

Aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
(Direktor: Prof. Dr. Nicolai Maass)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Charakterisierung Cisplatin-induzierter extrazellulärer Vesikel des Ovarialkarzinoms unter besonderer Berücksichtigung der Metalloprotease ADAM17

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Gerrit Hugendieck
aus Rheine
Kiel, 2023

Aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
(Direktor: Prof. Dr. Nicolai Maass)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Charakterisierung Cisplatin-induzierter extrazellulärer Vesikel des Ovarialkarzinoms unter besonderer Berücksichtigung der Metalloprotease ADAM17

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Gerrit Hugendieck
aus Rheine
Kiel, 2023

-
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dirk Bauerschlag, Universitätsklinikum Jena, Klinik für Frauenheilkunde und Fortpflanzungsmedizin
2. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Thomas Valerius, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Klinik für Innere Medizin II mit den Schwerpunkten Hämatologie und Onkologie
- Tag der mündlichen Prüfung: 07.03.2025

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 22.10.2024

gez.: Prof. Dr. Dirk Bauerschlag
Vorsitzender der Prüfungskommission

**In Dankbarkeit
meinen Eltern
Großeltern
und Maja**

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abbildungen	IV
Verzeichnis der Tabellen.....	VI
Abkürzungen.....	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Das Ovarialkarzinom	1
1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren.....	1
1.1.2 Klassifikation und Ätiopathogenese	1
1.1.3 Stadieneinteilung von Ovarialtumoren	2
1.1.4 Erst- und Zweitlinientherapie des Ovarialkarzinoms	2
1.1.5 Prognose des Ovarialkarzinoms	3
1.1.6 Chemotherapieresistenz	3
1.2 Die Metalloprotease ADAM17.....	4
1.2.1 Familie der <i>A Disintegrin And Metalloproteases</i>	4
1.2.2 <i>Ectodomain-Shedding</i> und regulierte intramembranäre Proteolyse.....	5
1.2.3 Struktur und Regulation von ADAM17	5
1.2.4 Physiologische Bedeutung von ADAM17	7
1.2.5 Pathophysiologische Bedeutung von ADAM17 im Ovarialkarzinom.....	8
1.3 Extrazelluläre Vesikel	9
1.3.1 Nomenklatur.....	9
1.3.2 Biogenese, Inhalt und Aufnahme von extrazellulären Vesikeln.....	10
1.3.3 Anreicherung von extrazellulären Vesikeln.....	11
1.3.4 Charakterisierung von extrazellulären Vesikeln	12
1.3.5 Biologische Bedeutung von extrazellulären Vesikeln.....	12
1.3.6 Pathophysiologische Bedeutung von extrazellulären Vesikeln im Ovarialkarzinom	13
1.4 Zielsetzung	15
2 Material	17
2.1 Zellkultur	17
2.1.1 Zelllinien	17
2.1.2 Zellkulturmedien, -stimulantien, Puffer und Lösungen.....	17
2.2 Proteinbiochemie.....	19
2.2.1 Lysepuffer mit Protease-Inhibitoren	19
2.2.2 Proteinbestimmung.....	19
2.2.3 Gelelektrophorese	19
2.2.4 Western Blot.....	20
2.2.5 Antikörper.....	21
2.3 Geräte	22
2.4 Verbrauchsmaterialien	25

3 Methoden	27
3.1 Zellkultur	27
3.1.1 Herstellung eines von extrazellulären Vesikeln depletierten Kulturmediums	27
3.1.2 Kultivieren, Passagieren und Kryokonservieren von Ovarialkarzinomzellen	28
3.1.3 Messung des Zellüberlebens	29
3.1.4 Bestimmung der Zellzahl sowie Durchführung von Aussaat und Stimulation	30
3.2 Gewinnung und Lagerung von Aszites	30
3.3 Anreicherung, Charakterisierung und Lagerung extrazellulärer Vesikel	31
3.3.1 Anreicherung extrazellulärer Vesikel durch differentielle Zentrifugation und Ultrazentrifugation	31
3.3.2 <i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>	33
3.3.3 Transmissionselektronenmikroskopie	35
3.3.4 Lipidprofil-Bestimmung	35
3.3.5 Untersuchung der Lagerungsfähigkeit extrazellulärer Vesikel	35
3.4 Proteinbiochemie	36
3.4.1 Herstellung von Lysaten	36
3.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung	37
3.4.3 Gelelektrophorese	37
3.4.4 Western Blot	38
3.5 Analyse der Aufnahme von extrazellulären Vesikeln durch Ovarialkarzinomzellen	39
3.5.1 Fluoreszenzmarkierung extrazellulärer Vesikel	39
3.5.2 <i>Live-Cell Imaging</i>	39
3.5.3 <i>Imaging</i> -Durchflusszytometrie	39
3.6 Statistische Analysen	41
4 Ergebnisse	42
4.1 ADAM17-Aktivierung und Partikelfreisetzung nach Cisplatin-Stimulation	42
4.2 Charakterisierung extrazellulärer Vesikel und Überprüfung der Protokollqualität	44
4.2.1 Charakterisierung mittels <i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>	45
4.2.2 Charakterisierung mittels Western Blot	56
4.2.3 Charakterisierung mittels Transmissionselektronenmikroskopie	58
4.2.4 Charakterisierung von Cisplatin-EV mittels Lipidomics	59
4.3 Lagerungsfähigkeit von extrazellulären Vesikeln bei -80 °C	61
4.4 Auswirkungen von Cisplatin- bzw. PMA-Stimulation auf Zellüberleben, EV-Freisetzung und EV-assoziierte ADAM17-Abundanz	64
4.4.1 Korrelation von Zelltod und EV-Freisetzung unter PMA- und Cisplatin-Stimulation	64
4.4.2 Western-Blot-Analyse zum Nachweis von ADAM17 in unter PMA- bzw. Cisplatin-Stimulation freigesetzten extrazellulären Vesikeln	66
4.5 Aufnahme extrazellulärer Vesikel in Ovarialkarzinomzellen	71
4.5.1 Beurteilung der Aufnahme extrazellulärer Vesikel mittels <i>Live-Cell Imaging</i>	71
4.5.2 Beurteilung der Aufnahme extrazellulärer Vesikel mittels <i>Imaging</i> -Durchflusszytometrie	72

4.6	EV-Konzentration und ADAM17-Abundanz von aus Aszites isolierten extrazellulären Vesikeln	75
5	Diskussion	79
5.1	Nachweis und Charakterisierung von durch Cisplatin- bzw. PMA-induzierten extrazellulären Vesikeln aus Ovarialkarzinomzellen	79
5.2	Dokumentation der EV-Anreicherung und Evaluation des methodenbedingten EV-Verlustes	84
5.3	Lagerungsfähigkeit von PMA- und Cisplatin-EV	86
5.4	Durch PMA- und Cisplatin-Stimulation freigesetzte extrazelluläre Vesikel enthalten ADAM17	86
5.5	Durch Cisplatin-Stimulation freigesetzte extrazelluläre Vesikel werden von Ovarialkarzinomzellen aufgenommen	91
5.6	Extrazelluläre Vesikel aus Patientinnen-Aszites enthalten ADAM17	94
5.7	Ausblick	97
6	Zusammenfassung	101
7	Abstract	102
8	Literaturverzeichnis	103
9	Anhang	114
9.1	Charakterisierung von PMA- und Cisplatin-EV mittels <i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>	114
9.2	Transmissionselektronenmikroskopische Übersichtsaufnahmen zur EV-Charakterisierung	119
9.3	Transmissionselektronenmikroskopische Übersichtsaufnahmen zur Beurteilung der EV-Lagerungsfähigkeit	120
9.4	Bestimmung der Konzentration und durchschnittlichen Größe von EV als Vorbereitung der EV-Aufnahmeexperimente	121
9.5	Berechnung der Domänenstruktur von ADAM17	122
9.5.1	Aminosäuresequenz und Domänenstruktur von ADAM17	122
9.5.2	Berechnung der Molekularen Massen der Domänen von ADAM17	123
9.6	Danksagung	124
9.7	Publikationen	125
9.8	Eidesstattliche Versicherung	126

Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1.1:	Domänenstruktur der Proform von ADAM17.	6
Abbildung 3.1:	Herstellung eines EV-depletierten Kulturmediums nach Théry et al. (2006).....	27
Abbildung 3.2:	Mikroskopische Darstellung des durch Trypanblaufärbung nachgewiesenen Zellüberlebens.	29
Abbildung 3.3:	Schematische Darstellung der Anreicherung von EV durch differentielle Zentrifugation und Ultrazentrifugation.....	32
Abbildung 3.4:	Schematische Darstellung einer Messung mittels NTA und Visualisierung der Ergebnisse.....	34
Abbildung 4.1:	Western Blot zum Nachweis der Cisplatin-induzierten zellulären Aktivierung von ADAM17.....	42
Abbildung 4.2:	NTA zur Bestimmung der Partikelfreisetzung von Igrov-1-Zellen unter PMA- bzw. Cisplatin-Stimulation.	43
Abbildung 4.3:	Darstellung der durch differentielle Zentrifugation und Ultrazentrifugation erhaltenen Überstände (S) und Pellets (P).	44
Abbildung 4.4:	NTA zur Bestimmung der Größe und Konzentration von Partikeln in Überständen und Pellets nach PMA-Stimulation von Igrov-1-Zellen und deren Prozessierung gemäß Anreicherungsprotokoll.	46
Abbildung 4.5:	NTA zur Bestimmung der Größe und Konzentration von Partikeln in Überständen und Pellets nach Cisplatin-Stimulation von Igrov-1-Zellen und deren Prozessierung gemäß Anreicherungsprotokoll.....	47
Abbildung 4.6:	Partikelkonzentration in Überständen und Pellets nach PMA- bzw. Cisplatin-Stimulation von Igrov-1-Zellen und deren Prozessierung gemäß Anreicherungsprotokoll.....	49
Abbildung 4.7:	Durchschnittliche Größen und Größenverteilung von PMA-induzierten Partikeln in den Überständen S1 _{PMA} bis S5 _{PMA} und den Pellets P2 _{PMA} , P3 _{PMA} und P5 _{PMA}	51
Abbildung 4.8:	Durchschnittliche Größen und Größenverteilung von Cisplatin-induzierten Partikeln in den Überständen S1 _{Cis} bis S5 _{Cis} und den Pellets P2 _{Cis} , P3 _{Cis} und P5 _{Cis}	52
Abbildung 4.9:	Prozentuale Anteile kleiner, mittelgroßer und großer Partikel in den Überständen S1 bis S5 und den Pellets P2, P3 und P5.	54
Abbildung 4.10:	Western Blots von Zelllysaten unbehandelter und mit Cisplatin- bzw. PMA-behandelter Igrov-1-Zellen sowie den[evtl. von] Pelletlysaten P2, P3 und P5 mit drei EV-Markern und einem Nicht-EV-Marker.....	57
Abbildung 4.11:	Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Partikeln der Pellets P5 _{PMA} und P5 _{Cis}	59
Abbildung 4.12:	Lipidzusammensetzung von Donorzellen und von EV, die unter verschiedenen Konzentrationen Cisplatin freigesetzt wurden.....	60
Abbildung 4.13:	EV-Konzentration und durchschnittliche EV-Größen vor und nach achttägigem Einfrieren.	62
Abbildung 4.14:	Elektronenmikroskopische Aufnahmen von in Trehalose-Lösung suspendierten EV.....	63

Abbildung 4.15:	Zellüberleben und relative EV-Freisetzung unter PMA- bzw. Cisplatin-Stimulation.	65
Abbildung 4.16:	Western Blots zum Nachweis von ADAM17 und dem EV-Marker CD63 in nach PMA-Stimulation angereicherten EV-Lysaten.	67
Abbildung 4.17:	Western Blots zum Nachweis von ADAM17 und dem EV-Marker CD63 in Lysaten von nach Cisplatin-Stimulation angereicherten EV.	69
Abbildung 4.18:	<i>Life-Cell Imaging</i> zur qualitativen Untersuchung der Aufnahme von fluoreszenzmarkierten EV durch Igrov-1-Zellen.	71
Abbildung 4.19:	<i>Imaging</i> -durchflusszytometrische Analyse der Aufnahme von PMA- bzw. Cisplatin-EV durch Igrov-1-Zellen.	72
Abbildung 4.20:	Relative Internalisierung von PMA- bzw. Cisplatin-EV in mit und ohne Latrunculin A behandelten Igrov-1-Zellen in Kurz- und Langzeitstimulation.	74
Abbildung 4.21:	NTA zur Ermittlung der Größenverteilung und Konzentration von aus Aszites angereicherten EV.	76
Abbildung 4.22:	Western Blot zum Nachweis von ADAM17 und den EV-Markern CD63 und HSP70 in aus Aszites angereicherten und lysierten EV.	77
Abbildung 5.1:	Domänenstruktur von ADAM17.	87
Abbildung 5.2:	Aufnahme von EV in Akzeptorzellen nach Mathieu et al. (2019).	92
Abbildung 5.3:	Hypothetisches Modell, auf welchen Wegen Cisplatin-EV-assoziierte ADAM17 tumorfördernd wirken könnte.	99
Abbildung 9.1:	NTA zur Bestimmung der Größe und Konzentration von Partikeln in Überständen und Pellets nach PMA-Stimulation von Igrov-1-Zellen und deren Prozessierung gemäß Anreicherungsprotokoll (2/3).	115
Abbildung 9.2:	NTA zur Bestimmung der Größe und Konzentration von Partikeln in Überständen und Pellets nach PMA-Stimulation von Igrov-1-Zellen und deren Prozessierung gemäß Anreicherungsprotokoll (3/3).	116
Abbildung 9.3:	NTA zur Bestimmung der Größe und Konzentration von Partikeln in Überständen und Pellets nach Cisplatin-Stimulation von Igrov-1-Zellen und deren Prozessierung gemäß Anreicherungsprotokoll (2/3).	117
Abbildung 9.4:	NTA zur Bestimmung der Größe und Konzentration von Partikeln in Überständen und Pellets nach Cisplatin-Stimulation von Igrov-1-Zellen und deren Prozessierung gemäß Anreicherungsprotokoll (3/3).	118
Abbildung 9.5:	Elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahmen von Partikeln der Pellets P5 _{PMA} und P5 _{Cis}	119
Abbildung 9.6:	Elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahmen von in Trehalose suspendierten Partikeln der Pellets P5 _{PMA} und P5 _{Cis}	120
Abbildung 9.7:	NTA zur Bestimmung der EV-Konzentrationen und durchschnittliche EV-Größen als Vorbereitung der EV-Aufnahmeexperimente (Kap. 4.5).	121
Abbildung 9.8:	Aminosäuresequenz und Domänenstruktur der Metalloprotease ADAM17.	122

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1:	FIGO- und TNM-Klassifikation der Tumore des Ovars, der Tube und des primären peritonealen Karzinoms nach Berek et al. (2018).	2
Tabelle 2:	Eigene Berechnung des molekularen Gewichts der verschiedenen ADAM17-Domänen, entsprechend einer Einteilung von Grötzinger et al. (2017)	123

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADAM	<i>A Disintegrin And Metalloprotease</i>
ADAMDEC1	<i>A-Disintegrin-And-Metalloprotease-Like Decysin 1</i>
APS	Ammoniumperoxidisulfat
AREG	Amphiregulin
ATP	Adenosintriphosphat
BRCA	<i>Breast Cancer Gen</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CAF	<i>Cancer-Associated Fibroblast</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
Cis	Cisplatin (cis-Diammindichloridoplatin)
CANDIS	<i>Conserved ADAM17 Dynamic Interaction Sequence</i>
DC	Dünnschichtchromatographie
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
ECL	<i>Enhanced Chemoluminescence Developing Solution</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESCRT	<i>Endosomal Sorting Complex Required for Transport</i>
et al.	und andere
EtOH	Ethanol
EV	Extrazelluläre Vesikel
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FIGO	<i>Fédération Internationale de Gynécologie et Obstetrique</i>
FKS	Fetales Kälberserum
ggf.	gegebenenfalls
GM130	Golgi-Matrixprotein 130
Gp130	Glykoprotein 130

GSM	Glykosphingomyelin
HB-EGF	<i>Heparin-Binding Epidermal-Growth-Factor-Like Growth Factor</i>
HCl	Chlorwasserstoffsäure
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
HSP70	Heat Shock Protein 70
IL-6	Interleukin-6
ILV	Intraluminale Vesikel
ISEV	<i>International Society of Extracellular Vesicles</i>
LPC	Lysophosphatidylcholin
LPE	Lysophosphatidylethanolamin
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
miRNA	<i>Micro Ribonucleic Acid</i>
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
MVE	Multivesikuläre Endosomen
Na ₃ VO ₄	Natriumorthovanadat
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaN ₃	Natriumazid
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NP-40	Octylphenoxy-Poly(ethylenoxy)ethanol
NTA	<i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>
P/S	Penicillin/Streptomycin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PC	Phosphatidylcholin
PC-O	1-O-alkyl-2-acyl-Phosphatidylcholin
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PE	Phosphatidylethanolamin
PEG	Polyethylenglycol

PFA	Paraformaldehyd
PI	Phosphatidylinositol
PI3K	Phosphoinositide-3-Kinase
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PS	Phosphatidylserin
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation-Assay</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
sADAM17	<i>Soluble ADAM17</i>
sCMOS	<i>Scientific Complementary Metal-Oxide-Semiconductor</i>
SDS	<i>Sodium Dodecylsulfate</i>
SEC	<i>Size-Exclusion Chromatography</i>
SEM	Standardfehler
sIL-6R- α	Soluble Interleukin-6 Receptor- α
SM	Sphingomyelin
SNARE	<i>Soluble N-Ethylmaleimide-Sensitive-Factor Attachment Receptor</i>
STR	<i>Short Tandem Repeat</i>
TACE	<i>Tumor Necrosis Factor-Alpha Converting Enzyme</i>
TAM	tumorassoziierte Makrophagen
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TBS-T	<i>Tris Buffered Saline with Tween</i>
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TNFR	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor</i>
TNM	Tumor-Nodus-Metastase
T _{reg}	regulatorische T-Zellen
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u. a.	unter anderem
Z	Zelllysate
z. B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Das Ovarialkarzinom

1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Das Ovarialkarzinom ist nach dem Mammakarzinom die gynäkologische Krebserkrankung mit der zweithöchsten Mortalität in Deutschland [1]. Betrachtet man jedoch die relativen Überlebensraten, so besitzt das Ovarialkarzinom im Vergleich mit dem Mammakarzinom eine deutlich schlechtere Prognose [1, 2]. Im Jahr 2016 erkrankten in Deutschland 7350 Frauen erstmalig an einem Ovarialkarzinom. Ihr durchschnittliches Alter zum Diagnosezeitpunkt betrug 68 Jahre [1]. Das Lebenszeitrisko, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, beträgt somit etwa 1,3 % [1, 3]. Zu den Hauptrisikofaktoren des Ovarialkarzinoms zählen ein fortgeschrittenes Alter, Übergewicht, Infertilität und eine familiäre Prädisposition. Als protektive Faktoren wurden mehrere Geburten, eine lange Stillzeit, Sterilisation durch Tubenligatur und die Einnahme von Ovulationshemmern identifiziert [1, 4–8].

1.1.2 Klassifikation und Ätiopathogenese

Histologisch konnte gezeigt werden, dass der Großteil der Ovarialtumore vom Epithel, Keimstranggewebe, Stroma oder von den Keimzellen ausgeht [9]. Hierbei bilden Tumore epithelialen Ursprungs mit mehr als 80 % die größte Gruppe und sind für den überwiegenden Teil der mit Ovarialtumoren assoziierten Todesfälle verantwortlich [1, 3, 9]. Die epithelialen Ovarialtumore lassen sich in *high-grade* seröse (70 %), endometrioid (10 %), klarzellige (10 %), muzinöse (5 %) und *low-grade* seröse (< 5 %) Tumore einteilen [10].

Es gibt zahlreiche Hypothesen zur Ätiologie des Ovarialkarzinoms. Bereits in den 1970er Jahren wurde vermutet, dass repetitive Verletzungen des Ovars infolge der Ovulationen und anschließender Regeneration des Epithels genetische Instabilitäten entstehen lassen, welche die Karzinombildung begünstigen [11]. Dahingegen legen neuere Untersuchungen die Vermutung nahe, dass die primäre Karzinombildung auch in den Eileitern oder im Endometrium stattfinden könnte und erst sekundär auf die Eierstöcke übergeht [4, 12]. Unabhängig davon konnte anhand von genetischen Analysen gezeigt werden, dass der überwiegende Teil der Ovarialkarzinome auf Basis spontaner Mutationen entsteht, wobei häufig das Tumorsuppressorgen p53 betroffen ist [13]. Darüber hinaus gibt es verschiedene Risikogene, die eine Erkrankung wahrscheinlicher machen [14]. Hierbei sind vor allem die *Breast Cancer Gen 1* (BRCA1)- und *Breast Cancer Gen 2* (BRCA2)-Mutationen zu nennen, welche bei bis zu 20 % der Ovarialkarzinom-Patientinnen nachweisbar sind [15].

1.1.3 Stadieneinteilung von Ovarialtumoren

Zur Einteilung der Stadien von Ovarialtumoren sind sowohl das Klassifikationssystem der *Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstetrique* (FIGO) als auch die Tumor-Nodus-Metastase-Klassifikation (TNM) gebräuchlich [16]. Seit dem Jahr 2014 werden Tumore des Ovars und der Tube sowie das primäre peritoneale Karzinom in einem gemeinsamen Klassifikationssystem geführt. Eine vereinfachte Darstellung wird in Tabelle 1 gezeigt [16, 17].

Tabelle 1: FIGO- und TNM-Klassifikation der Tumore des Ovars, der Tube und des primären peritonealen Karzinoms nach Berek et al. (2018).

TNM	FIGO	Definition
T1	I	Tumor auf die Ovarien oder Tuben beschränkt
T2	II	Tumor infiltriert Strukturen im kleinen Becken
T3	III	Tumor infiltriert peritoneale Strukturen außerhalb des kleinen Beckens und/oder bildet retroperitoneale Lymphknotenmetastasen (N1)
M1	IV	Fernmetastasen mit Ausnahme peritonealer Metastasen

1.1.4 Erst- und Zweitlinientherapie des Ovarialkarzinoms

Die aktuelle evidenz- und konsensbasierte S3-Leitlinie aus dem Jahr 2020 empfiehlt eine primäre operative Therapie mit gleichzeitigem *Staging*. Hierbei soll in die gesamte Abdominalhöhle Einsicht genommen werden, eine Peritonealzytologie abgenommen, Biopsien aller auffälligen Veränderungen und peritonealer Prädilektionsstellen entnommen, die Exstirpation von Ovarien und Uterus (wenn eine fertilisationserhaltende Therapie nicht möglich oder nötig ist) veranlasst, eine (Teil-)Resektion des *Omentum majus* durchgeführt und ggf. der Blinddarm sowie pelvine und paraaortale Lymphknoten entfernt werden [16]. Das Erreichen einer makroskopischen Tumorfreiheit zeigt sowohl im progressionsfreien Überleben als auch im Gesamtüberleben einen Vorteil [18]. Aus diesem Grund kann auch eine über die *Staging*-Operation hinausgehende multiviszzerale Resektion diskutiert werden, wenn dadurch eine makroskopische Tumorfreiheit erzielt werden kann [16].

Im Anschluss an die Operation folgt im Rahmen der Erstlinientherapie eine adjuvante platinhaltige Chemotherapie, welche mit dem Mitosehemmstoff Paclitaxel oder dem die Angiogenese hemmenden, monoklonalen Antikörper Bevacizumab ergänzt werden kann [16]. Zu den platinhaltigen Chemotherapeutika gehören Cis- und Carboplatin, wobei anzumerken ist, dass Cisplatin aktuell seltener in der Therapie des Ovarialkarzinoms eingesetzt wird. Dies liegt daran, dass Carboplatin eine bessere Verträglichkeit aufweist und mit einer therapiebezogenen höheren Lebensqualität assoziiert ist. Im

direkten Vergleich zeigen beide Zytostatika in Bezug auf das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben keine signifikanten Unterschiede [19]. Da Cis- und Carboplatin als Replikationshemmstoffe sowie Apoptoseinduktoren einen vergleichbaren Wirkungsort und Mechanismus zeigen, sind bei Resistenzbildung beide Therapeutika im Sinne einer Kreuzresistenz betroffen [20–24].

Nach einem Rezidiv wird in Abhängigkeit vom Resistenzverhalten des Tumors als Zweitlinientherapie entweder erneut eine platinhaltige Polychemotherapie eingeleitet oder auf eine Monochemotherapie mit PEGyliertem, liposomalem Doxorubicin, Topotecan, Gemcitabin bzw. Paclitaxel umgestellt. Diese Therapien können ggf. mit Bevacizumab, Poly-ADP-Ribose-Polymerase(PARP)-Inhibitoren, operativen Rezidivresektionen und einer Strahlentherapie ergänzt werden [16].

1.1.5 Prognose des Ovarialkarzinoms

Die Prognose des Ovarialkarzinoms ist trotz zahlreicher medizinischer Fortschritte in den letzten Jahrzehnten immer noch infaust. Patientinnen mit epithelialen Tumoren weisen eine durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate von 47 % auf, während Tumore im Stadium I mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 89 % und Tumore im Stadium IV mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 20 % assoziiert sind [3]. Die hohe Mortalität geht darauf zurück, dass etwa 75 % der Tumore erst in den fortgeschrittenen Stadien III und IV diagnostiziert werden und Patientinnen mit einem fortgeschrittenen Ovarialkarzinom in den meisten Fällen während oder nach der Therapie ein Rezidiv entwickeln [1, 25, 26]. Diese Rezidive lassen sich anhand der als Erstlinientherapie verabreichten Chemotherapie in platinsensitive und platinresistente Rezidive einteilen [27].

Neben den die Prognose einschränkenden Faktoren gibt es einige Aspekte, die zu einer günstigeren Prognose beitragen. Hierzu zählen ein niedriges Tumorstadium, ein möglichst geringes Tumorresidualvolumen nach der Operation, ein geringes histologisches Tumorgrading, die Anwendung einer leitliniengerechten Therapie sowie ein guter Allgemeinzustand und ein jüngeres Alter der Patientinnen [16].

1.1.6 Chemotherapieresistenz

Das allgemeine Ansprechen der meisten Ovarialtumore auf die platinhaltige Chemotherapie ist zu Therapiebeginn meist gut [28]. Jedoch kommt es in Abhängigkeit von der Residualtumorgröße nach Operation bei 60–85 % der Patientinnen mit einem epithelialen Ovarialkarzinom trotz Chemotherapiegabe zu einem Rezidiv [26]. In Bezug auf eine sich anschließende Zweitlinientherapie ist deshalb eine Einteilung in platingeeignete (platinsensitive) und -ungeeignete (platinresistente) Rezidive sinnvoll [16]. Hierbei ist jedoch anzumerken, dass Rezidive des Ovarialkarzinoms nur sehr selten kurativ behandelbar sind, weshalb den Patientinnen ggf. bereits frühzeitig eine palliative Weiterbehandlung angeboten werden sollte [26, 27]. All dies unterstreicht die Bedeutung der platinhaltigen

Chemotherapie in der kurativen Behandlung des Ovarialkarzinoms und die Wichtigkeit, Chemotherapieresistenzen und Tumorrezidive zu unterbinden.

In den vergangenen Jahren wurden zahlreiche Mechanismen identifiziert, durch welche Ovarialkarzinome eine Resistenz gegenüber einer Chemotherapie ausbilden können. Beschrieben wurden beispielsweise Membran-ATPasen und *Carrier*, welche die Chemotherapeutika aus den Tumorzellen schleusen, veränderte DNA-Reparaturmechanismen, die bei DNA-Schädigung die Tumorzelle nicht in die Apoptose führen, und veränderte Zell-Signaltransduktionswege, die auf vielfältige Weise das Tumorüberleben begünstigen [29]. Vielversprechend erscheint hierbei der *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR)-Signalweg, welcher tumorfördernde Schlüsselemente wie die *Mitogen Activated Protein Kinase* (MAPK) und die *Phosphoinositide-3-Kinase* (PI3K) kontrolliert [29–31]. Von großem Interesse ist, dass die Aktivität des EGF-Rezeptors maßgeblich von der *A Disintegrin And Metalloprotease 17* (ADAM17) moduliert wird, die einen Großteil der EGFR-Liganden durch *Ectodomain-Shedding* freisetzt [32, 33].

1.2 Die Metalloprotease ADAM17

1.2.1 Familie der *A Disintegrin And Metalloproteases*

ADAM17 gehört zu den *A Disintegrin And Metalloproteases* (ADAM), welche wiederum Teil der großen Familie der Metalloproteasen sind [34]. Die ADAMs gliedern sich in 21 humane Vertreter, von denen lediglich 13 eine proteolytische Aktivität aufweisen [35]. Die Fähigkeit zur Proteolyse ist an die Metalloproteasedomäne gebunden und insbesondere an die Aminosäuren-Sequenz HEXXHXXGXXHD [35, 36]. Diese Aminosäuren-Sequenz bindet über die drei Histidinreste ein Zink-Ion im aktiven Zentrum, wobei in Wechselwirkung mit dem Glutamatrest ein Wassermolekül polarisiert wird, welches durch nukleophilen Angriff die Peptidbindung eines Substrats spalten kann [37]. Die nicht-proteolytisch aktiven ADAMs übernehmen Funktionen in der Zell-Zellkommunikation [36]. Das Vorkommen der verschiedenen ADAM-Proteinasen ist sehr unterschiedlich. Ein Drittel der ADAMs (ADAM9, 10, 12, 15, 17, 19) wird ubiquitär exprimiert, was ihre hohe physiologische Bedeutung unterstreicht. Das zweite Drittel der ADAMs (ADAM8, 11, 12, 22, 23, 28, 33, *A-Disintegrin-And-Metalloprotease-Like Decysin 1* (ADAMDEC1)) zeigt eine höhere Gewebespezifität und wird beispielsweise in neuronalen, hämatopoetischen sowie plazentaren Zellen exprimiert. Das letzte Drittel der ADAMs (ADAM2, 7, 18, 20, 21, 29, 30) zeigt ein spezifisches Auftreten im Hoden und ist vor allem in Prozesse der Spermiogenese involviert [35].

Genetische Analysen zeigen, dass die Struktur vieler ADAM-Proteasen evolutionär stark konserviert wurde, was auch für ihre besondere Bedeutung in physiologisch fundamentalen Prozessen spricht [35, 38]. Aus diesem Grund ist es auch nicht verwunderlich, dass sie mit zahlreichen Erkrankungen

assoziiert sind. Eine herausragende Rolle spielt hierbei die Metalloprotease ADAM17, die in inflammatorischen Erkrankungen, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, neuronalen Erkrankungen und zahlreichen Tumorarten, darunter auch das Ovarialkarzinom, zur Pathogenese beiträgt [32]. Deshalb gehört ADAM17 zu den am intensivsten untersuchten ADAM-Proteasen und ist als diagnostischer Marker und als Zielstruktur von Medikamenten von zentralem Interesse [32, 33, 36, 39].

1.2.2 *Ectodomain-Shedding* und regulierte intramembranäre Proteolyse

Die posttranslationale Prozessierung von Proteinen ist in der Regel von großer Bedeutung für deren korrekte Funktion. Dies gilt auch für zahlreiche Transmembranproteine, welche häufig erst durch *Ectodomain-Shedding* oder kurz *Shedding* in ihre aktive Form überführt werden [40]. Beim *Ectodomain-Shedding* handelt es sich um eine irreversible Reaktion, in deren Folge eine extrazellulär gelegene Peptidbindung hydrolytisch durch eine Protease gespalten wird [40, 41]. Eine Protease, welche durch *Ectodomain-Shedding*-Substrate prozessieren kann, wird als „*Sheddase*“ bezeichnet. Zu den wichtigsten bekannten *Sheddases* gehört die Familie der ADAM-Proteasen. Beispielsweise besitzt ADAM17 mehr als 80 potenzielle Substrate, die u. a. als Zelladhäsionsmoleküle, Zytokine, Wachstumsfaktoren oder auch Rezeptoren fungieren [32, 42]. *Sheddases* haben somit einen wichtigen Einfluss auf die auto-, para- sowie juxtakrine Kommunikation im Zellgefüge und ermöglichen über das Blut eine endokrine Beeinflussung weit entfernter Zellen [36]. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass auch *Sheddases* selbst durch andere *Sheddases* prozessiert werden können. Ein Beispiel hierfür ist wiederum die *Sheddase* ADAM17, welche durch ADAM8 in eine lösliche Form (sADAM17) überführt werden kann [43].

Nach dem *Shedding* und der extrazellulären Freisetzung der Ektodomäne kann es dazu kommen, dass in einem zweiten Schritt die verbleibende Transmembrandomäne proteolytisch gespalten wird. Hierbei spricht man von regulierter intramembranärer Proteolyse. Die auf diesem Weg entstehenden zytosolischen Spaltprodukte können beispielsweise als Transkriptionsfaktoren die Expression von Genen verändern [40, 44].

1.2.3 Struktur und Regulation von ADAM17

Bei ADAM17 handelt es sich um ein Typ-1-Transmembranprotein, dessen Proform ausgehend vom N-terminalen Ende in eine Prodomäne, eine Metalloproteasedomäne, eine Disintegrin-like-Domäne, eine membranproximale Domäne, eine *Conserved ADAM17 Dynamic Interaction Sequence* (CANDIS)-Region, eine Transmembranregion sowie eine zytoplasmatische Domäne gliedert werden kann (Abb. 1.1) [45].

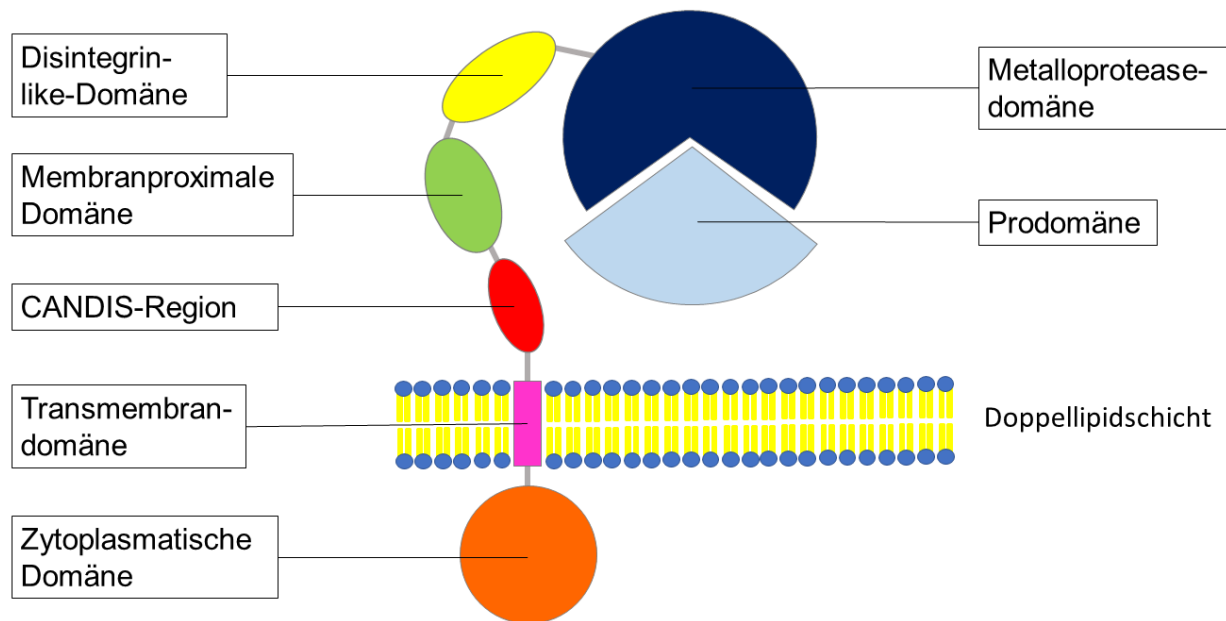


Abbildung 1.1: Domänenstruktur der Proform von ADAM17.

