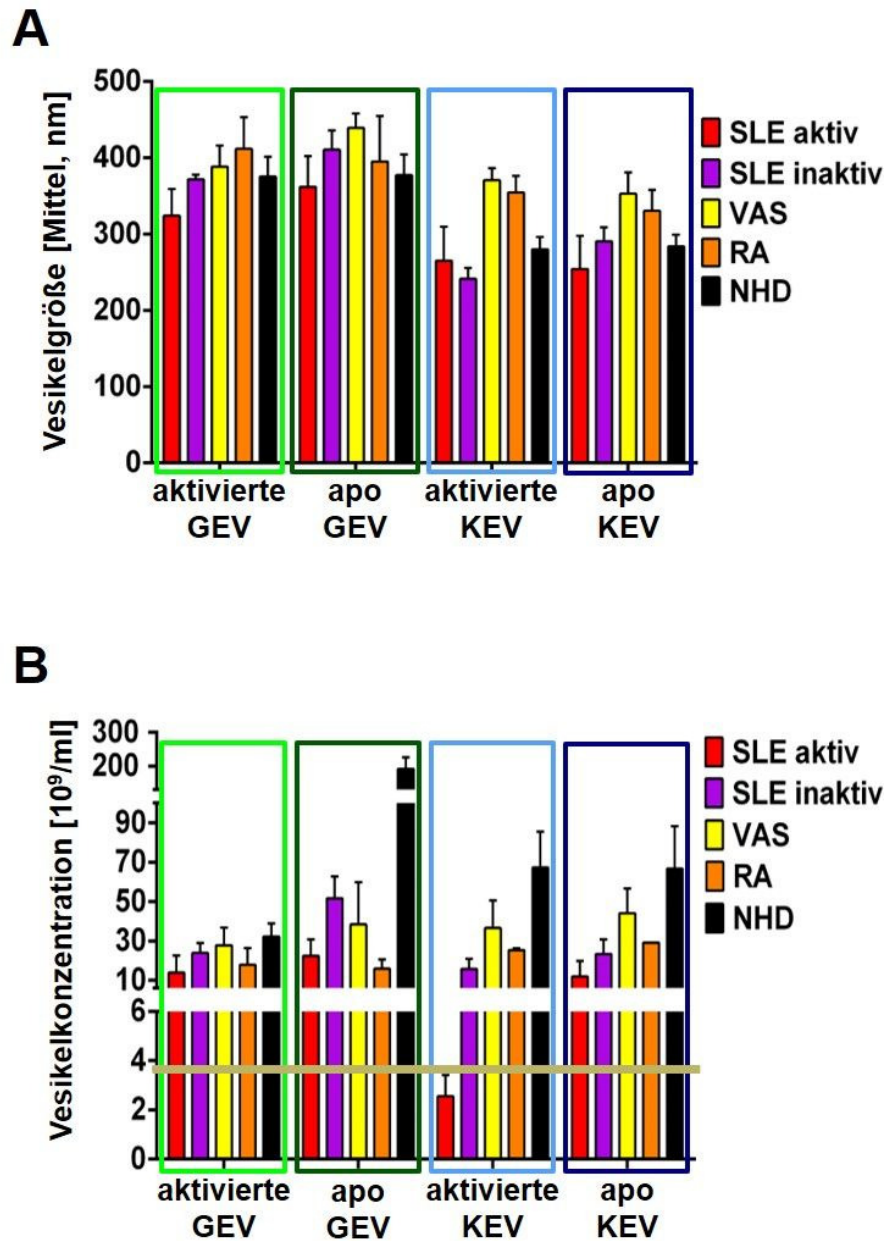


Abbildung 18: **Vesikelgröße und Vesikelkonzentrationen von GEV und KEV bei SLE, VAS, RA und NHD.** GEV und KEV wurden nach T-Zell-Aktivierung oder Apoptose-Induktion aus T-Zellen von SLE, VAS, RA und NHD isoliert und mittels NTA analysiert (aktivierte GEV/KEV: GEV/KEV freigesetzt von aktivierten T-Zellen; apo GEV/KEV: GEV/KEV freigesetzt von apoptotischen T-Zellen). Aktivierte GEV: hellgrüner Kasten, apoptotische GEV: dunkelgrüner Kasten, aktivierte KEV: hellblauer Kasten, apoptotische KEV: dunkelblauer Kasten. SLE-Patienten unterlagen immunsuppressiver Therapie und unterschieden sich nur in ihrer Krankheitsaktivität (aktive SLE in Rot: SLEDAI ≥ 6 , inaktive SLE in Lila: SLEDAI ≤ 4). Graphen zeigen VAS-Patienten in Gelb, RA-Patienten in Orange und NHD in Schwarz. (A) Der Graph zeigt die gemittelten Vesikelgrößen [nm] von aktivierten/apoptotischen GEV bzw. KEV von SLE, VAS, RA und NHD. (B) Der Graph zeigt die gemittelten Vesikelkonzentrationen [10^9 Vesikel/ml] der isolierten von aktivierten/apoptotischen GEV bzw. KEV von SLE, VAS, RA und NHD.

Ergebnisse wurden generiert aus 6 unabhängigen Experimenten (RA=4, Mittelwerte+SEM). Statistische Signifikanz ($p \leq 0,05$) wurde mit dem Studentischen T-Test berechnet. GEV: große extrazelluläre Vesikel; KEV: kleine extrazelluläre Vesikel; SLE: Systemischer Lupus erythematosus; VAS: Vaskulitis; RA: rheumatoide Arthritis; NHD: gesunder Normalspender; NTA: *nanoparticle tracking analysis*; SLEDAI: *systemic lupus erythematosus disease activation index*.

Mehrere Proteine wurden im Hinblick auf die Charakterisierung von SLE-Vesikeln mittels Western Blot untersucht (s. Abbildung 19). Dabei lag der Fokus zum einen auf Proteinen, die im SLE oder im Rahmen von Zell-Aktivierung/ Inflammation eine Rolle spielen [48, 55, 56, 63, 77, 83, 103]. Im Speziellen sind dies die Proteine HSP90, HMGB1, ENO1 und STRAP (s. Abbildung 19A). Wie in Abbildung 19A gezeigt scheinen HMGB1, ENO1 und STRAP spezifisch für GEV zu sein. Für HSP90 zeigte sich bei SLE-Patienten und NHD jeweils eine ähnliche Expression beim Vergleich von KEV und GEV. Bei SLE-Patienten zeigte sich eine vermehrte Akkumulation von HSP90 nach Induktion von Apoptose (was bei NHD nicht zu beobachten war). Interessanterweise zeigte sich bei gesunden Spendern in GEV apoptotischer Zellen ein Spaltprodukt des HSP90 bei ca. 55 kDa. Dieses Spaltprodukt konnte bei SLE-Patienten in deutlich geringerem Maße in den GEV apoptotischer Zellen detektiert werden (s. Abbildung 19A). Diese Spaltung ist a.e. caspase-vermittelt.

Wie unter 5.1.2 bereits beschrieben, konnte das Protein HMGB1 nur in apoptotischen Vesikeln, vor allem in GEV, beobachtet werden, gleichermaßen bei SLE und NHD. Für ENO1 zeigte sich bei SLE-Patienten die stärkste Expression in GEV apoptotischer Zellen, sowie eine deutlich geringere Expression in den anderen Vesikelpopulationen. Demgegenüber fand sich bei Vesikeln gesunder Spender eine hohe Expression von ENO1 in GEV aktivierter als auch apoptotischer Zellen. KEV zeigten eine deutlich geringere ENO1-Expression. Das Expressionsmuster des STRAP-Proteins ähnelt dem des eben beschriebenen ENO1-Proteins.

Zum anderen wurden Proteine untersucht, die sich sehr zum Nachweis von KEV eignen (EHD3, GSN, H2A, s. Abbildung 19B). Alle drei untersuchten Proteine konnten ausschließlich sowohl in SLE-KEV als auch NHD-KEV nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich das Protein EHD3 in SLE-KEV sehr schwach exprimiert, hingegen in NHD-KEV sehr stark. Das Protein GSN zeigte sich generell schwach in seiner Expression, jedoch in NHD-KEV etwas deutlicher als in SLE-KEV. Das Protein H2A zeigte ein sehr deutliches und gleichstarkes Fluoreszenzsignal sowohl in SLE-KEV als auch in NHD-KEV (s. Abbildung 19B).

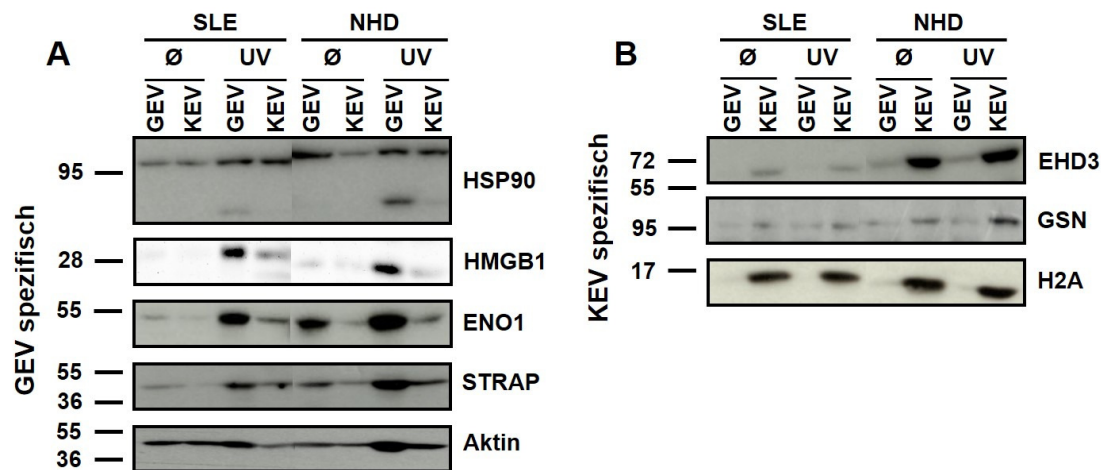


Abbildung 19: **Western Blot Analyse von Proteinen in verschiedenen EV-Populationen in inaktiven SLE und NHD.** GEV und KEV wurden von aktivierten T-Zellen (\emptyset) und apoptotischen T-Zellen (UV, UV-B-Strahlung: 90 J/cm^2 , 30 s) nach 20-stündiger Inkubation (37°C , 5% CO_2) mittels differentieller UZ isoliert, lysiert und mittels BCA-Assay quantifiziert. $15 \mu\text{g}$ pro Probe wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran im Semi-Dry-Verfahren geblottet. Für jedes nachgewiesene Protein wurde die Membran mit einem spezifischen Erstantikörper gegen das nachzuweisende Protein über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend mit einem spezifischen HRP-konjugierten Sekundärantikörper, der die Spezies des Erstantikörper erkennt, für 1 h bei RT inkubiert. Die Detektion wurde mittels ECL und Röntgenfilmaufnahme durchgeführt. Analytierte Proteine sind, wie folgt, gruppiert: (A) Proteine, die im SLE oder im Rahmen von Zell-Aktivierung/ Inflammation eine Rolle spielen und (B) KEV-spezifische Proteine. Gezeigt ist eines aus vier repräsentativen Experimenten. EV: Extrazelluläre Vesikel; SLE: Systemischer Lupus erythematoses; NHD: gesunder Normalspender; GEV: große extrazelluläre Vesikel; KEV: kleine extrazelluläre Vesikel; UV: UV-B Bestrahlung; UZ: Ultrazentrifugation; BCA: *bicinchoninic acid*; PVDF: Polyvinylidendifluorid; RT: Raumtemperatur; ECL: *enhanced chemiluminescence*; HRP: *horseradish-peroxidase*; PUE: Proteasomuntereinheiten. Proteine: HSP90: *heat shock protein 90*; HMGB1: *high mobility group box Protein B1*; ENO1: Alphaenolase; STRAP: *serine-threonine kinase receptor-associated protein*; Aktin; EHD3: *eps 15 homology domain-containing Protein 3*; GSN: Gelsolin; H2A: Histon 2A.

Die Proteinanalyse per Western Blot war in folgender Hinsicht aufschlussreich:

(1) Proteine, die unter dem Passus "GEV-spezifisch" untersucht wurden, zeigten sich wenig exprimiert in aktivierten GEV von inaktiven SLE-Proben, stärker in apoptotischen GEV und zusätzlich allerdings auch in apoptotischen KEV akkumuliert. Alle untersuchten Proteine wiesen eine starke Proteinexpression in apoptotischen GEV sowohl bei inaktiven SLE-Patienten als auch bei NHD auf. Am interessantesten war die Detektion des Spaltproduktes von HSP90, das sich ausschließlich in apoptotischen GEV bei SLE (sehr schwach) und NHD (etwas stärker als bei SLE) nachweisen ließ.

(2) Proteine, die unter dem Passus "KEV-spezifisch" analysiert wurden, waren dies auch gleichermaßen bei SLE und NHD. Vor allem fand man mit dem Marker H2A einen zuverlässigen, vesikelspezifischen (KEV) und krankheitsunabhängigen (bezogen auf Vergleich zwischen SLE und NHD) KEV-Marker.

6 Diskussion

Die Auswahl der Separationsart ist essentiell. In ihrer Studie geben Konoshenko et al. einen Überblick über bisher genutzte Techniken zur Aufreinigung von EV: Neben der traditionellen und meistverwendeten Ultrazentrifugation zur Aufreinigung von Vesikeln werden auch Ultrafiltration, das Ausnutzen physikalischer EV-Eigenschaften, protein-basiertes Präzipitieren oder Selektion über Oberflächenmoleküle genutzt [43]. Des Weiteren berichtet diese über die Herausforderungen, die jede Isolationstechnik beinhaltet, und schließt damit, dass bei der Wahl der Methode neben Kosten und Nutzen auch das Ziel, was im Nachgang mit den isolierten EV untersucht werden soll, berücksichtigt werden muss [43]. Bei allen beschriebenen Techniken geht es nur darum eine EV-Population aufzureinigen, meistens kleinere Vesikel, die mit Exosomen assoziiert werden. Die Berücksichtigung größerer Vesikel, die mit Mikrovesikeln assoziiert sind, fehlt. Ebenso wird der gewählte Freisetzungstimulus nicht erwähnt. Im Gegensatz dazu hat die Trennungsmethodik dieser Arbeit (Filtration mit anschließender differentieller Ultrazentrifugation in zwei Schritten: 10000 xg; 100000 xg [106]) den Vorteil, dass isolierte Vesikel weder durch zusätzliches Protein "verunreinigt", noch deren physikalischen Eigenschaften verändert werden. Sie führte zur Isolation von zwei EV-Populationen aus einer Probe, was den Aufwand erheblich reduziert und so zuvor noch nicht beschrieben wurde. Die Methodik der Separation von GEV und KEV ist gut genug um die jeweilige Populationen voneinander zu trennen. Allerdings gibt es bislang keine bessere Isolationstechnik, die eine "scharfe" Trennung zwischen beiden Vesikeltypen aus einer Probe erlaubt.

Die Güte der Trennungsmethodik in GEV und KEV führt dazu, dass einzelne Proteine und DNS-Moleküle, wie Nukleosomen, nur in einer EV-Population nachzuweisen sind, hingegen in der anderen nicht, und umgekehrt. Die Interpretation der Daten lassen verschiedene Schlüsse zu: Betrachtet man die Proteine des TZR-Signalings, deren Detektion ausschließlich in GEV erwartet wurde, wurden die Proteine ZAP70 und ERK 2 auch in geringer Expression in apoptotischen KEV analysiert. Dies kann zum Einen daran liegen, dass es noch keine "scharfe" Trennung zwischen beiden Vesikeltypen gibt. Zum Anderen ist es möglich, dass durch die Apoptose-Induktion eine Reorganisation innerhalb der Zelle stattfindet, wodurch auch GEV-spezifische Proteine in apoptotischen KEV enthalten wären. Dies verleitet zu einer falsch-positiven Annahme des Proteins und reduziert die Anzahl an typischen Proteinen für den jeweiligen EV-Typ bzw. -Subtyp. Am auffälligsten zeigt sich jedoch die Proteinexpression von ERK 1. Die sehr starke Detektion in apoptotischen KEV könnte auch darauf zurückzuführen sein, dass die Ursache der Apoptose-Aktivierung, nämlich die Schädigung der DNS mittels UV-B Bestrahlung, ebenfalls zu einer Aktivierung der ERK-Proteine führt [92]. Ein weiteres Indiz für die Umverteilung von Proteinen

durch Apoptose-Induktion zeigt sich in den Proteinen TSG101 und HSP70. Diese galten als die Exosomenmarker schlechthin [7, 108]. Dies konnte in dieser Arbeit für aktivierte KEV bestätigt werden. Jedoch waren sie nach Apoptose-Induktion nur noch in apoptotischen GEV nachweisbar. Die Publikationen von Nabhan et al. und Yanez-Mo et al. beschreiben, dass bei bestimmten Situationen eben diese Proteine an die Plasmamembran transloziert werden und dadurch auch in größeren Vesikeln, wie Mikrovesikeln, nachweisbar werden [65, 107]. Dies unterstützt die Hypothese, dass GEV, wie Mikrovesikel, durch Abschnürung von der Plasmamembran entstehen. Weiterhin konnten unabhängig von Freisetzungstimulus eindeutige Proteine für GEV bzw. KEV identifiziert werden, die die Separationsgüte sowie die Spezifität einer EV-Produktion und -genese bestätigen. Aufgrund der Apoptose-Induktion, die alle Proteinexpressionen bzw. -regulationen in einer Zelle verändert, war es nicht möglich eine Ladekontrolle bei Western Blot-Analysen durchzuführen.

Das Verpacken von Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren in EV dient der interzellulären Kommunikation zwischen verschiedenen Zelltypen innerhalb eines Organismus, die unter normalen als auch pathophysiologischen Bedingungen stattfinden können [21]. Dieser physiologischen Eigenschaft schließen sich die Publikationen von Choi et al. und Tkach et Théry an [17, 98]. Fleming et al. erweitert diesen Aspekt in seiner Studie, in der EV, die von Melanomzellen isoliert wurden, eine Antitumor-Antwort unterdrückten, indem sie die suppressiven Eigenschaften von myeloiden Zellen positiv beeinflussten [30]. Weiter beschreibt Schiller et al. die Schutzfunktion vor einer Immunreaktion und der besseren Aufnahme von phagozytierende Zellen durch das Verpacken von autoreaktiven Molekülen in EV [81]. Die Ergebnisse, der hier vorgelegten Arbeit, unterstützen die bisherige Vorhersage, dass das Verpacken in EV ein regulierter Prozess ist. Weiterhin wird das Betrachtungsfeld um die Unterscheidung zwischen GEV und KEV, sowie den Freisetzungstimulus (Zell-Aktivierung vs. Apoptose) erweitert. Die Spezifität der Proteinexpression in EV belegt, dass die Produktion von EV kein zufälliger Prozess, sondern ein spezifisch regulierter Prozess sein muss. Insbesondere zeigen dies die wiederholbaren Ergebnisse, wie die Herunterregulation von MHC- Klasse II Molekülen durch Stimulation mit aktivierten oder apoptotischen GEV, das Verpacken von HMGB1 in apoptotische EV (hauptsächlich GEV) von NHD und SLE-Patienten, wie auch die "Sortierung" des Spaltproduktes von HSP90 ausschließlich in apoptotische GEV von NHD und SLE-Patienten. Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass dadurch Danger-Signale explizit vermindert werden und dadurch einen Schutz vor Inflammation bieten sollen. Kritikpunkt hier ist, dass das Gefahren-Molekül HMGB1 in schwacher Expression auch in apoptotischen KEV auftrat. Hier könnte die Isolationstechnik, die zu keiner "scharfen" Trennung zwischen GEV und KEV führt, Hintergrund dafür sein. Des Weiteren gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied in der MHC- Klasse II-Expression zwischen unbehandelten

und mit KEV-stimulierten DZ. Dabei spielte es keine Rolle, ob mit aktivierten oder apoptotischen KEV stimuliert wurde. Durchweg lässt sich beobachten, dass KEV weniger starke Reaktionen verursachen als GEV. Bislang ist in der Arbeit immer mit der gleichen Proteinmenge stimuliert worden. Während man bei GEV durchweg gute statistische Werte erzielte, empfiehlt es sich bei weiterführenden Studien, die Proteinmenge an KEV zu erhöhen. Wie besonders gut in Kapitel 5.1.1, Abbildung 4D zu sehen, ist der Fehler bei aktivierten KEV im Verhältnis zum Mittelwert zu groß, um das Ergebnis nutzen zu können. Deshalb ist eine erhöhte Proteinmenge (zu Beginn das Vierfache) für die Zukunft zu empfehlen, um signifikante Ergebnisse zu erzielen.