ADAM17 kann, vom N-terminalen Ende betrachtet, in eine Prodomäne (PD), eine Metalloproteasedomäne (MD), eine Disintegrin-like-Domäne (DLD), eine membranproximale Domäne (MPD), eine CANDIS-Region (CR), eine Transmembrandomäne (TM) und eine zytoplasmatische Domäne (ZD) eingeteilt werden. Abbildung modifiziert nach Grötzinger et al. (2017) [45].

Durch proteolytische Abspaltung der Prodomäne wird ADAM17 in die mature, funktionell aktive Metalloprotease überführt [46, 47]. Die Aktivität von maturer ADAM17 kann auf vielfältige Weise beeinflusst werden. Ein wichtiger Faktor ist beispielsweise die Lipidkomposition der Zellmembran. So konnte gezeigt werden, dass ADAM17 bereits während ihres intrazellulären Transports in Cholesterin- und Sphingolipid-reiche Mikrodomänen, sogenannte *Lipid Rafts*, eingebettet wird, die die *Shedding*-Aktivität beeinflussen können [48, 49]. Eine weitere Möglichkeit der Beeinflussung der Aktivität von ADAM17 durch Lipide beruht auf deren asymmetrischer Verteilung zwischen innerer und äußerer Zellmembranseite. In eukaryotischen Zellen sind Sphingomyeline (SM) vornehmlich auf der äußeren und Phosphatidylserine (PS) größtenteils auf der inneren Zellmembranseite lokalisiert [50]. Durch sogenannte Phospholipid-Translokatoren können jedoch auch PS von der inneren in die äußere Zellmembranseite transferiert werden [51]. Dort könnten sie mit ihren negativen Ladungen einen Teil der membranproximalen Domäne sowie die CANDIS-Region von ADAM17 binden und somit zu einer Konformationsänderung des Proteins führen. Hierdurch könnte das katalytische Zentrum von ADAM17 in eine für dessen *Shedding*-Aktivität benötigte Position gebracht werden [45, 51]. Insbesondere während der Apoptose, die mit einem Verlust der Membranintegrität einhergeht, befinden sich PS vermehrt auf der äußeren Zellmembranseite und dienen dort als ein „*Eat-me-signal*“ für Phagozyten [52, 53]. Darüber hinaus kann auch aus der Stimulation der Proteinkinase C eine vermehrte PS-Exposition resultieren [54]. Interessanterweise gehört Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA), als

Strukturanalogon des Diacylglycerins, sowohl zu den Stimulatoren der Proteinkinase C als auch zu den potentesten Induktoren des ADAM17-*Sheddings* [55, 56].

1.2.4 Physiologische Bedeutung von ADAM17

Wie bereits ausgeführt besitzt ADAM17 ein Spektrum von mehr als 80 Substraten, was ihre hohe physiologische, aber auch potenziell pathophysiologische Bedeutung unterstreicht [32]. Ihr großer Stellenwert bei der Entwicklung zeigt sich an ADAM17-defizienten Mäusen, die meist bereits intra-uterin oder kurz nach der Geburt versterben und Fehlbildungen an den Augen, Haaren und verschiedenen Organsystemen, darunter Herz und Haut, aufweisen [57]. In anderen Experimenten konnte hingegen nachgewiesen werden, dass Mäuse, die sehr geringe ADAM17-Mengen bilden, lebensfähig sind. Sie zeigten jedoch vergleichbare Fehlbildungen und entwickeln darüber hinaus epitheliale und intestinale Barriere-Funktionsstörungen [58]. Interessanterweise ähneln sich die Phänotypen von ADAM17- und EGFR-defizienten Mäusen, was auf eine besondere Bedeutung beider Proteine am EGFR-Signalweg hindeutet [59].

Der Einfluss von ADAM17 auf den EGFR-Signalweg besteht darin, dass sie viele Liganden des EGFR durch *Ectodomain-Shedding* freisetzt. Dazu gehören der *Transforming Growth Factor α* (TGF- α), der *Heparin-Binding Epidermal-Growth-Factor-Like Growth Factor* (HB-EGF) und das Glykoprotein Amphiregulin (AREG) [32, 60]. Dem EGFR nachgeschaltet sind beispielsweise der MAPK-Signalweg oder auch die PI3K [30, 31]. Auf diesem Weg werden für den Zellzyklus wichtige Funktionen wie Proliferation, Zellüberleben und Differenzierung reguliert [60].

TNF- α ist das wohl bekannteste Substrat von ADAM17, weshalb die Metalloprotease auch als *Tumor Necrosis Factor-Alpha Converting Enzyme* (TACE) bezeichnet werden kann [61]. TNF- α kann zwei verschiedene Rezeptoren, den *Tumor Necrosis Factor Receptor 1* (TNFR1) und den *Tumor Necrosis Factor Receptor 2* (TNFR2), binden und aktivieren. Von Interesse ist, dass bei Aktivierung beide Rezeptoren zum Teil entgegengesetzte Auswirkungen auf das Zellüberleben haben: So ist der TNFR1 vor allem mit Prozessen wie Apoptose, Nekroptose und Entzündung assoziiert, wohingegen TNFR2 Prozesse wie Zellüberleben und Proliferation fördert [62]. Beide Rezeptoren präferieren verschiedene Formen von TNF- α : TNFR1 wird vornehmlich durch ADAM17 prozessiertes, lösliches TNF- α stimuliert, wohingegen TNFR2 sowohl durch membrangebundenes als auch lösliches TNF- α aktiviert werden kann [63]. Da ADAM17 membrangebundenes TNF- α durch *Ectodomain-Shedding* in seine lösliche Form überführt und dadurch vornehmlich den TNFR1 aktiviert, kommt ihr eine besondere Bedeutung bei der Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase zu.

Neben TNF- α gehört Interleukin-6 (IL-6) in Bezug auf Entzündungsreaktionen zu den besonders intensiv untersuchten Zytokinen. Das proinflammatorische Potenzial von IL-6 ist kontextabhängig und

es muss betont werden, dass IL-6 auch antiinflammatorische Eigenschaften besitzt. Diese verschiedenen Wirkungsweisen von IL-6 sind ebenfalls von großer Bedeutung für die Gewebshomöostase. Von Interesse ist zudem, dass die Art und Weise, wie und wo die Komplexbildung von IL-6 und dem IL-6-Rezeptor erfolgt, Einfluss darauf nimmt, ob IL-6 pro- oder antiinflammatorisch wirkt [64]. Es können zwei Wege der Komplexbildung unterschieden werden: (1) Beim klassischen Weg bindet IL-6 an einen membrangebundenen IL-6-Rezeptor. Dieser IL-6/IL-6-Rezeptorkomplex führt zu einer Dimerisierung des Glykoproteins 130 (gp130), was anschließend nachgeschaltete Signalwege induziert [65, 66]. Im Mausmodell konnte nachgewiesen werden, dass nur wenige Zelltypen, darunter Hepatozyten und einige Leukozyten, den membrangebundenen IL-6-Rezeptor exprimieren [64, 67]. (2) Für Zellen ohne einen membrangebundenen IL-6-Rezeptor hat daher der sogenannte *trans-signaling*-Weg eine große Bedeutung. Hier wird eine lösliche Form des IL-6-Rezeptors u. a. durch ADAM17 in den extrazellulären Raum freigesetzt [68]. IL-6 kann nachfolgend diesen löslichen Rezeptor binden, woraufhin der entstandene Rezeptorkomplex das ubiquitär auf Zellen vorhandene gp130 binden kann und somit nachgeschaltete Signalwege induziert werden [32, 67]. Bemerkenswert ist, dass der IL-6-trans-Signalweg vorwiegend entzündungsfördernd wirkt, wohingegen der klassische Weg eher mit regenerativen und physiologischen homöostatischen Prozessen assoziiert ist [32, 64, 68].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass ADAM17 als *Upstream*-Protease für den Zellzyklus wichtige Elemente wie Proliferation, Zellüberleben und Differenzierung kontrolliert und auch in Inflammations- sowie Regenerationsprozesse involviert ist.

1.2.5 Pathophysiologische Bedeutung von ADAM17 im Ovarialkarzinom

Zu den Meilensteinen der Krebsentwicklung, den sogenannten *hallmarks of cancer*, gehören u. a. die Aufrechterhaltung der Zellproliferation, die Resistenz gegenüber Wachstumssuppressoren, die Apoptoseresistenz, die Fähigkeit zur Invasion von Gewebe und die Metastasenbildung. Das Erreichen vieler dieser Meilensteine wird direkt oder indirekt durch Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren begünstigt [69]. Da ADAM17 sowohl dem EGFR- als auch dem TNF- α - und dem IL-6-trans-Signalweg als *Upstream*-Protease vorgeschaltet ist, liegt die Vermutung nahe, dass ihr auch eine bedeutende Rolle bei Tumorerkrankungen zugeschrieben werden könnte. So konnte eine vermehrte Expression von ADAM17 in zahlreichen soliden Tumoren nachgewiesen werden, darunter auch das Ovarialkarzinom [70–74].

Die Auswirkung eines gesteigerten ADAM17-Vorkommens zeigt sich vornehmlich in den tumorfördernden Effekten ihrer Substrate. In Tumorbiopsien von Ovarialkarzinomen konnten eine erhöhte Expression von TNF- α und HB-EGF nachgewiesen sowie erhöhte Konzentrationen des *Soluble Interleukin-6 Receptor*- α (sIL-6R- α) und AREG in tumorassoziiertem Aszites gemessen werden [74–77]. Im Mausmodell konnte zudem gezeigt werden, dass TNF- α über die Stimulation des TNFR1 das Tumormikro-

milieu beeinflusst und zu einem gesteigerten Tumorwachstum beiträgt [78]. Interessanterweise konnte in einem weiteren Mausmodell mit humanen Ovarialkarzinom-Xenografts nachgewiesen werden, dass AREG-Antikörper das Tumorwachstum hemmen [77]. In diesem Modell konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die Hemmung von AREG zu einer gesteigerten Chemosensitivität der Krebszellen führt [77]. Auch für den IL-6-trans-Signalweg konnte ein Einfluss auf die Chemosensitivität des Ovarialkarzinoms nachgewiesen werden. Hier zeigte sich, dass in Zellkulturexperimenten durch Aktivierung des IL-6-trans-Signalwegs das Tumorzellüberleben unter einer Taxan-Therapie erhöht und die Intravasation von Tumorzellen begünstigt werden. Unterstützend zu dieser Erkenntnis konnte in Ovarialkarzinom-Xenografts in Mäusen nachgewiesen werden, dass eine Hemmung des IL-6-trans-Signalwegs zu einer erhöhten Taxan-Sensitivität der Tumore führt und die Bildung von Aszites vermindert wird [76].

In diesem Zusammenhang ist es von großem Interesse, dass in Aszites von Ovarialkarzinom-Patientinnen, die mit einer Chemotherapie behandelt wurden, große Mengen an AREG gemessen werden konnten [77]. Diese Beobachtung deckt sich mit In-vitro-Experimenten, in denen gezeigt werden konnte, dass unter Cisplatin-Stimulation ADAM17 vermehrt in Ovarialkarzinomzellen exprimiert wird und konsekutiv zu vermehrter AREG-Freisetzung führt [33]. Für Wachstumsfaktoren wie AREG konnte gezeigt werden, dass sie einen bedeutenden Einfluss auf die Tumorgenese nehmen und darüber hinaus Tumorzellen helfen, sich den toxischen Effekten einer Chemotherapie zu entziehen [79]. Dies sind wichtige Mechanismen bei der Entstehung einer Chemotherapieresistenz, welche die Bedeutung von ADAM17 als vorgeschaltete *Sheddase* unterstreichen.

1.3 Extrazelluläre Vesikel

1.3.1 Nomenklatur

Der erste Nachweis der Existenz von extrazellulären Vesikeln (EV) gelang Chergaff und West im Jahr 1946, indem sie zeigten, dass humanes Serum prokoagulatorische, von Thrombozyten produzierte Partikel enthält [80]. Seitdem wurden zahlreiche Begriffe für von Zellen sezernierte Vesikel verwendet, die sich beispielsweise an ihrer Funktion (z. B. Tolerosomen), an ihrem Entstehungsort (z. B. Protasomen), dem Auslöser für ihre Freisetzung (apoptotische Körperchen) oder an ihrer Biogenese (Exosomen, Mikrovesikel) orientieren [81, 82]. Um diese heterogenen Gruppen unter einem Sammelbegriff zu vereinigen, wurde von der *International Society of Extracellular Vesicles* (ISEV) der neutrale Sammelbegriff „extrazelluläre Vesikel“ (EV) vorgeschlagen. EV werden von der ISEV konsensbasiert als „unter natürlichen Bedingungen aus Zellen freigesetzte Partikel, die von einer Doppellipidschicht umgeben und nicht replikationsfähig sind“ definiert [82]. Die Zuordnung von EV zu den verschiedenen heterogenen Untergruppen ist derzeit nur in Ausnahmefällen möglich, da es an

verlässlichen, spezifischen Markern mangelt, einheitliche Größendefinitionen fehlen und keine selektiven Anreicherungsverfahren definiert sind. Daher wird im experimentellen Kontext die Verwendung dieses Sammelbegriffs propagiert [82–85]. Um EV näher zu definieren, empfiehlt die ISEV, sie vorzugsweise nach ihren physikalischen Eigenschaften (kleine EV < 200 nm, mittelgroße EV 200–1000 nm und große EV > 1000 nm), ihrer biochemischen Zusammensetzung (z. B. *Cluster of Differentiation* (CD) 63/9 positive EV) oder ihrer Entstehungsart bzw. ihrem Ursprung (z. B. PMA-EV, Cisplatin-EV bzw. Igrov-1-EV) zu benennen und Abweichungen von diesem Benennungssystem klar zu kennzeichnen [82]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Empfehlungen der ISEV zur Benennung von EV (Stand 2018) umgesetzt.

1.3.2 Biogenese, Inhalt und Aufnahme von extrazellulären Vesikeln

Zum jetzigen Zeitpunkt ermöglicht ausschließlich das Beobachten von Zellvesikeln zum Zeitpunkt ihrer Entstehung eine verlässliche Einteilung in verschiedene biogenetische Typen [82]. Hierbei lassen sich in Abhängigkeit von ihrer Biogenese zwei Gruppen unterscheiden: Exosomen und Mikrovesikel (Ektosomen) [84, 86]. Der Begriff „Exosom“ wird in diesem Kontext für Vesikel verwendet, die in multivesikulären Endosomen (MVE) als intraluminale Vesikel (ILV) gebildet und anschließend in den extrazellulären Raum freigesetzt werden, wohingegen der Begriff „Mikrovesikel“ für Vesikel verwendet wird, die sich direkt von der Plasmamembran abschnüren [84–87]. Obwohl Exosomen und Mikrovesikel an verschiedenen zellulären Orten gebildet werden, besitzen sie Gemeinsamkeiten in ihrer Entstehung und zeigen auch in ihrer Funktion zahlreiche Analogien [84, 88]. Im Folgenden wird zunächst auf die Biogenese von Exosomen eingegangen.

In MVE kommt es durch verschiedene Prozesse zur Einstülpung von ILV. Der bekannteste Entstehungsprozess von ILV ist dabei abhängig vom *Endosomal Sorting Complex required for Transport* (ESCRT). Hierbei handelt es sich um eine Gruppe von Proteinen, die die Entstehung und Beladung von ILV mit ubiquitinierten Proteinen koordiniert [89, 90]. Es gibt jedoch auch ESCRT-unabhängige Wege, die zur Bildung von ILV führen [91]. So kann die für die Vesikelbildung benötigte Membrankrümmung der MVE z. B. auch durch die enzymatische Anreicherung von Ceramid in Lipid-Mikrodomänen oder von Tetraspaninen (CD9, CD63, CD81) ausgelöst werden [86, 92, 93]. Die Krümmung der Membran bewirkt initial eine unspezifische Anreicherung von Proteinen und Lipiden, die durch eine koordinierte Beladung der ILV mit z. B. Mikro-RNA (miRNA), DNA-Fragmenten, Cytokinen oder Transmembranproteinen ergänzt wird [87, 94–96]. Das gereifte MVE fusioniert schließlich entweder mit einem Lysosom, wodurch dessen Inhalt abgebaut wird, oder wird zur Plasmamembran transportiert [97]. Im letzteren Fall kann die Membranfusion des MVE mit der Plasmamembran durch den *Soluble N-Ethylmaleimide-Sensitive-Factor Attachment Receptor Complex* (SNARE-Komplex) orchestriert und die Exosomen in den extrazellulären Raum freigesetzt werden [87, 98].

Wie bei der Bildung von ILV gibt es auch bei Mikrovesikeln zahlreiche Prozesse, die die Ausstülpung der Plasmamembran und die Beladung sowie Freisetzung der Vesikel koordinieren. Auf Ebene der Plasmamembran kann es durch die Umstrukturierung von Lipiden, Proteinen oder dem Zytoskelett zu Ausstülpungen der Plasmamembran kommen [99]. Hierbei können auf Proteinebene Bestandteile des ESCRT-Komplexes beteiligt sein [100]. Eine andere Möglichkeit der Bildung besteht in der Ca^{2+} -abhängigen Umstrukturierung der Lipidstruktur der Plasmamembran durch beispielsweise Scramblasen, die zu einer vermehrten Exposition von Phosphatidylserin in der äußeren Plasmamembran führen und eine leichte Ausstülpung der Membran anstoßen [101]. Die simultan auftretende Beladung der Vesikel ist vielschichtig; hierbei können beispielsweise Tetraspanine beteiligt sein [86, 102]. Auch die Assoziation von Proteinen mit Lipid-Mikrodomänen kann deren selektive Aufnahme in Mikrovesikel begünstigen [86]. Nachdem die Mikrovesikel mit ihrer potenziell funktionellen Fracht beladen worden sind, werden sie wie Exosomen in den extrazellulären Raum freigesetzt.

Nach ihrer Freisetzung können EV in Abhängigkeit von den von ihnen getragenen Molekülen in vielfältiger Weise die interzelluläre Kommunikation beeinflussen. Hierbei können Oberflächenmoleküle von EV direkt mit Elementen der Zellmembran interagieren und u. a. Signalkaskaden anstoßen [103–106]. Darüber hinaus können sie durch ihre Aufnahme in Akzeptorzellen ihr funktionelles Potenzial entfalten. Diese Aufnahme von EV in Zielzellen kann über direkte Membranfusion, Mikro- und Makropinozytose, Clathrin-abhängige und -unabhängige Endozytose oder auch ggf. spezifische Rezeptoren vermittelt werden, ist aber weiterhin Gegenstand aktueller Forschung [106, 107].

1.3.3 Anreicherung von extrazellulären Vesikeln

In den letzten Jahrzehnten wurden unterschiedliche Anreicherungsverfahren für EV entwickelt. Zu nennen sind hier beispielhaft die Auftrennung bzw. Anreicherung von EV anhand von Dichtegradienten, mittels *Size-Exclusion Chromatography* (SEC) oder auch differentieller Ultrazentrifugation [108, 109]. Eine Umfrage aus dem Jahr 2015 zeigt, dass differentielle Ultrazentrifugation die weltweit am meisten verwendete Anreicherungs-methode für EV darstellt [110]. Die Anreicherung von EV mittels dieser Methode basiert auf dem Prinzip, dass sich Partikel mit verschiedenen Sedimentationskoeffizienten in unterschiedlichen Zentrifugationsschritten pelletieren lassen. Charakteristischerweise lassen sich dadurch vornehmlich große EV bei 2000 x g, mittelgroße EV bei 10.000–20.000 x g und kleine EV bei 100.000 x g isolieren [111]. Dazu kommt der Vorteil, dass durch differentielle Zentrifugation auch aus großen Volumina, z. B. in Form von Zellkultur-Überständen, effizient EV gewonnen werden können [109, 112]. Nachteile dieser Methode sind ihre lange Dauer, ihre moderate Ausbeute an EV, die ggf. auftretende Aggregation von EV und die Verunreinigung der Pellets mit nicht-vesikulären Bestandteilen [82, 109, 112–114].

1.3.4 Charakterisierung von extrazellulären Vesikeln

Die Forschung zum Themenbereich EV hat in den letzten Jahren stark zugenommen. Um eine bessere Vergleichbarkeit von Publikationen in diesem Forschungsfeld zu ermöglichen, hat die ISEV im Jahr 2014 in einer Stellungnahme die „minimale experimentelle Voraussetzung für die Definition von extrazellulären Vesikeln“ vorgeschlagen [115]. Diese Stellungnahme wurde im Jahr 2018 überarbeitet und beinhaltet die aktuellen Empfehlungen zur Charakterisierung von EV [82]. Sie geben eine quantitative, qualitative und morphophysikalische Untersuchung von Partikeln vor.

Die quantitative Bestimmung der EV-Masse kann dabei näherungsweise aus der Gesamtanzahl der Partikel (z. B. durch *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA)) sowie aus der Protein- oder der Lipidgestammmenge abgeleitet werden. Für die qualitative Charakterisierung wird empfohlen, Vesikel mindestens auf drei in EV angereicherte Markerproteine und ein in der Regel nicht in EV enthaltenes Markerprotein zu untersuchen. Als positive Marker sollen mindestens ein membrangebundenes Protein (z. B. CD9, CD63, CD81) und ein zytosolisches Protein (z. B. *Heat Shock Protein 70* (HSP70)) nachgewiesen werden. Bei dem negativen EV-Marker soll es sich um ein dem experimentellen Kontext angepasstes, in EV nicht oder in vermindertem Maße vorhandenes Protein handeln, das die Probe ggf. verunreinigen könnte (z. B. Serumproteine, Urinbestandteile, Zellbestandteile). Zusätzlich können angereicherte Vesikel auf Markerproteine aus subzellulären Kompartimenten wie dem endoplasmatischen Retikulum (ER) (z. B. Calnexin) oder dem Golgi-Apparat (GM130) untersucht werden, die in vermindertem Maß von kleinen EV getragen werden. In Bezug auf ihre morphophysikalischen Eigenschaften wird empfohlen, EV mittels zweier Methoden zu untersuchen: In einer Methode sind einzelne Vesikel in einer hohen Auflösung zu detektieren (z. B. mit Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)), sodass deren Morphologie begutachtet werden kann. Mit einer anderen Methode sollen die biophysikalischen Eigenschaften der EV, z. B. deren Größenverteilung (z. B. mittels NTA), bestimmt werden [82, 83].

1.3.5 Biologische Bedeutung von extrazellulären Vesikeln

Lange Zeit wurde vermutet, dass EV vornehmlich der Ausschleusung von Abfallprodukten aus Zellen dienen [88]. Die Forschung der letzten Jahrzehnte hat jedoch gezeigt, dass den EV eine wichtige und zentrale Rolle bei der Zellkommunikation sowohl unter physiologischen als auch unter pathophysiologischen Bedingungen zukommt [87, 116]. Hierbei werden die Funktion und die Eigenschaften der EV maßgeblich durch die von ihnen transportierten Moleküle bestimmt. Von besonderem Interesse sind dabei Proteine und Lipide, aber auch Nukleotid-Moleküle [85].

Für viele Proteine konnte nachgewiesen werden, dass sie auf oder in EV angereichert werden [117]. Dies gilt für die bereits genannten EV-Markerproteine. Andere Beispiele sind der *Transforming Growth*

Factor β 1 (TGF β 1), der *Major Histocompatibility Complex* (MHC) Klasse II, der EGFR oder auch die Metalloprotease ADAM17 [118–123]. Bemerkenswerterweise konnten auch typische ADAM17-Substrate wie z. B. TNF-alpha, IL-6R oder auch AREG als von EV getragene Proteine identifiziert werden [124–126].

Neben den von ihnen getragenen Proteinen unterscheiden sich EV auch in ihrer Lipidkomposition von ihren Donorzellen. So konnte gezeigt werden, dass EV verschiedener Zelltypen Lipide wie Cholesterol, Sphingomyeline (SM), Glycosphingolipide und PS anreichern, wohingegen beispielsweise Phosphatidylcholine (PC) nur in vermindertem Maß nachweisbar waren [127]. Auf eine potenzielle Beteiligung von Ceramiden und PS in der Biogenese von EV wurde bereits eingegangen (Kap. 1.3.2). Darüber hinaus könnten Lipide die Biofunktionalität von EV beeinflussen, indem sie bestimmte Proteine in Membran-Domänen (z. B. *Lipid Rafts*) gruppieren, deren Aufnahme in Zielzellen begünstigen oder auch, indem sie direkt als Signalmoleküle fungieren [128–130]. Die Lipidkomposition von EV kann auch als Biomarker für chronische Erkrankungen (z. B. Asthma) oder Krebserkrankungen (z. B. Prostatakarzinom) sowie entsprechend aktueller Empfehlungen der ISEV als positive Marker bei der Charakterisierung von EV dienen [82, 131, 132].

Darüber hinaus enthalten EV verschiedene Arten von RNA (z. B. miRNAs und mRNA) und sogar DNA-Fragmente [133, 134]. Diese Nukleotid-Moleküle könnten auf diesem Weg z. B. die Proteinsynthese oder die Genexpression in EV-Akzeptorzellen beeinflussen [133, 135]. Das Ausschleusen von DNA mittels EV könnte auch dem Aufrechterhalten der Zellhomöostase von Donorzellen dienen, indem dadurch eine Akkumulation von proapoptotisch wirkenden DNA-Fragmenten im Zytosol verhindert wird [136].

Potenziell funktionelle Einflüsse von EV konnten u. a. bereits auf das Immunsystem, auf das Herz-Kreislauf-System, den Gastrointestinaltrakt, die Reproduktionsorgane oder auch auf neurologische Strukturen gezeigt werden [85]. Die Verträglichkeit und Wirksamkeit von EV-basierten Therapien konnte im Rahmen erster klinischer Studien nachgewiesen werden [137–139]. Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden jedoch noch keine Standards für die Durchführung solcher Studien erarbeitet und wichtige Messgrößen, wie z. B. die Reinheit der EV, Dosierung und Applikationsart, müssen noch definiert werden, um die tatsächliche Effizienz von EV-basierten Therapien bewerten zu können [140].

1.3.6 Pathophysiologische Bedeutung von extrazellulären Vesikeln im Ovarialkarzinom

Bei Patienten mit verschiedenen Tumorerkrankungen konnten in Aszites, Plasma oder auch Urin eine erhöhte EV-Konzentration nachgewiesen werden. Für diese tumorassoziierten EV konnte gezeigt werden, dass sie beispielsweise ein breites Repertoire an tumorfördernden Proteinen tragen, die auch als diagnostische Marker Verwendung finden könnten [141–144]. Dies gilt auch für mit dem

Ovarialkarzinom assoziierte EV, die auf vielfältige Weise die Tumorgenese fördern können. Im Folgenden wird insbesondere auf Faktoren eingegangen, die Einfluss auf die Prognose von Ovarialkarzinom-Patientinnen nehmen können.

Die Forschung der vergangenen Jahre hat gezeigt, dass es sich bei Tumoren häufig um ein komplexes Zusammenspiel zahlreicher, verschiedener Zellentitäten handelt, die durch ihre Wechselwirkungen ein Tumor-Mikromilieu ausbilden können, das in vielfacher Weise die Tumorgenese fördern kann [145]. Dieses vielschichtige Wechselspiel von Tumorzellen und tumorassoziierten Zellen scheint in erheblichem Maße von EV koordiniert zu werden [146]. Ein solches Wechselspiel besteht beispielsweise darin, dass Ovarialkarzinomzellen EV freisetzen können, welche Fibroblasten aktivieren, die daraufhin typische Eigenschaften von *Cancer-Associated Fibroblasts* (CAF) ausbilden [147]. Für CAF konnte wiederum gezeigt werden, dass sie *Transforming Growth Factor* $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) tragende EV produzieren können, die die Migrations- und Invasionsfähigkeit von Ovarialkarzinomzelllinien steigern können [120].

Für Ovarialkarzinom-EV konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass sie auf vielfältige Art Einfluss auf Immunzellen nehmen, wodurch körpereigene Reaktionen gegen Tumorzellen unterdrückt werden. Beispielsweise konnte nachgewiesen werden, dass Ovarialkarzinom-EV direkt sowohl Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) als auch T-Zellen hemmen und im Fall von T-Zellen auch deren Apoptose induzieren können, was zu einer verminderten Immunantwort führen kann [148–151]. Eine andere Möglichkeit, wie EV eine Immuntoleranz gegenüber einem Tumor induzieren könnten, besteht in der Bildung von regulatorischen T-Zellen (T_{reg}). Anhand von Biopsien konnte gezeigt werden, dass epitheliale Ovarialkarzinome einen deutlich größeren Anteil an T_{reg} aufweisen als vergleichbare benigne Ovarialtumore. Diese Menge an T_{reg} scheint durch EV von tumorassoziierten Makrophagen (TAM) bedingt zu sein, indem sie die Differenzierung von T_{reg} aus CD4⁺ T-Zellen stimulieren [152]. Die Tatsache, dass diese Differenzierung durch tumorassoziierte EV begünstigt wird und T_{reg} überwiegend hemmend auf das Immunsystem wirken, unterstreicht die Bedeutung von EV als Koordinatoren eines tumorfördernden, immunsuppressiven Tumormikromilieus in Ovarialkarzinomen.

Neben der Koordinierung des Tumor-Mikromilieus im Primärtumor sind EV auch maßgeblich an der Entstehung der für das Ovarialkarzinom typischen Peritonealkarzinose beteiligt. Hierbei werden Schlüsselemente wie die Freisetzung von Tumorzellen aus dem Primärtumor und deren Invasion des Peritoneums durch die Mesothelbarriere durch tumorassoziierte EV begünstigt [153, 154]. Ein Prinzip, wie EV bereits lange vor Ankunft von Tumorzellen in einem Gewebe deren Invasion und Versorgung vorbereiten können, ist die Bildung einer sogenannten prämetastatischen Nische. Hierbei handelt es sich um ein Gewebe-Mikromilieu, das durch molekulare und zelluläre Veränderungen entsteht und dadurch rezeptive Eigenschaften erwirbt, die eine Metastasen-Ansiedelung erleichtern [155]. EV

können in prämetastatischen Nischen beim Ovarialkarzinom vergleichbare Funktionen wie im Tumor-Mikromilieu des Primärtumors übernehmen. Sie können die Bildung neuer Blutgefäße initiieren, eine lokale Immunsuppression bedingen, das zelluläre Gefüge umstrukturieren und auf diese Weise das Anwachsen und Gedeihen von Tumorzellen ermöglichen [147–152, 156, 157]. Zwei ausführliche Darstellungen der Beteiligung von EV an der Vorbereitung und Aufrechterhaltung metastatischer Nischen im Ovarialkarzinom sowie deren Beteiligung an der Entstehung der typischen Peritonealkarzinose wurden 2019 von Feng et al. sowie Nakamura et al. publiziert [158, 159].

Neben der Etablierung eines tumorfördernden Mikromilieus können EV auch Chemoresistenzen begünstigen und somit einen großen Einfluss auf die Therapie und Prognose des Ovarialkarzinoms nehmen. Bereits im Jahr 2005 konnte gezeigt werden, dass Cisplatin-resistente im Vergleich zu -sensitiven Ovarialkarzinomzellen bei Cisplatin-Exposition vermehrt platinhaltige EV sezernieren, was auf einen möglichen Entgiftungsmechanismus der Zellen über EV hinweist [160]. Jedoch zeigen Ovarialkarzinomzellen, die mit den EV von mit Cisplatin behandelten Zellen inkubiert werden, eine erhöhte Invasivität, was darauf hindeutet, dass diese Vesikel eine über die Entgiftung hinausgehende, tumorfördernde Funktion erfüllen [154]. Bemerkenswerterweise können die unter Cisplatin-Stimulation freigesetzten EV nicht nur die Invasivität, sondern auch die Resistenz gegenüber dem Chemotherapeutikum in Akzeptorzellen signifikant erhöhen. Eine solche Resistenz-Übertragung kann auch beobachtet werden, wenn Cisplatin-sensitive mit den EV von Cisplatin-resistenten Ovarialkarzinomzellen auch ohne vorherige Cisplatin-Therapie behandelt werden [161, 162]. Bedeutend ist, dass auch die EV von tumorassoziierten Zellen wie TAM einen Einfluss auf das Chemoresistenzprofil von Ovarialkarzinomzellen zu nehmen scheinen [163].

Zusammenfassend formuliert sind EV im Ovarialkarzinom in vielfältiger Weise am Informationsaustausch im Tumormikromilieu, an der Bildung von prämetastatischen Nischen, der Formation einer Peritonealkarzinose sowie an der Entstehung und Verbreitung von Chemoresistenzen beteiligt.

1.4 Zielsetzung

Sowohl extrazelluläre Vesikel (EV) als auch die Metalloprotease ADAM17 könnten eine bedeutende Rolle bei der Entstehung, der Progression und der Chemotherapie-Resistenzentwicklung des Ovarialkarzinoms spielen. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass durch Cisplatin-stimulierte Ovarialkarzinomzellen eine mittels ELISA bestimmte, gesteigerte ADAM17-Konzentration im Vergleich zu unstimulierten Zellen aufweisen. Diese Cisplatin-induzierte Konzentrationserhöhung geht jedoch mit einem Verlust der ADAM17-Oberflächenexpression einher. Da dieser Effekt ebenfalls bei Stimulation mit dem ADAM17-Aktivator PMA beobachtet wurde, lässt dies einen gemeinsamen, durch beide Substanzen induzierten Umverteilungsmechanismus von ADAM17 vermuten [33]. Auch

Groth et al. (2016) konnten eine Verminderung der ADAM17-Oberflächenexpression bei PMA-stimulierten Lungenepithelzellen (A549) nachweisen, welche mit einer Freisetzung von EV mit funktionell aktiver ADAM17 korreliert war [123].

In Anlehnung an die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe wird im Folgenden untersucht, welchen Einfluss Cisplatin auf den Gesamtgehalt von maturer ADAM17 in Ovarialkarzinomzellen nimmt. Dabei soll in Bezug auf die von Groth et al. (2016) beobachtete Umverteilung von ADAM17 geklärt werden, ob EV-assoziierte ADAM17 unter Cisplatin-Stimulation freigesetzt wird. Konkret sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Bewirkt eine Cisplatin- oder PMA-Stimulation die Freisetzung von EV aus Igrov-1-Zellen und können diese entsprechend den von der ISEV (2018) vorgeschlagenen Mindeststandards eindeutig charakterisiert werden?
2. Ist das von Théry et al. publizierte und entsprechend den Ergebnissen von Ashiru et al. (2010) und Chitadze et al. (2013) modifizierte Protokoll zur Anreicherung von EV geeignet?
3. Korrelieren Zelltod, EV-Freisetzung und die Abundanz EV-assoziiierter ADAM17 mit der Cisplatin-Konzentration?
4. Werden durch Cisplatin-Stimulation freigesetzte EV von Igrov-1-Zellen aufgenommen?

Abschließend soll perspektivisch untersucht werden, ob die im Rahmen von Zellkulturexperimenten erhobenen Ergebnisse auch auf EV aus Patientinnen-Aszites übertragbar sind.

Mit den Untersuchungen dieser Arbeit soll die Verbindung von EV und ADAM17 im Ovarialkarzinom näher beleuchtet werden. Darüber hinaus soll die Anreicherung und Charakterisierung von mit dem Ovarialkarzinom assoziierten EV weiter standardisiert werden. Allgemeines Ziel dieser Arbeit ist es, die Forschung auf dem Weg zu unterstützen, eine frühere Diagnose des Ovarialkarzinoms zu ermöglichen und die Entstehung von Chemoresistenzen während der Therapie zu umgehen, um auf diesem Weg die meist fatale Prognose des Ovarialkarzinoms zu verbessern.

2 Material

2.1 Zellkultur

2.1.1 Zelllinien

Zelllinien	Vertrieb
Igrov-1 Humane Zelllinie des Ovarialkarzinoms. Das Ursprungsgewebe wurde einer 47-jährigen Frau mit einem Stadium-III-Ovarialkarzinom aus dem rechten Ovar entnommen. Synonyme: IGROV-1, IGR.OV1, NCI-60, NCI60	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA

2.1.2 Zellkulturmedien, -stimulantien, Puffer und Lösungen

Medien	Hersteller
Einfriermedium RPMI 1640 mit Glutamin und 2 g/l NaHCO ₃ 10 % (v/v) Gibco® FKS 10 % (v/v) DMSO	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Zellkulturmedium RPMI 1640 mit Glutamin und 2 g/l NaHCO ₃ 10 % (v/v) Gibco® FKS 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin 10.000 U/10.000 µg/ml in 0,9 % NaCl	PAN Biotech Thermo Fisher Scientific Sigma-Aldrich

Zellstimulantien	Hersteller
Cisplatin 1,0015 mM Cis-Diammindichloridoplatin in 0,9 % NaCl	Apotheke Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
≥ 99,8%iger Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Latrunculin A	Tocris, Bioscience, Bristol, UK
0,9 % NaCl 154 mM NaCl	Roth

	in ddH ₂ O	Braun, Melsungen, Deutschland
PMA		Sigma-Aldrich

Puffer und Lösungen		Hersteller
FACS-Waschpuffer		
1 % (w/v)	BSA	Serva, Heidelberg, Deutschland
0,1 % (w/v)	NaN ₃	Merck, Kenilworth, USA
	in PBS	Lonza, Walkersville, USA
Fixationspuffer		
1 % (w/v)	PFA	Merck
	in PBS	Lonza
PBS ohne Calcium und Magnesium, steril filtriert		Lonza
25 mM Trehalose		
25 mM	D(+)-Trehalose-Dihydrat	Roth
	in 0,1 µm filtriertem PBS	Lonza
Trypsin/EDTA Lösung (0,5 %/0,2 %) 10 x in PBS		Biochrom, Berlin, Deutschland
Membranfarbstoffe		
0,4 % Trypanblau-Lösung		Sigma-Aldrich
Vybrant™ DiO Cell-Labeling Solution		Thermo Fisher Scientific
Wheat germ agglutinin (Alexa Fluor 647 conjugate)		Thermo Fisher Scientific

Kits	Hersteller
Mycoplasmentest:	
MycoAlert™ Plus	Lonza
Venor® GeM OneStep	Minerva Biolabs, Berlin, Deutschland
STR-Marker-Analyse	
AmpFISTR® Identifiler® Plus PCR Amplification Kit	Thermo Fisher Scientific

2.2 Proteinbiochemie

2.2.1 Lysepuffer mit Protease-Inhibitoren

Chemikalien	1x konzentriert	2x konzentriert	Hersteller
Tris	50 mM	100 mM	Merck
NaCl	150 mM	300 mM	Roth
EDTA	2 mM	4 mM	Merck
NaF	1 mM	2 mM	Merck
Na ₃ VO ₄	1 mM	2 mM	Santa Cruz, Dallas, USA
NP-40 (IGEPAL CA-630)	1 % (v/v)	2 % (v/v)	Sigma-Aldrich
Triton™ X-100	1 % (v/v)	2 % (v/v)	Sigma-Aldrich
Zunächst muss der pH-Wert auf 7,5 eingestellt werden, erst dann werden NP-40 und Triton X-100 zugegeben.			
1 Tablette Complete™ mini ohne EDTA (Proteaseinhibitoren) pro 10 ml			Roche, Mannheim, Deutschland

2.2.2 Proteinbestimmung

Protein-Assay	Hersteller
Coomassie Protein Assay Reagent	Thermo Fisher Scientific
DC Protein-Assay Bio-Rad	Bio-Rad, Hercules, USA

2.2.3 Gelelektrophorese

Gele	Hersteller
Sammelgel (10 ml)	
1,67 ml 30%iges Acrylamid/ 0,8%iges Bisacrylamid	Roth
1,25 ml 1M Tris-HCl-Puffer (pH 6,8)	Merck
100 µl 10%iges SDS	Merck
7,03 ml ddH ₂ O	Braun
50 µl 20%iges APS	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
10 µl TEMED	Roth
Trenngel (30 ml)	

12 ml	30%iges Acrylamid/ 0,8%iges Bisacrylamid	Roth
11,2 ml	1M Tris-HCL-Puffer (pH 8,8)	Merck
300 µl	10%iges SDS	Merck
6,7 ml	ddH ₂ O	Braun
100 µl	20%iges APS	GE Healthcare
20 µl	TEMED	Roth

Puffer und Lösungen	Hersteller
3x SDS-PAGE Probenpuffer	
200 mM Tris-HCL-Puffer (pH 6,8)	Merck
6 % (w/v) SDS	Merck
30 % (v/v) Glycerin	Merck
0,05 % (v/v) Bromphenolblau in ddH ₂ O	Sigma-Aldrich Millipore, Burlington, USA
Um reduzierende Konditionen zu erzeugen: + 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol	Merck
NuPAGE MES 20x SDS Running-Buffer	Novex, Carlsbad, USA
Elektrophoresepuffer	
25 mM Tris	Merck
192 mM Glycin	Merck
3,5 mM SDS in ddH ₂ O	Merck Millipore

Größenmarker	Hersteller
Precision Plus Protein™ All Blue	Bio-Rad
Precision Plus Protein™ Dual Color Standards	Bio-Rad
PageRuler™ Low Range Unstained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific

2.2.4 Western Blot

Puffer und Lösungen	Hersteller
Transferpuffer	
25 mM Tris	Merck
192 mM Glycin	Merck

0,15 % (v/v)	10%iges SDS	Merck
20 % (v/v)	Methanol	Roth
	in ddH ₂ O	Millipore
Waschpuffer (TBS)		
10 mM	Tris	Merck
150 mM	NaCl	Roth
	in ddH ₂ O	Millipore
Waschpuffer (TBS-T)		
0,05 % (v/v)	Tween® 20	Sigma-Aldrich
	in TBS	
Ponceau S Färbelösung		Sigma-Aldrich
Blockierlösungen		
Bovines Serumalbumin 5 % (w/v) in TBS		Serva
Milchpulver 5 % (w/v) in TBS-T		Frema, Radolfzell, Deutschland
ECL™ Western Blotting Detection Reagent		GE Healthcare
„Stripping“-Lösung		
62,5 mM	Tris-HCL-Puffer (pH 6,8)	Merck
10 % (v/v)	SDS	Merck
2 % (v/v)	β-Mercaptoethanol	Merck
	in ddH ₂ O	Braun

2.2.5 Antikörper

Zielantigen	Spezies	Klon	Verdünnung	Katalognummer	Hersteller
CD9	Kaninchen	EPR2949	1:1000	ab92726	Abcam, Cambridge, UK
CD63	Maus	TS63	1:1000	ab59479	Abcam
HSP70	Maus	W27	1:1000	648001	BioLegend, San Diego, USA
Calnexin	Ratte	W17077C	1:1000	699401	BioLegend
ADAM17	Kaninchen	polyklonal	1:1000	ab39162	Abcam
β-Actin	Maus	AC-74	1:1000	A2228	Sigma-Aldrich
Maus-IgG	Schaf	-	1:7500	NA931V	GE Healthcare
Ratte-IgG	Ziege	-	1:5000	NA9350V	GE Healthcare
Kaninchen-IgG	Esel	-	1:5000	NA9340V	GE Healthcare

2.3 Geräte

Geräte	Hersteller
Belichtungskassette Hypercassette™	GE Healthcare
Blotkammer Trans-Blot® cell Mini Trans-Blot® cell	Bio-Rad Bio-Rad
Elektrospray-Ionisator Triversa Nanomate®	Advion, Ithaca, USA
Gefriertruhen Tiefkühltruhe (-20 °C) U570 Premium ULT Freezer (-85 °C)	Liebherr, Bulle, Schweiz New Brunswick Scientific, New Brunswick, USA
Gefrierbehälter mit definierter Kühlrate Mr. Frosty	Sigma-Aldrich
Gelelektrophorese-Laufkammer Mini Gel Tank XCell SureLock™ Protean® xi Cell	Thermo Fisher Scientific Thermo Fisher Scientific Bio-Rad
Hämozytometer Neubauer improved, Bright-Line	Neubauer Laboroptik Ltd, Landing, UK
Heizblock HB2 Dri-Block, DB 3A	Wealtec Corp., New Taipei City, Taiwan Techne, Staffordshire, UK
Inkubator Thermo Heracell™ 240i	Thermo Fisher Scientific
Kleinschüttler VXR basic Vibrax®	IKA-Werke, Staufen, Deutschland
Kühlschränke Liebherr, ProfiLine (4 °C) Liebherr, Premium No Frost (4 °C) Bosch, Kühlschrank (4 °C)	Liebherr Liebherr Bosch, Stuttgart, Deutschland
Magnet-Heizrührer IKAMAG® RCT	IKA-Werke

Messinstrumente Spektralphotometer SmartSpec™ 3000 Automatisierte Mikroskope NYONE® Lionheart™ FX <i>Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)</i> NanoSight 300 (NS 300) Transmissionselektronenmikroskop (TEM) JEOL 1400 Plus TEM TEM-Kamera TemCam-F416 (4k x 4k) Rasterelektronenmikroskop Philips XL 20 Imaging-Durchflusszytometer ImageStream® X Mark II Massenspektrometer Q Exactive™ Plus Mikrotiterplatten-Photometer Sunrise™-Basic Tecan Infinite® M Plex	Bio-Rad Synentec GmbH, Elmshorn, Deutschland BioTek, Vermont, USA Malvern Panalytical, Malvern, UK JEOL Germany, München, Deutschland TVIPS, München, Deutschland Philips, Eindhoven, Niederlande Merck Thermo Fisher Scientific Tecan, Männedorf, Schweiz Tecan
Mikroskop Zeiss ID 03	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Pipetten Eppendorf Research 0,1–2,5 µl Eppendorf Research 1–10 µl Eppendorf Research 10–100 µl Eppendorf Research 20–200 µl Eppendorf Research 100–1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland Eppendorf Eppendorf Eppendorf Eppendorf
Pipettierhilfe Accu-jet®	Brand, Wertheim, Deutschland
Schüttler Rocky® Ultrarocker™	Labortechnik Fröbel GmbH, Lindau, Deutschland Bio-Rad

Roller	
Stuart SRT6 Rollmixer	Bibby Scientific, Staffordshire, UK
Rotoren	
F-45-18-11	Eppendorf
Heraeus™ Sepatech 8074	Heraeus, Hanau, Deutschland
Heraeus™ Sepatech 8030	Heraeus, Hanau
Heraeus™ Sepatech 3743	Heraeus, Hanau
SW 32.1 Ti + freischwingende Einsätze	Beckmann Coulter, Indianapolis, USA
Steril-Bank	
Heraeus™ Lamin Air® HB2472K	Heraeus
Sicherheitsbrenner	
GASI	Schütt-BioTec, Göttingen, Deutschland
Ultrazentrifugen	
Beckmann XL80	Beckmann Coulter
Vakuumpumpe	
N022 AN.18	Neuberger, Freiburg, Deutschland
Vortexmischer	
Vortex-Genie™ 2, G-560E	Scientific Industries Inc., Bohemia, USA
Reax 1R	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
MS1 Minishaker	IKA-Werke
Wasserbad	
GFL 1003	GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland
GFL 1083	GFL Gesellschaft für Labortechnik
Western Blot-Prozessor	
CP 1000	AGFA, Mortsel, Belgien
Zentrifugen	
5415C	Eppendorf
Heraeus™ Varifuge 3.OR	Thermo Fisher Scientific
Heraeus™ Biofuge™ 15R	Thermo Fisher Scientific
Heraeus™ Megafuge™ 1.0	Thermo Fisher Scientific
Computerprogramme	
YT-software®	Synentec
NanoSight software Version 3.40	Malvern Panalytical

Amnis® IDEAS 6.3	Luminex, Austin, USA
Amnis® Inspire™	Luminex,
Gen5™	BioTek, Winooski, USA
Magellan™ Standard	Tecan
Microsoft Office 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Graphpad Prism 8	GraphPad Software, San Diego, USA

2.4 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Kalibrierungs-Kit	
Amnis® SpeedBead® Kit for ImageStream®	Luminex
Reaktionsgefäße	
0,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
1,5 ml	Sarstedt
2 ml	Sarstedt
15 ml	Greiner Bio-One, Frickhausen, Deutschland
50 ml	Greiner Bio-One
Pipettenspitzen	
1–10 µl	Sarstedt
1–200 µl	Sarstedt
1–1000 µl	Sarstedt
Serologische Pipetten	
1 ml	Greiner Bio-One
5 ml	Greiner Bio-One
10 ml	Greiner Bio-One
25 ml	Greiner Bio-One
50 ml	Greiner Bio-One
Pasteurpipetten, ISO7712, 230 mm	Assistent Karl Hecht, Sonderheim von der Rhön, Deutschland
Spritzen	
1 ml Luer Plastipak™	BD, Wokingham, UK
50 ml Luer-Lok Plastipak™	BD

Zellkulturflaschen	
TC Flasche T-75, Cell+, Bel. Kap.	Sarstedt
Flachbodenplatten	
6-Well Cellstar	Greiner Bio-One
96-Well TC-Platte, Cell+, F gelb	Sarstedt
Spritzenaufsatzfilter	
0,1 µm, steril, Minisart® Syringe Filter	Sartorius, Göttingen, Deutschland
0,2 µm, steril, Whatman® Puradisc	Merck
0,45 µm, steril Whatman® Puradisc	Merck
Ultrazentrifugationsröhrchen	
Ultra-Clear™ Tubes 16 x 102 mm	Beckmann Coulter
Photometerküvetten	
Polysterol Küvetten 10 x 4 x 45 mm	Sarstedt
Fertiggele	
NuPAGE™ 4–12 % Bis-Tris Gel	Thermo Fisher Scientific
Nitrozellulosemembran	
Protran™ Supported 0.2 µm NC	GE Healthcare
Filterpapier für Western Blot	
Whatman™ 3 mm	GE Healthcare
Western-Blotting Detektionsreagenz	
Amersham Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Herstellung eines von extrazellulären Vesikeln depletierten Kulturmediums

Fetales Kälberserum (FKS) ist ein Hauptbestandteil vieler Zellkulturmedien. Da es aus dem Blut von Kuhfeten gewonnen wird, enthält es natürlicherweise große Mengen an extrazellulären Vesikeln (EV). Dieser Umstand erschwert die selektive Anreicherung und Analyse von EV, welche von in FKS-haltigem Medium kultivierten Zellen freigesetzt werden. Aus diesem Grund war es notwendig, ein Kulturmedium herzustellen, welches möglichst wenige EV enthält. Ein Verfahren zur Herstellung eines solchen EV-depletierten Kulturmediums wurde bereits 2006 von Théry et al. publiziert [82, 112]. Eine schematische Darstellung des in dieser Arbeit angewendeten Protokolls wird in Abbildung 3.1 gezeigt.

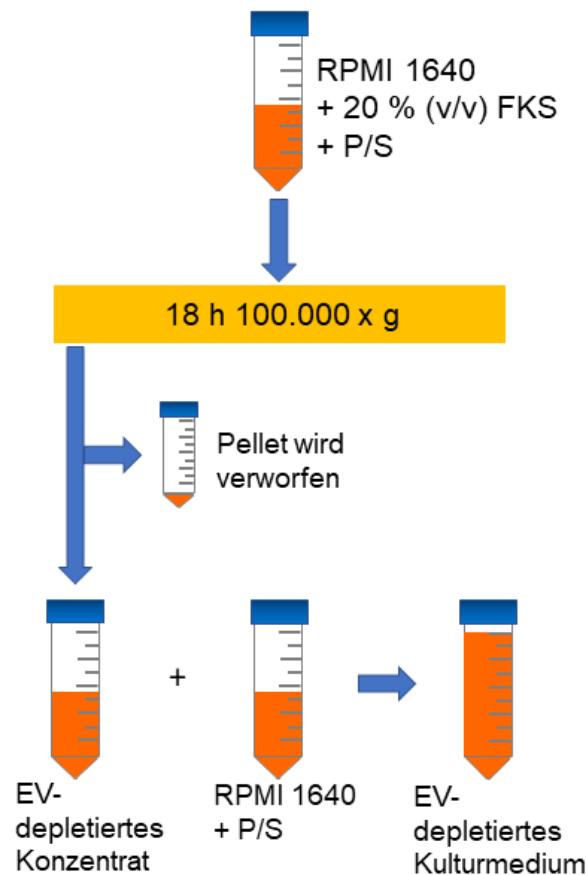


Abbildung 3.1: Herstellung eines EV-depletierten Kulturmediums nach Théry et al. (2006).

Ein Kulturmedium-Konzentrat mit einem FKS-Anteil von 20 % (v/v) und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (10.000 U/10.000 µg/ml) (P/S) wurde für mindestens 18 h bei 100.000 x g zentrifugiert. Die pelletierten Mediumbestandteile wurden verworfen und der EV-freie Überstand wahlweise bei 4 °C eingelagert oder zur direkten Verwendung zu gleichen Teilen mit einem Ansatz aus RPMI-1640-Medium und 1 % P/S (10.000 /10.000 µg/ml) gemischt.

In einem ersten Schritt wurde ein Kulturmedium-Konzentrat angesetzt, bestehend aus Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium, 20 % (v/v) FKS und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin

(10.000 U/10.000 µg/ml). Anschließend wurden jeweils 18 ml dieses Konzentrats in Ultrazentrifugationsröhrchen überführt. Diese wurden in freischwingende Einsätze eines SW-32.1-Ti-Rotors eingesetzt und 18 h bei 4 °C in einer Beckmann-XL80-Zentrifuge bei 100.000 x g (28.000 rpm) zentrifugiert. Die EV-depletierten Überstände wurden unter sterilen Bedingungen mit einem 0,2 µm Spritzenvor-satzfilter in ein Sammelgefäß überführt und die EV-haltigen Pellets verworfen. Dieses Kulturmedium-Konzentrat wurde anschließend für maximal vier Wochen bei 4 °C gelagert. Für die Anzucht von Zellkulturen wurde das EV-depletierte Kulturmedium-Konzentrat zu gleichen Teilen mit einem Ansatz aus RPMI-1640-Medium und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (10.000 U/10.000 µg/ml) gemischt.

3.1.2 Kultivieren, Passagieren und Kryokonservieren von Ovarialkarzinomzellen

Für alle in dieser Arbeit beschriebenen Zellkultur-Experimente wurde die Ovarialkarzinomzelllinie Igrov-1 verwendet. Die Zellen wurden, abhängig von der Versuchsdurchführung, in EV-haltigem bzw. EV-depletiertem RPMI-1640-Medium mit 10 % (v/v) FKS und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (10.000 U/10.000 µg/ml) bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden bei Erreichen einer 80%igen Konfluenz passagiert. Hierfür wurde der Überstand abgesaugt und die adhären-ten Zellen am Flaschenboden mit 5 ml Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Um die Zellen anschließend vom Flaschenboden lösen zu können, wurden 4 ml Trypsin hinzugegeben und der Ansatz bei 37 °C für 10 min inkubiert. Trypsin ist eine Serinprotease, die der Adhärenz dienende, extrazelluläre Proteine schneidet und die Zellen auf diese Art vom Flaschenboden bzw. aus dem Zellgefüge löst [164]. Anschließend wurde die Flaschenseite mehrmals händisch beklopft, um die Zellen mechanisch noch weiter zu vereinzeln. Das Ablösen der Zellen wurde mikroskopisch verifiziert. Die Aktivität des Trypsins wurde durch Zugabe von 6 ml 37 °C warmem, FKS-haltigem RPMI-Medium gestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein 50-ml-Reaktionsgefäß überführt und die Zellen bei 300 x g für 10 min pelletiert. Die Überstände wurden verworfen und die Zellpellets in 10 ml PBS aufgenommen und erneut bei 300 x g für 10 min zentrifugiert [33]. Anschließend wurden die Zellpellets im Verhältnis 1:5 bis 1:10 verdünnt und zur Aussaat in 10 ml Medium (RPMI 1640/ 10 % (v/v) FKS/ 1 % (v/v) P/S) in Zellkulturflaschen überführt.

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen in Einfriermedium resuspendiert und mithilfe eines Gefrierbehälters mit einer definierten Kühlrate auf -80 °C abgekühlt und innerhalb von 24 h in flüssigen Stickstoff eingelagert. Um mögliche Mykoplasmen-Kontaminationen auszuschließen, wurden regelmäßige Testungen durchgeführt. Die Zellidentität wurde durch *Short Tandem Repeat (STR)*-Analyse verifiziert. Auf diese Weise konnten Kontaminationen mit anderen Zelllinien ausgeschlossen werden [165].

3.1.3 Messung des Zellüberlebens

Das Überleben der in Kultur gehaltenen Zellen wurde mithilfe einer Trypanblau-Färbung untersucht. Trypanblau wird von lebenden Zellen kaum aufgenommen, färbt jedoch das Zytoplasma toter Zellen aufgrund von deren gestörter Zellwandintegrität an [166]. Hierzu wurden zunächst die Zellkulturüberstände abgenommen und die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen. Nachfolgend wurden die Zellen mit 3 ml Trypsin für 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Aktivität des Trypsins wurde durch Zugabe von 3 ml FKS-haltigem RPMI-Medium gestoppt und der Flaschenboden abschließend mit 2 ml PBS gewaschen. Die für das Waschen verwendete PBS-Lösung und das Trypsin-Medium-Gemisch wurden mit den in ihnen gelösten Zellen in ein Reaktionsgefäß überführt. Das sich ergebende Gesamtvolumen von 10 ml Zellsuspension wurde im Anschluss mehrfach resuspendiert. Dann wurden 20 µl der Zellsuspension mit 20 µl 0,4 % (v/v) Trypanblau-Lösung und 380 µl PBS in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß gemischt. Ein beispielhaftes mikroskopisches Bild Trypanblau-gefärbter Zellen ist in Abbildung 3.2 dargestellt.

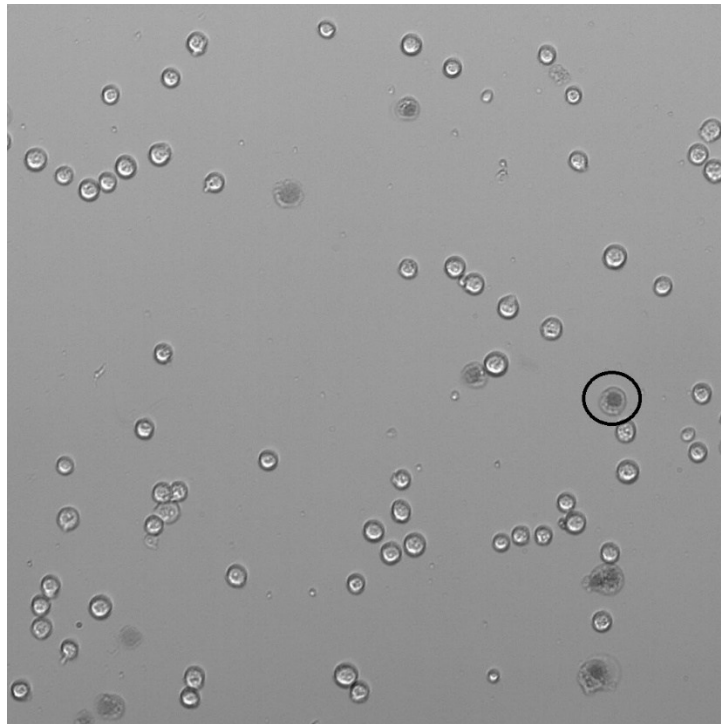


Abbildung 3.2: Mikroskopische Darstellung des durch Trypanblaufärbung nachgewiesenen Zellüberlebens. Gezeigt werden mit Trypanblau gefärbte Igrov-1-Zellen. Das Zytoplasma toter Zellen färbt sich aufgrund der gestörten Zellwandintegrität an, wohingegen lebende Zellen den Farbstoff aufgrund ihrer intakten Zellwand nicht aufnehmen und daher im mikroskopischen Bild deutlich heller erscheinen. Eine tote, dunkel gefärbte Zelle wurde beispielhaft mit einem Kreis gekennzeichnet.

Um die Färbungsunterschiede mikroskopisch visualisieren und quantifizieren zu können, wurden Triplikate von jeweils 100 µl der oben beschriebenen, gefärbten Zellsuspension in eine 96-Well-Flachbodenplatte überführt und bei 300 x g für 5 min zentrifugiert. Das Zellüberleben wurde mithilfe des *Nyone Cell Imager*, eines vollautomatisierten Mikroskops, auf Basis der Zellfärbung bestimmt.

3.1.4 Bestimmung der Zellzahl sowie Durchführung von Aussaat und Stimulation

Um eine definierte Zellzahl in Kultur nehmen zu können, wurden durch Trypsin gelöste Zellen (Kap. 3.1.2) bei 300 x g zentrifugiert, mit PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und anschließend in 10 ml PBS aufgenommen. Von dieser Zellsuspension wurden 20 µl mit 80 µl PBS (Verhältnis 1:5) gemischt und anschließend 10 µl in eine Neubauer-Zählkammer (Hämozytometer) überführt.

Eine Neubauer-Zählkammer besitzt vier große Quadranten, die ihrerseits in 16 kleinere Quadrate unterteilt sind. Es wurde darauf geachtet, dass sich die Zellen aus dem genannten Ansatz gleichmäßig in der Zählkammer verteilen. Die Zellen wurden gezählt und der Vorgang ein weiteres Mal durchgeführt. Anschließend konnte die Konzentration der Zellen in der Suspension mit folgender Formel berechnet werden:

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} = \frac{\text{Zellzahl}}{8} \times 5 \times 10^4$$

In dieser Formel repräsentiert die Zahl 8 die Anzahl der Quadranten, die Zahl 5 steht für den Verdünnungsfaktor und die Zahl 10^4 für den Kammerfaktor.

Die zu Beginn eines Experimentes ausgesäte Anzahl an Igrov-1-Zellen leitete sich von Erfahrungswerten unserer Arbeitsgruppe ab. So wurden $3,5 \times 10^6$ Zellen pro T75-Zellkulturflasche, $4,5 \times 10^5$ Zellen pro Well einer 6-Well-Flachbodenplatte bzw. $1,3 \times 10^4$ Zellen pro Well einer 96-Well-Flachbodenplatte ausgesät mit dem Ziel, nach einer 24-stündigen Kultivierung eine 70%ige Zellkonfluenz zu erreichen. Die Konfluenz der in T75-Zellkulturflaschen kultivierten Zellen wurde täglich mikroskopisch abgeschätzt und diente als Qualitätskontrolle des Zellwachstums.

Die Stimulation der ausgebrachten Igrov-1-Zellen erfolgte, je nach Experimentaufbau, für 2 h bzw. 48 h mit verschiedenen Konzentrationen Cisplatin bzw. Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) sowie den im folgenden genannten Kontrollen. Diese Stimulantien und Kontrollen wurden in EV-depletiertem Medium (Kap. 3.1.1) gelöst und vor der Behandlung auf 37 °C aufgewärmt. Als Kontrollen wurden gleiche Volumina der Lösungsmittel gewählt, in welchen die Stimulantien diluiert waren (0,9 % Natriumchlorid-Lösung (NaCl) bei Cisplatin bzw. Ethanol-RPMI-Medium-Gemisch (EtOH) im Verhältnis 1:15 bei PMA). Das Zellüberleben wurde täglich bzw. nach entsprechender Stimulationsdauer gemessen (Kap. 3.1.3).

3.2 Gewinnung und Lagerung von Aszites

Aszites von Ovarialkarzinom-Patientinnen wurde bei Entlastungspunktionen oder während Operationen unter sterilen Bedingungen abgenommen und umgehend zur weiteren Prozessierung in das Gynäkologische Labor überführt. Vorab willigten die Patientinnen in eine Verwendung der Aszites zu

Forschungszwecken gemäß der Deklaration von Helsinki ein. Ein entsprechender Antrag wurde durch die Ethikkommission der Christian-Albrecht-Universität zu Kiel bewilligt (AZ-Nr: D563/21). Zunächst wurden die Aszitesproben in 50-ml-Reaktionsgefäßen aufgeteilt und bei 250 x g zentrifugiert. Die zellfreien Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und bis zu deren weiterer Verarbeitung bei -20 °C eingelagert.

3.3 Anreicherung, Charakterisierung und Lagerung extrazellulärer Vesikel

3.3.1 Anreicherung extrazellulärer Vesikel durch differentielle Zentrifugation und Ultrazentrifugation

In dieser Arbeit wurden als Ausgangsmaterialien für die EV-Anreicherung Zellkulturüberstände (Kap. 3.1.2) und Aszitesproben (Kap. 3.2) gewählt. Beide Ausgangsmaterialien wurden in einem ersten Schritt in 50-ml-Reaktionsgefäße überführt. Die Aszitesproben wurden in einem Verhältnis von 1:4 mit PBS (0,1 µm filtriert) verdünnt. Anschließend wurden die Zellkulturüberstände bzw. die verdünnten Aszitesproben sowie geeignete Kontrollen gemäß dem in Abbildung 3.3 dargestellten Protokoll prozessiert.

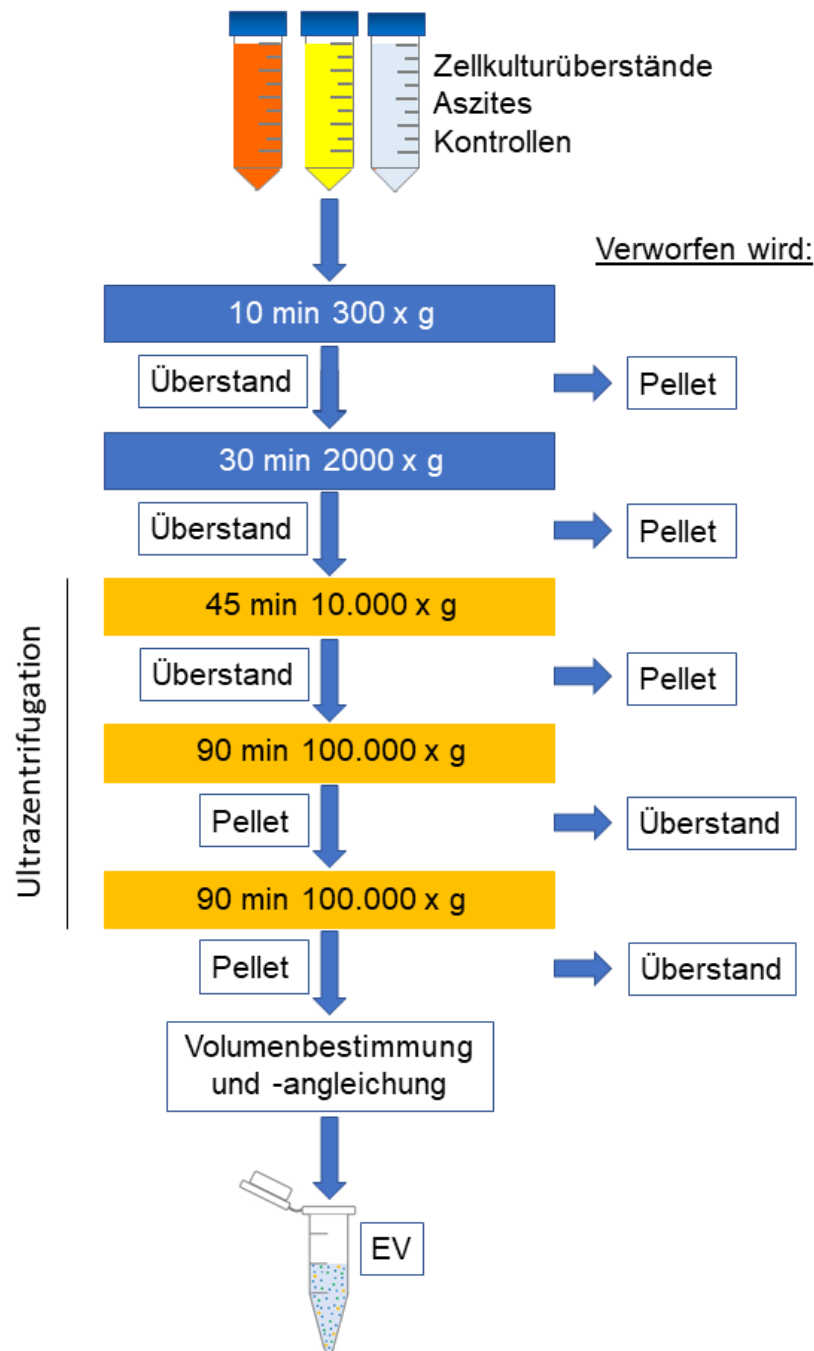


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der Anreicherung von EV durch differentielle Zentrifugation und Ultrazentrifugation.

EV enthaltende Zellkulturüberstände oder Aszitesproben sowie geeignete Kontrollen wurden sequentiell 10 min bei 300 x g, 30 min bei 2000 x g, 45 min bei 10.000 x g und anschließend zweimal bei 100.000 x g für 90 min zentrifugiert. Die nach den jeweiligen Zentrifugationsschritten erhaltenen Pellets und Überstände wurden verworfen oder weiterprozessiert. Im Anschluss wurde das nach Abnahme des letzten Überstands im Zentrifugationsröhrchen verbliebene Volumen bestimmt. Nachfolgend wurden die Volumina der zu vergleichenden Proben angeglichen.

Das zur Anreicherung von EV mittels differentieller Zentrifugation und Ultrazentrifugation verwendete Protokoll basiert auf einem bereits im Jahr 1996 von Raposo et al. publizierten Verfahren, das von Théry et al. im Jahr 2006 in leicht modifizierter Form publiziert wurde. Dieses Protokoll wurde unter Kenntnisnahme der Ergebnisse von Ashiru et al. (2010) sowie Chitadze et al. (2013) aus der

Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ottmar Janßen in Bezug auf einzelne Zentrifugationszeiten angepasst [112, 121, 167, 168].

Diesem modifizierten Protokoll folgend wurden die Ausgangsmaterialien zunächst bei 300 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Die resultierenden Überstände wurden in neue 50-ml-Reaktionsgefäße überführt. Das erhaltene Pellet wurde, je nach Versuchsaufbau, verworfen oder den Zellsuspensionen hinzugefügt, aus denen die Zelllysate hergestellt (Kap. 3.4.1.1) bzw. das Zellüberleben (Kap. 3.1.3) gemessen wurde. Die überführten Überstände wurden bei 2000 x g und 4 °C für 30 min zentrifugiert und anschließend in Ultrazentrifugationsröhrchen gegeben. Es wurde darauf geachtet, dass diese Röhrchen stets bis zu ihrem Rand gefüllt waren, um einen Unwuchteffekt des Rotors in der Ultrazentrifuge zu vermeiden. Die durch Pipettierverlust entstandenen Differenzen der Volumina in den Ultrazentrifugationsröhrchen wurden mit PBS (0,1 µm filtriert) bzw. filtrierter 25 mM Trehalose-Lösung (0,1 µm filtriert) ausgeglichen.