Im Vergleich mit der Publikation von Lee et al. sieht man deutliche Unterschiede in der Exosomenkonzentration von aktiven SLE-Patienten [49]. Im Gegensatz zu Lee et al., der die Exosomen aus dem Blutserum von SLE-Patienten direkt isolierte, stammen die hier untersuchten KEV von aktivierten T-Zellen aus einwöchiger Kultivierung. Dabei ist auffällig, dass nach der Kultivierung eine geringere Menge an KEV von aktiven SLE freigesetzt wird. Eine erste Möglichkeit für die Unterschiede kann beim Blutserum festgemacht werden: Blutserum enthält zu ca. 1/3 Granulozyten und zu ca. 1/6 Lymphozyten. Damit ist nicht klar, von welchen Zellen bzw. Zelltypen die isolierten EV freigesetzt wurden und welche letztlich für die Immunreaktion sorgten. Als zweite Möglichkeit können die höheren Krankheitswerte bei Lee et al. in Betracht gezogen werden. Lee et al. zeigt in seiner Arbeit hier auch eine lineare Korrelation auf, wobei mit steigender Krankheitsaktivität mehr KEV zu beobachten sind, was diese Möglichkeit unterstützt. Als drittes besteht auch ein Unterschied zwischen den Aufreinigungsmethoden. Lee et al. verwendet einen Aufreinigungskit für Exosomen, womit chemisch eingegriffen wird.

Folgende Ergebnisse unterstützen gemeinsam die Aussage über die Funktion zum Schutz gegen Autoimmunreaktionen, deren Fehlen sich in einer Fehlregulation des Verpackens innerhalb der Pathogenese im Lupus darstellen. Dazu zählen a) das Verpacken von Autoantigenen in GEV bzw. KEV, b) die geringe Expression an HSP90-Spaltprodukt in SLE-GEV im Vergleich zu HSP90 in SLE-EV, c) eine schwache EHD3-Expression in SLE-KEV und d) dass weniger KEV vor allem im aktiven SLE synthetisiert werden. Es wird weiterhin die Aussage verfolgt, dass die Produktion von EV ein systematischer, regulierter Prozess ist anhand der Proteinspezifität in EV. Diesen Punkt greift auch die Publikation von Katsiogiannis auf, in dem er darauf verweist, dass Autoantigene in EV verpackt werden [38].

Ripley et al. berichtet über erhöhte HSP90-Level mit erhöhten Leveln an HSP90-Autoantikörpern [77]. Lotz et al. beschreibt das HSP90 im intrazellulären Vesikeltransport beteiligt ist [55]. Die Publikationen von Chukkapalli et al., Naslavsky et al. und Galperin et al. belegen, dass EHD3 im intrazellulären Vesikeltransport stark involviert

ist [19, 32, 66].

All dieses zusammengenommen lässt folgende Vermutung zu: Entweder wird generell weniger HSP90 in SLE gespalten, oder es wird per se weniger in SLE-EV verpackt. Letzteres gilt auch für EHD3. Hinzu kommt, dass die Vesikelproduktion von KEV beeinträchtigt ist. Dies führt zu der Annahme, dass Proteine weniger synthetisiert werden, in größere Vesikel oder gar nicht verpackt werden. Im Falle von nicht-verpackten Proteinen, muss man immer bedenken, dass der Thymus keine Toleranz gegen Zellkernbestandteile induziert. Alles in Allem spiegelt dies Möglichkeiten wieder, die an einer krankheitsbedingten Fehlregulation und deren Einwirken auf die Vesikelgenese und-transport in der Pathogenese des SLE teilhaben könnten. Die Möglichkeiten von allen drei Fehlerbildern könnte auch mit der Krankheitsaktivität korrelieren. Allerdings fehlt es bislang an Studien, die diesen Aspekt im Zusammenhang mit SLE im Bezug auf das Spaltprodukt HSP90 und EHD3 untersucht haben.

Im Hinblick auf beeinträchtigte KEV-Synthetisierung im aktiven SLE soll noch ein möglicher Einfluss durch die Medikation (immunsuppressive Therapie) diskutiert werden. Was allerdings dagegen spricht, sind die Vergleichsergebnisse der inaktiven SLE-Patienten, die derselben Krankheit und Medikation unterliegen wie die aktiven SLE-Patienten. Der einzige Unterschied liegt in der Krankheitsaktivität, also ob die Patienten einen aktiven Schub oder in Remission sind, und womöglich ist das ein Ansatz, bei dem noch weiterführende Analysen von Nöten sind, um hier eine klare Abgrenzung machen zu können. Da immunmodulatorische Eigenschaften von KEV (oder auch Exosomen) in der Literatur mehrfach beschrieben wurden [76, 101, 105], könnte dies in Zusammenhang mit der Krankheitsaktivität in der Pathogenese des SLE durchaus relevant sein.

Ein weiterer Aspekt des Krankheitsbildes SLE besteht in einer anhaltenden Inflammation. Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass MHC- Klasse II durch Stimulation von NHD-EV herunterreguliert wurden. Im Vergleich zeigt Lee et al., dass bei einer Stimulation mit SLE-Exosomen eine Immunreaktion ausgelöst wird [49]. Bobrie et al. beschreibt, dass EV auch MHC- Klasse I und II Moleküle besitzen und dadurch auch Antigene präsentieren können [6]. Dazu passt, dass gemäß Fehr et al. bei Stimulation mit EV keine adäquate Herunterregulation von MHC- Klasse II Molekülen im aktiven SLE stattfand [28]. Diese Daten belegen, dass EV eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des SLE spielen und auch mit daran beteiligt sein könnten, eine anhaltende Inflammation aufrecht zu erhalten.

Die Ergebnisse zeigten, dass GEV Oberflächenmoleküle wie auch Plasmamembran-assoziierte Proteine der Ausgangszelle enthielten. Möglich wäre, dass diese Oberflächenmoleküle und Proteine in einem Recycling-Prozess von phagozytierenden Zellen genutzt und wiederverwertet werden können statt durch Neosynthese in diesen Zellen selbst hergestellt werden zu müssen. Dies würde einen weiteren physiologischen

Nutzen von EV darstellen, der energie-, material- bzw. rohstoffsparend ist. Diese Idee muss aber noch in weiterführenden Studien untersucht und geklärt werden.

7 Ausblick

Diese Arbeit beschäftigte sich zunächst mit der Charakterisierung von GEV und KEV im Vergleich. Dabei konnten GEV und KEV klar voneinander abgegrenzt werden, einerseits durch ihre Größe, andererseits durch ihr jeweiliges Proteinexpressionspektrum. Je nach Freisetzungs-Stimulus konnten für jeden Vesikeltyp klare Differenzierungsmarker zum Nachweis und zur Abgrenzung von anderen Vesikeltypen herausgefunden werden. Dies bildet eine Basis für die EV-Community: Durch die Abbildung 10 ist die Grundlage für eine **Reinheitskontrolle** geschaffen worden, mit der jede isolierte EV-Population analysiert werden kann, um zu erkennen, mit welchen EV-Populationstyp bzw.-typen gearbeitet wird.

Im weiteren Verlauf wurde der Einfluss von GEV und KEV auf DZ untersucht. Es zeigte sich, dass GEV und KEV die DZ dahingehend beeinflussten, dass sich die Expression von Oberflächenmarkern änderte und Zytokine sezerniert wurden, allerdings im Rahmen einer antiinflammatorischen Reaktion. Da durch Stimulation mit GEV die MHC-II-Expression massiv herabreguliert wurde, könnte in weiterführenden Studien zum Einen in die Breite durch Analysen mit anderen phagozytierenden Zellen bzw. zum Anderen in die Tiefe durch die Untersuchung der **Signaltransduktionen** gegangen werden. Bei den Signaltransduktionen stellt sich die Frage, ob es womöglich ein intrazelluläres Signaling von phagozytierten EV auf die Zelle selbst ist oder ob der Schutz der Selbsterkennung hierfür verantwortlich ist. Auch ein weiterführender Blick auf die Beteiligung oder Blockade von Signaltransduktionen wäre von großem Interesse. Weiterhin könnte der Mechanismus untersucht werden, warum GEV die TNF- α -Produktion reduziert, KEV hingegen die INF- γ und IL-1 β -Produktion in DZ hochreguliert, GEV und KEV die IL-6-Produktion steigert, ist noch unklar, jedoch wichtig für das Verständnis der Immunregulation im Kontext des Zelltodes und der EV-Synthese.

Mit der Charakterisierung von EV, die einerseits von SLE-Patienten und andererseits von gesunden Individuen (NHD) stammten, zeigte sich, dass SLE-EV in ihrer Größe denen von NHD-EV ähneln. Unterschiede waren in der Konzentration der freigesetzten Vesikel und in der verminderten Expression zweier Proteine, nämlich des Spaltprodukts von HSP90 nach Apoptose-Induktion in GEV und EHD3 in KEV, ersichtlich. Der nächstgelegene Schritt wäre eine tiefere **Analyse von HSP90 und EHD3** im Hinblick auf die Schnittstellen und die zugrundeliegenden Mechanismen. Des Weiteren sollte direkt nachgewiesen werden, ob Beeinträchtigungen sowohl in der Vesikelbeladung als auch im Speziellen bei KEV im Vesikeltransport für diese Proteine vorliegen. Im pathophysiologischen Aspekt ist noch unklar, welche Rolle dieser Unterschied in der Pathogenese des SLE einnimmt. Zum Beispiel könnte durch *in vivo* Studien untersucht

werden, in wie weit die unterschiedlichen EV-Populationen an der Bildung der klinischen Marker wie dsDNA-Antikörper oder erniedrigte C3c-Level als Folge der Komplementaktivierung beteiligt wären. Weiterführend könnte untersucht werden, warum weniger EV bei Entzündungserkrankungen synthetisiert werden. Im Speziellen, warum KEV nicht adäquat im aktiven SLE produziert werden und im Allgemeinen weniger apoptotische GEV entstehen. Auch eine weitere Definition charakteristischer Proteine in KEV vs. GEV im Vergleich von SLE mit anderen systemischen Erkrankungen wie z.B. Sepsis könnte helfen die Schlüsselrolle bei der Entstehung des SLE weiter zu identifizieren und dadurch von anderen Krankheiten abgrenzen zu können. Ebenso könnte die Proteinexpression von MHC- Klasse II- Molekülen in GEV / KEV analysiert werden, um Nachweise bzw. Rückschlüsse für eine beeinträchtigte Herunterregulation des Proteins in aktiven SLE-Patienten finden zu können.

8 Veröffentlichungen

8.1 Wissenschaftliche Originalveröffentlichungen

L. Claßen, L.-O. Tykocinski, F. Wiedmann, C. Birr, P. Schiller, C. Tucher, S. Krienke, M.-S. Raab, N. Blank, H.-M. Lorenz, M. Schiller. **Extracellular Vesicles Mediate Intercellular Communication: Transfer of Functionally Active microRNAs by Microvesicles Into Phagocytes.** *Eur J Immunol.* 2017 Sep;47(9):1535-1549. doi: 10.1002/eji.201646595.