Der erste Ultrazentrifugationsschritt erfolgte bei 9000 x g und 4 °C für 45 min in freischwingenden Einsätzen eines SW-32.1-Ti-Rotors. Danach wurden die Überstände in neue Ultrazentrifugationsröhrchen überführt und bei 100.000 x g und 4 °C für 90 min zentrifugiert. Um das EV-Pellet zu schonen, wurden zwei Drittel des EV-depletierten Überstands mit einer Pasteurpipette in kreisenden Bewegungen abgesaugt und der verbliebene Überstand unter Kippen des Ultrazentrifugationsröhrchens bei gleichzeitigem Absaugen entfernt. Das freigelegte EV-Pellet wurde mit filtrierter PBS bzw. filtrierter Trehalose-Lösung (25 mM) gewaschen und erneut bei 100.000 x g und 4 °C für 90 min zentrifugiert. Der dadurch entstandene EV-depletierte Überstand wurde, wie im vorherigen Schritt beschrieben, abgenommen. Die auf diese Weise freigelegten EV-Pellets wurden für jeweils 30 s durch Schütteln gelöst. Anschließend wurden die in den Röhrchen verbliebenen Restvolumina mit einer Pipette bestimmt. Diese Volumina wurden mit filtrierter PBS bzw. filtrierter Trehalose-Lösung (25 mM) eingestellt und definierte Volumina für die nachfolgenden Charakterisierungsuntersuchungen (Kap. 3.3.2, 3.3.3, 3.3.4) abgenommen. Die restlichen Proben wurden lysiert (Kap. 3.4.1.3) und bei -20 °C eingelagert.

3.3.2 Nanoparticle Tracking Analysis

Mittels *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA) kann die durchschnittliche Größe, die Größenverteilung und Konzentration von EV in Lösungen bestimmt werden. Grundlage dieser Messmethode ist, dass einzelne durch einen Laserstrahl illuminierte Mikropartikel lichtmikroskopisch visualisiert und mit einer sCMOS (*Scientific Complementary Metal-Oxide-Semiconductor*) Kamera gefilmt werden. Das aus einzelnen Bildaufnahmen (*Frames*) rekonstruierte Bewegungsprofil der Partikel, welches auf Basis der Brown'schen Molekularbewegung entsteht, lässt unter Anwendung der Stokes-Einstein-Gleichung Rückschlüsse auf den Partikeldurchmesser d zu:

$$d = \frac{\kappa_B \times T}{3 \times \pi \times \eta \times D}$$

Hier repräsentiert κ_B die Boltzmann-Konstante, T die absolute Temperatur, η die Viskosität der Flüssigkeit, in welcher die Partikel gelöst sind, und D den Diffusionskoeffizienten. Unter Kenntnis des gemessenen Volumens kann so die Konzentration der Partikel ermittelt werden.

In Abbildung 3.4 werden der Messaufbau einer NTA-Untersuchung schematisch dargestellt (A) sowie Beispiele der während des Messvorgangs illuminierten Partikel (B) und eine Beispiel-Auswertung von durch NTA erhaltenen Ergebnissen (C) gezeigt.

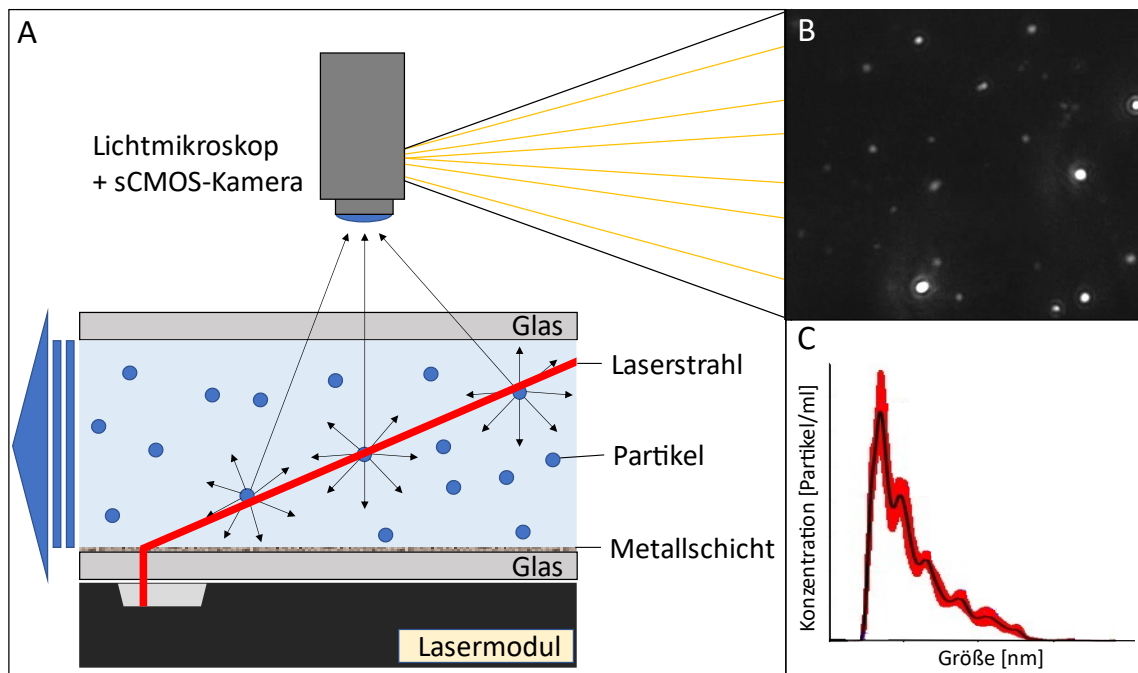


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung einer Messung mittels NTA und Visualisierung der Ergebnisse.

(A) Messaufbau einer *Nanoparticle-Tracking-Analysis*-Untersuchung. Ein durch ein Lasermodul generierter Laserstrahl wird an einer mit Metall beschichteten Glaswand der Laufkammer, die mit der zu messenden Probe gefüllt ist, abgelenkt. Der Laserstrahl trifft in der Probe auf Partikel, welche das Licht streuen (dargestellt durch Pfeile). (B) Durch ein Lichtmikroskop mit nachgeschalteter sCMOS(*Scientific Complementary Metal-Oxide-Semiconductor*)-Kamera können diese Partikel visualisiert und deren Bewegungen gefilmt werden. (C) Auf Basis der Brown'schen Molekularbewegung und durch Anwendung der Stokes-Einstein-Gleichung kann die Größe der Partikel ermittelt werden, wobei sich die Konzentration der Partikel aus der Kenntnis des jeweils analysierten Volumens ergibt.

Die Messungen wurden mithilfe des *NanoSight 300* (NS300) bei 25 °C durchgeführt. Verwendet wurde ein 488-nm-Lasermodul. Das *Camera Level* und der Fokus wurden vor Beginn der Messung so weit angepasst, dass die Partikel optimal sichtbar waren. Zu Beginn jeder Probenmessung wurde die auf dem Lasermodul befestigte Laufkammer für 20 s mit einem *Syringeload* von 500 durchgespült. Es wurden vier Messungen für 60 s bei einem *Syringeload* von 40 durchgeführt. Die Laufkammer wurde anschließend mit mindestens 1 ml PBS (0,1 µm filtriert) gewaschen. Bei den Aufnahmen wurde der

Detection Threshold so gewählt, dass maximal viele Partikel korrekt von der NTA-Software erkannt wurden und ein Artefaktanteil von 10 % nicht überschritten wurde.

Um eine Vergleichbarkeit zwischen den aufgrund des Anreicherungs Vorgangs unterschiedlich konzentrierten Proben herzustellen, wurden Partikelmengen-Normierungen durchgeführt. Hierzu wurden die in Überständen oder Pellets gemessenen Partikelmengen auf die zu Beginn der Experimente in Kultur genommenen Zellen (Kap. 3.1.4) normiert.

3.3.3 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurde in Kooperation mit Dr. Philipp Arnold aus dem Anatomischen Institut der Christian-Albrecht-Universität zu Kiel auf Basis eines bereits etablierten und publizierten Protokolls durchgeführt [125, 169]. Hierfür wurden in filtrierter PBS oder in filtrierter Trehalose-Lösung aufgenommene EV (Kap. 3.3.1) an Dr. Philipp Arnold zur weiteren Prozessierung übergeben. Diese Prozessierung umfasste auch die Färbung der Probe mit halbgesättigtem Uranylacetat (*negative staining*). Die Aufnahmen der in den vorbereiteten Proben enthaltenen EV wurden in einem JEOL-1400-Plus-Transmissionsmikroskop mit einer integrierten TemCam-F416-Kamera generiert.

3.3.4 Lipidprofil-Bestimmung

Die Lipidprofil-Bestimmung wurde in Kooperation mit Dr. Dominik Schwudke vom Forschungszentrum Borstel durchgeführt. Das der Lipidextraktion zugrundeliegende Protokoll wurde bereits im Jahr 2008 publiziert [170]. Die in Bezug auf ihr Lipidprofil zu analysierenden Proben waren unbehandelte Igrov-1-Zellen (Kap. 3.1.2) sowie angereicherte EV-Proben (Kap. 3.3.1). Als Negativ-Kontrolle diente EV-depletiertes Medium (Kap. 3.1.1). Sämtliche Proben wurden direkt nach ihrer Gewinnung bzw. Herstellung in flüssigem Stickstoff gefrosten, anschließend bei -80 °C eingelagert und zeitnah massenspektrometrisch untersucht.

3.3.5 Untersuchung der Lagerungsfähigkeit extrazellulärer Vesikel

Um die Lagerungsfähigkeit von EV zu analysieren und optimale Lagerungsbedingungen zu evaluieren, wurden EV entweder in PBS (0,1 µm filtriert) oder in einer 25 mM PBS-Trehalose-Lösung (0,1 µm filtriert) aufgenommen. Hierzu wurden während ihrer Anreicherung (Kap. 3.3.1) sämtliche durch Pipetierverlust entstandenen Volumendifferenzen durch die entsprechenden Trägermittel ausgeglichen. Nach dem ersten 100.000 x g Zentrifugationsschritt wurden die erhaltenen Pellets mit PBS oder 25 mM PBS-Trehalose-Lösung gewaschen und nach der zweiten 100.000 x g Zentrifugation in jeweils 2 ml des entsprechenden Trägermittels aufgenommen. Diese EV-Suspensionen wurden anschließend auf zwei

Reaktionsgefäße verteilt und entweder sofort mittels NTA untersucht oder nach einer mindestens achttägigen Lagerung bei -80 °C mit NTA und TEM analysiert.

3.4 Proteinbiochemie

3.4.1 Herstellung von Lysaten

3.4.1.1 Zelllysate

Nach Entfernen der Zellkulturüberstände wurden die Zellen mit 10 ml 4 °C kalter PBS gewaschen und anschließend mithilfe eines Zellschabers vom Flaschenboden gelöst. Diese Zellsuspension wurde in ein 50-ml-Reaktionsgefäß überführt. In der Zellkulturflasche verbliebene Zellen wurden durch erneutes Waschen des Flaschenbodens mit 5 ml PBS gewonnen und ebenfalls in das entsprechende Reaktionsgefäß gegeben. Die Zellsuspension wurde anschließend bei 300 x g für 5 min zentrifugiert. Der erhaltene, zellfreie Überstand wurde mit einer Pasteurpipette unter Schonung der Zellpellets abgesaugt. Dieses Pellet wurde in 500 µl einfach konzentriertem Lysepuffer (Kap. 2.2.1) resuspendiert und im Anschluss bei -20 °C gelagert. Zur weiteren Prozessierung wurden die Proben schonend auf Eis aufgetaut und für 10 min bei 17.310 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Zelllysate (entspricht dem entstandenen Überstand) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es wurde im Anschluss entweder einer Proteinkonzentrationsmessung (Kap. 3.4.2) zugeführt oder erneut bei -20 °C eingelagert.

3.4.1.2 Asziteslysate

Aszites (Kap. 3.2) wurde schonend auf Eis aufgetaut und mithilfe eines Vortexmischers geschüttelt. Anschließend wurden 500 µl Aszites mit 500 µl einfach konzentriertem Lysepuffer (Kap. 2.2.1) gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Eine 10-minütige Zentrifugation bei 17.310 x g und 4 °C schloss sich an. Das Asziteslysate (entspricht dem entstandenen Überstand) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und einer Proteinkonzentrationsmessung (Kap. 3.4.2) zugeführt.

3.4.1.3 Lysate extrazellulärer Vesikel

Die EV wurden bei ihrer Gewinnung in einem definierten Volumen aufgenommen (Kap. 3.3.1). Sie wurden anschließend im Verhältnis 1:1 mit doppelt konzentriertem Lysepuffer (Kap. 2.2.1) versetzt und für 30 s mithilfe eines Vortexmischers geschüttelt. Anschließend wurden die EV-Lysate bei -20 °C eingelagert. Für eine weitere Prozessierung wurden sie schonend auf Eis aufgetaut und für die Probenerstellung für die SDS-Gelelektrophorese verwendet (Kap. 3.4.3). Es wurde keine Bestimmung der Proteinkonzentration durchgeführt, da die in den EV enthaltenen Proteinmengen zu gering für einen Nachweis mittels Bradford Assay bzw. DC (Dünnschichtchromatographie) Protein-Assay waren.

3.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

3.4.2.1 Bradford Assay

Zur Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bradford-Assay wurden 5 µl des jeweiligen Lysats (Kap. 3.4.1.1, 3.4.1.2, 3.4.1.3) mit 995 µl *Coomassie Protein Assay Reagent* gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als Leerwert diente ein Ansatz aus 5 µl des verwendeten Lysepuffers und 995 µl *Coomassie Protein Assay Reagent*. Grundlage dieser Methode ist, dass der verwendete Farbstoff Komplexe mit den geladenen und ungeladenen Seitenketten von Proteinen bildet, wodurch sich das Absorptionsspektrum des Farbstoffs von 465 nm auf etwa 595 nm verschiebt [171]. Durch ein Spektralphotometer kann anschließend diese Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen und mithilfe einer Eichgeraden auf die Proteinkonzentration geschlossen werden.

3.4.2.2 Bio-Rad DC Protein-Assay

Zur Proteinkonzentrationsbestimmung mittels *Bio-Rad DC Protein-Assay* wurde nach Anleitung des Herstellers eine Eichgerade anhand einer Verdünnungsreihe des Lysepuffers (Kap. 2.2.1) mit dem im Kit enthaltenen Proteinstandard erstellt. Es wurden sowohl vom Standard als auch von der zu messenden Probe jeweils 5 µl als Zweifachansätze in eine 96-Well-Flachbodenplatte pipettiert. Die Reagenzien S und A wurden im Verhältnis 1:50 gemischt und jeweils 25 µl in die zuvor befüllten Wells gegeben. Anschließend wurden 200 µl Reagenz B hinzugegeben. Ein Leerwert, bestehend aus 25 µl Reagenz A/S und 200 µl B, wurde ebenfalls als Zweifachansatz auf die 96-Well-Flachbodenplatte aufgetragen. Die so vorbereitete 96-Well-Flachbodenplatte wurde anschließend kurz geschüttelt und für 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wurde nachfolgend mit einem Mikrotiterplatten-Photometer bei 750 nm gemessen. Anhand der Eichgerade konnte die Proteinkonzentration der Probe ermittelt werden.

3.4.3 Gelelektrophorese

Um die in den Lysaten enthaltenen Proteine gemäß ihrem Molekulargewicht auftrennen zu können, wurde eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt [172]. Es wurden maximal 3 µg Protein in insgesamt 20 µl Lysepuffer (Kap. 2.2.1) aufgenommen und mit 10 µl 3x SDS-PAGE Probenpuffer (Kap. 2.2.3) mit oder ohne 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol vermengt. Der β-Mercaptoethanol-haltige 3x SDS-PAGE Probenpuffer mit seinen reduzierenden Eigenschaften wurde für die Darstellung der Proteine CD9, HSP70, Calnexin und ADAM17, der Puffer ohne β-Mercaptoethanol für die Darstellung von CD63 im Western Blot (Kap. 3.4.4) verwendet. Die in den jeweiligen Puffern aufgenommenen Proben wurden 5 min auf 100 °C erhitzt, wodurch die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine gelöst wurden. Da sich in diesem Schritt Kondenswasser bildete, wurden die Proben anschließend mit einer Tischzentrifuge für ca. 15 s zentrifugiert. Im Anschluss wurden

kommerzielle 4–12 % Bis-Tris NuPAGE Fertiggele oder nach entsprechender Rezeptur selbst hergestellte Gele (Kap. 2.2.3) mit den Proben beladen. Danach wurden die Gele in eine Gelelektrophorese-Laufkammer gespannt. Dabei wurden die Laufkammer mit den Fertiggele, den Hinweisen des Herstellers folgend, mit MES(2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure)-Puffer befüllt, wohingegen in die Laufkammer mit den selbst hergestellten Gelen Laufpuffer (Kap. 2.2.3) gegeben wurde. Anschließend wurde eine elektrische Spannung an die Laufkammer angelegt. Die Gelelektrophorese wurde beendet, nachdem die im Gel sichtbare blaue Bromphenol-Lauffront in den Puffer übergegangen war.

3.4.4 Western Blot

Die durch SDS-Page-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden auf eine 0,2 µm Nitrozellulosemembran transferiert und mittels Western Blot detektiert [173, 174]. Hierzu wurde das Gel (Kap. 2.2.3) mithilfe eines Gelmessers aus seiner Umhüllung gelöst und zugeschnitten. Eine Western-Blot-Kassette wurde wie folgt vorbereitet: Schwamm, 2 x Filterpapier (3 mm), SDS-Gel mit Proteinen, Nitrozellulosemembran, 2 x Filterpapier (3 mm), Schwamm. Anschließend wurde die Kassette in eine Blot-Kammer eingesetzt. Es wurden ein Kühlelement und Transferpuffer hinzugegeben und die Proteine für 1 h bei 100 V auf die Nitrozellulosemembran transferiert. Danach wurde die Membran mit ddH₂O gewaschen und der Proteintransfer mittels Ponceau S kontrolliert. Die Membran wurde zugeschnitten und das Ponceau S mit TBS abgewaschen. Die Membran wurde für 45 min mit 5 % (w/v) BSA/TBS inkubiert, wodurch potenziell unspezifische Bindungsstellen auf der Membran blockiert wurden. Die Membran wurde nachfolgend mit dem in TBS-T bzw. 5 % (w/v) Magermilchpulver/TBS-T gelösten primären Antikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran dreimal für 20 min mit TBS-T gewaschen. Dann wurde der korrespondierende sekundäre Antikörper in TBS-T verdünnt und für 1 h auf die Membran gegeben. Im Anschluss wurde die Membran erneut dreimal für 20 min mit TBS-T gewaschen und danach für 1 min mit *Enhanced chemoluminescence developing solution* (ECL) inkubiert. Überschüssiges ECL wurde entfernt und die entstandene Chemilumineszenz mithilfe eines Detektionsfilms nachgewiesen.

Um weitere Proteine auf der Membran durch Antikörper nachweisen zu können, wurden die Antikörper des vorherigen Detektionsschritts nach 20-minütiger Inkubation der Membran in einer *Stripping-Lösung* (Kap. 2.2.4) bei 56 °C im Wasserbad entfernt. Die Membran wurde danach dreimal für jeweils 30 min mit TBS-T gewaschen und nachfolgend mit 5 % (w/v) BSA/TBS für 30 min geblockt. Danach wurde die Membran mit einem weiteren primären Antikörper, wie beschrieben, behandelt.

3.5 Analyse der Aufnahme von extrazellulären Vesikeln durch Ovarialkarzinomzellen

3.5.1 Fluoreszenzmarkierung extrazellulärer Vesikel

Eine definierte Menge EVs wurde in insgesamt 500 µl PBS (0,1 µm filtriert) verdünnt und mit 5 µl *Vybrant DiO Cell-Labeling Solution* für 30 s gemischt. Die Suspension wurde für 20 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, erneut in Ultrazentrifugationsröhrchen überführt und bei 100.000 x g für 1 h zentrifugiert (PD Dr. Hinrich Hansen, 2019, mündliche Mitteilung). Die Überstände wurden vorsichtig abgenommen, das in den Röhrchen verbliebene Restvolumen mit einer Pipette gemessen und anschließend mit filtrierter PBS auf ein definiertes Volumen eingestellt (Kap. 3.3.1). Durch die Volumenadaptation konnte auf die EV-Konzentration geschlossen werden. Dadurch war es möglich, in Folgeexperimenten eine definierte EV-Menge zu verwenden.

3.5.2 Live-Cell Imaging

Um die Aufnahme fluoreszenzmarkierter EV (Kap. 3.5.1) durch Igrov-1-Zellen qualitativ beurteilen zu können, wurde eine Untersuchung mittels *Live-Cell Imaging* durchgeführt. Hierzu wurden am Vortag des Experiments Igrov-1-Zellen in einer 96-Well-Flachbodenplatte ausgesät (Kap. 3.1.4). Die fluoreszenzmarkierten EV wurden in EV-depletiertem Medium (Kap. 3.1.1) aufgenommen. Im Anschluss konnte eine definierte EV-Menge ($5,86 \times 10^7$) auf die Zellen gegeben werden. Die mit EV behandelten Zellen wurden in die Inkubationskammer des Lionheart FX Mikroskops überführt und bei 20-facher Vergrößerung automatisch alle 20 min über einen Zeitraum von 18 h fotografiert. Aus diesen Einzelbildern wurde im Anschluss an die Messung ein Film generiert.

3.5.3 Imaging-Durchflusszytometrie

Um die Aufnahme fluoreszenzmarkierter EV durch Igrov-1-Zellen qualitativ und quantitativ beurteilen zu können, wurden die Zellen mittels *Imaging-Durchflusszytometrie* untersucht. Dafür wurde ein bereits 2018 von Lettau et al. publiziertes Protokoll für die Darstellung fluoreszenzmarkierter EV modifiziert [175]. Die zu untersuchenden Igrov-1-Zellen wurden am Vortag des Experiments in einer 6-Well-Flachbodenplatte ausgesät (Kap. 3.1.4). Am folgenden Tag wurden die Zellen entweder mit 750 µl EV-depletiertem Medium oder 2,4 mM Latrunculin A für 30 min bei 37 °C inkubiert. Latrunculin A ist ein Makrolid-Toxin, welches die Polymerisation von Zytoskelettelementen inhibiert und dadurch die Aktin-abhängige Endozytose hemmt. Nachfolgend wurden die Zellen eines Wells entweder mit 1 ml EV-depletiertem Medium, in das $4,45 \times 10^7$ fluoreszenzmarkierte EV gegeben wurden (Kap. 3.5.1), oder mit den entsprechenden Kontrollen (EV-depletiertes Medium, *Vybrant DiO Cell-Labeling Solution*) behandelt. Nach 4 h bzw. 14 h wurden die Zellkulturüberstände abgenommen

und die Aufnahme der EV durch die Hinzugabe von 1 ml 4 °C kalter PBS pro Well gestoppt. Dann wurde die PBS abgenommen und die Zellen eines jeden Wells mit 750 µl Trypsin bei 37 °C inkubiert. Die Trypsin-Aktivität wurde mit 750 µl EV-depletiertem Medium (Kap. 3.1.1) gestoppt und das Ablösen der Zellen vom Wellboden mikroskopisch kontrolliert. Die Zellen wurden anschließend bei 300 x g für 5 min sedimentiert. Der Überstand wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt, durch 400 µl 4 °C kalte PBS ersetzt und das Pellet mehrfach resuspendiert. Anschließend wurden 200 µl dieser Zellsuspension in ein Well einer 96-Well-Flachbodenplatte überführt. Die Zellen wurden nachfolgend erneut 2 min bei 4 °C und 300 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet auf einem Kleinschüttler vom Well-Boden gelöst. Nach Zugabe von 100 µl *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS)-Waschpuffer erfolgte eine weitere Zentrifugation unter den zuvor beschriebenen Bedingungen. Die erhaltenen Überstände wurden wieder abgenommen und die Pellets erneut vom Well-Boden gelöst. Dann wurden in jedes Well 10 µl 1:200 verdünntes *Wheat germ agglutinin* (Alexa Fluor 647 conjugate) gegeben und die Zellen samt Farbstoff für 15 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Um überschüssigen Farbstoff zu entfernen, wurden die Zellen anschließend dreimal mit jeweils 100 µl FACS-Waschpuffer gewaschen und nach jedem Waschschrift bei 300 x g und 4 °C für 2 min pelletiert. Die gefärbten Zellen eines Wells wurden in 50 µl einer 1%igen Paraformaldehyd(PFA)-Lösung aufgenommen, in 1,5-ml-Reaktionsgefäße überführt und bis zu ihrer Messung im *Imaging*-Durchflusszytometer bei 4 °C gelagert.

Die Kalibrierung des *Imaging*-Durchflusszytometers erfolgte vor jeder Messung mit *SpeedBeads*. Für die Messung der Proben wurde die *Amnis Inspire*-Software von Luminex verwendet. Es wurden jeweils 10.000 Zellen mit einer Größe $> 12,5 \mu\text{m}^2$ untersucht. Hierbei wurden die Durchlichtbilder der Zellen in Kanal 1, die Aufnahmen der gefärbten EV im Kanal 2 und die der membrangefärbten Zellen im Kanal 5 dargestellt. Die Durchlichtbilder der Zellen wurden in Kanal 1, der *Dio-Vybrant*-Farbstoff (Emissionsmaximum bei 501 nm) in Kanal 2 und der Membranfarbstoff *Wheat germ agglutinin* (Alexa Fluor 647 conjugate) (Emissionsmaximum bei 665 nm) in Kanal 5 aufgenommen. Um die Fluoreszenzfärbungen zu kompensieren, wurde mit einzelgefärbten Kontrollen eine spektrale *Crosstalk*-Matrix berechnet. Die Auswertung erfolgte mit der von Luminex entwickelten *Amnis IDEAS*-Software. Es wurden nur fokussierte Einzelzellen analysiert. Das Zellinnere wurde sowohl auf Basis des Durchlichtbildes als auch der Membranfärbung als Gesamtfläche der Zelle abzüglich eines Vier-Pixel-Randbereichs definiert (Erode M01,4 und Erode M05,4). Von einer Internalisierung der EV wurde ausgegangen, wenn die Fläche des EV-Farbstoffsignals im Kanal 2 (M02) innerhalb des als Zellinneres definierten Bereichs lag und die Fluoreszenzintensität höher als in den ungefärbten Kontrollzellen war. Der Anteil der Zellen, die Partikel aufgenommen hatten, wurde anhand der Gesamtanzahl fokussierter Einzelzellen berechnet.

3.6 Statistische Analysen

Alle Daten wurden, wenn nicht anders angegeben, als Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) dargestellt und die statistischen Analysen, wie in der Publikation von Hedemann et al. (2018) beschrieben, durchgeführt [33]. Zunächst wurde die Normalverteilung der zu analysierenden Daten mit einem Shapiro-Wilk-Test untersucht [176]. Diese und alle weiteren Berechnungen wurden anschließend mit *GraphPad Prism* durchgeführt. Im Fall von normalverteilten Daten wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) mit einer anschließenden Bonferroni-Korrektur durchgeführt [177]. Bei nicht normalverteilten Daten wurde zuerst ein Friedman-Test und im Anschluss ein *Dunn's multiple comparison post hoc test* angewandt [178, 179]. Resultierende p-Werte kleiner als 0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet.

4 Ergebnisse

4.1 ADAM17-Aktivierung und Partikelfreisetzung nach Cisplatin-Stimulation

ADAM17 kann als Proform und mature Form vorliegen. Bei der funktionell inaktiven Proform (ca. 120 kDa) wird das katalytische Zentrum durch eine inhibitorische Prodomäne blockiert, welche bei der kleineren, maturen, funktionell aktiven Form (ca. 75 kDa), proteolytisch abgespalten wird und so das aktive Zentrum freilegt. Aus diesem Grund wird in dieser Arbeit bei Nachweis eines vermehrten Auftretens der maturen Form im Verhältnis zur Proform von einer ADAM17-Aktivierung gesprochen. Um den Einfluss von Cisplatin auf die Aktivierung von ADAM17 zu messen, wurden $3,5 \times 10^6$ Chemotherapie-sensible Igrov-1-Zellen ausgesät und mit steigenden Konzentrationen Cisplatin (0 μM – 10 μM) für 48 h inkubiert (Kap. 3.1.4). Anschließend wurden die aus den entsprechend behandelten Zellen gewonnenen Lysate gelelektrophoretisch aufgetrennt und im Western Blot hinsichtlich der Expression der Proform sowie der maturen Form von ADAM17 beurteilt (Kap. 3.4.1.1, 3.4.3, 3.4.4).

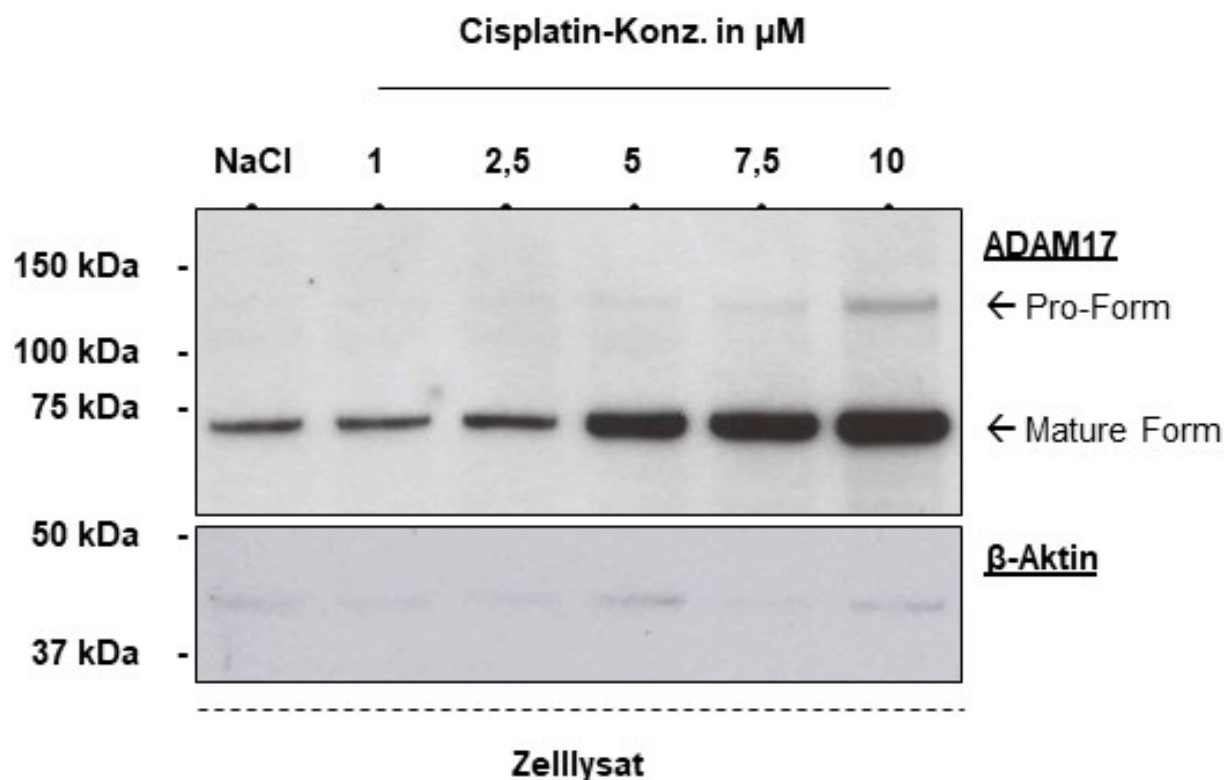


Abbildung 4.1: Western Blot zum Nachweis der Cisplatin-induzierten zellulären Aktivierung von ADAM17.

Igrov-1-Zellen wurden für 48 h mit verschiedenen Konzentrationen Cisplatin (1 μM -10 μM) und NaCl inkubiert. Die Zellen wurden lysiert, davon wurden Proben mit einem Proteingehalt von 3 μg mittels SDS-Page aufgetrennt, anschließend auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und mittels Western Blot auf die Präsenz der Proform (120 kDa) und der maturen Form (75 kDa) von ADAM17 analysiert. β -Aktin diente als Beladungskontrolle. Das dargestellte Experiment wurde einmalig in Form eines Vorexperiments durchgeführt.

In diesem Vorexperiment zeigte sich, dass die mature Form von ADAM17 mit zunehmender Cisplatin-Konzentration vermehrt in den Lysaten nachgewiesen werden konnte. Dies gilt auch für die Proform

von ADAM17, deren Bande nach einer Behandlung mit 10 μM Cisplatin am stärksten ausgeprägt war. Im Vergleich dazu war jedoch die Bande der muren Form von ADAM17 bei sämtlichen Cisplatin-Konzentrationen stärker ausgeprägt als die der Proform (Abb. 4.1).

In einem weiteren Vorexperiment wurde untersucht, welchen Einfluss Cisplatin auf die Freisetzung von EV aus Ovarialkarzinomzellen hat. Hierzu wurden $3,5 \times 10^6$ Igrov-1-Zellen für 24 h kultiviert und mit Cisplatin (7,5 μM) bzw. der Positivkontrolle PMA (2 nM) sowie den entsprechenden Lösungsmittelkontrollen behandelt. Nach einer 48-stündigen Inkubation wurden die Zellkulturüberstände abgenommen, wie in Abbildung 3.3 beschrieben, prozessiert und die Anzahl angereicherter Partikel mittels *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA) bestimmt (Kap. 3.3.2).

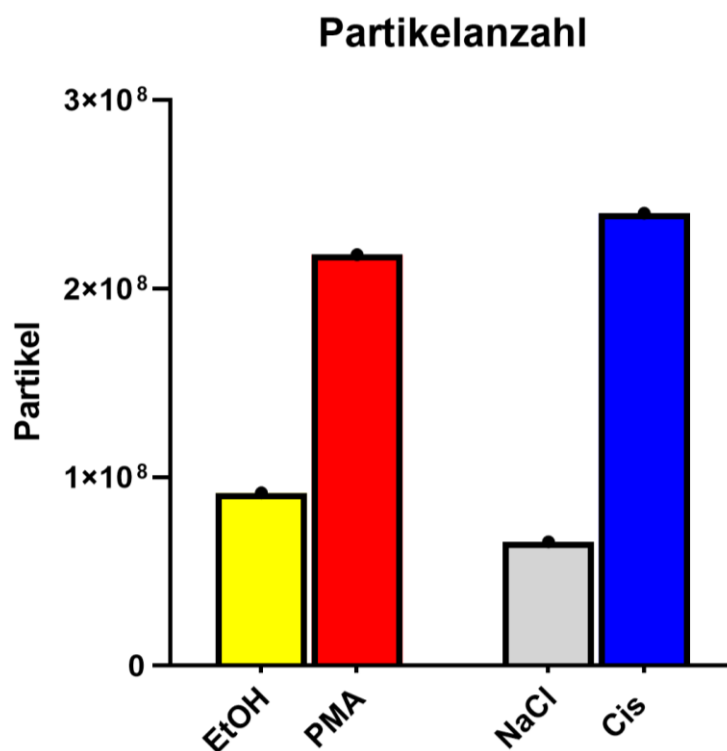


Abbildung 4.2: NTA zur Bestimmung der Partikelfreisetzung von Igrov-1-Zellen unter PMA- bzw. Cisplatin-Stimulation.

Aus Überständen von mit PMA (2 nM) und Cisplatin (Cis) (7,5 μM) bzw. mit den entsprechenden Lösungsmittelkontrollen (EtOH und NaCl) für 48 h inkubierten Igrov-1-Zellen wurden durch differentielle Zentrifugation und Ultrazentrifugation Partikel angereichert. Die ermittelte Partikelanzahl wurde zur Verbesserung der Vergleichbarkeit normiert (Kap. 3.3.2). Es handelt sich um ein einmal durchgeführtes Vorexperiment.