A. Torres Crigna, F. Fricke, K. Nitschke, T. Worst, U. Erb, M. Karremann, D. Buschmann, S. Elvers-Hornung, C. Tucher, M. Schiller, I. Hausser, J. Gebert, and K. Bieback. **Inter-laboratory comparison of EV isolation based on ultracentrifugation.** *Transfusion Medicine and Hemotherapy* (Angenommen zur Publikation Mai 2020)

C. Tucher, K. Bode, P. Schiller, L. Claßen, C. Birr, M.M. Souto-Carneiro, N. Blank, H.-M. Lorenz, and M. Schiller. **Extracellular Vesicle Subtypes Released From Activated or Apoptotic T-Lymphocytes Carry a Specific and Stimulus-Dependent Protein Cargo.** *Front Immunol* 2018 Mar 15;9:534. doi: 10.3389/fimmu.2018.00534.

8.2 Posterpräsentationen

Molecular characterization of extracellular vesicles from apoptotic and activated lymphocytes. C. Tucher, P. Heyder, S. Krienke, H.-M. Lorenz, M. Schiller
43. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie (DGRh) Bremen, 2. - 5. September 2015

Differential characterization of microvesicles and exosomes from activated and apoptotic human lymphocytes C. Tucher, P. Schiller, S. Neu, S. Krienke, H.-M. Lorenz, M. Schiller
Annual Meeting - International Society for Extracellular Vesicles (2016) Rotterdam, 4. - 7. Mai 2016

9 Literatur

Literatur

- [1] S Afford and S Randhawa. Apoptosis. *Molecular pathology : MP*, 53(2):55–63, 2000. ISSN 1366-8714. doi: 10.1136/mp.53.2.55.
- [2] Zoraida Andreu and Maria Yáñez-Mó. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Frontiers in Immunology*, 5(SEP):1–12, 2014. ISSN 16643224. doi: 10.3389/fimmu.2014.00442.
- [3] Samuel S Antwi-Baffour. Molecular characterisation of plasma membrane-derived vesicles. *Journal of biomedical science*, 22(1):68, 2015. ISSN 1423-0127. doi: 10.1186/s12929-015-0174-7. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4532247&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [4] Andrés Augusto Arias, Carlos M Perez-Velez, Julio César Orrego, Marcela Moncada-Velez, Jessica Lineth Rojas, Alejandra Wilches, Andrea Restrepo, Mónica Trujillo, Carlos Garcés, Catalina Arango-Ferreira, Natalia González, Carmen Oleaga-Quintas, Diana Fernández, Johana Marcela Isaza-Correa, Diego Eduardo Gongóra, Daniel Gonzalez-Loaiza, Juan Esteban Sierra, Jean Laurent Casanova, Jacinta Bustamante, and José Luis Franco. Severe Enteropathy and Hypogammaglobulinemia Complicating Refractory Mycobacterium tuberculosis Complex Disseminated Disease in a Child with IL-12R β 1 Deficiency. *Journal of Clinical Immunology*, 37(7):732–738, 2017. ISSN 1573-2592. doi: 10.1007/s10875-017-0435-1. URL <https://doi.org/10.1007/s10875-017-0435-1>.
- [5] Rudolf Bauerfeind, Ruth Jelinek, Andrea Hellwig, and Wieland B. Huttner. Neurosecretory vesicles can be hybrids of synaptic vesicles and secretory granules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(16):7342–7346, 1995. ISSN 00278424. doi: 10.1073/pnas.92.16.7342.
- [6] Angélique Bobrie, Marina Colombo, Graça Raposo, and Clotilde Théry. Exosome Secretion: Molecular Mechanisms and Roles in Immune Responses. *Traffic*, 12(12):1659–1668, 2011. ISSN 13989219. doi: 10.1111/j.1600-0854.2011.01225.x.
- [7] Angélique Bobrie, Marina Colombo, Sophie Krumeich, Graca Raposo, and Clotilde Théry. Diverse subpopulations of vesicles secreted by different intracellular mechanisms are present in exosome preparations obtained by differential ultracentrifugation. *Journal of Extracellular Vesicles*, 1:157–164, 2012. ISSN 2001-

3078. doi: 10.3402/jev.v1i0.18397. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002207289302975N>.
- [8] Isabel Bochmann, Frédéric Ebstein, Andrea Lehmann, Jeremias Wohlschlaeger, Stephan Urs Sixt, Peter Michael Kloetzel, and Burkhardt Dahlmann. T lymphocytes export proteasomes by way of microparticles: A possible mechanism for generation of extracellular proteasomes. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 18(1):59–68, 2014. ISSN 15821838. doi: 10.1111/jcmm.12160.
- [9] Verena Börger, Michel Bremer, Rita Ferrer-Tur, Lena Gockeln, Oumaima Stambouli, Amina Becic, and Bernd Giebel. Mesenchymal Stem/Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles and Their Potential as Novel Immunomodulatory Therapeutic Agents. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7):1450, 2017. ISSN 1422-0067. doi: 10.3390/ijms18071450. URL <http://www.mdpi.com/1422-0067/18/7/1450>.
- [10] Marion M Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1):248–254, 1976. ISSN 0003-2697. doi: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269776905273>.
- [11] Olga E. Bryzgunova, Marat M. Zaripov, Tatyana E. Skvortsova, Evgeny A. Lekchnov, Alina E. Grigor'eva, Ivan A. Zaporozhchenko, Evgeny S. Morozkin, Elena I. Ryabchikova, Yuri B. Yurchenko, Vladimir E. Voitsitskiy, and Pavel P. Laktionov. Comparative study of extracellular vesicles from the urine of healthy individuals and prostate cancer patients. *PLoS ONE*, 11(6):1–17, 2016. ISSN 19326203. doi: 10.1371/journal.pone.0157566.
- [12] Jin Cai, Gengze Wu, Pedro A Jose, and Chunyu Zeng. Functional transferred DNA within extracellular vesicles. *Experimental Cell Research*, 349(1):179–183, 2016. ISSN 0014-4827. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.10.012>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014482716303378>.
- [13] Ana Canda-Sánchez, Francisco J Salgado, Amparo Pérez-Díaz, Carla Varela-González, Pilar Arias, and Montserrat Nogueira. Differential Distribution of Both IL-12R β Chains in the Plasma Membrane of Human T Cells. *Journal of Membrane Biology*, 227(1):1–12, 2009. ISSN 1432-1424. doi: 10.1007/s00232-008-9127-3. URL <https://doi.org/10.1007/s00232-008-9127-3>.
- [14] Stefania Cannito, Elisabetta Morello, Claudia Bocca, Beatrice Foglia, Elisa Benetti, Erica Novo, Fausto Chiazza, Mara Rogazzo, Roberto Fantozzi, Davide Povero,

- Salvatore Sutti, Elisabetta Bugianesi, Ariel E. Feldstein, Emanuele Albano, Massimo Collino, and Maurizio Parola. Microvesicles released from fat-laden cells promote activation of hepatocellular NLRP3 inflammasome: A pro-inflammatory link between lipotoxicity and non-alcoholic steatohepatitis. *PLoS ONE*, 12(3): 1–22, 2017. ISSN 19326203. doi: 10.1371/journal.pone.0172575.
- [15] Ina Catrein, Richard Herrmann, Armin Bosserhoff, and Thomas Ruppert. Experimental proof for a signal peptidase I like activity in *Mycoplasma pneumoniae*, but absence of a gene encoding a conserved bacterial type I SPase. *FEBS Journal*, 272(11):2892–2900, 2005. ISSN 1742464X. doi: 10.1111/j.1742-4658.2005.04710.x.
- [16] Guillaume T. Charras, Chi K. Hu, Margaret Coughlin, and Timothy J. Mitchison. Reassembly of contractile actin cortex in cell blebs. *Journal of Cell Biology*, 175(3):477–490, 2006. ISSN 00219525. doi: 10.1083/jcb.200602085.
- [17] Dongsic Choi, Tae Hoon Lee, Cristiana Spinelli, Shilpa Chennakrishnaiah, Esterina D’Asti, and Janusz Rak. Extracellular vesicle communication pathways as regulatory targets of oncogenic transformation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 67:11–22, jul 2017. ISSN 1084-9521. doi: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.01.003>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1084952117300046>.
- [18] Helena C. Christianson, Katrin J. Svensson, Toin H. Van Kuppevelt, Jin Ping Li, and Mattias Belting. Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(43): 17380–17385, 2013. ISSN 00278424. doi: 10.1073/pnas.1304266110.
- [19] Sahiti Chukkapalli, Mohamed Amessou, Hafedh Dekhil, Ashok Kumar Dilly, Qiang Liu, Sudeshna Bandyopadhyay, Ron Dan Thomas, Alex Bejna, Gerald Baptist, and Mustapha Kandouz. Ehd3, a regulator of vesicular trafficking, is silenced in gliomas and functions as a tumor suppressor by controlling cell cycle arrest and apoptosis. *Carcinogenesis*, 35(4):877–885, 2014. ISSN 14602180. doi: 10.1093/carcin/bgt399.
- [20] Laura Claßen, Lars-Oliver Tykocinski, Felix Wiedmann, Carolin Birr, Petra Schiller, Christine Tucher, Stefan Krienke, Marc-Steffen Raab, Norbert Blank, Hanns-Martin Lorenz, and Martin Schiller. Extracellular vesicles mediate intercellular communication: Transfer of functionally active microRNAs by microvesicles into phagocytes. *European Journal of Immunology*, pages n/a–n/a. ISSN 1521-4141. doi: 10.1002/eji.201646595. URL <http://dx.doi.org/10.1002/eji.201646595>.

- [21] Marina Colombo, Graça Raposo, and Clotilde Théry. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30(1):255–289, 2014. ISSN 1081-0706. doi: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122326.
- [22] Daniel R. Croft, Mathew L. Coleman, Shuixing Li, David Robertson, Teresa Sullivan, Colin L. Stewart, and Michael F. Olson. Actin-myosin-based contraction is responsible for apoptotic nuclear disintegration. *Journal of Cell Biology*, 168(2): 245–255, 2005. ISSN 00219525. doi: 10.1083/jcb.200409049.
- [23] Shirly O.T. Curreem, Rory M. Watt, Susanna K.P. Lau, and Patrick C.Y. Woo. Two-dimensional gel electrophoresis in bacterial proteomics. *Protein and Cell*, 3(5): 346–363, 2012. ISSN 16748018. doi: 10.1007/s13238-012-2034-5.
- [24] Jörg H W Distler, David S. Pisetsky, Lars C. Huber, Joachim R. Kalden, Steffen Gay, and Oliver Distler. Microparticles as regulators of inflammation: Novel players of cellular crosstalk in the rheumatic diseases. *Arthritis and Rheumatism*, 52(11):3337–3348, 2005. ISSN 00043591. doi: 10.1002/art.21350.
- [25] C. D’Souza-Schorey Crislyn and James W. Clancy. Tumor-derived microvesicles: Shedding light on novel microenvironment modulators and prospective cancer biomarkers. *Genes and Development*, 26(12):1287–1299, 2012. ISSN 08909369. doi: 10.1101/gad.192351.112.
- [26] Erez Eitan, Caitlin Suire, Shi Zhang, and Mark P. Mattson. Impact of Lysosome Status on Extracellular Vesicle Content and Release. *Ageing Res Rev*, 2016. ISSN 1527-5418. doi: 10.1016/j.arr.2016.05.001.
- [27] Susan Elmore. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4):495–516, 2007. ISSN 01926233. doi: 10.1080/01926230701320337.
- [28] Eva-Marie Fehr, Silvia Spoerl, Petra Heyder, Martin Herrmann, Isabelle Bekeredjian-Ding, Norbert Blank, Hanns-Martin Lorenz, and Martin Schiller. Apoptotic-cell-derived membrane vesicles induce an alternative maturation of human dendritic cells which is disturbed in SLE. *Journal of autoimmunity*, 40:86–95, feb 2013. ISSN 1095-9157 (Electronic). doi: 10.1016/j.jaut.2012.08.003.
- [29] Dirk Fitzner, Mareike Schnaars, Denise Van Rossum, Gurumoorthy Krishnamoorthy, Payam Dibaj, Mostafa Bakhti, Tommy Regen, Uwe Karsten Hanisch, and Mikael Simons. Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis. *Journal of Cell Science*, 124(3):447–458, 2011. ISSN 00219533. doi: 10.1242/jcs.074088.

- [30] Viktor Fleming, Xiaoying Hu, Céline Weller, Rebekka Weber, Christopher Groth, Zeno Riestler, Laura Hüser, Qian Sun, Vasyl Nagibin, Carsten Kirschning, Vincenzo Bronte, Jochen Utikal, Peter Altevogt, and Viktor Umansky. Melanoma Extracellular Vesicles Generate Immunosuppressive Myeloid Cells by Upregulating PD-L1 via TLR4 Signaling. *Cancer Research*, 79(18):4715 LP – 4728, sep 2019. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-19-0053. URL <http://cancerres.aacrjournals.org/content/79/18/4715.abstract>.
- [31] U.S. Gaipal, A. Kuhn, A. Sheriff, L.E. Munoz, S. Franz, R.E. Voll, J.R. Kalden, and M. Herrmann. Clearance of Apoptotic Cells in Human SLE. *Curr Dir Autoimmun*, 9:2006, 2006.
- [32] Emilia Galperin, Sigi Benjamin, Debora Rapaport, Rinat Rotem-Yehudar, Sandra Tolchinsky, and Mia Horowitz. EHD3: A Protein That Resides in Recycling Tubular and Vesicular Membrane Structures and Interacts with EHD1. *Traffic*, 3(8):575–589, 2002. ISSN 1398-9219. doi: 10.1034/j.1600-0854.2002.30807.x. URL <http://doi.wiley.com/10.1034/j.1600-0854.2002.30807.x>.
- [33] M. Garcia-Contreras, R.W. Brooks, L. Boccuzzi, P.D. Robbins, and C. Ricordi. Exosomes as biomarkers and therapeutic tools for type 1 diabetes mellitus. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, pages 2940–2956, 2017. ISSN 2284-0729.
- [34] Aaron Goldman and David W. Speicher. UNIT 10.7 Electroblothing from Polyacrylamide Gels. *Current protocols in Protein Science*, 82(3), 2016. doi: 10.1002/0471140864.ps1007s82.
- [35] Luís Inês, Cândida Silva, Maria Galindo, Francisco J. López-Longo, Georgina Terroso, Vasco C. Romão, Iñigo Rúa-Figueroa, Maria J. Santos, José M. Pego-Reigosa, Patrícia Nero, Marcos Cerqueira, Cátia Duarte, Luís C. Miranda, Miguel Bernardes, Maria J. Gonçalves, Coral Mouriño-Rodríguez, Filipe Araújo, Ana Raposo, Anabela Barcelos, Maura Couto, Pedro Abreu, Teresa Otón-Sanchez, Carla Macleira, Filipa Ramos, Jaime C. Branco, José A.P. Silva, Helena Canhão, and Jaime Calvo-Alén. Classification of systemic lupus erythematosus: Systemic Lupus International Collaborating Clinics versus American College of Rheumatology criteria. A comparative study of 2,055 patients from a real-life, international systemic lupus erythematosus cohort. *Arthritis Care and Research*, 67(8):1180–1185, 2015. ISSN 21514658. doi: 10.1002/acr.22539.
- [36] Lyonel G. Israels and Esther D. Israels. Apoptosis. *the Oncologist*, (suppl 4): 332–339, 1999. doi: 10.1634/theoncologist.12-9-1055.

- [37] Hina Kalra, Gregor P.C. Drummen, and Suresh Mathivanan. Focus on extracellular vesicles: Introducing the next small big thing. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(2), 2016. ISSN 14220067. doi: 10.3390/ijms17020170.
- [38] Stergios Katsiogiannis. Extracellular Vesicles: Evolving Contributors in Autoimmunity Stergios. *For Immunopathol Dis Therap.*, 6((3-4)):163–170, 2015. doi: 10.1615/ForumImmunDisTher.2016016491.
- [39] Yumi Kawamura, Yusuke Yamamoto, Taka Aki Sato, and Takahiro Ochiya. Extracellular vesicles as trans-genomic agents: Emerging roles in disease and evolution. *Cancer Science*, 108(5):824–830, 2017. ISSN 13497006. doi: 10.1111/cas.13222.
- [40] Andrew Keller, Alexey I Nesvizhskii, Eugene Kolker, and Ruedi Aebersold. Empirical Statistical Model To Estimate the Accuracy of Peptide Identifications Made by MS/MS and Database Search. *Analytical Chemistry*, 74(20):5383–5392, oct 2002. ISSN 0003-2700. doi: 10.1021/ac025747h. URL <https://doi.org/10.1021/ac025747h>.
- [41] W.-U. Kim, S.-Y. Min, S.-H. Hwang, S.-A. Yoo, K.-J. Kim, and C.-S. Cho. Effect of oestrogen on T cell apoptosis in patients with systemic lupus erythematosus. *Clinical & Experimental Immunology*, 161(3):453–458, 2010. ISSN 00099104. doi: 10.1111/j.1365-2249.2010.04194.x. URL <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2249.2010.04194.x>.
- [42] Ravindra Kolhe, Monte Hunter, Siyang Liu, Ravirajsinh N. Jadeja, Chetan Pundkar, Ashis K. Mondal, Bharati Mendhe, Michelle Drewry, Mumtaz V. Robjani, Yutao Liu, Carlos M. Isales, Robert E. Guldberg, Mark W. Hamrick, and Sadanand Fulzele. Gender-specific differential expression of exosomal miRNA in synovial fluid of patients with osteoarthritis. *Scientific Reports*, 7(1):2029, 2017. ISSN 2045-2322. doi: 10.1038/s41598-017-01905-y. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28515465>{%}5Cn<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5435729>{%}5Cn<http://www.nature.com/articles/s41598-017-01905-y>.
- [43] Maria Yu Konoshenko, Evgeniy A. Lekchnov, Alexander V. Vlassov, and Pavel P. Laktionov. Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends. *BioMed Research International*, 2018, 2018. ISSN 23146141. doi: 10.1155/2018/8545347.
- [44] Joanna Kowal, Mercedes Tkach, and Clotilde Théry. Biogenesis and secretion of exosomes. *Current Opinion in Cell Biology*, 29:116–125, 2014. ISSN 0955-0674.

doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2014.05.004>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095506741400057X>.

- [45] Joanna Kowal, Guillaume Arras, Marina Colombo, Mabel Jouve, Jakob Paul Morath, Bjarke Primdal-Bengtson, Florent Dingli, Damaris Loew, Mercedes Tkach, and Clotilde Théry. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(8): E968–77, 2016. ISSN 1091-6490. doi: 10.1073/pnas.1521230113. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26858453>{%}5Cn<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4776515>.
- [46] Martin A. Kriegel, Theresa Tretter, Norbert Blank, Martin Schiller, Christoph Gabler, Silke Winkler, Joachim R. Kalden, and Hanns Martin Lorenz. Interleukin-4 supports interleukin-12-induced proliferation and interferon-g secretion in human activated lymphoblasts and T helper type 1 cells. *Immunology*, 119(1):43–53, 2006. ISSN 00192805. doi: 10.1111/j.1365-2567.2006.02404.x.
- [47] T. Kubo, R. D. Hatton, J. Oliver, X. Liu, C. O. Elson, and C. T. Weaver. Regulatory T Cell Suppression and Anergy Are Differentially Regulated by Proinflammatory Cytokines Produced by TLR-Activated Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*, 173(12):7249–7258, 2004. ISSN 0022-1767. doi: 10.4049/jimmunol.173.12.7249. URL <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.173.12.7249>.
- [48] J H Lee, S B Cho, D Bang, S H Oh, K-J Ahn, J Kim, Y-B Park, S-K Lee, and K H Lee. Human anti-alpha-enolase antibody in sera from patients with Behcet's disease and rheumatologic disorders. *Clinical and experimental rheumatology*, 27(2 Suppl 53):S63–6, 2009. ISSN 0392-856X (Print).
- [49] Joo Youn Lee, Jin Kyun Park, Eun Young Lee, Eun Bong Lee, and Yeong Wook Song. Circulating exosomes from patients with systemic lupus erythematosus induce an proinflammatory immune response. *Arthritis Research & Therapy*, 2016. ISSN 1478-6362. doi: 10.1186/s13075-016-1159-y.
- [50] Tae Hoon Lee, Esterina D'Asti, Nathalie Magnus, Khalid Al-Nedawi, Brian Meehan, and Janusz Rak. Microvesicles as mediators of intercellular communication in cancer—the emerging science of cellular ‘debris’. *Seminars in Immunopathology*, 33(5):455–467, 2011. ISSN 1863-2300. doi: 10.1007/s00281-011-0250-3. URL <https://doi.org/10.1007/s00281-011-0250-3>.
- [51] Natalie Lefort, Rémi LeBlanc, and Marc E. Surette. Dietary Buglossoides Arvensis oil increases circulating n-3 polyunsaturated fatty acids in a dose-dependent