Es zeigte sich, dass im Vergleich zu den Kontrollen sowohl durch PMA- als auch durch Cisplatin-Stimulation vermehrt Partikel freigesetzt wurden (Abb. 4.2).

4.2 Charakterisierung extrazellulärer Vesikel und Überprüfung der Protokollqualität

Zur Überprüfung, ob unter Einfluss von Cisplatin bzw. PMA aus Ovarialkarzinomzellen EV freigesetzt werden, war es erforderlich, die im Vorexperiment angereicherten Partikel entsprechend den von der ISEV vorgeschlagenen Kriterien (Kap. 1.3.4) zu charakterisieren. Parallel dazu sollte das in dieser Arbeit verwendete Protokoll hinsichtlich seiner EV-Anreicherungsqualität und des methodenbedingten EV-Verlustes evaluiert werden, um es für Folgeexperimente als Standard zu etablieren (Kap. 3.3.1). Zur Klärung dieser Fragestellungen wurden die Überstände Cisplatin- (7,5 μ M) bzw. PMA- (2 nM) stimulierter Igrov-1-Zellen, wie in Abbildung 4.3 dargestellt, prozessiert und analysiert.

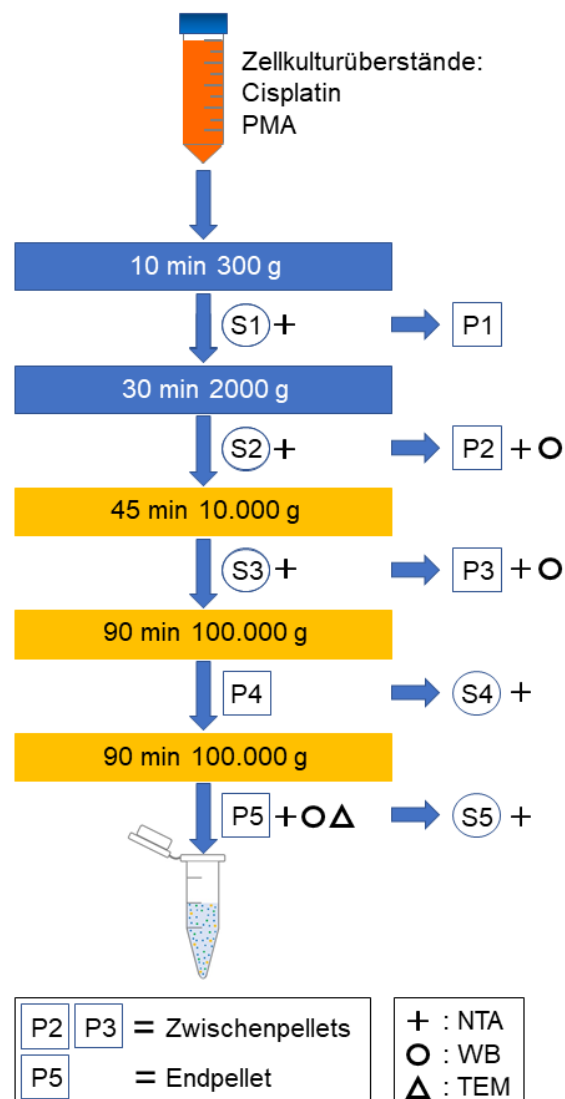


Abbildung 4.3: Darstellung der durch differentielle Zentrifugation und Ultrazentrifugation erhaltenen Überstände (S) und Pellets (P).

Die Zellkulturüberstände der mit PMA (2 nM) bzw. Cisplatin (7,5 μ M) inkubierten Zellen wurden abgenommen und den dargestellten Zentrifugations- und Ultrazentrifugationsschritten zugeführt. Die mit einem Kreuz (+) markierten Überstände (S1 bis S5) und Pellets (P1 bis P5) wurden mit NTA, die mit einem Kreis (o) markierten mittels Western Blot (WB) und die mit einem Dreieck (Δ) markierten mit Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) analysiert.

Die im Pellet P5, im Folgenden als „Endpellet“ bezeichnet, enthaltenen EV-verdächtigen Partikel wurden entsprechend den ISEV-Kriterien mit NTA (Abb. 4.4 bis 4.9), Western Blot (Abb. 4.10) und TEM (Abb. 4.11) analysiert. Die Anreicherungsqualität des Protokolls, gemessen am EV-Verlust, wurde durch eine NTA-Untersuchung der Überstände S1 bis S5 sowie der Pellets P2 und P3, im Folgenden als „Zwischenpellets“ bezeichnet, dokumentiert (Abb. 4.4 bis 4.9). Das Pellet P1 konnte nicht mittels NTA untersucht werden, da es vor allem aus Zellen und Zellfragmenten mit Größen von mehr als 1 μm bestand. Das Pellet P4 wurde ebenfalls nicht mittels NTA analysiert, da es in toto weiterprozessiert wurde, um möglichst viele Partikel im Pellet P5 zu erhalten. Um einen möglichen EV-Verlust über die Zwischenpellets P2 und P3 auszuschließen, wurden diese zusätzlich mittels Western Blot untersucht (Abb. 4.10).

4.2.1 Charakterisierung mittels *Nanoparticle Tracking Analysis*

Um die in den Überständen S1 bis S5 und in den Pellets P2, P3 und P5 vorhandenen Partikel bezüglich ihrer Größe und Konzentration charakterisieren zu können, wurden sie mit NTA untersucht (Kap. 3.3.2). Der Übersicht halber wurden die Überstände und Pellets im Folgenden entsprechend den verschiedenen zugrundeliegenden Stimulationen PMA ($S1_{\text{PMA}}$ bis $S5_{\text{PMA}}$, $P1_{\text{PMA}}$ bis $P5_{\text{PMA}}$) oder Cisplatin ($S1_{\text{Cis}}$ bis $S5_{\text{Cis}}$, $P1_{\text{Cis}}$ bis $P5_{\text{Cis}}$) benannt. Die Ergebnisse zweier repräsentativer Experimente sind in den Abbildungen 4.4 und 4.5 dargestellt. Eine ausführliche Zusammenstellung aller weiteren Daten befindet sich im Anhang (Abb. 9.1 bis 9.4).

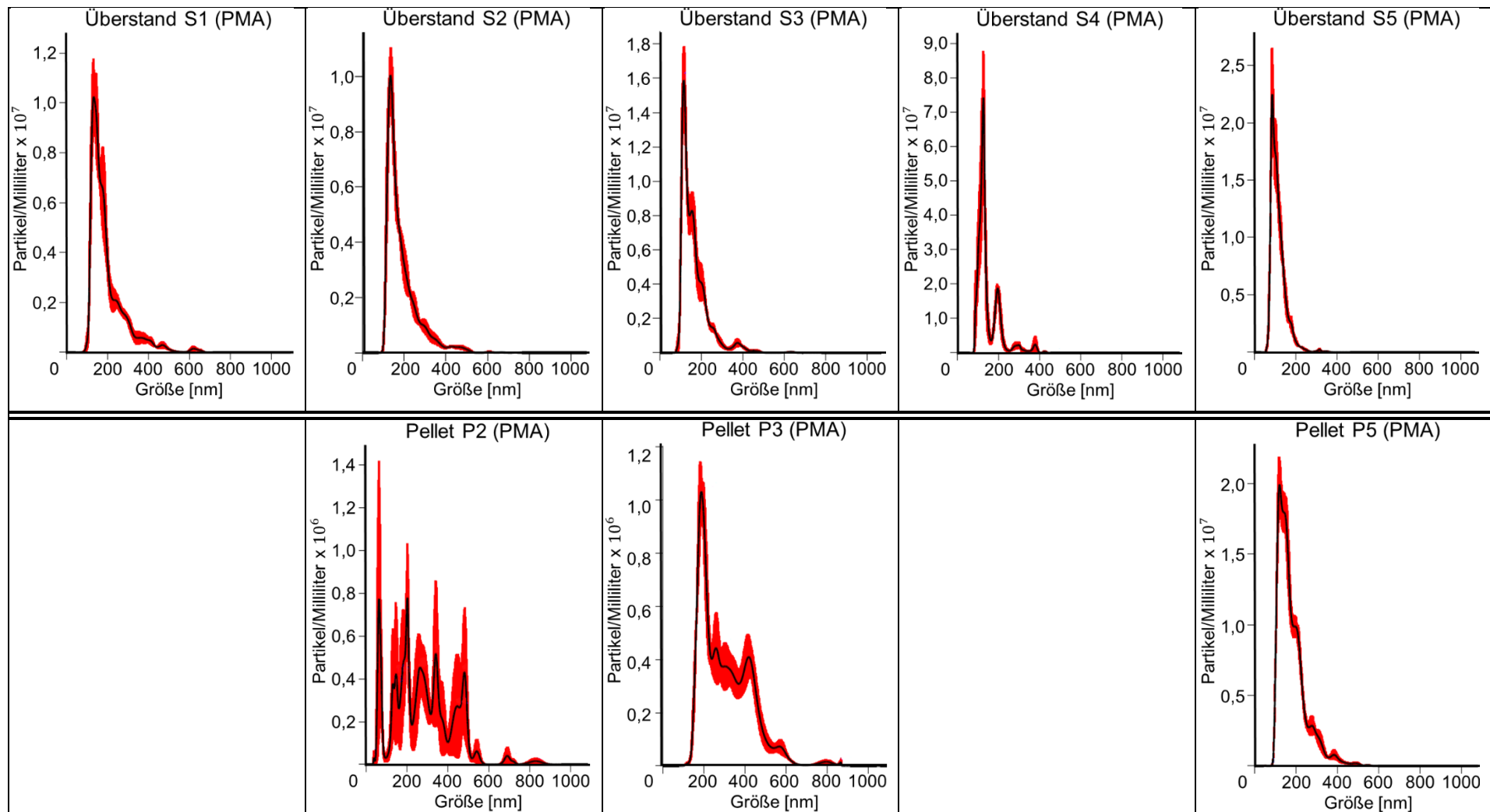


Abbildung 4.4: NTA zur Bestimmung der Größe und Konzentration von Partikeln in Überständen und Pellets nach PMA-Stimulation von Igrov-1-Zellen und deren Prozessierung gemäß Anreicherungsprotokoll.

Die Überstände PMA-stimulierter (2 nM) Igrov-1-Zellen wurden prozessiert (Abb. 4.3). Die Überstände S1_{PMA} bis S5_{PMA} und die Pellets P2_{PMA}, P3_{PMA}, P5_{PMA} wurden mittels NTA untersucht. Die gezeigten Daten entstammen einem Experiment, jeder Graph repräsentiert mindestens drei unabhängige Messungen. Eine ausführliche Darstellung aller erhobenen Ergebnisse befindet sich im Anhang (Abb. 9.1–9.4).

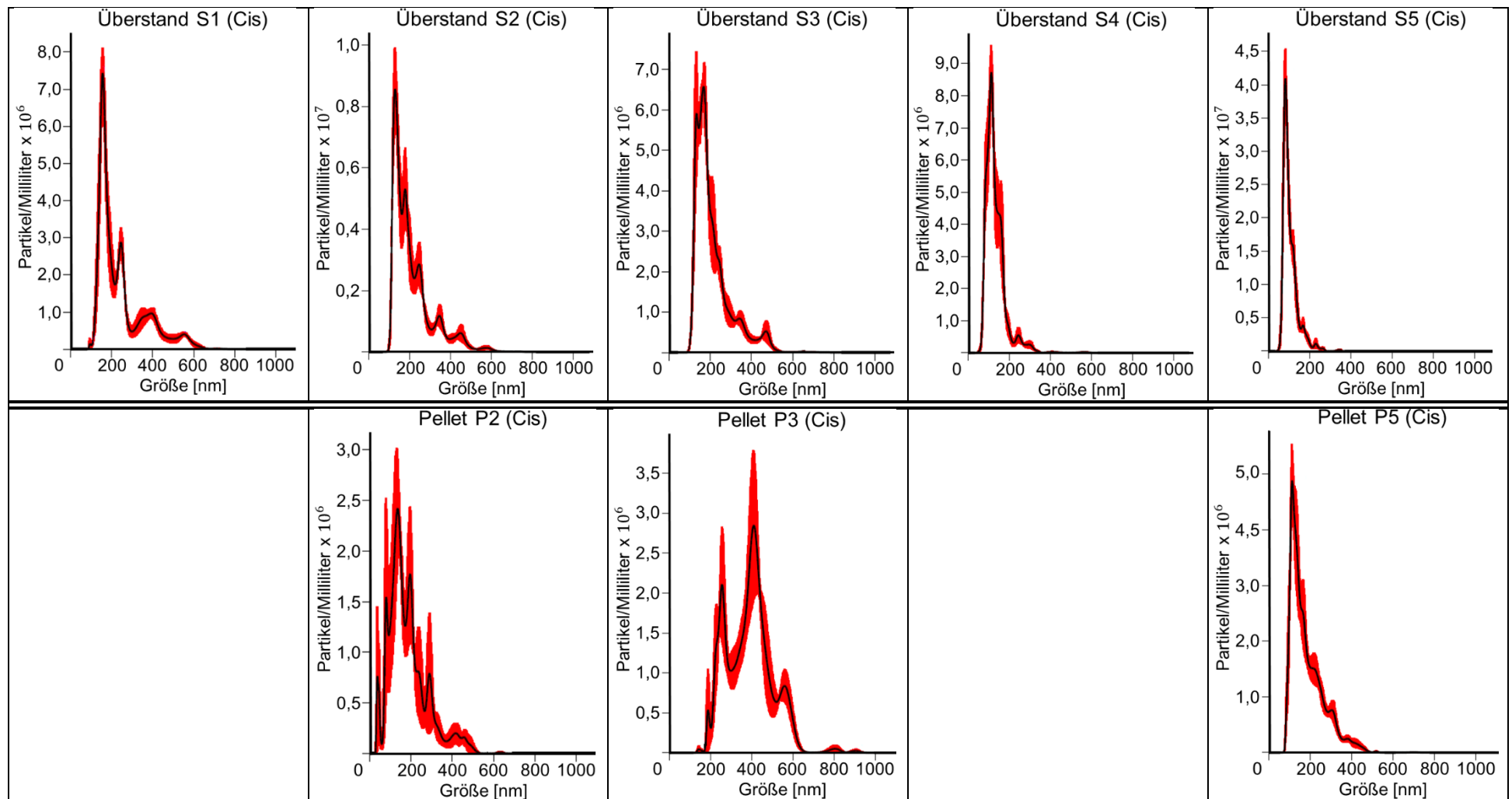


Abbildung 4.5: NTA zur Bestimmung der Größe und Konzentration von Partikeln in Überständen und Pellets nach Cisplatin-Stimulation von Igrov-1-Zellen und deren Prozessierung gemäß Anreicherungsprotokoll.

Die Überstände Cisplatin-stimulierter (7,5 μM) Igrov-1-Zellen wurden prozessiert (Abb. 4.3). Die Überstände S1_{Cis} bis S5_{Cis} und die Pellets P2_{Cis}, P3_{Cis}, P5_{Cis} wurden mittels NTA untersucht. Die gezeigten Daten entstammen einem Experiment, jeder Graph repräsentiert mindestens drei unabhängige Messungen. Eine ausführliche Darstellung aller erhobenen Ergebnisse befindet sich im Anhang (Abb. 9.1–9.4).

Im Folgenden wird zunächst auf die Dispersität der Partikel eingegangen, die in den verschiedenen Überständen und Pellets enthalten waren. Hierbei zeigte sich, dass die in den Überständen S1_{PMA} bis S5_{PMA} enthaltenen Partikel eine nahezu monodisperse Verteilung aufwiesen, wobei die Kurvenmaxima im Verlauf der Prozessierung bei kleineren Partikelgrößen lagen. Dementsprechend lag das Kurvenmaximum des Überstands S1_{PMA} bei durchschnittlich 129 nm und das des Überstands S5_{PMA} bei 92 nm. Bezüglich der in den Zwischenpellets P2_{PMA} und P3_{PMA} enthaltenen Partikel konnte festgestellt werden, dass beide eine polydisperse Größenverteilung aufwiesen. Hierbei zeigte sich, dass die Partikelgrößenverteilung des Pellets P2_{PMA} so viele Kurvenmaxima besaß, dass sie keinen durchschnittlichen Partikelgrößen zugeschrieben werden konnten und in einem Bereich von 63 nm bis 479 nm lagen (63 nm, 75 nm, 133 nm, 145 nm, 157 nm, 201 nm, 213 nm, 243 nm, 263 nm, 291 nm, 339 nm, 363 nm, 451 nm und 479 nm). Die Größenverteilung der im Pellet P3_{PMA} angereicherten Partikel zeigte vier Maxima bei durchschnittlich 176 nm, 240 nm, 323 nm und 418 nm. Die im Endpellet P5_{PMA} angereicherten Partikel waren hingegen mit einem Kurvenhöhepunkt bei durchschnittlich 118 nm nahezu monodispers verteilt.

Die in den Überständen S1_{Cis} bis S5_{Cis} enthaltenen Partikel zeigten auch eine weitgehend monodisperse Größenverteilung, wobei die Kennzahlen ihrer Kurvenmaxima bei fortschreitender Prozessierung kontinuierlich abnahmen. So lag das Kurvenmaximum der Größenverteilung der im Überstand S1_{Cis} enthaltenen Partikel bei durchschnittlich 166 nm und fiel bis auf durchschnittlich 81 nm im Überstand S5_{Cis} ab. In Bezug auf die Zwischenpellets P2_{Cis} und P3_{Cis} konnte festgestellt werden, dass sie, wie die Pellets P2_{PMA} und P3_{PMA}, eine polydisperse Größenverteilung der in ihnen angereicherten Partikel aufwiesen. Wie bei Pellet P2_{PMA} zeigten auch die Partikel aus Pellet P2_{Cis} zahlreiche Kurvenmaxima zwischen 39 nm und 367 nm (39 nm, 81 nm, 109 nm, 137 nm, 153 nm, 161 nm, 197 nm, 213 nm, 221 nm, 283 nm, 291 nm, 319 nm, 361 nm und 367 nm). Die Größenverteilung der im Pellet P3_{Cis} angereicherten Partikel zeigte zwei Kurvenmaxima bei durchschnittlich 242 nm und 413 nm. Die im Endpellet P5_{Cis} enthaltenen Partikel hatten dagegen eine nahezu monodisperse Größenverteilung mit einem Kurvenmaximum bei ebenfalls durchschnittlich 118 nm.

Nachdem die Dispersität der Überstände S1 bis S5 sowie der Pellets P2, P3 und P5 untersucht worden war, wurden sie bezüglich der in ihnen enthaltenen Partikelkonzentration analysiert. In Abbildung 4.6 sind die normierten Partikelkonzentrationen der verschiedenen Überstände und der entsprechenden Pellets dargestellt. Für die Konzentrationsberechnung wurden die in den Überständen und Pellets detektierten Partikel gemäß der Anzahl ausgesäter Zellen normiert (Kap. 3.3.2). Ziel der Normierung war es, die Konzentration der in den Überständen und Pellets enthaltenen Partikel vergleichbar zu machen.

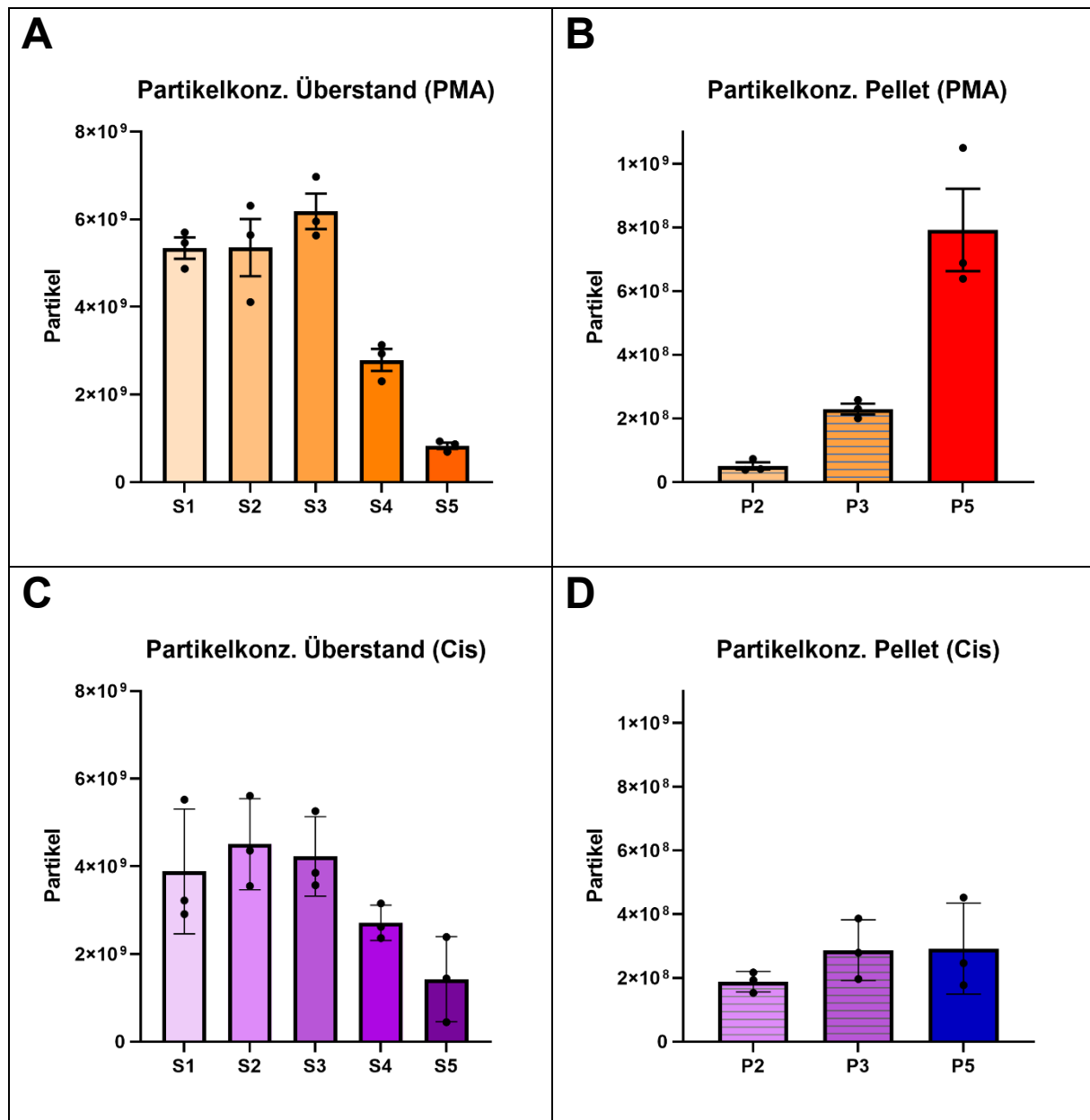


Abbildung 4.6: Partikelkonzentration in Überständen und Pellets nach PMA- bzw. Cisplatin-Stimulation von Igrov-1-Zellen und deren Prozessierung gemäß Anreicherungsprotokoll.

Dargestellt sind die mittels NTA ermittelten Partikelmengen der Überstände S1 bis S5 und der Pellets P2, P3 und P5, welche aus den Zellkulturüberständen von mit 2 nM PMA- (A und B) oder 7,5 μ M Cisplatin- (C und D) behandelten Igrov-1-Zellen unter Verwendung des in Abb. 4.3 dargestellten Protokolls angereichert wurden. Alle Partikelmengen wurden gemäß der Anzahl ausgebrachter Zellen ($3,5 \times 10^6$) normiert (Kap. 3.1.4, 3.3.2). Die Daten sind als Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente mit SEM dargestellt.

Es zeigte sich, dass die Partikelkonzentration in den Überständen S1_{PMA} bis S3_{PMA} (Abb. 4.6 A) zunächst von durchschnittlich $5,3 \times 10^9$ auf $6,2 \times 10^9$ Partikel stieg und während der folgenden Ultrazentrifugationsschritte bis auf $8,3 \times 10^8$ Partikel im Überstand S5_{PMA} abnahm. Vergleichbares gilt für die Partikelkonzentration der Überstände S1_{Cis} bis S5_{Cis} (Abb. 4.6 C). Hier stieg die Konzentration zunächst von durchschnittlich $3,9 \times 10^9$ Partikeln im Überstand S1_{Cis} bis auf $4,5 \times 10^9$ Partikel im Überstand S2_{Cis} und nahm mit weiteren Zentrifugationsschritten bis auf $1,4 \times 10^9$ Partikel im Überstand S5_{Cis} ab.

Interessanterweise zeigten die Pellets P2_{PMA}, P3_{PMA}, P5_{PMA} und P2_{Cis}, P3_{Cis}, P5_{Cis} in Bezug auf die Partikelkonzentration eine zu den Überständen entgegengesetzte, steigende Tendenz (Abb. 4.6 B und D). So wurden im Pellet P2_{PMA} durchschnittlich 4×10^7 , im Pellet P3_{PMA} $2,3 \times 10^8$ und im Pellet P5_{PMA} $7,9 \times 10^8$ Partikel detektiert. Eine vergleichbare, jedoch weniger ausgeprägte Zunahme zeigte sich bei den aus Überständen Cisplatin-behandelter Igrov-1-Zellen pelletierten Partikeln. Hier konnten durchschnittlich $1,9 \times 10^8$ Partikel im Pellet P2_{Cis} sowie jeweils $2,9 \times 10^8$ Partikel in den Pellets P3_{Cis} und P5_{Cis} detektiert werden.

In den Abbildungen 4.7 und 4.8 sind die in den Überständen S1 bis S5 und den Pellets P2, P3 und P5, gemessenen Partikelgrößen sowie deren Größenverteilungen dargestellt. Als Kennzahlen der Größenverteilung der Partikel wurden der D10 (Abb. 4.7 B und F, Abb. 4.8 B und F), der D50 (Abb. 4.7 C und G, Abb. 4.8 C und G) und der D90 (Abb. 4.7 D und F, Abb. 4.8 D und F) bestimmt. D10 bedeutet, dass 10 % der Partikel kleiner sind als der dargestellte Wert, D50, dass 50 % der Partikel kleiner sind als der dargestellte Wert, und D90, dass entsprechend 90 % der Partikel kleiner sind als der dargestellte Wert.

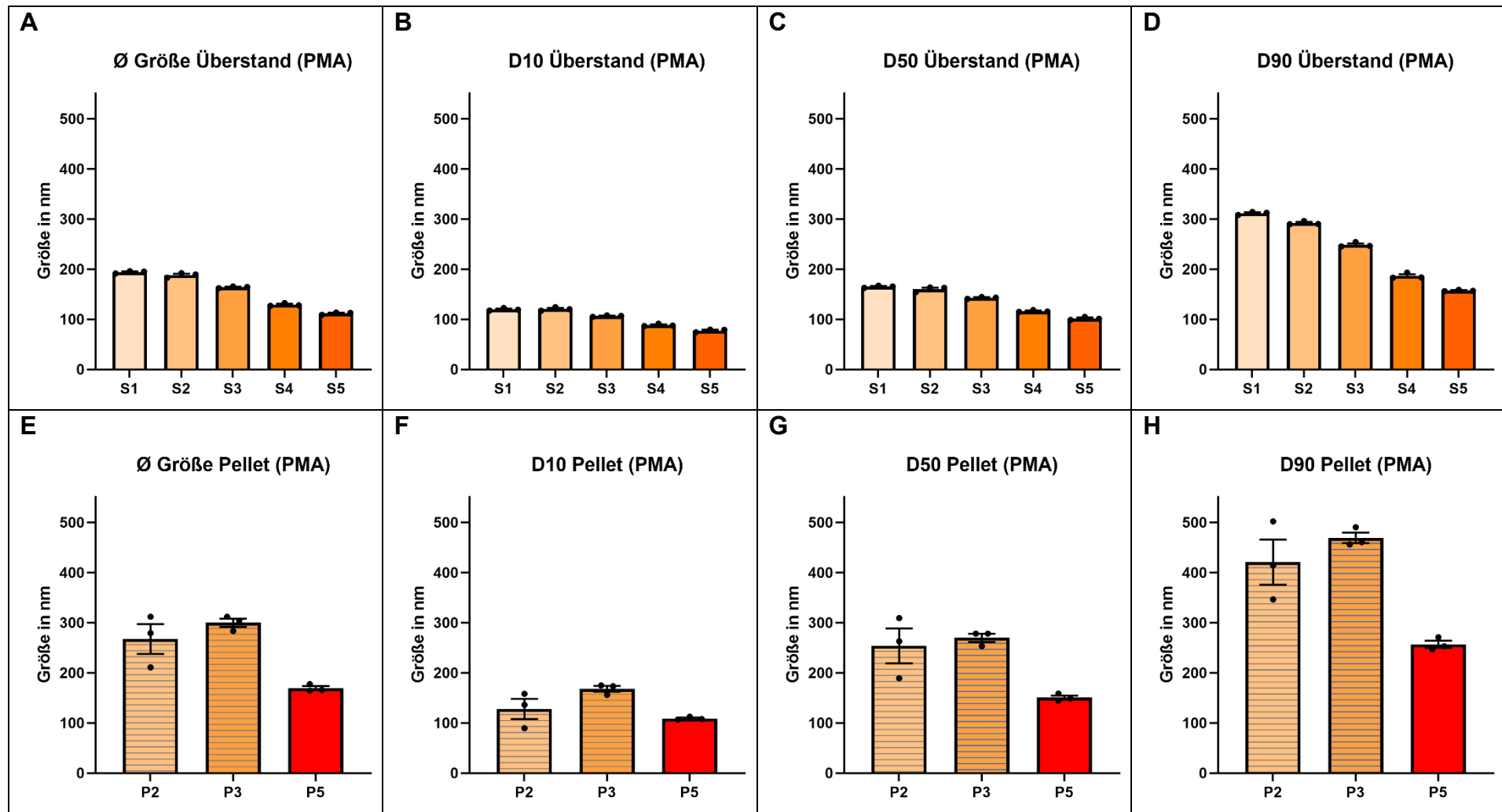


Abbildung 4.7: Durchschnittliche Größen und Größenverteilung von PMA-induzierten Partikeln in den Überständen S1_{PMA} bis S5_{PMA} und den Pellets P2_{PMA}, P3_{PMA} und P5_{PMA}.

Die Zellkulturüberstände PMA-behandelter (2 nM) Igrov-1-Zellen wurden unter Verwendung des in Abb. 4.3 dargestellten Protokolls prozessiert. Dargestellt sind die mittels NTA ermittelten durchschnittlichen Partikelgrößen (A, E) sowie die Größenverteilungen D10¹ (B, F), D50² (C, G) und D90³ (D, H). Die Daten sind jeweils als Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente mit SEM dargestellt. ¹ D10: 10 % der Partikel sind kleiner als der dargestellte Wert. ² D50: 50 % der Partikel sind kleiner als der dargestellte Wert.

³ D90: 90 % der Partikel sind kleiner als der dargestellte Wert.

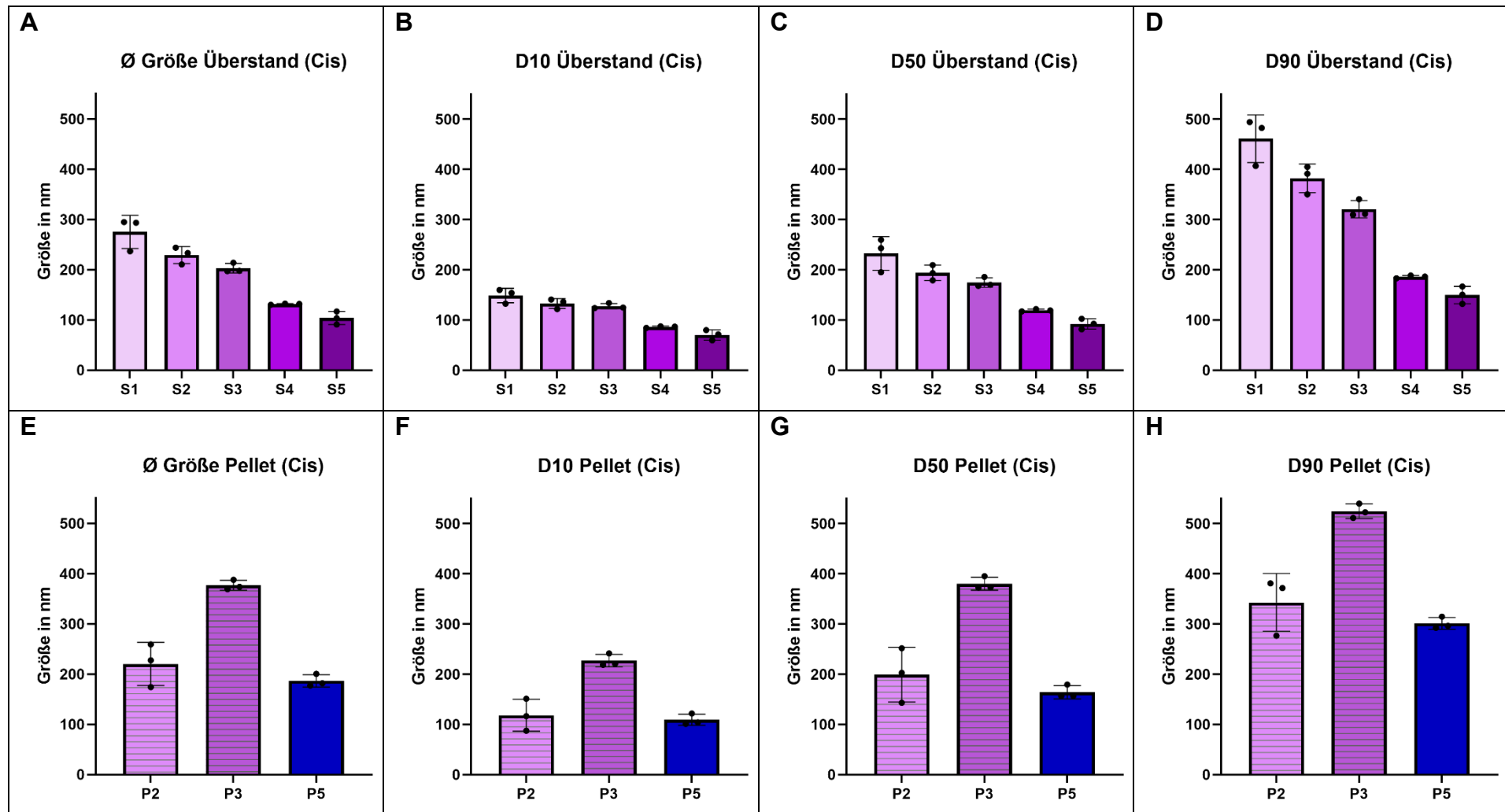


Abbildung 4.8: Durchschnittliche Größen und Größenverteilung von Cisplatin-induzierten Partikeln in den Überständen S1_{Cis} bis S5_{Cis} und den Pellets P2_{Cis}, P3_{Cis} und P5_{Cis}.

Die Zellkulturüberstände Cisplatin-behandelter (7,5 µM) Igrov-1-Zellen wurden unter Verwendung des in Abb. 4.3 dargestellten Protokolls prozessiert. Dargestellt sind die mittels NTA ermittelten durchschnittlichen Partikelgrößen (A, E) sowie die Größenverteilungen D10¹ (B, F), D50² (C, G) und D90³ (D, H). Die Daten jeweils sind als Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente mit SEM dargestellt. ¹ D10: 10 % der Partikel sind kleiner als der dargestellte Wert. ² D50: 50 % der Partikel sind kleiner als der dargestellte Wert. ³ D90: 90 % der Partikel sind kleiner als der dargestellte Wert.