- manner and enhances lipopolysaccharide-stimulated whole blood interleukin-10—A randomized placebo-controlled trial. *Nutrients*, 9(3):1–17, 2017. ISSN 20726643. doi: 10.3390/nu9030261.
- [52] Xiao-Li Li, Heng Li, Min Zhang, Hua Xu, Long-Tao Yue, Xin-Xin Zhang, Shan Wang, Cong-Cong Wang, Yan-Bin Li, Ying-Chun Dou, and Rui-Sheng Duan. Exosomes derived from atorvastatin-modified bone marrow dendritic cells ameliorate experimental autoimmune myasthenia gravis by up-regulated levels of IDO/Treg and partly dependent on FasL/Fas pathway. *Journal of neuroinflammation*, 13(1):8, 2016. ISSN 1742-2094. doi: 10.1186/s12974-016-0475-0. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4710023&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [53] G. Liu, C. Wu, Y. Wu, and Y. Zhao. Phagocytosis of apoptotic cells and immune regulation. *Scandinavian Journal of Immunology*, 64(1):1–9, 2006. ISSN 03009475. doi: 10.1111/j.1365-3083.2006.01771.x.
- [54] M.-L. Liu, K J Williams, and V P Werth. Microvesicles in Autoimmune Diseases. *Advances in Clinical Chemistry*, 77:125–175, 2016. ISSN 0065-2423. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.acc.2016.06.005>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065242316300397>.
- [55] G. P. Lotz, A. Brychzy, S. Heinz, and W. M. J. Obermann. A novel HSP90 chaperone complex regulates intracellular vesicle transport. *Journal of Cell Science*, 121(5):717–723, 2008. ISSN 0021-9533. doi: 10.1242/jcs.015610. URL <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.015610>.
- [56] Aparna Mahajan, Martin Herrmann, and Luis E. Muñoz. Clearance deficiency and cell death pathways: A model for the pathogenesis of SLE. *Frontiers in Immunology*, 7(FEB):1–12, 2016. ISSN 16643224. doi: 10.3389/fimmu.2016.00035.
- [57] Geneviève Marcoux, Anne-Claire Duchez, Nathalie Cloutier, Patrick Provost, Peter A. Nigrovic, and Eric Boilard. Revealing the diversity of extracellular vesicles using high-dimensional flow cytometry analyses. *Scientific Reports*, 6(1):35928, 2016. ISSN 2045-2322. doi: 10.1038/srep35928. URL <http://www.nature.com/articles/srep35928>.
- [58] Suresh Mathivanan. Exosomes and Shedding Microvesicles are Mediators of Intercellular Communication: How do they Communicate with the Target Cells? *J. Biotechnol. Biomater.*, 2(4):e110, 2012. ISSN 2155952X. doi: 10.4172/2155-952X.1000e110.

- [59] D. G. Meckes and N. Raab-Traub. Microvesicles and Viral Infection. *Journal of Virology*, 85(24):12844–12854, 2011. ISSN 0022-538X. doi: 10.1128/JVI.05853-11. URL <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.05853-11>.
- [60] Pragnesh Mistry and Mariana J. Kaplan. Cell death in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Clinical Immunology*, 2016. ISSN 15217035. doi: 10.1016/j.clim.2016.08.010. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2016.08.010>.
- [61] Abir Mondal, Divya Kumari Singh, Suchismita Panda, and Anjali Shiras. Extracellular Vesicles As Modulators of Tumor Microenvironment and Disease Progression in Glioma. *Frontiers in Oncology*, 7(July):1–8, 2017. ISSN 2234-943X. doi: 10.3389/fonc.2017.00144. URL <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2017.00144/full>.
- [62] Adrian E. Morelli, Adriana T. Larregina, William J. Shufesky, Mara L.G. Sullivan, Donna Beer Stolz, Glenn D. Papworth, Alan F. Zahorchak, Alison J. Logar, Zhiliang Wang, Simon C. Watkins, Louis D. Falo, and Angus W. Thomson. Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood*, 104(10):3257–3266, 2004. ISSN 00064971. doi: 10.1182/blood-2004-03-0824.
- [63] Marta Mosca, Daniele Chimenti, Federico Pratesi, Chiara Baldini, Consuelo Anzilotti, Stefano Bombardieri, and Paola Migliorini. Prevalence and clinico-serological correlations of anti-alpha-enolase, anti-C1q, and anti-dsDNA antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *The Journal of rheumatology*, 33(4):695–697, apr 2006. ISSN 0315-162X (Print).
- [64] L. E. Muñoz, K. Lauber, M. Schiller, A. A. Manfredi, G. Schett, R. E. Voll, and M. Herrmann. Die Bedeutung einer unvollständigen Beseitigung apoptotischer Zellen für Ätiologie und Pathogenese des SLE. *Zeitschrift für Rheumatologie*, 69(2):152–156, 2010. ISSN 03401855. doi: 10.1007/s00393-009-0603-7.
- [65] Joseph F Nabhan, Ruoxi Hu, Raymond S Oh, Stanley N Cohen, and Quan Lu. Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(11):4146–51, 2012. ISSN 1091-6490. doi: 10.1073/pnas.1200448109.
- [66] N. Naslavsky, J. McKenzie, N. Altan-Bonnet, D. Sheff, and S. Caplan. EHD3 regulates early-endosome-to-Golgi transport and preserves Golgi morphology. *Journal of Cell Science*, 122(3):389–400, 2009. ISSN 0021-9533. doi: 10.1242/jcs.037051. URL <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.037051>.

- [67] Alexey I Nesvizhskii, Andrew Keller, Eugene Kolker, and Ruedi Aebersold. A Statistical Model for Identifying Proteins by Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 75(17):4646–4658, sep 2003. ISSN 0003-2700. doi: 10.1021/ac0341261. URL <https://doi.org/10.1021/ac0341261>.
- [68] Cláudia Trindade Nunes, Kelly L. Miners, Garry Dolton, Chris Pepper, Chris Fegan, Malcolm D. Mason, and Stephen Man. A novel tumor antigen derived from enhanced degradation of bax protein in human cancers. *Cancer Research*, 71(16):5435–5444, 2011. ISSN 00085472. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0393.
- [69] L a O'Reilly and a Strasser. Apoptosis and autoimmune disease. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*, 48(1):5–21, 1999. ISSN 1023-3830 (Print). doi: 10.1007/s000110050369.
- [70] Isabella Parolini, Cristina Federici, Carla Raggi, Luana Lugini, Simonetta Palle-schi, Angelo De Milito, Carolina Coscia, Elisabetta Iessi, Mariantonia Logozzi, Agnese Molinari, Marisa Colone, Massimo Tatti, Massimo Sargiacomo, and Stefano Fais. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *Journal of Biological Chemistry*, 284(49):34211–34222, 2009. ISSN 00219258. doi: 10.1074/jbc.M109.041152.
- [71] Elmar Pieterse and Johan van der Vlag. Breaking immunological tolerance in systemic lupus erythematosus. *Frontiers in Immunology*, 5(APR):1–8, 2014. ISSN 16643224. doi: 10.3389/fimmu.2014.00164.
- [72] Jonathan M Pitt, Guido Kroemer, and Laurence Zitvogel. Extracellular vesicles : masters of intercellular communication and potential clinical interventions. 126(4):1139–1143, 2016. doi: 10.1172/JCI87316.cell.
- [73] Marsela Qesari, Anne Richter, Justyna Ogonek, Eva Mischak-Weissinger, Xiao-Nong Wang, and Anne M Dickinson. Cytomegalovirus-Specific T Cells Isolated by IFN-gamma Secretion Assay Do Not Induce Significant Graft-Versus-Host Reactions In Vitro. *Transplantation*, 100(11):2352–2361, nov 2016. ISSN 1534-6080 (Electronic). doi: 10.1097/TP.0000000000001219.
- [74] Graça Raposo and Willem Stoorvogel. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends, 2013. ISSN 00219525.
- [75] A. G Renehan, C Booth, and C. S Potten. What is apoptosis, and why is it important? *BMJ (Clinical research ed.)*, 322(7301):1536–8, 2001. ISSN 09598138. doi: 10.1136/bmj.322.7301.1536.
- [76] Jafar Rezaie, Saeed Ajezi, Çığır Biray Avcı, Mohammad Karimipour, Mohammad Hossein Geranmayeh, Alireza Nourazarian, Emel Sokullu, Aysa Re-

- zabakhsh, and Reza Rahbarghazi. Exosomes and their Application in Biomedical Field: Difficulties and Advantages. *Molecular Neurobiology*, 2017. ISSN 1559-1182. doi: 10.1007/s12035-017-0582-7. URL <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0582-7>.
- [77] B J Ripley, D A Isenberg, and D S Latchman. Elevated levels of the 90 kDa heat shock protein (hsp90) in SLE correlate with levels of IL-6 and autoantibodies to hsp90. *Journal of autoimmunity*, 17(4):341–346, dec 2001. ISSN 0896-8411 (Print). doi: 10.1006/jaut.2001.0549.
- [78] C. Rupp, K. A. Bode, Y. Leopold, P. Sauer, and D. N. Gotthardt. Pathological features of primary sclerosing cholangitis identified by bile proteomic analysis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1864(4):1380–1389, 2018. ISSN 1879260X. doi: 10.1016/j.bbadis.2017.09.012. URL <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.09.012>.
- [79] Federica Sallusto and Antonio Lanzavecchia. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *Journal of Experimental Medicine*, 179(4):1109–1118, 1994. ISSN 0022-1007. doi: 10.1084/jem.179.4.1109. URL <http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.179.4.1109>.
- [80] Paola Scaffidi, Tom Misteli, and Marco E Bianchi. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*, 418(6894):191–195, jul 2002. ISSN 0028-0836 (Print). doi: 10.1038/nature00858.
- [81] Martin Schiller, Isabelle Bekeredjian-Ding, Petra Heyder, Norbert Blank, Anthony D. Ho, and Hanns-Martin Lorenz. Autoantigens are translocated into small apoptotic bodies during early stages of apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 15(1):183–191, 2008. ISSN 1350-9047. doi: 10.1038/sj.cdd.4402239. URL <http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.cdd.4402239>.
- [82] Martin Schiller, Marijo Parcina, Petra Heyder, Sandra Foermer, Jenny Ostrop, Albrecht Leo, Klaus Heeg, Martin Herrmann, Hanns-Martin Lorenz, and Isabelle Bekeredjian-Ding. Induction of Type I IFN Is a Physiological Immune Reaction to Apoptotic Cell-Derived Membrane Microparticles. *The Journal of Immunology*, 189(29):1747–1756, 2012. ISSN 1550-6606. doi: 10.4049/jimmunol.1100631. URL <http://jimmunol.org/content/189/4/1747.abstract>.
- [83] Martin Schiller, Petra Heyder, Saskia Ziegler, Anna Niessen, Laura Claßen, Anna Lauffer, and Hanns-Martin Lorenz. During apoptosis HMGB1 is translocated into apoptotic cell-derived membrane vesicles. *Autoimmunity*, 46(5):342–346, aug

2013. ISSN 0891-6934. doi: 10.3109/08916934.2012.750302. URL <http://dx.doi.org/10.3109/08916934.2012.750302>.
- [84] Dilip Shah, Sangita Sah, and Swapan K. Nath. Interaction between glutathione and Apoptosis in Systemic Lupus Erythematosus. *Autoimmun Review*, 12(7): 741–751, 2013. ISSN 08966273. doi: 10.1016/j.autrev.2012.12.007.
- [85] Wen Hai Shao and Philip L. Cohen. Disturbances of apoptotic cell clearance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research and Therapy*, 13(1):1–7, 2011. ISSN 14786354. doi: 10.1186/ar3206.
- [86] Juhi Sharma, Jeffrey M. Hampton, Giancarlo R. Valiente, Takuma Wada, Holly Steigelman, Matthew C. Young, Rachel R. Spurbeck, Alisa D. Blazek, Steffi Bösh, Wael N. Jarjour, and Nicholas A. Young. Therapeutic development of mesenchymal stem cells or their extracellular vesicles to inhibit autoimmune-mediated inflammatory processes in systemic lupus erythematosus. *Frontiers in Immunology*, 8(MAY):1–7, 2017. ISSN 16643224. doi: 10.3389/fimmu.2017.00526.
- [87] N R Smalheiser. Exosomal transfer of proteins and RNAs at synapses in the nervous system. *Biol Direct*, 2:35, 2007. ISSN 1745-6150. doi: 1745-6150-2-35[pii]10.1186/1745-6150-2-35. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve{&}db=PubMed{&}dopt=Citation{&}list{&}uids=18053135>.
- [88] Victoria L. Smith, Liam Jackson, and Jeffrey S. Schorey. Ubiquitination as a Mechanism To Transport Soluble Mycobacterial and Eukaryotic Proteins to Exosomes. *The Journal of Immunology*, 195(6):2722–2730, 2015. ISSN 0022-1767. doi: 10.4049/jimmunol.1403186. URL <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1403186>.
- [89] C Sousa, I Pereira, A C Santos, C Carbone, A B Kovačević, A M Silva, and E B Souto. Targeting dendritic cells for the treatment of autoimmune disorders. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 158:237–248, 2017. ISSN 0927-7765. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.06.050>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776517304095>.
- [90] Masaki Takasugi, Ryo Okada, Akiko Takahashi, David Virya Chen, Sugiko Watanabe, and Eiji Hara. Small extracellular vesicles secreted from senescent cells promote cancer cell proliferation through EphA2. *Nature communications*, 8:15729, 2017. ISSN 2041-1723. doi: 10.1038/ncomms15728. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28585531{&}5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5467215>.

- [91] Eng M. Tan, Alan S. Cohen, James F. Fries, Alfonse T. Masi, Dennis J. Mcshane, Naomi F. Rothfield, Jane Green Schaller, Norman Talal, and Robert J. Winchester. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism*, 25(11):1271–1277, 1982. ISSN 00043591. doi: 10.1002/art.1780251101.
- [92] Damu Tang, Dongcheng Wu, Atsushi Hirao, Jill M. Lahti, Lieqi Liu, Brie Mazza, Vincent J. Kidd, Tak W. Mak, and Alistair J. Ingram. ERK activation mediates cell cycle arrest and apoptosis after DNA damage independently of p53. *Journal of Biological Chemistry*, 277(15):12710–12717, 2002. ISSN 00219258. doi: 10.1074/jbc.M111598200.
- [93] Sara K Tedeschi, Sindhu R Johnson, Dimitrios Boumpas, David Daikh, Thomas Dorner, David Jayne, Diane Kamen, Kirsten Lerstrom, Marta Mosca, Rosalind Ramsey-Goldman, Corine Sinnette, David Wofsy, Josef S Smolen, Raymond P Naden, Martin Aringer, and Karen H Costenbader. Developing and Refining New Candidate Criteria for Systemic Lupus Erythematosus Classification: An International Collaboration. *Arthritis care & research*, 70(4):571–581, apr 2018. ISSN 2151-4658 (Electronic). doi: 10.1002/acr.23317.
- [94] Toine ten Broeke, Richard Wubbolts, and Willem Stoorvogel. MHC class II antigen presentation by dendritic cells regulated through endosomal sorting. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(12):1–21, 2013. ISSN 19430264. doi: 10.1101/cshperspect.a016873.
- [95] Clotilde Thery, Laurence Zitvogel, and Sebastian Amigorena. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol*, 2(8):569–579, aug 2002. ISSN 1474-1733. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nri855>.
- [96] Clotilde Théry, Matias Ostrowski, and Elodie Segura. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 9(8):581–593, 2009. ISSN 1474-1741. doi: 10.1038/nri2567. URL <https://doi.org/10.1038/nri2567>.
- [97] C B Thompson. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science (New York, N.Y.)*, 267(5203):1456–1462, mar 1995. ISSN 0036-8075 (Print).
- [98] Mercedes Tkach and Clotilde Théry. Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell*, 164(6):1226–1232, 2016. ISSN 10974172. doi: 10.1016/j.cell.2016.01.043.
- [99] C. Tucher, K. Bode, P. Schiller, L. Claßen, C. Birr, M.M. Souto-Carneiro, N. Blank, H.-M. Lorenz, and M. Schiller. Extracellular vesicle subtypes released from acti-

- vated or apoptotic T-lymphocytes carry a specific and stimulus-dependent protein cargo. *Frontiers in Immunology*, 9(MAR), 2018. ISSN 16643224. doi: 10.3389/fimmu.2018.00534.
- [100] Mark D. Turner, Belinda Nedjai, Tara Hurst, and Daniel J. Pennington. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1843(11):2563–2582, 2014. ISSN 18792596. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.05.014. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.05.014>.
- [101] Lorena Urbanelli, Alessandro Magini, Sandra Buratta, Alessandro Brozzi, Krizia Sagini, Alice Polchi, Brunella Tancini, and Carla Emiliani. Signaling pathways in exosomes biogenesis, secretion and fate. *Genes*, 4(2):152–170, 2013. ISSN 20734425. doi: 10.3390/genes4020152.
- [102] Jessica Wahlgren, Tanya De L Karlson, Pernilla Glader, Esbjörn Telemo, and Hadi Valadi. Activated Human T Cells Secrete Exosomes That Participate in IL-2 Mediated Immune Response Signaling. *PLoS ONE*, 7(11):1–10, 2012. ISSN 19326203. doi: 10.1371/journal.pone.0049723.
- [103] L Wang, Y Dai, W Peng, S Qi, X Ouyang, and Z Tu. Differential expression of serine-threonine kinase receptor-associated protein in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 20(9):921–927, may 2011. ISSN 0961-2033. doi: 10.1177/0961203311399304. URL <https://doi.org/10.1177/0961203311399304>.
- [104] G R Wickman, L Julian, K Mardilovich, S Schumacher, J Munro, N Rath, S AL Zander, A Mleczak, D Sumpton, N Morrice, W V Bienvenut, and M F Olson. Blebs produced by actin–myosin contraction during apoptosis release damage-associated molecular pattern proteins before secondary necrosis occurs. *Cell Death and Differentiation*, 20(10):1293–1305, 2013. ISSN 1350-9047. doi: 10.1038/cdd.2013.69. URL <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/cdd.2013.69>.
- [105] Eduard Willms, Henrik J Johansson, Imre Mäger, Yi Lee, K Emelie M Blomberg, Mariam Sadik, Amr Alaarg, C I Edvard Smith, Janne Lehtiö, Samir El Andaloussi, Matthew J A Wood, and Pieter Vader. Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties. *Scientific reports*, 6(February):22519, 2016. ISSN 2045-2322. doi: 10.1038/srep22519. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4773763&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [106] Kenneth W. Witwer, Edit I. Buzás, Lynne T. Bemis, Adriana Bora, Cecilia Lässer, Jan Lötvall, Esther N. Nolte-‘t Hoen, Melissa G. Piper, Sarada Sivaraman, Johan

- Skog, Clotilde Théry, Marca H. Wauben, and Fred Hochberg. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2(1):20360, 2013. ISSN 2001-3078. doi: 10.3402/jev.v2i0.20360. URL <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3402/jev.v2i0.20360>.
- [107] Maria Yanez-Mo, Pia R.-M. Siljander, Andreu Zoraida, Apolonija Bedina Zavec, Francesc E. Borra, Edit I. Buzas, Krisztina Buzas, Enriqueta Casal, Francesco Cappello, Joana Carvalho, Eva Colas, Anabela Cordeiro-da Silva, Stefano Fais, Juan M. Falcon-Perez, Irene M. Ghobrial, Bernd Giebel, Mario Gimona, Michael Graner, Ihsan Gursel, Mayda Gursel, Niels H. H. Heegaard, An Hendrix, Peter Kierulf, Katsutoshi Kokubun, Maja Kosanovic, Veronika Kralj-Iglic, Eva-Maria Krämer-Albers, Saara Laitinen, Cecilia Lässer, Thomas Lener, Erzsebet Ligeti, Aija Line, Georg Lipps, Alicia Llorente, Jan Lötvall, Mateja Mancek-Keber, Antonio Marcilla, Maria Mittelbrunn, Irina Nazarenko, Esther N.M. Nolte-’tHoen, Tuula A. Nyman, Lorraine O’Driscoll, Mireia Olivan, Carla Oliveira, Eva Pallinger, Hernando A. del Portillo, Jaume Reventos, Marina Rigau, Eva Rohde, Marei Sammar, Francisco Sanchez-Madrid, N. Santarem, Katharina Schallmoser, Marie Stampe Ostenfeld, Willem Stoorvogel, Roman Stukelj, Susanne G. Van der Grein, M. Helena Vasconcelos, Marca H. M. Wauben, and Olivier De Wever. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4(27066), 2015. ISSN 10534296. doi: 10.1016/j.semradonc.2004.10.004.
- [108] Yusuke Yoshioka, Yuki Konishi, Nobuyoshi Kosaka, Takeshi Katsuda, Takashi Kato, and Takahiro Ochiya. Comparative marker analysis of extracellular vesicles in different human cancer types. *Journal of extracellular vesicles*, 2:1–9, 2013. ISSN 2001-3078. doi: 10.3402/jev.v2i0.20424. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3760642&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [109] Lili Zhang, Zeljka Smit-McBride, Xiaoyu Pan, Jeanette Rheinhardt, and John W.B. Hershey. An oncogenic role for the phosphorylated h-subunit of human translation initiation factor eIF3. *Journal of Biological Chemistry*, 283(35):24047–24060, 2008. ISSN 00219258. doi: 10.1074/jbc.M800956200.
- [110] Anoek Zomer, Carrie Maynard, Frederik Johannes Verweij, Alwin Kamermans, Ronny Schäfer, Evelyne Beerling, Raymond Michel Schiffelers, Elzo De Wit, Jordi Berenguer, Saskia Inge Johanna Ellenbroek, Thomas Wurdinger, Dirk Michiel Pegtel, and Jacco Van Rheenen. In vivo imaging reveals extracellular vesicle-mediated phenocopying of metastatic behavior. *Cell*, 161(5):1046–1057, 2015. ISSN 10974172. doi: 10.1016/j.cell.2015.04.042.