Es zeigte sich, dass die durch PMA-Stimulation freigesetzten Partikel, welche in den Überständen S1_{PMA} bis S5_{PMA} gemessen wurden, mit jedem Zentrifugationsschritt kleiner wurden (Abb. 4.7 A, B, C, D). Die durchschnittliche Partikelgröße verringerte sich von 194 nm im Überstand S1_{PMA} auf 112 nm im Überstand S5_{PMA}. Betrachtet man die Partikelgrößenverteilung, so waren 10 % der Partikel im Überstand S1_{PMA} < 120 nm und im Überstand S5_{PMA} < 77 nm, 50 % der Partikel waren im Überstand S1_{PMA} < 165 nm und im Überstand S5_{PMA} < 102 nm groß, während 90 % der Partikel im Überstand S1_{PMA} < 311 nm und im Überstand S5_{PMA} < 157 nm groß waren.

Auch die Analyse der durch Cisplatin-Stimulation freigesetzten Partikel zeigte, dass in den Überständen S1_{Cis} bis S5_{Cis} (Abb. 4.8 A, B, C, D) die Partikelgröße kontinuierlich abfiel. Die durchschnittliche Partikelgröße nahm von 275 nm im Überstand S1_{Cis} bis auf 104 nm im Überstand S5_{Cis} ab. Bezüglich der Größenverteilung der Partikel zeigte sich, dass 10 % der Partikel im Überstand S1_{Cis} < 149 nm und im Überstand S5_{Cis} < 70 nm groß, 50 % der Partikel im Überstand S1_{Cis} < 233 nm und im Überstand S5_{Cis} < 92 nm groß sowie 90 % der Partikel im Überstand S1_{Cis} < 461 nm und im Überstand S5_{Cis} < 150 nm groß waren.

Die in den Pellets P2_{PMA}, P3_{PMA} und P5_{PMA} angereicherten Partikel wurden ebenfalls hinsichtlich ihrer durchschnittlichen Größe und Größenverteilung charakterisiert (Abb. 4.7 E, F, G, H). Die durchschnittliche Partikelgröße im Pellet P2_{PMA} lag bei 267 nm, im Pellet P3_{PMA} bei 300 nm und im Endpellet P5_{PMA} bei 169 nm. Bezüglich der Größenverteilung zeigte sich, dass 10 % der Partikel im Pellet P2_{PMA} < 128 nm, im Pellet P3_{PMA} < 168 nm und im Pellet P5_{PMA} < 109 nm groß waren, 50 % der Partikel im Pellet P2_{PMA} waren < 255 nm, im Pellet P3_{PMA} < 270 nm und im Pellet P5_{PMA} < 150 nm groß. 90 % der Partikel waren im Pellet P2_{PMA} < 421 nm, im Pellet P3_{PMA} < 469 nm und im Pellet P5_{PMA} < 260 nm groß.

Die in den Pellets P2_{Cis}, P3_{Cis} und P5_{Cis} angereicherten Partikel präsentierten die in Abb. 4.8 (E, F, G, H) dargestellten durchschnittlichen Größen bzw. Größenverteilung. Die durchschnittliche Partikelgröße lag im Pellet P2_{Cis} bei 220 nm, im Pellet P3_{Cis} bei 377 nm und im Endpellet P5_{Cis} bei 186 nm. Bezüglich der Größenverteilung konnte ermittelt werden, dass 10 % der Partikel im Pellet P2_{Cis} < 118 nm, im Pellet P3_{Cis} < 227 nm und im Pellet P5_{Cis} < 109 nm groß waren, dass 50 % der Partikel im Pellet P2_{Cis} < 199 nm, im Pellet P3_{Cis} < 380 nm und im Endpellet P5_{Cis} < 164 nm groß waren und dass 90 % der Partikel im Pellet P2_{Cis} < 343 nm, im Pellet P3_{Cis} < 525 nm und im Pellet P5_{Cis} < 301 nm groß waren.

In einem nächsten Schritt wurde die Verteilung der Partikel innerhalb definierter Größenbereiche bestimmt. Entsprechend den Empfehlungen der ISEV zur Nomenklatur von EV werden im Folgenden kleine (< 200 nm), mittelgroße (200–1000 nm) und große Partikel (> 1 µm) unterschieden. In Abbildung 4.9 sind die prozentualen Anteile kleiner, mittelgroßer und großer Partikel in den Überständen S1 bis S5 und den Pellets P2, P3, P5 dargestellt.

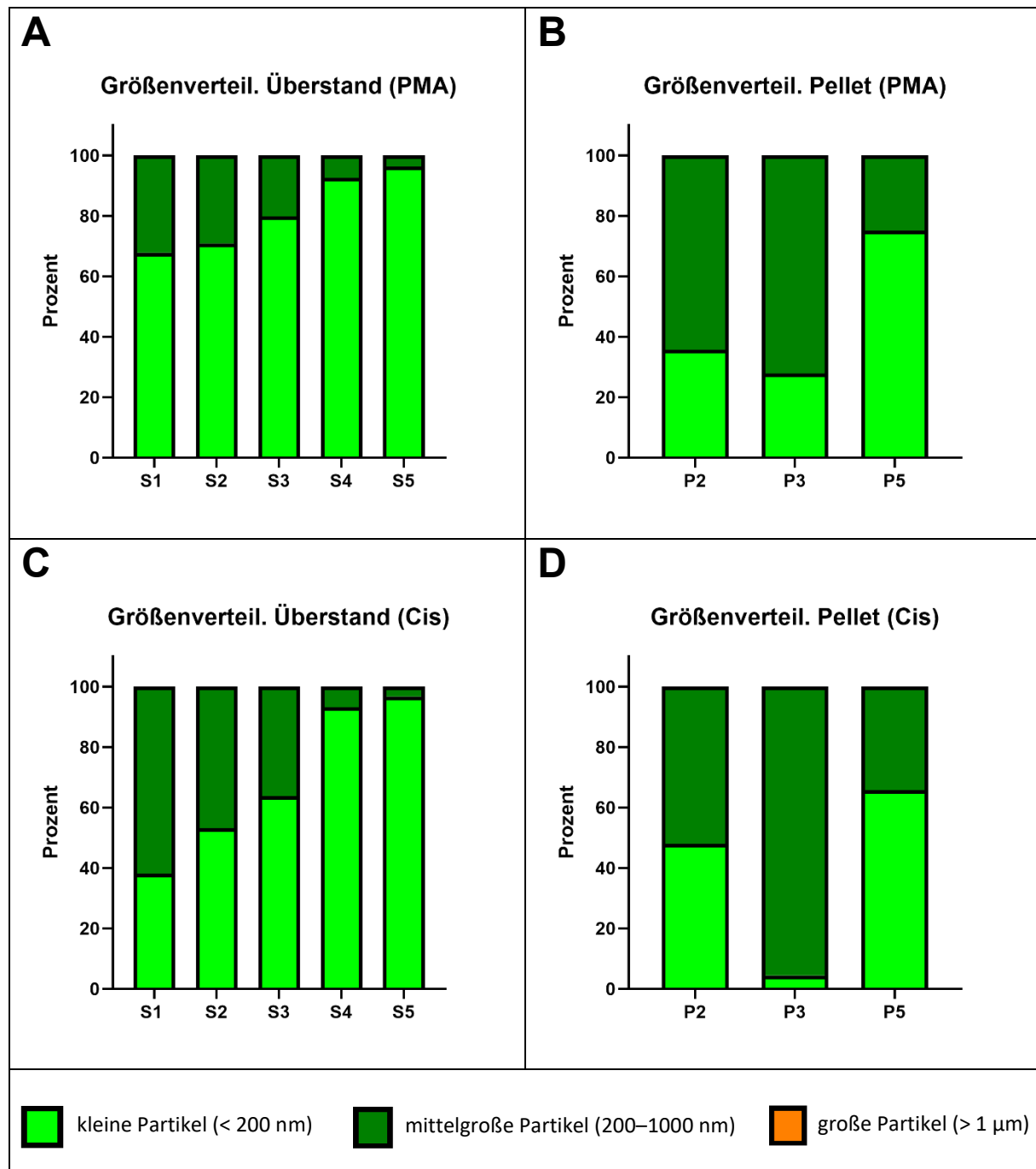


Abbildung 4.9: Prozentuale Anteile kleiner, mittelgroßer und großer Partikel in den Überständen S1 bis S5 und den Pellets P2, P3 und P5.

Dargestellt sind die Größenverteilungen der in den verschiedenen Überständen S1_{PMA} bis S5_{PMA} (A) und S1_{Cis} bis S5_{Cis} (C) sowie den Pellets P2_{PMA}, P3_{PMA}, P5_{PMA} (B) und P2_{Cis}, P3_{Cis}, P5_{Cis} (D) enthaltenen Partikel. Hellgrün dargestellt sind kleine (< 200 nm) und dunkelgrün dargestellt sind mittelgroße (200–1000 nm) Partikel. Große Partikel (> 1 µm) waren aufgrund der geringen Menge nicht darstellbar. Angegeben sind Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente.

In den Überständen S1_{PMA} bis S5_{PMA} (Abb. 4.9 A) zeigte sich, dass der Anteil an kleinen Partikeln während der Prozessierung kontinuierlich zunahm. So waren ca. 68 % der Partikel im Überstand S1_{PMA} und ca. 96 % der Partikel im Überstand S5_{PMA} kleiner als 200 nm. Dementsprechend nahm der Anteil mittelgroßer Partikel von ca. 32 % im Überstand S1_{PMA} bis auf ca. 4 % im Überstand S5_{PMA} ab. Partikel mit einer Größe von mehr als 1 µm konnten nur vereinzelt im Überstand S2_{PMA} nachgewiesen werden.

Eine ähnliche, jedoch weniger ausgeprägte Tendenz konnte für die Pellets $P2_{PMA}$, $P3_{PMA}$ und $P5_{PMA}$ (Abb. 4.9 B) nachgewiesen werden. Hier lag der Anteil kleiner Partikel im Pellet $P2_{PMA}$ bei ca. 36 %, im Pellet $P3_{PMA}$ bei ca. 28 % und im Pellet $P5_{PMA}$ bei ca. 75 %. Die Anteile mittelgroßer Partikel verhielten sich dem entsprechend; so wiesen ca. 64 % der Partikel in $P2_{PMA}$, ca. 72 % der Partikel in $P3_{PMA}$ und ca. 25 % der Partikel in $P5_{PMA}$ eine Größe zwischen 200 und 1000 nm auf. Große Partikel konnten mit einem Anteil von ca. 0,06 % im Pellet $P3_{PMA}$ nachgewiesen werden.

Auch in den Überständen $S1_{Cis}$ bis $S5_{Cis}$ (Abb. 4.9 C) erhöhte sich der Anteil kleiner Partikel während der verschiedenen Zentrifugations- und Ultrazentrifugationsschritte maßgeblich. Hier lag der Anteil an kleinen Partikeln im Überstand $S1_{Cis}$ bei ca. 38 % und stieg während der Prozessierung bis auf ca. 97 % im Überstand $S5_{Cis}$. Konsekutiv nahm der Anteil mittelgroßer Partikel von ca. 62 % im Überstand $S1_{Cis}$ bis auf ca. 3 % im Überstand $S5_{Cis}$ ab. Interessanterweise konnten große EV vereinzelt sowohl im Überstand $S1_{Cis}$ als auch im Überstand $S5_{Cis}$ nachgewiesen werden.

Bezüglich der Pellets $P2_{Cis}$, $P3_{Cis}$, $P5_{Cis}$ (Abb. 4.9 D) konnte festgestellt werden, dass der Anteil kleiner Partikel während der Prozessierung starken Schwankungen unterlag. Im Pellet $P2_{Cis}$ waren ca. 48 % der Partikel, im Pellet $P3_{Cis}$ ca. 4 % der Partikel und im Pellet $P5_{Cis}$ ca. 66 % der Partikel kleiner als 200 nm. Der Anteil an mittelgroßen Partikeln zeigte eine entgegengesetzte Tendenz, wobei ca. 52 % der Partikel im Pellet $P2_{Cis}$, ca. 96 % der Partikel im Pellet $P3_{Cis}$ und ca. 34 % der Partikel im Pellet $P5_{Cis}$ eine Größe zwischen 200 und 1000 nm besaßen. Große Partikel konnten vereinzelt in den Pellets $P2_{Cis}$ und $P3_{Cis}$, jedoch nicht im Pellet $P5_{Cis}$ nachgewiesen werden.

Zusammenfassend kann in Bezug auf die in den Überständen $S1_{PMA}$ bis $S5_{PMA}$ und $S1_{Cis}$ bis $S5_{Cis}$ enthaltenen Partikel festgestellt werden, dass sie nahezu monodispers verteilt waren. Darüber hinaus nahmen die Partikelmengen in den Überständen $S1_{PMA}$ bis $S3_{PMA}$ und $S1_{Cis}$ bis $S2_{Cis}$ zunächst zu und während der anschließenden Zentrifugationsschritte ab. In Bezug auf die Partikelmenge in den Pellets $P2_{PMA}$, $P3_{PMA}$, $P2_{Cis}$ und $P3_{Cis}$ zeigte sich, dass die geringsten Partikelmengen jeweils im Pellet P2 und die höchsten im Pellet P5 gemessen wurden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass sowohl die durchschnittlichen Partikelgrößen als auch die Kennzahlen der Partikelgrößen $D10$, $D50$, $D90$ in den Überständen $S1_{PMA}$ bis $S5_{PMA}$ und $S1_{Cis}$ bis $S5_{Cis}$, mit jedem Zentrifugationsschritt kleiner wurden. Im Einklang mit diesen Ergebnissen stand, dass der Anteil kleiner Partikel in den Überständen von S1 bis S5 kontinuierlich zunahm, wobei der höchste Anteil mittelgroßer Partikel in beiden Stimulationsgruppen im Pellet P3 gemessen werden konnte.

Bezüglich der Charakterisierung des Pellets $P5_{PMA}$ kann zusammenfassend gesagt werden, dass die darin enthaltenen Partikel weitgehend monodispers verteilt waren und sich durchschnittlich $7,9 \times 10^8$ Partikel anreicherten, die im Durchschnitt 169 nm groß waren. In Bezug auf die Größenverteilung der im Pellet $P5_{PMA}$ enthaltenen Partikel kann resümiert werden, dass 10 % < 109 nm, 50 % < 150 nm und

90 % < 257 nm groß waren sowie ca. 75 % als kleine und ca. 25 % als mittelgroße Partikel bezeichnet werden konnten. Auch die im Pellet P5_{Cis} angereicherten Partikel zeigten eine weitgehend monodisperse Verteilung. Im Durchschnitt konnten im Pellet P5_{Cis} $2,9 \times 10^8$ Partikel angereichert werden. Diese Partikel waren durchschnittlich 186 nm groß, wobei 10 % < 109 nm, 50 % < 164 nm und 90 % < 301 nm groß waren. Betrachtet man die Verteilung der Partikel in definierten Größenbereichen, so können ca. 66 % als klein und ca. 34 % der Partikel als mittelgroß bezeichnet werden.

4.2.2 Charakterisierung mittels Western Blot

Zu den von der ISEV vorgeschlagenen Kriterien zur Charakterisierung von EV gehört auch der Nachweis von Proteinen, die in gesteigertem bzw. vermindertem Maß von EV getragen werden. Es wird empfohlen, mindestens drei in EV angereicherte Proteine sowie ein von EV in vermindertem Maß getragenes Protein zu analysieren. Um die in den Zwischenpellets P2, P3 und dem Endpellet P5 sedimentierten Partikel näher zu charakterisieren (Abb. 4.3), wurde daher das Verfahren Western Blot angewendet. Als Kontrollen wurden die Lysate behandelter (2 nM PMA, 7,5 µM Cisplatin) und unbehandelter Zellen gewählt. Die genannten Proben wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western Blot untersucht. Dabei wurde die Expression der in EV-angereicherten Proteine CD9, CD63 und HSP70 analysiert. Darüber hinaus wurden die Proben auf das Vorhandensein von Calnexin, eines Proteins, das in vermindertem Maß in EV vorkommt, untersucht. In Abbildung 4.10 sind die entsprechenden drei Western Blots dargestellt.

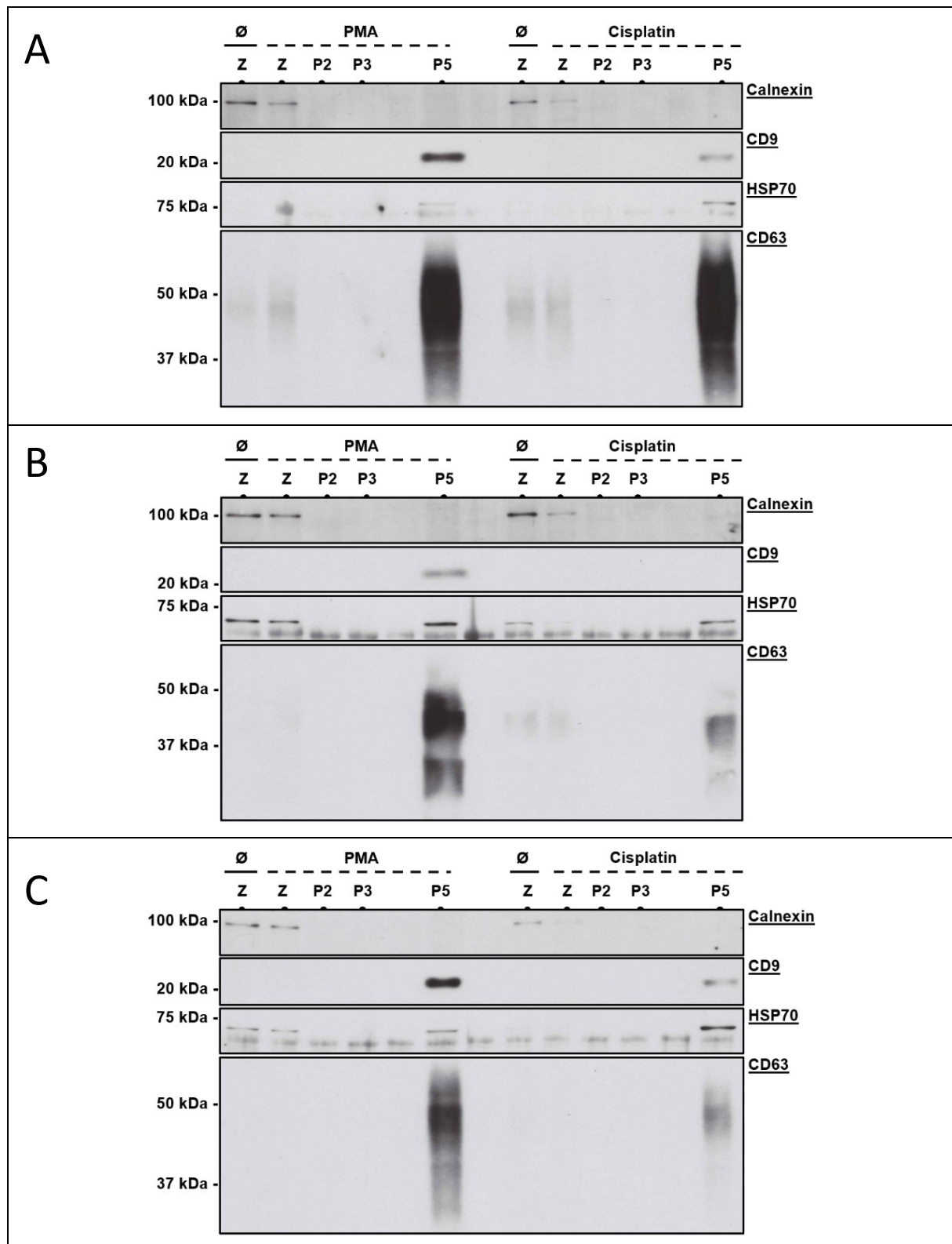


Abbildung 4.10: Western Blots von Zelllysaten unbehandelter und mit Cisplatin- bzw. PMA-behandelter Igrov-1-Zellen sowie den Pelletlysaten P2, P3 und P5 mit drei EV-Markern und einem Nicht-EV-Marker.

Zelllysate (Z) (Kap. 3.4.1.1) von unbehandelten (Ø) und von für 48 h mit PMA- (2 nM) bzw. Cisplatin- (7,5 µM) behandelten Zellen (1 µg) sowie Lysate (Kap. 3.4.1.3) der während der differentiellen Zentrifugations- und Ultrazentrifugationszyklen (Abb. 4.3) erhaltenen Pellets P2_{PMA} (1 µg), P3_{PMA} (1 µg), P5_{PMA} (20 µl) und P2_{Cis} (1 µg), P3_{Cis} (1 µg), P5_{Cis} (20 µl) wurden mittels SDS-Page-Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurde die Expression von CD9, HSP70 und CD63 (EV-Marker) sowie von Calnexin (Nicht-EV-Marker) mittels Immunoblot untersucht. Alle drei biologischen Replikate (A, B, C) sind dargestellt.

In den entwickelten Western Blots zeigte sich, dass Calnexin, als Nicht-EV-Marker, sowohl in den Lysaten behandelter als auch unbehandelter Zellen nachweisbar war, wohingegen es in keinem der Pelletlysate detektiert werden konnte. Das als EV-Marker eingesetzte Tetraspanin CD9 konnte hingegen eindeutig in den Pelletlysaten P5_{PMA} und P5_{Cis} nachgewiesen werden, wobei die CD9-Bande in allen drei Blots stärker im Pelletlysat P5_{PMA} als in P5_{Cis} ausgeprägt war. Das Chaperon HSP70 zeigte die größte Abundanz in den Pelletlysaten P5_{PMA} und P5_{Cis}, wobei es in zwei von drei Blots (Abb. 4.10 B, C) ebenfalls in den Lysaten behandelter und unbehandelter Zellen nachgewiesen werden konnte. Gleiches gilt für das Tetraspanin CD63: Es zeigte das stärkste Signal in den Pelletlysaten P5_{PMA} und P5_{Cis}, konnte aber auch in zwei von drei Blots (Abb. 4.10 A, B) in den Lysaten behandelter und unbehandelter Zellen nachgewiesen werden.

Zusammenfassend kann in Bezug auf die Anreicherungsqualität des verwendeten Protokolls (Abb. 4.3) konstatiert werden, dass weder Calnexin noch die in EV angereicherten Proteine CD9, HSP70 und CD63 in den Lysaten der Zwischenpellets P2 und P3 nachweisbar waren. Im Gegensatz dazu waren in den Pelletlysaten P5_{PMA} und P5_{Cis} die Proteine CD9, HSP70 und CD63 im Vergleich zu den Kontrollen verstärkt nachweisbar, wohingegen der Negativmarker Calnexin nicht detektiert werden konnte. Die im Pellet P5 angereicherten Partikel präsentierten somit den Kriterien der ISEV entsprechend eine EV-typische Proteinkonstellation.

4.2.3 Charakterisierung mittels Transmissionselektronenmikroskopie

Die von der ISEV (2018) vorgeschlagene morphologische Charakterisierung von EV wurde mithilfe von TEM durchgeführt. Hierfür wurden Partikel der Pellets P5_{PMA} und P5_{Cis} gefärbt (*negative staining*) und mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) visualisiert (Kap. 3.3.3). Repräsentative Detailaufnahmen sind in Abb. 4.11 dargestellt, weitere repräsentative Übersichtsaufnahmen befinden sich im Anhang (Abb. 9.5).

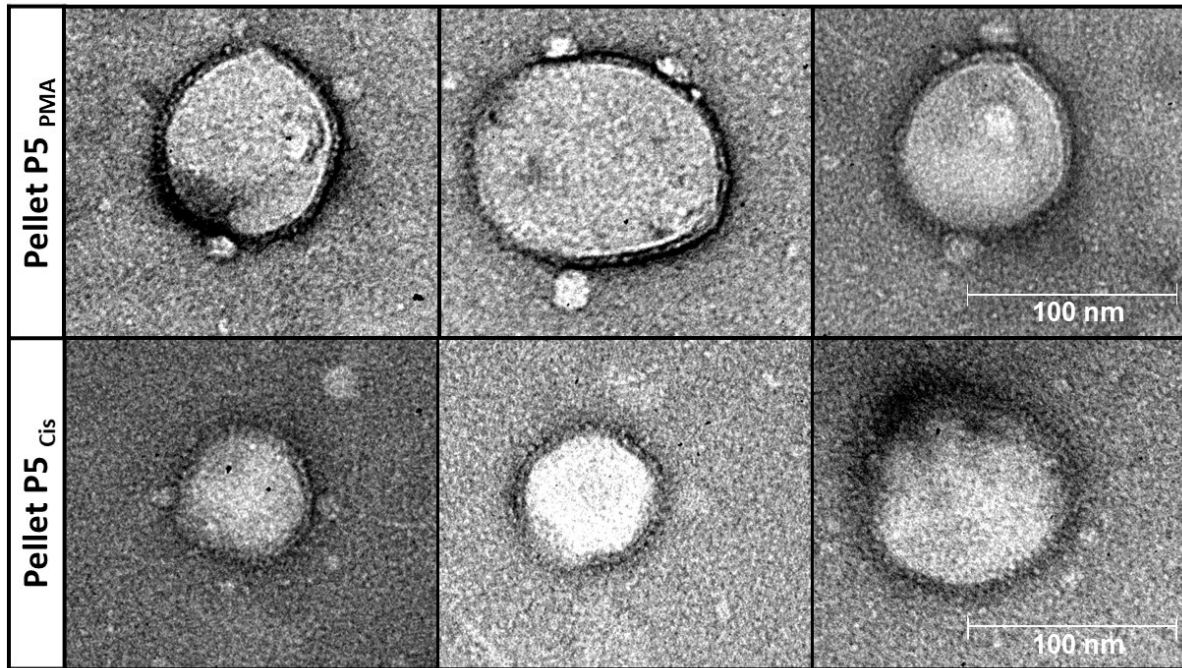


Abbildung 4.11: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Partikeln der Pellets P5_{PMA} und P5_{Cis}. Ein Teil der Pellets P5_{PMA} und P5_{Cis} (Kap. 3.3.3) wurde in PBS aufgenommen und für 18 Tage bei -80 °C kryokonserviert. Die angereicherten Partikel wurden mit einer halbgesättigten Uranylacetat-Lösung gefärbt (*negative staining*) und anschließend mittels TEM visualisiert. Alle Bilder einer Behandlungsart wurden aus dem Material einer identischen, biologischen Probe erstellt. Maßstab 100 nm. Weitere Übersichtsaufnahmen im Anhang (Abb. 9.5).

Es zeigte sich, dass die Pellets P5_{PMA} und P5_{Cis} von einer Doppelmembran umgebene Vesikel im Größenbereich von 100 nm enthielten. Diese Vesikel präsentierten großflächige Aufhellungen in ihrem Inneren, was als Korrelat einer verminderten Elektronenstreuung interpretiert werden kann. Auch außerhalb der Vesikel konnten rundliche Aufhellungen, allerdings ohne Doppelmembran detektiert werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Partikel aus den Pellets P5_{PMA} und P5_{Cis} eine EV-typische Morphologie besitzen. In Verbindung mit den zuvor erhobenen Charakterisierungsergebnissen können diese Partikel somit den ISEV-Definitionskriterien entsprechend als EV bezeichnet werden. Aus diesem Grund wird im Folgenden von den im Pellet P5_{PMA} angereicherten Partikeln als PMA-EV und von den im Pellet P5_{Cis} angereicherten Partikeln als Cisplatin-EV gesprochen.

4.2.4 Charakterisierung von Cisplatin-EV mittels Lipidomics

Nachdem die in den Pellets P5 angereicherten Partikel gemäß ISEV-Kriterien als EV definiert werden konnten, wurde ihr Lipidprofil untersucht (Kap. 3.3.4). Die Lipidzusammensetzung der unter verschiedenen Konzentrationen Cisplatin (0 μ M, 1 μ M, 7,5 μ M) freigesetzten EV wurde mit der von unbehandelten Igrov-1-Zellen (Donorzellen) verglichen. Die Abbildung 4.12 zeigt verschiedene *Cluster*, in denen die relative Abundanz von Phosphatidylcholin (PC), 1-O-alkyl-2-acyl-Phosphatidylcholin (PC-O),

Lysophosphatidylcholin (LPC), Sphingomyelin (SM), Phosphatidylethanolamin (PE), Lysophosphatidylethanolamin (LPE) und Cholesterol in den entsprechenden EV und unbehandelten Donorzellen dargestellt ist.

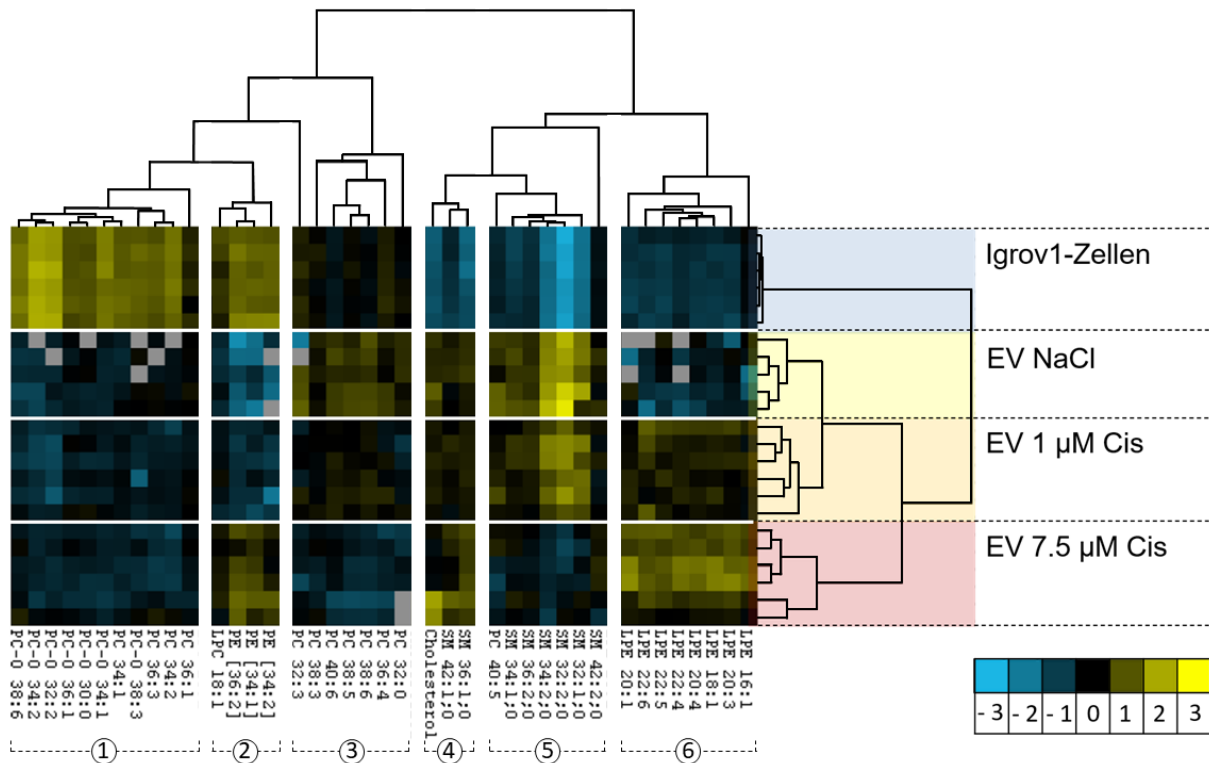


Abbildung 4.12: Lipidzusammensetzung von Donorzellen und von EV, die unter verschiedenen Konzentrationen Cisplatin freigesetzt wurden.

Die Vorbereitung von Igrv1-Zellen und angereicherten EV, die unter NaCl- bzw. Cisplatin-Stimulation (1 µM, 7,5 µM) freigesetzt wurden, für die Lipidanalyse und Messung erfolgte wie in Kapitel 3.3.4 beschrieben. Die Ergebnisse wurden auf Basis dreier unabhängiger Experimente generiert und sind als *Heatmap* dargestellt. Die relative Abundanz wird anhand einer Farbskala dargestellt. Lipide, die ein ähnliches Verteilungsmuster in den Proben zeigten, wurden 6 Clustern zugeordnet (umkreiste Zahlen 1–6). Abkürzungen: PC: Phosphatidylcholin, PC-O: 1-O-alkyl-2-acyl-Phosphatidylcholin, PE: Phosphatidylethanolamin, LPC: Lysophosphatidylcholin, SM: Sphingomyelin, LPE: Lysophosphatidylethanolamin.

Es zeigte sich, dass die PC-O (38:6, 38:3, 36:1, 34:2, 32:2, 30:0) und die PC (36:3, 34:2) im Vergleich zu den parentalen Zellen in den freigesetzten EV vermindert vorhanden sind (Cluster 1). LPC (18:1) und die PE (36:2, 34:1, 34:2) (Cluster 2) sind vor allem in den Zellen und in den durch 7,5 µM Cisplatin freigesetzten EV abundant, jedoch in den durch NaCl und 1 µM Cisplatin-Stimulation freigesetzten EV nur vermindert nachweisbar. PC (32:3, 38:3, 40:6, 38:5, 38:6, 36:4, 32:0) (Cluster 3) sind sowohl in den Zellen als auch in den unter NaCl und 1 µM Cisplatin-Stimulation freigesetzten EV leicht angereichert, in den unter 7,5 µM Cisplatin-Stimulation freigesetzten EV hingegen in vermindertem Maß nachweisbar. Cholesterol und SM (36:1;0, 42:1;0) (Cluster 4) sind in sämtlichen EV-Proben im Vergleich zu den Zellen angereichert. PC (40:5) und SM (34:1;0, 36:2;0, 34:2;0, 32:2;0, 32:1;0, 42:2;0) (Cluster 5) sind in den durch NaCl- und 1 µM Cisplatin-Stimulation freigesetzten EV im Vergleich zu den Zellen und den unter 7,5 µM Cisplatin-Stimulation freigesetzten EV stark angereichert. Die LPE (20:1, 22:6, 22:5, 22:4,

20:4, 18:1, 20:4, 18:1, 20:3, 16:1) (Cluster 6) sind insbesondere in den durch 1 μM und 7,5 μM Cisplatin-Stimulation freigesetzten EV im Vergleich zu Donorzellen sowie den durch NaCl-Stimulation freigesetzten EV vermehrt vorhanden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die durch NaCl- und Cisplatin-Stimulation (1 μM und 7,5 μM) freigesetzten EV sich in Bezug auf ihr Lipidprofil von unbehandelten Donorzellen unterscheiden. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass auch die EV, die unter verschiedenen Konzentrationen Cisplatin freigesetzt wurden, ein unterschiedliches Lipidprofil aufweisen.

4.3 Lagerungsfähigkeit von extrazellulären Vesikeln bei -80 °C

Eine vielversprechende Methode zur Lagerung von EV ist die Kryokonservierung bei -80 °C, die auch von der ISEV propagiert wird [180]. Obwohl eine Kryokonservierung bei -80 °C als eine EV-schonende Lagerungsmethode gilt, konnte gezeigt werden, dass durch die EV-Charakteristika wie Konzentration und Größe oder auch die funktionelle Aktivität in bestimmten Proben beeinflusst werden können [181]. Interessanterweise gibt es Hinweise, dass diese negativen Einflüsse durch den Einsatz einer 25 mM PBS-Trehalose-Lösung vermindert werden könnten [182].