10 Abkürzungsverzeichnis

ACTB	Beta-Aktin-Protein
ACTG1	Gamma-Aktin-Protein
AHCY	Adenosylhomocysteinase
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
Apo	apoptotisch
APS	Ammoniumpersulfat
AxV	AnnexinV
BCA	<i>bicinchonic acid</i>
β -Me	2-Mercaptoethanol
bp	Basenpaar(e)
bz	Bortezomib
CBA	<i>cytometric bead array</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
DCs/DZ	<i>dendritic cells</i> / dendritische Zellen
DDB1	DNS <i>damage-binding</i> Protein 1
DIGE	<i>two dimensional difference gel electrophoresis</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
2D	zweidimensional
D-Ratio	Differenz-Ratio
DTT	Dithiothreitol
ECH1	Enoyl-CoA Hydratase 1
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
EHD3	<i>eps 15 homology domain-containing protein 3</i>
EIF3H	Untereinheit H des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors 3
ENO1	Alpha-Enolase
ERK 1+2	<i>extracellular signal-regulated kinase 1+2</i>
EVs/EV	<i>extracellular vesicles</i> / extrazelluläre Vesikel
Erys	Erythrozyten
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
Fas	<i>fatty acid synthetase</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
GEV	große extrazelluläre Vesikel
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage-colony stimulating factor</i>
GNB2L1	<i>guanine nucleotide-binding protein subunit beta2-like1</i>
GSN	Gelsolin
H2A	Histon 2A
HLA-DR	Humanes Leukozyten Antigen-DR
HMGB1	<i>high mobility group box 1 protein</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRP	<i>horseradish-peroxidase</i>

HSPD1	60 kDa Hitzeschock-Protein 1
HSP70	Hitzeschockprotein 70 kDa
HSP90	Hitzeschockprotein 90 kDa
IFN	Interferon
IL	Interleukin
KEV	kleine extrazelluläre Vesikel
LAP3	Leucin-Aminopeptidase 3
LAT	<i>linker for activation of T cell</i>
LCK	<i>lymphocyte kinase</i>
LEVs	<i>large extracellular vesicles</i>
LPS	Lipopolysaccharid(e)
LSM	Lymphozyten-Separationsmedium
MACS	<i>magnetic activated cell sorting</i>
MHC- class II	<i>major histocompatibility complex</i> - Klasse II
miRNS	Mikro-Ribonukleinsäuren
MS	Massenspektrometrie
MSZ	mesenchymale Stammzellen
MVP	Major Vault Protein
MYH9	schwere Kette 9 des Myosinprotein
NACA	<i>nascent-polypeptide-associated complex alpha polypeptide</i>
NAF	Natriumfluorid
NEAA	Nicht-Essentielle-Aminosäuren
NHD	<i>normal healthy donor</i> / Normalspender
NTA	<i>nanoparticle tracking analysis</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMZ	mononukleäre Zellen aus peripherem Blut
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PD-L1	<i>programmed death-ligand 1</i>
PE	Phycoerythrin
pERK	phosphoryliertes ERK
PGK1	Phosphoglyceratkinase 1
PHA	Phytohemagglutinin
PJ	Propidiumjodid
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonylfluorid
ppm	<i>part per million</i>
PPP1R7	regulatorische Untereinheit 7 der Phosphatase 1
PS	Phosphatidylserin(e)
PSMA1	Untereinheit alpha Typ-1 des Proteasoms
PSMB4	Untereinheit beta Typ-4 des Proteasoms
PSMB9	Untereinheit beta Typ-9 des Proteasoms
PSMB10	Untereinheit beta Typ-10 des Proteasoms
PUE	Proteasomuntereinheit(en)
PVDF	Polyvinylidendifluorid
R10	RPMI-Medium+10% FKS
RA	Rheumatoide Arthritis
RNS	Ribonukleinsäure
ROCK	<i>rho-associated coil</i> Kinase
RPSA	40S ribosomale Protein SA

RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodiumdodecylsulfate</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SEPT9	Septin9
SEVs	<i>small extracellular vesicles</i>
SLE	<i>systemic lupus erythematosus</i> / Systemischer Lupus Erythematoses
SLEDAI	<i>systemic lupus erythematosus disease activation index</i>
STIP1	Stress-induziertes Phosphoprotein 1
STRAP	<i>serine-threonine kinase receptor-associated protein</i>
TEMED	N,N,N',N',-Tetra-Methyl-Ethylen-Diamin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tri(hydroxymethyl)aminomethan
TSG101	<i>tumor susceptibility 101</i>
TZR	T-Zell-Rezeptor
Ub/Ubi	Ubiquitinierung
UPLC	<i>ultra performance liquid chromatography</i>
üN	über Nacht
ÜS	Überstand
UV-B	Ultraviolett-B
UZ	Ultrazentrifugation
VAS	Vaskulitis
VDAC	<i>voltage-dependent anion selective channel 1</i>
vs.	versus
WB	Western Blot
Y27632	<i>rho-associated coil</i> Kinaseinhibitor
YWHAQ	14-3-3 theta Protein
ZAP70	<i>zeta-associated protein 70</i>
ZKF	T175 Zellkulturflasche

Einheiten

α	alpha
A	Ampere
β	beta
°C	Grad Celsius
cm ²	Quadratcentimeter
d	Tag
Da	Dalton [g/mol]
x g	Erdanziehung [9,81 m/s ²]
γ	gamma
g	Gramm
h	Stunde
J	Joule
l	Liter
Log	logarithmisch
m	Meter
M	Molarität [mol/l;g/mol]
min	Minute(n)
m/z	Masse pro Ladung
rpm	Geschwindigkeit in <i>rounds per minute</i>
s	Sekunde(n)
U/IU	Einheit der Enzymaktivität [Units]
V	Volt
w	wöchentlich / Woche

Vorsilben zur Bezeichnung von Vielfachen und Teilen einer Einheit

k	Kilo (10 ³)
m	Milli (10 ⁻³)
μ	Micro (10 ⁻⁶)
n	Nano (10 ⁻⁹)
p	Piko (10 ⁻¹²)

11 Abbildungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

1	Bildliche Darstellung der Arbeitsabläufe der Punkte 4.2.1 - 4.2.3 . . .	28
2	Morphologie von GEV und KEV	39
3	NTA-Aufnahmen von GEV und KEV	41
4	Vesikelkonzentration und Proteingehalt von GEV und KEV	43
5	Proteinexpression und Regulationsmuster in GEV und KEV nach Apoptose-Induktion	46
6	Bildliche 3D-Darstellung des Proteinexpressionsmusters des Proteins NACA	48
7	Differentielles Expressionsmuster der massenspektrometrisch-ermittelten Proteine in GEV und KEV	53
8	Western Blot Analyse von Proteinen in verschiedenen EV-Populationen	56
9	Die Freisetzung von GEV wird durch Proteasominhibitor Bortezomib beeinträchtigt	57
10	Charakterisierung von EV-Subtypen durch verschiedene Proteinprofile	58
11	Aktivierte GEV/KEV führen zu einer moderaten DZ-Reifung	60
12	Apoptotische GEV/KEV führen zu einer moderaten DZ-Reifung	62
13	Proinflammatorisches Zytokinprofil von EV-stimulierten DZ	64
14	Antiinflammatorisches Zytokinprofil von EV-stimulierten DZ	66
15	T-Zellzahlen von SLE, VAS, RA und Normalspender an d0 und d7	67
16	T-Zellvitalität von SLE, VAS, RA und NHD	69
17	Größenverteilung der EV bei SLE, VAS, RA und NHD	72
18	Vesikelgröße und Vesikelkonzentrationen von GEV und KEV bei SLE, VAS, RA und NHD	75
19	Western Blot Analyse von Proteinen in verschiedenen EV-Populationen in inaktiven SLE und NHD	77

12 Tabellenverzeichnis

Tabellenverzeichnis

1	Merkmale zur Klassifizierung des Systemischen Lupus Erythematoses (SLE)	12
2	Materialienliste	17
3	Geräteliste	18
4	Chemikalienliste	19
5	Allgemeine Puffer und Lösungen	20
6	Puffer für Zellyse, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot	21
7	Charakteristika der SLE-Patienten	22
8	Charakteristika der Patienten mit Rheumatoider Arthritis	22
9	Charakteristika der Patienten mit Vaskulitis	23
10	Molekularer Größen-Standard für Gelelektrophorese	23
11	Zelltypen und Zellkulturmedien	24
12	Humane Zytokine zur Kultivierung von T-Zellen und DZ	24
13	Stimulantien	25
14	Durchflusszytometrie-Antikörper	25
15	Western Blot-Antikörper	26
16	DIGE-Farbstoffe	26
17	Verwendete Programme/ Software	27
18	Zusammensetzung eines 12,5% SDS-Gels	32

13 Danksagung

Herrn Prof. Alexander Dalpke danke ich überaus für seine Geduld, sein Verständnis und Einfühlungsvermögen, seine detaillierten und konstruktiven Reviews und dass er stets ein offenes Ohr für mich hatte. Weiterhin bedanke ich mich für die Bereitschaft des Erstgutachters.

Herrn Prof. Volker Lohmann, Herrn Prof. Viktor Umansky, Herrn Prof. Markus Hecker danke ich für ihre Bereitschaft als Gutachter und Prüfer.

Ein großer Dank geht an Herrn Prof. Hanns-Martin Lorenz und Dr. Martin Schiller, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Beiden danke ich für die Durchführung meiner Doktorarbeit in den Räumen der Rheumatologie, die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen, die wertvollen Ratschläge und Denkanstöße und die Möglichkeit der Teilnahme an Kongressen und Fortbildungen.

Petra, Margarida, Stefan, Susanne, Carolin, Lars, Theresa, Pana, Laura danke ich für deren Unterstützung bei den täglichen Laborarbeiten.

Sämtlichen Mitarbeitern des Uniklinikums Heidelberg und der Universität danke ich für ihre Unterstützung bei der Gewinnung von Blutspenden oder "Mausproben".

Dr. Konrad Bode, Dominik Stammeler, Andrea Hellwig und dem Team der Core Facility Mass spec unter Herrn Dr. Thomas Ruppert für die Unterstützung bei technischen Arbeiten.

Dr. Ursula Leipziger und meinem Mann Konrad kann ich nicht genug danken für das geduldige Aufbauen und anhaltende Mutmachen.

Vielen Dank!