In einem ersten Schritt sollte der Einfluss einer Kryokonservierung bei -80 °C sowie die Auswirkung verschiedener Trägermittel auf die Konzentration und Größe von PMA- und Cisplatin-EV untersucht werden (Kap. 3.3.5). Hierzu wurden die EV während der Anreicherung entweder in PBS oder Trehalose prozessiert und anschließend in jeweiligen Trägermitteln aufgenommen. Von den Suspensionen wurde 1 ml direkt im Anschluss an die Anreicherung mittels NTA gemessen und die restliche Probe bei -80 °C kryokonserviert. Diese Proben wurde nach acht Tagen schonend auf Eis aufgetaut und erneut mittels NTA gemessen. In der Abbildung 4.13 sind die Konzentration sowie die durchschnittlichen Größen der in verschiedenen Trägermitteln gelösten PMA- bzw. Cisplatin-EV vor und nach ihrer Kryokonservierung dargestellt.

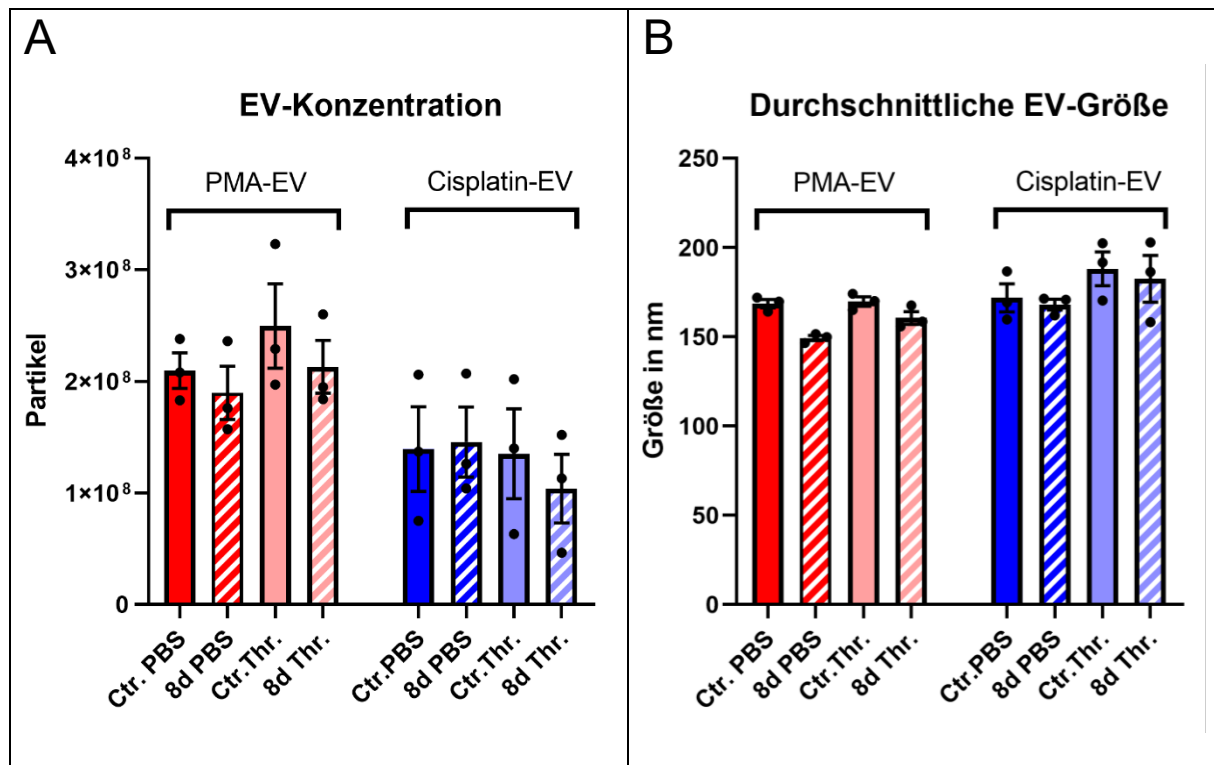


Abbildung 4.13: EV-Konzentration und durchschnittliche EV-Größen vor und nach achttägigem Einfrieren.

Durch PMA- (2 nM) bzw. Cisplatin- (7,5 µM Cis) Stimulation freigesetzte EV wurden mittels differentieller Zentrifugation und Ultrazentrifugation angereichert und anschließend in den Trägermitteln PBS bzw. in eine 25 mM PBS-Trehalose-Lösung (Tre.) aufgenommen. Die Proben wurden direkt nach Anreicherung (einfarbige Balken) sowie nach achttägiger Lagerung bei -80 °C (gestreifte Balken) mittels NTA gemessen. Angegeben sind normierte EV-Konzentrationen (A) und die durchschnittlichen EV-Größen (B). Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte +/- SEM dreier unabhängiger Experimente (Punkte).

Die Konzentration der PMA-EV unterschied sich, unabhängig von den eingesetzten Trägermitteln, vor bzw. nach der Kryokonservierung nicht signifikant (Abb. 4.13 A). Vergleichbares gilt für die Cisplatin-EV, die ebenfalls keine signifikanten Partikelmengenunterschiede in den verschiedenen Trägermitteln vor und nach achttägigem Einfrieren zeigten (Abb. 4.13 A). Auch bezüglich der durchschnittlichen Partikelgrößen konnten weder bei den in PBS- noch in Trehalose-Lösung suspendierten PMA- oder Cisplatin-EV signifikante Unterschiede vor und nach Kryokonservierung gezeigt werden. Auffallend war jedoch, dass in sämtlichen EV-Proben eine wenn auch nicht signifikante Verminderung der durchschnittlichen EV-Größe nach der Kryokonservierung nachgewiesen werden konnte (Abb. 4.13 B).

In einem zweiten Schritt wurde beurteilt, inwieweit Trehalose die Morphologie von in ihr kryokonservierten PMA- oder Cisplatin-EV beeinflusst. Um dies zu untersuchen, wurden die EV nach einer 18-tägigen Lagerung bei -80 °C aufgetaut und elektronenmikroskopisch untersucht. Repräsentative Detailaufnahmen sind in Abb. 4.14 dargestellt. Repräsentative Übersichtsaufnahmen befinden sich im Anhang (Abb. 9.6).

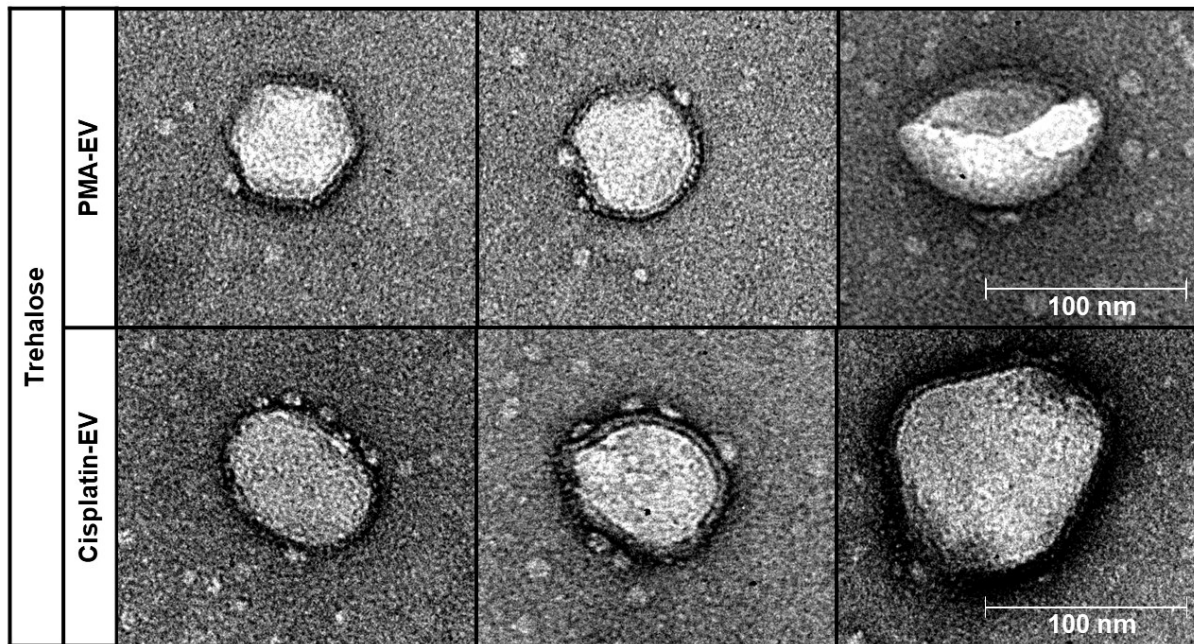


Abbildung 4.14: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von in Trehalose-Lösung suspendierten EV.

PMA- bzw. Cisplatin-EV wurden angereichert, in einer 25 mM PBS-Trehalose-Lösung aufgenommen, für 18 Tage bei -80°C gelagert, mit einer halbgesättigten Uranylacetat-Lösung (*negative staining*) gefärbt und mittels TEM visualisiert. Alle Bilder einer Behandlungsart wurden aus dem Material einer identischen, biologischen Probe erstellt. Maßstab 100 nm. Weitere Übersichtsaufnahmen befinden sich im Anhang (Abb. 9.6).

Es zeigte sich, dass die in Trehalose-Lösung aufgenommenen PMA- bzw. Cisplatin-EV eine mit den in PBS suspendierten EV vergleichbare Morphologie präsentierten (Abb. 4.11). Sie wiesen wie die in PBS aufgenommenen EV eine Doppelmembran auf. Innerhalb dieser Doppelmembran konnte ein aufgehellter Bereich als Korrelat einer verminderten Elektronenstreuung visualisiert werden. Auch die zuvor beschriebenen rundlichen, außerhalb der Vesikel gelegenen Aufhellungen konnten in diesen Proben nachgewiesen werden. Eine Abweichung in Bezug auf die in PBS aufgenommenen EV zeigte sich darin, dass einzelne Vesikel eine hexagonale Form aufwiesen (Abb. 4.14).

Zusammenfassend kann konstatiert werden, dass sich PMA- bzw. Cisplatin-EV nach einer achttägigen Lagerung bei -80°C in ihrer Konzentration und durchschnittlichen Größe nicht signifikant von „frischen“ Proben unterschieden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Trehalose im gewählten Experimentaufbau keine signifikanten Vorteile gegenüber PBS als Trägermittel bei der EV-Lagerung aufweist.

4.4 Auswirkungen von Cisplatin- bzw. PMA-Stimulation auf Zellüberleben, EV-Freisetzung und EV-assoziierte ADAM17-Abundanz

Im Folgenden werden die Einflüsse verschiedener Cisplatin-Konzentrationen auf das Zellüberleben sowie die EV-Freisetzung untersucht. Darüber hinaus wird evaluiert, ob diese Cisplatin-EV ADAM17 tragen. Als Kontrolle dienen, in Anlehnung an die Publikation von Groth et al. (2016), unter PMA-Kurz- (2 h) bzw. -Langzeitstimulation (48 h) freigesetzte EV.

4.4.1 Korrelation von Zelltod und EV-Freisetzung unter PMA- und Cisplatin-Stimulation

Um nachweisen zu können, ob die Induktion des Zelltods bei PMA- oder Cisplatin-Behandlung mit der EV-Freisetzung korreliert, wurden Igrov-1-Zellen mit steigenden Konzentrationen Cisplatin (0–10 μM) oder PMA (2 nM) sowie den entsprechenden Kontrollen (Ethanol-Gemisch (EtOH), 0,9 % Natrium-Chlorid (NaCl), EV-depletiertes Medium) behandelt (Kap. 3.1.4). Das Zellüberleben wurde nach den entsprechenden Stimulationszeiträumen (2 h bzw. 48 h) bestimmt (Kap. 3.1.3, 3.1.4). Die mittels NTA ermittelten EV-Konzentrationen wurden normiert (Kap. 3.3.2) und anschließend in Relation zu den EV-Konzentrationen gesetzt, die aus den Überständen mit NaCl-stimulierten Zellen angereichert wurden. Eine Gegenüberstellung von Zellüberleben und EV-Freisetzung ist in Abbildung 4.15 dargestellt. In Bezug auf die Cisplatin-Stimulationsreihe wurden als repräsentative Auswahl nur die Konzentrationen der unter NaCl, 1 μM sowie 7,5 μM Cisplatin-Behandlung freigesetzten EV bestimmt.

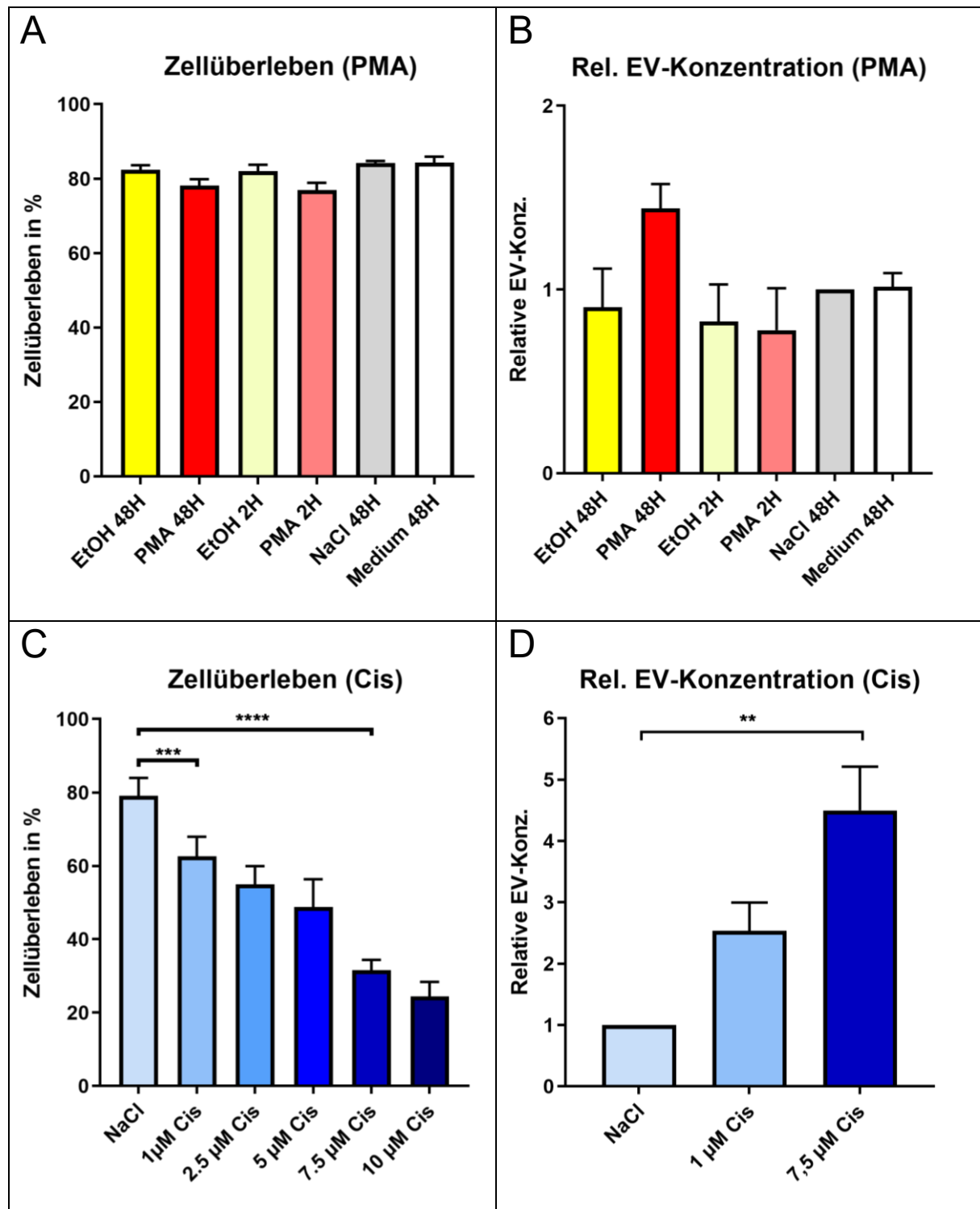


Abbildung 4.15: Zellüberleben und relative EV-Freisetzung unter PMA- bzw. Cisplatin-Stimulation.

Das Zellüberleben von in Kurz- (2 h) und Langzeitstimulation (48 h) mit PMA- (2 nM) bzw. verschiedenen Konzentrationen Cisplatin- (0–10 µM) (C) stimulierten Zellen sowie der entsprechenden Kontrollen (EtOH, NaCl und Medium) (A) wurde auf Basis der Zellfärbung mittels *Nyone Cell Imager* bestimmt (Kap. 3.1.3). Die jeweiligen EV wurden angereichert (Kap. 3.3.1), mit NTA untersucht, auf die Anzahl ausgesäter Zellen normiert (Kap. 3.3.2) und in Relation zu den unter NaCl-Stimulation freigesetzten EV-Mengen angegeben (B, D). Die Graphen zeigen jeweils Mittelwerte $\pm$ SEM von drei unabhängigen Experimenten. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$, **** = $p < 0.0001$.

Im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen zeigte sich, dass weder eine PMA-Kurzzeit- noch eine -Langzeitstimulation das Zellüberleben signifikant beeinflusste. Es ist jedoch anzumerken, dass

die Kontrollen (EtOH, NaCl und Medium) ein Zellüberleben von 82 bis 84 % aufwiesen, wohingegen das Zellüberleben nach einer 2-stündigen PMA-Stimulation bei 77 % und nach einer 48-stündigen Stimulation bei 78 % lag (Abb. 4.15 A). Bezüglich der EV-Freisetzung konnte gezeigt werden, dass eine Langzeitstimulation mit PMA im Vergleich zur NaCl-Kontrolle die Freisetzung von EV induzierte (1,44-fach). Dieser Effekt war jedoch unter den gegebenen Bedingungen nicht signifikant (Abb. 4.15 B).

Im Vergleich dazu nahm das Zellüberleben durch Stimulation mit steigender Cisplatin-Konzentration signifikant ab. So betrug das Zellüberleben der mit NaCl-behandelten Zellen 79 %, der mit 1 μ M Cisplatin behandelten Zellen 63 % ($p = 0,0001$) und der mit 7,5 μ M Cisplatin behandelten Zellen nur noch 32 % ($p < 0,0001$) (Abb. 4.15 C). Die EV-Freisetzung zeigte eine dem Zellüberleben entgegengesetzte Tendenz. So konnten hier, bezogen auf die NaCl-Kontrolle, eine 2,5-fach erhöhte EV-Freisetzung bei Stimulation mit 1 μ M Cisplatin und eine 4,5-fach erhöhte EV-Freisetzung bei Stimulation mit 7,5 μ M Cisplatin ($p = 0,0031$) nachgewiesen werden (Abb. 4.15 C).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine PMA-Stimulation das Zellüberleben kaum einschränkt, jedoch zu einer gesteigerten, wenn auch nicht signifikanten EV-Freisetzung führt. Hingegen induziert Cisplatin konzentrationsabhängig den Zelltod und steigert gleichzeitig die EV-Freisetzung.

4.4.2 Western-Blot-Analyse zum Nachweis von ADAM17 in unter PMA- bzw. Cisplatin-Stimulation freigesetzten extrazellulären Vesikeln

Nachfolgend wird untersucht, ob ADAM17 in den unter PMA- oder Cisplatin-Stimulation freigesetzten EV nachgewiesen werden kann. Wie im Kapitel 1.2.3 beschrieben, kommt ADAM17 als funktionell aktive, mature Form (75 kDa) und als funktionell inaktive Proform (120 kDa) vor. Neben diesen Formen wurden auch kleinere Fragmente der Metalloprotease im Western Blot beschrieben [43, 123]. Die in dieser Arbeit untersuchten Fragmente werden im Folgenden als 60/55-kDa-Fragment (60 kDa in Zelllysaten, 55 kDa in EV-Lysaten) und 22/18-kDa-Fragment (22 kDa in Zelllysaten, 18 kDa in EV-Lysaten) bezeichnet.

Um die Abundanz der verschiedenen Formen und Fragmente von ADAM17 in den durch PMA- oder Cisplatin-Stimulation freigesetzten EV sowie in den entsprechenden Kontrollen zu ermitteln, wurden Western Blots durchgeführt. Neben ADAM17 wurde auch die Expression des EV-Markerproteins CD63 untersucht. Als zusätzliche Kontrollen wurden die Lysate unbehandelter bzw. mit NaCl behandelter Igrov-1-Zellen gewählt. In Abbildung 4.16 sind die Western Blots von Lysaten, der nach PMA-Kurz- und -Langzeitstimulation freigesetzten EV sowie der entsprechenden Kontrollen dargestellt.

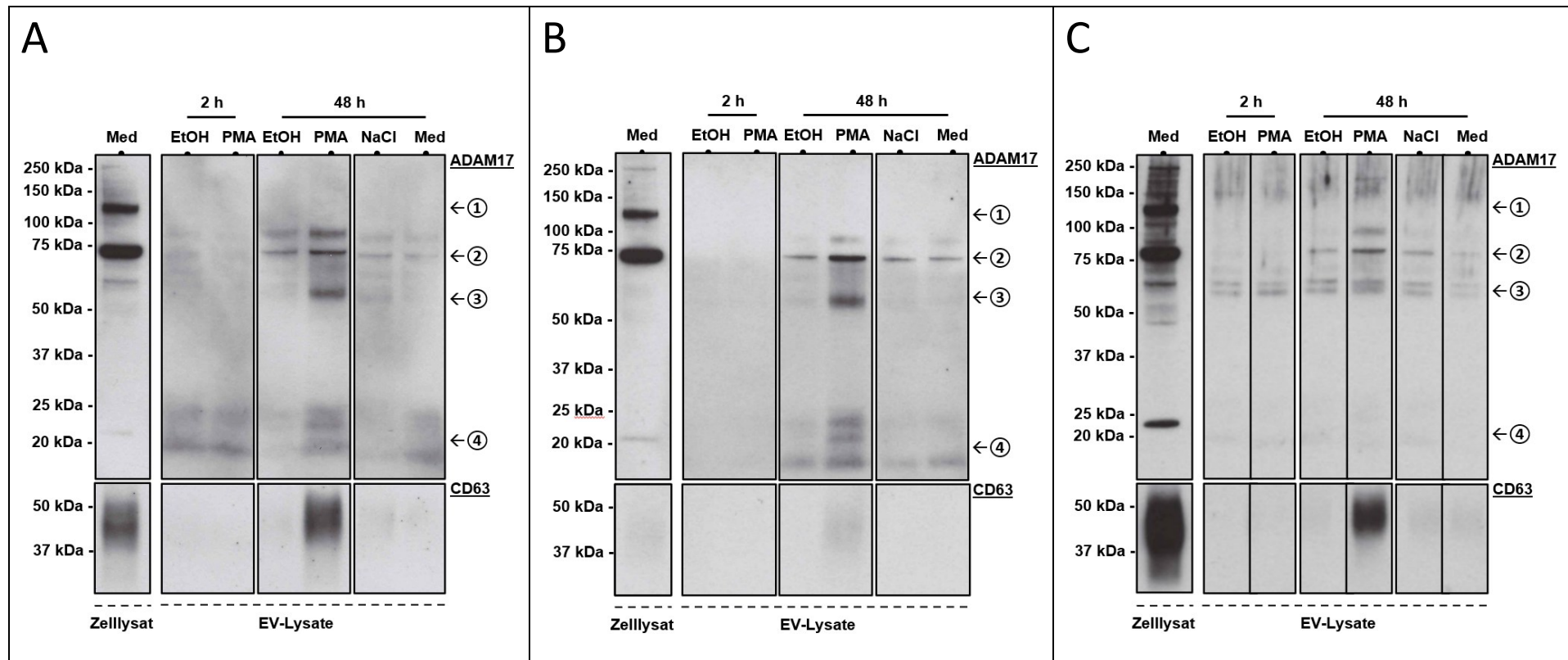


Abbildung 4.16: Western Blots zum Nachweis von ADAM17 und dem EV-Marker CD63 in nach PMA-Stimulation angereicherten EV-Lysaten.

EV-Lysate (Kap. 3.4.1.3) wurden aus den Überständen von in Kurz- (2 h) und Langzeitstimulation (48 h) mit PMA (2 nM) und entsprechenden Kontrollen (Ethanol-Lösung (EtOH), 0,9 % Natrium-Chlorid-Lösung (NaCl) sowie EV-depletiertem Medium (Med)) behandelten Igrov-1-Zellen gewonnen. Als Vergleich diente ein Zelllysate (Z) (Kap. 3.4.1.1) von unbehandelten Igrov-1-Zellen. Drei biologische Replikate (A, B, C) sind dargestellt. ①= Proform von ADAM17, ②= mature ADAM17, ③= 60/55-kDa-Fragment, ④= 22/18-kDa-Fragment.

In den Western Blots zeigte sich, dass das Tetraspanin CD63 in dem Zelllysate unbehandelter Igrov-1-Zellen als starke Bande bei ca. 30–60 kDa nachweisbar war (Abb. 4.16). In den EV-Proben konnte CD63 nur in einem von drei Blots nach Kurzzeitstimulation mit PMA nachgewiesen werden, wohingegen es in der entsprechenden Kontrolle (EtOH) nicht detektiert werden konnte. In den nach Langzeitstimulation freigesetzten EV war CD63 in den Kontrollen (EtOH, NaCl und Medium) als schwache, in den nach PMA-Stimulation erhaltenen EV als ausgeprägte Bande nachweisbar.

Die Bande der Proform (120 kDa) von ADAM17 konnte im Lysat unbehandelter Zellen nachgewiesen werden, nicht jedoch in den EV-Proben. Die mature Form (75 kDa) von ADAM17 konnte im Zelllysate in vergleichbarer Intensität wie die Proform nachgewiesen werden. Für die EV-Proben kann resümiert werden, dass mature ADAM17 nach Kurzzeitstimulation mit PMA nur in einem von drei Blots und nach Stimulation mit der entsprechenden EtOH-Kontrolle nicht detektiert werden konnte. In den nach Langzeitstimulation erhaltenen EV-Proben ist mature ADAM17 in den Kontrollen (EtOH, NaCl und Medium) nur schwach vorhanden, zeigt sich aber nach PMA-Stimulation als ausgeprägte Bande. Die Bande des 60/55-kDa-Fragments von ADAM17 konnte in den Zelllysaten schwach nachgewiesen werden. Bezüglich der EV-Proben konnte sie nur bei den unter PMA-Langzeitstimulation freigesetzten EV detektiert werden, wobei sie dort in zwei von drei Blots eine gesteigerte Abundanz zeigte. Das 22/18-kDa-Fragment konnte in den Zelllysaten unbehandelter Zellen detektiert werden. In den EV-Proben war dieses Fragment ebenfalls in allen nach Langzeitstimulation freigesetzten EV und in zwei von drei Blots auch in den nach Kurzzeitstimulation freigesetzten EV nachweisbar. Interessanterweise konnte die 22-kDa-Bande, die sonst ausschließlich in den Zelllysaten nachweisbar war, auch in den durch PMA-Langzeitstimulation freigesetzten EV detektiert werden.

Nachfolgend wird der Einfluss der Cisplatin-Stimulation auf die Abundanz der verschiedenen ADAM17-Formen und -Fragmente untersucht. In Abbildung 4.17 sind die Western Blots der durch 0–10 μ M Cisplatin induzierten EV mit den entsprechenden Kontrollen dargestellt.

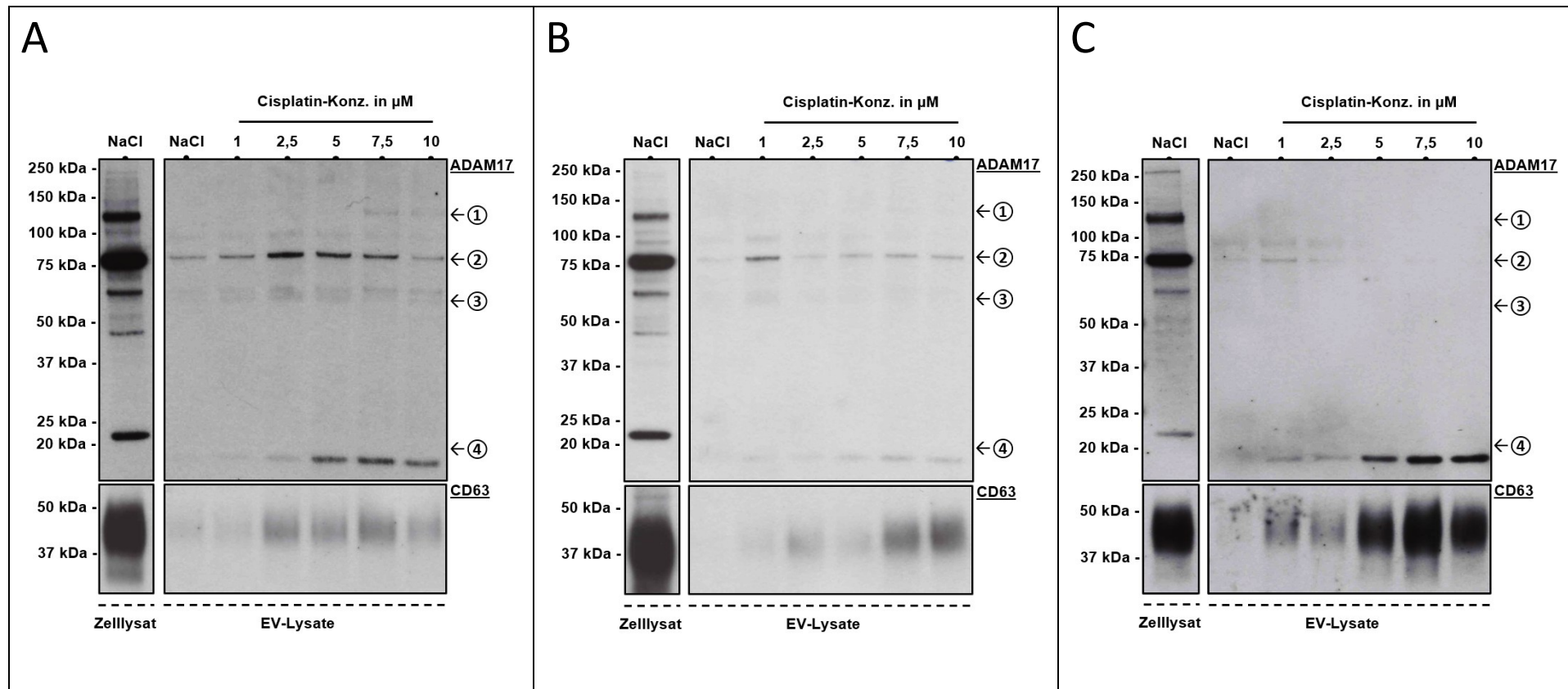


Abbildung 4.17: Western Blots zum Nachweis von ADAM17 und dem EV-Marker CD63 in Lysaten von nach Cisplatin-Stimulation angereicherten EV.

EV-Lysate (Kap. 3.4.1.3) wurden aus den Überständen von mit 0–10 μM Cisplatin behandelten Igrov-1-Zellen gewonnen. Als Vergleich diente ein Zelllysate (Z) (Kap. 3.4.1.1) von mit NaCl behandelten Igrov-1-Zellen. Drei biologische Replikate (A, B, C) sind dargestellt. ① = Proform von ADAM17, ② = mature ADAM17, ③ = 60/55-kDa-Fragment, ④ = 22/18-kDa-Fragment.

In den Western Blots war der EV-Marker CD63 in den Lysaten der mit NaCl behandelten Zellen deutlich nachweisbar (Abb. 4.17). Bezüglich der nach Stimulation mit 0–10 μM Cisplatin freigesetzten EV war auffällig, dass die Abundanz des Tetraspanins bis zu einer Cisplatin-Konzentration von 7,5 μM stieg. In den nach Einsatz von 10 μM Cisplatin erhaltenen EV-Proben konnte CD63 im Vergleich mit den nach 7,5 μM Cisplatin-Stimulation freigesetzten EV in einem Blot in vergleichbarem und in zwei Blots in vermindertem Maß detektiert werden.

Die Proform (120 kDa) von ADAM17 wurde im Lysat der mit NaCl behandelten Igrov-1-Zellen als ausgeprägte Bande nachgewiesen. Darüber hinaus wurde sie in einem von drei Blots in den durch 7,5 μM und 10 μM Cisplatin-stimulierten EV detektiert. Die mature Form (75 kDa) von ADAM17 konnte wie die Proform im Zelllysate nachgewiesen werden. In den EV, die nach Stimulation mit 1 μM bzw. 2,5 μM Cisplatin freigesetzt wurden, konnte die mature Form mit der für die EV-Proben höchsten Abundanz detektiert werden, allerdings war die Bande deutlich schwächer ausgeprägt als im Zelllysate. Interessanterweise wurde in den Proben der durch höhere Cisplatin-Konzentrationen freigesetzten EV deutlich weniger funktionell aktive ADAM17 detektiert. Das 60/55-kDa-Fragment konnte im Zelllysate nachgewiesen werden, nicht aber in den EV-Proben. Das 22/18-kDa-Fragment war, wie die anderen ADAM17-Formen bzw. das 60/55-kDa-Fragment, besonders deutlich im Zelllysate nachweisbar. Bemerkenswerterweise korrelierte in den EV-Proben die Intensität der Bande des 22/18-kDa-Fragments positiv mit der Cisplatin-Konzentration, mit maximaler Ausprägung nach Stimulation mit 7,5 μM bzw. 10 μM Cisplatin.

Zusammenfassend formuliert exprimieren unbehandelte bzw. mit NaCl behandelte Igrov-1-Zellen die Proform (120 kDa), die mature Form (75 kDa), das 60-kDa-Fragment und das 22-kDa-Fragment von ADAM17 sowie das Tetraspanin CD63. Bezüglich der durch PMA-Stimulation freigesetzten EV waren die aktive mature Form (75 kDa), das 55-kDa-Fragment und das 22/18-kDa-Fragment von ADAM17 nachweisbar. Hinsichtlich der unter Cisplatin-Stimulation freigesetzten EV zeigte sich, dass in entsprechenden Lysaten die Proform (120 kDa), die aktive, mature Form (75 kDa) und das 18-kDa-Fragment von ADAM17 detektiert werden konnten, wobei die Intensität korrespondierender Banden bei verschiedenen Cisplatin-Konzentrationen variierte.

4.5 Aufnahme extrazellulärer Vesikel in Ovarialkarzinomzellen

Nachdem in PMA- und Cisplatin-EV (Abb. 4.16, Abb. 4.17) verschiedene Formen und Fragmente von ADAM17 nachgewiesen werden konnten, wurde untersucht, ob diese EV von Ovarialkarzinomzellen aufgenommen werden. Hierfür wurden Igrov-1-Zellen mit definierten Mengen fluoreszenzmarkierter PMA- bzw. Cisplatin-EV inkubiert (Kap. 3.5.1). Eine NTA zur Bestimmung der EV-Konzentrationen zur Vorbereitung der EV-Aufnahmeexperimente ist im Anhang in Abbildung 9.7 dargestellt; diese Abbildung enthält auch die durchschnittlichen EV-Größen.

4.5.1 Beurteilung der Aufnahme extrazellulärer Vesikel mittels *Live-Cell Imaging*

Zur qualitativen Beurteilung der Aufnahme von EVs durch Igrov-1-Zellen wurden diese mit fluoreszenzmarkierten EV (Kap. 3.5.1), welche unter Cisplatin-Stimulation ($7,5 \mu\text{M}$) freigesetzt wurden, behandelt. Anschließend wurden die Zellen für einen Zeitraum von 10 h alle 20 min in einem Lionheart™ FX Mikroskop bei 20-facher Vergrößerung fotografiert (Kap. 3.5.2). Eine exemplarische Aufnahme ist in Abbildung 4.18 dargestellt (der QR-Code erlaubt den Zugriff auf ein repräsentatives Video).

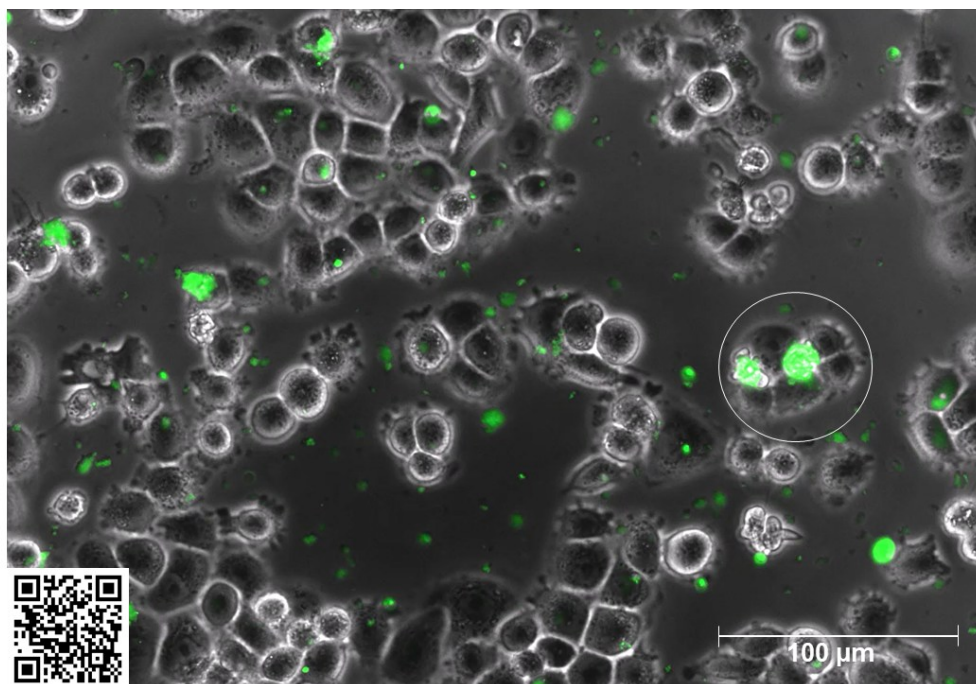


Abbildung 4.18: *Live-Cell Imaging* zur qualitativen Untersuchung der Aufnahme von fluoreszenzmarkierten EV durch Igrov-1-Zellen.

Igrov-1-Zellen wurden mit einer definierten Menge von unter Cisplatin-Stimulation ($7,5 \mu\text{M}$) freigesetzten und nachfolgend fluoreszenzmarkierten EV (grün) behandelt. Die Zellen und EV wurden für 10 h alle 20 min mit einer 20-fachen Vergrößerung fotografiert. Eine exemplarische Aufnahme ist dargestellt sowie ein repräsentatives Video, das durch den im unteren linken Bildrand dargestellten QR-Code einsehbar ist. Maßstab 100 μm .

Wie in Abbildung 4.18 und dem Video gezeigt, konnten zahlreiche grün fluoreszierende Partikel verschiedener Größen im Überstand der Zellen nachgewiesen werden. Im Zeitverlauf zeigte sich, dass

sich viele dieser Partikel an die Zellen hefteten und sich anschließend mit ihnen über den Boden der Flachbodenplatte bewegten. In einigen Zellen ließ sich eine Aufnahme der Partikel vermuten, da sich das Zytoplasma dieser Zellen grün verfärbte. Im Fall der mit einem Kreis markierten Zellen (Abb. 4.18) konnte darüber hinaus dokumentiert werden, dass diese Grünfärbung des Zytoplasmas bei Zellteilung auf beide Tochterzellen überging.

4.5.2 Beurteilung der Aufnahme extrazellulärer Vesikel mittels *Imaging-Durchflusszytometrie*

Zur qualitativen und quantitativen Beurteilung der Aufnahme von fluoreszenzmarkierten EV (PMA, Cisplatin) (Kap. 3.5.1) in Igrov-1-Zellen (Akzeptorzellen) sowie zur näheren Charakterisierung der zeitlichen Dynamik dieses Prozesses wurde die *Imaging-Durchflusszytometrie* angewendet (Kap. 3.5.3). Die Kultivierung und Behandlung der Akzeptorzellen mit dem Makrolid-Toxin Latrunculin A sowie mit den fluoreszenzmarkierten EV wird in Kapitel 3.5.3 beschrieben. Nach der jeweiligen Behandlungszeit (4 h, 14 h) wurden die Membranen der Empfängerzellen gefärbt und für die *Imaging-Durchflusszytometrie* vorbereitet (Kap. 3.5.3). Exemplarische Einzelaufnahmen nach einer Inkubationszeit von 14 h sind in Abbildung 4.19 gezeigt.

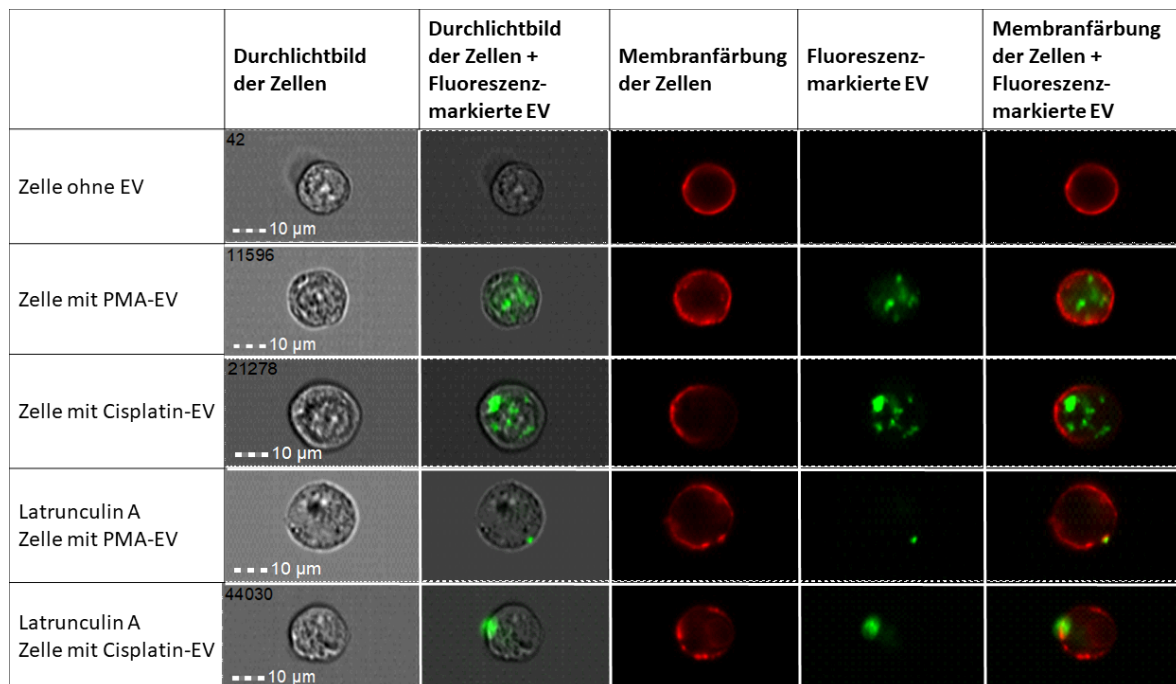


Abbildung 4.19: *Imaging-durchflusszytometrische* Analyse der Aufnahme von PMA- bzw. Cisplatin-EV durch Igrov-1-Zellen.

Dargestellt sind exemplarische Einzelaufnahmen von Zellen ohne EV-Behandlung und von Zellen, welche mit unter PMA- (2 nM) oder Cisplatin-Stimulation (7,5 µM) freigesetzten und fluoreszenzmarkierten EV (grün) in An- oder Abwesenheit von Latrunculin A für 14 h inkubiert wurden. Maßstab 10 µm.

In der qualitativen Begutachtung der in den verschiedenen Proben enthaltenen Zellen wurde deutlich, dass sich die EV nach Inkubation in distinkten Strukturen innerhalb der Zelle befinden, was auf deren

Aufnahme hindeutet. Mit Latrunculin A behandelte Zellen zeigten im Vergleich zu unbehandelten Zellen weniger dieser fluoreszierenden intrazellulären Strukturen (Abb. 4.19).

Um die Aufnahme der unter PMA- oder Cisplatin-Stimulation freigesetzten EV mit und ohne Latrunculin-A-Behandlung quantifizieren zu können, wurde der Anteil der Zellen ermittelt, die EV internalisiert haben. Hierbei wurde die Zellmembran einerseits auf Grundlage der lichtmikroskopischen Durchlichtbilder und andererseits anhand der Membranfärbung definiert (Abb. 4.20).

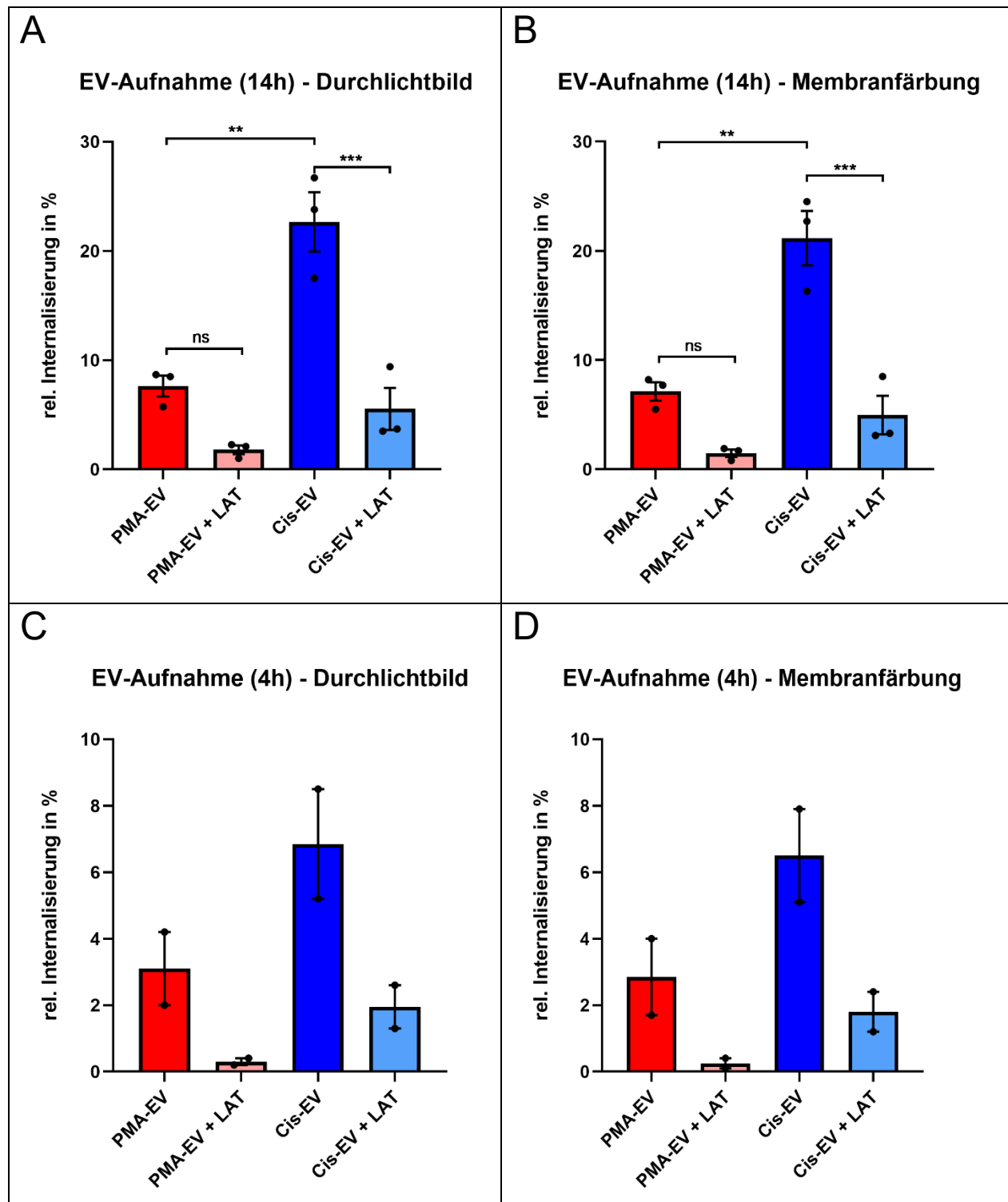


Abbildung 4.20: Relative Internalisierung von PMA- bzw. Cisplatin-EV in mit und ohne Latrunculin A behandelten Igrov-1-Zellen in Kurz- und Langzeitstimulation.

Igrov-1-Zellen wurden entweder mit oder ohne Latrunculin A behandelt und anschließend mit durch PMA- (2 nM) oder Cisplatin-Stimulation (7,5 μ M) freigesetzten und fluoreszenzmarkierten EV inkubiert. Dargestellt sind die relativen Internalisierungen in Langzeit- (A, B) und Kurzzeitstimulation (C, D). Die relative Internalisierung wurde auf Basis des lichtmikroskopischen Durchlichtbildes (A, C) sowie auf Basis der Zellmembranfärbung (B, D) berechnet. Die in A und B dargestellten Ergebnisse wurden auf Basis dreier unabhängiger Experimente erhoben, die in C und D dargestellten Ergebnisse auf Basis zweier unabhängiger Experimente. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$, **** = $p < 0.0001$.

Bei der quantitativen Analyse wird im Folgenden der Anteil der Igrov-1-Zellen, bei denen eine EV-Aufnahme stattgefunden hat, als Durchschnitt der auf Basis des Durchlichtbildes (und der Membranfärbung) ermittelten Werte angegeben. Nach 14-stündiger Inkubation hatten etwa 7,6 % der unbehandelten Zellen auf Basis des Durchlichtbildes (etwa 7,1 % auf Basis der Membranfärbung) und etwa 1,8 % der mit Latrunculin A behandelten Zellen auf Basis des Durchlichtbildes (etwa 1,5 % auf Basis der Membranfärbung) PMA-EV aufgenommen (Abb. 4.20 A, B). Die Aufnahme von Cisplatin-EV konnte ohne Latrunculin-A-Behandlung in etwa 22,7 % der Zellen auf Basis des Durchlichtbildes (etwa 21,2 % auf Basis der Membranfärbung) nachgewiesen werden. Mit Latrunculin-A-Behandlung lag die Aufnahme bei etwa 5,5 % der Zellen auf Basis des Durchlichtbildes (etwa 5 % auf Basis der Membranfärbung) (Abb. 4.20 A, B). Passend dazu konnten bereits nach einer 4-stündigen Inkubation mit PMA- oder Cisplatin-EV vergleichbare Tendenzen bezüglich deren Aufnahme in entsprechend behandelten Igrov-1-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 4.20 C, D).

Zusammenfassend kann konstatiert werden, dass Cisplatin-EV signifikant mit einer höheren Wahrscheinlichkeit in die Empfängerzellen aufgenommen wurden als PMA-EV ($p = 0,0013$ auf Basis des Durchlichtbildes, $p = 0,014$ auf Basis der Membranfärbung). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass diese Aufnahme von Cisplatin-EV durch eine Behandlung der Zellen mit Latrunculin A signifikant gehemmt werden konnte ($p = 0,0006$ auf Basis des Durchlichtbildes, $p = 0,0007$ auf Basis der Membranfärbung).

4.6 EV-Konzentration und ADAM17-Abundanz von aus Aszites isolierten extrazellulären Vesikeln

Nachdem gezeigt werden konnte, dass ADAM17 in PMA- und Cisplatin-EV detektierbar war, wurde untersucht, ob die Metalloprotease auch in EV aus biologischen Proben von Ovarialkarzinom-Patientinnen nachweisbar ist. Eine geeignete biologische Probe zur Anreicherung von EV könnte Aszites sein, welcher häufig im Rahmen des Ovarialkarzinoms auftritt [183–185]. Tumorassoziierter Aszites hat den Vorteil, dass er bei Operationen und Entlastungspunktionen routinemäßig abgenommen wird und aus diesem Grund in ausreichendem Maß für Untersuchungs- und Forschungszwecke zur Verfügung steht [184].

In einem initialen Etablierungsexperiment wurde eine von einer Ovarialkarzinom-Patientin gewonnene Aszitesprobe (Kap. 3.2) mit dem in Kapitel 3.3.1 und Abbildung 3.3 beschriebenen qualitätskontrollierten Protokoll prozessiert. Anschließend wurden die potenziell aus dem Aszites angereicherten EV mittels NTA bezüglich ihrer Konzentration, durchschnittlichen Größe und Größenverteilung (D10, D50, D90) charakterisiert. Nachfolgend wurden sie mit Western Blot auf das Vorhandensein der

EV-Markerproteine CD63 und HSP70 sowie auf die Abundanz der unterschiedlichen ADAM17-Formen und Fragmente hin analysiert. Die Abbildung 4.21 zeigt die NTA-Untersuchung der Aszitesprobe.

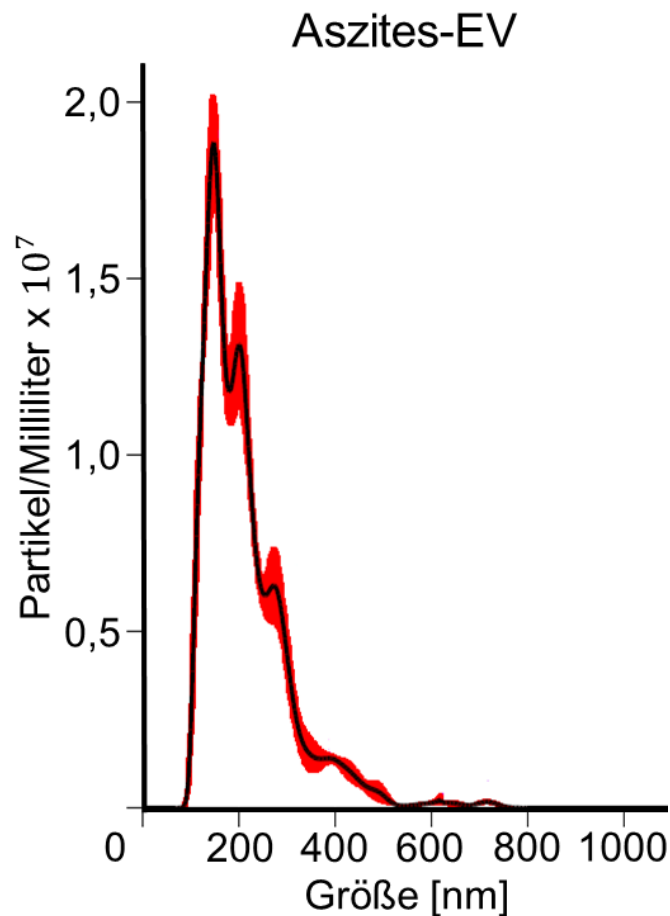


Abbildung 4.21: NTA zur Ermittlung der Größenverteilung und Konzentration von aus Aszites angereicherten EV. Der dargestellte Graph entspricht vier Einzelmessungen der gleichen biologischen Probe. Es handelt sich um ein initiales Etablierungsexperiment.

Die angereicherten EV wiesen, mit einem Kurvenmaximum bei 147 nm, eine nahezu monodisperse Größenverteilung auf. Zusätzlich zeigte sich, dass aus 1 ml Aszites etwa $4,8 \times 10^8$ EV angereichert werden konnten. Diese Aszites-EV besaßen eine durchschnittliche Größe von ca. 212 nm. In Bezug auf ihre Größenverteilung konnte festgestellt werden, dass 10 % kleiner als ca. 127 nm, 50 % kleiner als ca. 189 nm und 90 % kleiner als 319 nm waren. Mit Blick auf die Größenverteilung der angereicherten EV innerhalb definierter Größenbereiche zeigte sich, dass ca. 56 % als kleine (< 200 nm) und ca. 44 % als mittelgroße (200–1000 nm) EV bezeichnet werden können. Es konnten keine großen (> 1 μ m) EV in dem Endpellet der Aszitesprobe detektiert werden.

Anschließend wurden die aus Aszites angereicherten EV mit Western Blot untersucht. Dazu wurden die Lysate der EV zusammen mit 2 μ g Protein des entsprechenden Asziteslysats (Kap. 3.4.1.2I[?]) im Western Blot auf ADAM17, HSP70 und CD63 untersucht (Abb. 4.2.2).

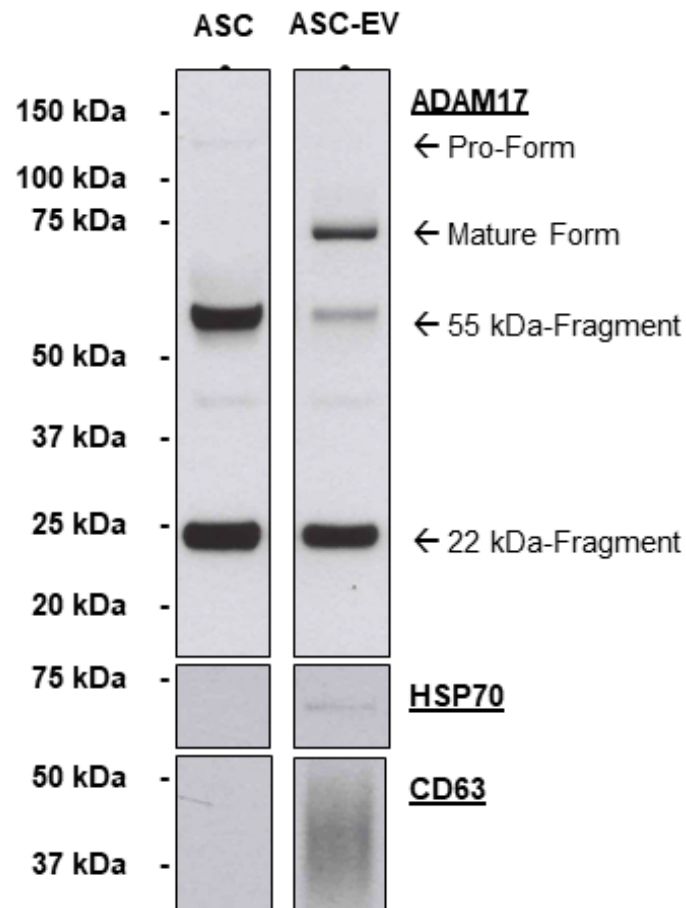


Abbildung 4.22: Western Blot zum Nachweis von ADAM17 und den EV-Markern CD63 und HSP70 in aus Aszites angereicherten und lysierten EV.

Als Kontrolle wurden 2 µg eines Zell-depletierten Asziteslysats (ASC) aufgetragen. Es handelt sich um ein einmalig durchgeführtes Experiment.

Im entwickelten Western Blot zeigte sich, dass die EV-Markerproteine CD63 und HSP70 in der aus Aszites gewonnenen EV-Probe, anders als in der Zell-depletierten Aszitesprobe, angereichert waren. Die Proform (120 kDa) der Metalloprotease ADAM17 war schwach im Zell-depletierten Aszites nachweisbar, wohingegen sie nicht in den Aszites-EV detektiert werden konnte. Umgekehrt verhielt es sich mit der aktiven, maturen Form von ADAM17 (75 kDa): diese war nicht im Zell-depletierten Aszites nachweisbar, konnte jedoch abundant im EV-Lysat detektiert werden. Sowohl im Zell-depletierten Aszites als auch in den Aszites-EV konnte das bereits in den Zellkulturexperimenten beschriebene 55-kDa-Fragment von ADAM17 nachgewiesen werden. Dabei zeigte das Fragment eine deutlich höhere Abundanz in der Zell-depletierten Aszitesprobe als in der EV-Probe. Ein weiteres ADAM17-Bruchstück, das bereits in den Zellkulturexperimenten nachgewiesen werden konnte, ist das 22-kDa-Fragment. Dieses Fragment zeigte – wie das 55-kDa-Fragment – eine hohe Expression im Zell-depletierten Aszites, war jedoch interessanterweise ebenfalls abundant in den Aszites-EV detektierbar.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass EV aus Aszites von Ovarialkarzinom-Patientinnen angereichert werden konnten. Diese Aszites-EV zeigten ein vergleichbares Größenprofil wie die EV, die unter Cisplatin- bzw. PMA-Stimulation in den Zellkulturexperimenten freigesetzt wurden. Des Weiteren konnte in den Aszites-EV die aktive, mature Form (75 kDa), ein 55-kDa-Fragment und ein 22-kDa-Fragment von ADAM17 nachgewiesen werden.

5 Diskussion

Das Ovarialkarzinom gehört zu den gynäkologischen Tumoren mit der höchsten Mortalität, weil ein später Diagnosezeitpunkt und die Entwicklung von Chemotherapieresistenzen die Prognose stark einschränken [1, 2, 26]. Aus diesem Grund ist es von besonderem Interesse, die Diagnose zu einem möglichst frühen Zeitpunkt stellen zu können und Mechanismen der Chemotherapie-Resistenzentwicklung aufzuklären und ihnen vorzubeugen. Entsprechend den aktuellen evidenz- und konsensbasierten S3-Leitlinien wird zur initialen Behandlung des Ovarialkarzinoms eine platinhaltige Chemotherapie empfohlen [16]. Unter einer solchen Erstlinientherapie entwickeln jedoch 60–85 % der Patientinnen ein Rezidiv [26].

Ein Protein, welches eine bedeutende Rolle bei der Entstehung von Chemotherapieresistenzen im Ovarialkarzinom einnehmen könnte, ist die Metalloprotease ADAM17, die verschiedenen onkogenen Signalwegen vorgeschaltet ist (Kap. 1.2.4, 1.2.5). Neuere Erkenntnisse legen nahe, dass auch extrazelluläre Vesikel, die durch eine platinhaltige Chemotherapie induziert wurden, die Resistenzentwicklung bzw. Rezidiventstehung von Ovarialkarzinomen beeinflussen könnten [154, 161, 162]. In Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte nachgewiesen werden, dass eine Cisplatin-Stimulation von Ovarialkarzinomzellen den Umsatz des ADAM17-Substrats Amphiregulin steigert, gleichzeitig aber die Oberflächenexpression von ADAM17 vermindert. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch nach einer Stimulation mit dem Phorbolester PMA erzielt [33]. Auch Groth et al. (2016) wiesen nach, dass eine PMA-Stimulation zu einem verminderten Nachweis von ADAM17 auf der Zelloberfläche von Lungenkarzinomzellen führt; interessanterweise konnte von dieser Arbeitsgruppe auch gezeigt werden, dass diese Umverteilung von ADAM17 auf extrazelluläre Vesikel erfolgt [123].

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, ob auch EV von Cisplatin- bzw. PMA-stimulierten Ovarialkarzinomzellen ADAM17 tragen. Um diese Fragestellung zu klären, war es zunächst von Interesse, von Ovarialkarzinomzellen sezernierte Partikel aus Zellkulturüberständen anzureichern, mit standardisierten Verfahren nachzuweisen und als EV zu charakterisieren.

5.1 Nachweis und Charakterisierung von durch Cisplatin- bzw.

PMA-induzierten extrazellulären Vesikeln aus Ovarialkarzinomzellen

Wie in Kapitel 1.3.4 beschrieben, wurden von der ISEV im Jahr 2018 überarbeitete Charakterisierungsstandards für EV veröffentlicht, die auf quantitativen, qualitativen und morphophysikalischen Beurteilungen der EV beruhen und somit eine verbesserte Vergleichbarkeit von Publikationen ermöglichen sollen [82]. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Charakterisierungsstandards angewendet, indem die nach Zentrifugation und Ultrazentrifugation erhaltenen Endpellets (Kap. 4.2,

4.3, Abb. 4.3) der PMA- und Cisplatin-Stimulationsgruppen mittels NTA (Abb. 4.4 bis 4.9), Western Blot (Abb. 4.10), TEM (Abb. 4.11) und Lipidomics (Abb. 4.12) methodisch untersucht wurden.

Die quantitative Beurteilung der in den Endpellets (Abb. 4.3) enthaltenen Partikel ergab, dass aus den Überständen der PMA-Stimulationsgruppe etwa doppelt so viele Partikel angereichert werden konnten wie aus den Überständen der Cisplatin-Stimulationsgruppe (Abb. 4.6 B und D). Diese Konzentrationsunterschiede könnten dadurch erklärt werden, dass die verwendete PMA-Lösung (2 nM) die Freisetzung von Partikeln aus den Zellen effektiver stimulierte als die verwendete Cisplatin-Lösung (7,5 μ M). Gegen eine höhere EV-Freisetzung unter PMA-Stimulation (2 nM) spricht allerdings, dass im Vorexperiment (Abb. 4.2) und in den EV-Aufnahme-Experimenten (Abb. 4.7) mehr Partikel in den Cisplatin- als in den PMA-Endpellets detektiert werden konnten. Eine zweite Möglichkeit, die die Partikel-Konzentrationsunterschiede in den Endpellets der verschiedenen Stimulationsgruppen erklären könnte, besteht darin, dass die verwendeten Lösungen (2 nM PMA bzw. 7,5 μ M Cisplatin) eine vergleichbare Stimulation der Partikelfreisetzung bewirken, Cisplatin aber im Gegensatz zu PMA den Zelltod der Donorzellen stärker induziert (Abb. 4.15 A und C), wodurch weniger Zellen während des Stimulationszeitraums für eine EV-Produktion zur Verfügung stehen könnten. Eine dritte Option wäre, dass die gewählte Cisplatin-Konzentration sogar effektiver die EV-Freisetzung stimuliert, diese Wirkung aber durch deren zytotoxisches Potenzial überlagert wird.

Bei einer Gegenüberstellung von Zellüberleben und EV-Freisetzung zeigte sich, dass Cisplatin den Zelltod konzentrationsabhängig fördert und eine Stimulation mit höheren Cisplatin-Konzentrationen eine gesteigerte EV-Freisetzung bewirkt (Abb. 4.15 C und D). Diese Beobachtung könnte dafür sprechen, dass Cisplatin die Freisetzung von EV aus den Zellen bis zu deren Zelltod stimuliert. Andererseits wäre es auch möglich, dass der gesteigerte EV-Nachweis eine Folge des Cisplatin-induzierten Zelltods ist, welcher zur Bildung einer großen Anzahl apoptotischer Körperchen führen könnte. Es scheint wahrscheinlich, dass in Abhängigkeit von der Cisplatin-Konzentration die beiden beschriebenen Effekte eintreten und im gleichen oder unterschiedlichen Maß die EV-Bildung (hierzu gehört auch die Bildung von apoptotischen Körperchen) induzieren.

Bei Betrachtung von Zellüberleben und EV-Freisetzung nach PMA-Stimulation (2 nM, Stimulationszeit 48 h; Abb. 4.15 A und B) konnte nachgewiesen werden, dass das Zellüberleben durch eine PMA-Stimulation nicht beeinflusst wird. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass PMA (2nM, Stimulationszeit 48 h) eine im Mittel etwa 1,4-fach erhöhte, jedoch nicht signifikante EV-Freisetzung im Vergleich zur Kontrolle (NaCl) induzierte (Abb. 4.15 B). Hieraus kann geschlossen werden, dass PMA keinen signifikanten Einfluss auf das Zellüberleben und nur einen geringen Einfluss auf die EV-Freisetzung nimmt. Weitere Ergebnisse dieser Arbeit legen jedoch nahe, dass der Einfluss einer PMA-Stimulation auf die EV-Freisetzung auch ausgeprägter sein könnte (Abb. 4.6).

Neben den beschriebenen EV-Konzentrationsunterschieden zeigte sich, dass die im Endpellet angereicherten EV von PMA-behandelten Zellen mit einem Durchmesser von durchschnittlich 169 nm deutlich kleiner waren als die entsprechenden Cisplatin-EV, die einen Durchmesser von durchschnittlich 186 nm aufwiesen (Abb. 4.7, 4.8). Da Cisplatin in Abhängigkeit vom Zelltod und PMA eine EV-Freisetzung unabhängig vom Zelltod stimuliert, könnten die durchschnittlichen Größenunterschiede auf ein vermehrtes Vorkommen von apoptotischen Körperchen in der Cisplatin-Stimulationsgruppe zurückgeführt werden. Derzeit existieren keine konsensbasierten Standards, um apoptotische Körperchen von anderen EV zu unterscheiden; dennoch werden sie in der Literatur mehrheitlich den mittelgroßen und großen EV (500–5000 nm) zugeordnet [82, 102, 186, 187]. Simpson et al. (2013) beschreiben allerdings auch apoptotische Körperchen, die im Größenbereich der kleinen EV liegen (> 50 nm) [188]. Da unter einer Cisplatin-Stimulation durchschnittlich größere EV freigesetzt werden, spricht dies mit hoher Wahrscheinlichkeit dafür, dass sich unter diesen auch apoptotische Körperchen befinden.

Ordnet man die EV anhand der von der ISEV (2018) vorgeschlagenen Größeneinteilung, so zeigt sich, dass Cisplatin-EV mit ca. 66 % den kleinen EV (< 200 nm) und mit ca. 34 % den mittelgroßen EV (200–1000 nm) zugeordnet werden konnten. Im Vergleich dazu wurden in den PMA-Endpellets mit 75 % mehr kleine EV und mit 25 % weniger mittelgroße EV detektiert. In beiden Endpellets (Abb. 4.3) konnten keine großen EV (> 1000 nm) nachgewiesen werden (Abb. 4.9). Der größere Anteil mittelgroßer EV konnte durch Cisplatin-Stimulation induziert werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Schlussfolgerung, dass ein Anteil der Vesikel im Cisplatin-Endpellet aus apoptotischen Körperchen bestehen könnte. Die Auswirkungen einer Cisplatin-Behandlung auf die EV-Freisetzung aus Ovarialkarzinomzellen wurden auch von Vera et al. (2019) untersucht. Sie zeigten, dass aus den Zellkulturüberständen Cisplatin-behandelter HeyA8-Ovarialkarzinomzellen etwa 80 % kleine EV (< 200 nm) im Endpellet angereichert wurden [189]. Diese Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit, da der größte Anteil der EV dem Spektrum der kleinen EV zugerechnet werden konnte. Vera et al. (2019) untersuchten jedoch eine andere Zelllinie, kultivierten diese in Sphroiden und stimulierten diese darüber hinaus mit einer geringeren Cisplatin-Konzentration (5 μ M) für 72 h. Die von Vera et al. (2019) verwendete geringere Cisplatin-Konzentration könnte in Kombination mit dem längeren Stimulationszeitraum dazu geführt haben, dass weniger Zellen in Apoptose gingen und somit weniger mittelgroße und große apoptotische Körperchen entstanden.

In der Western-Blot-Analyse der Endpellets (Abb. 4.3) der verschiedenen Stimulationsgruppen konnten sowohl die Tetraspanine CD9 und CD63 als auch HSP70 detektiert werden, wohingegen Calnexin nicht nachweisbar war (Abb. 4.10). Dies spricht zum einen dafür, dass die aus den Überständen von PMA- bzw. Cisplatin-stimulierten Igrov-1-Zellen gewonnenen Partikel die für EV-typischen Proteine tragen und nicht mit intrazellulären Bestandteilen (Calnexin ist ein im endoplasmatischen

Retikulum lokalisiertes Lektin-Chaperon [190]) verunreinigt wurden [82]. Aus der Abwesenheit von Calnexin kann darüber hinaus geschlossen werden, dass es sich bei den angereicherten Partikeln vornehmlich um kleine EV (< 200 nm) handelt [82]. Diese Beobachtung deckt sich mit der anhand der NTA ermittelten Größenverteilung der Partikel (Abb. 4.9).

Eine Herausforderung bei Durchführung der Western Blots bestand darin, dass die durch differentielle Zentrifugation und Ultrazentrifugation angereicherten Endpellets (Abb. 4.3) nicht genügend Protein enthielten, um dieses mithilfe von Standard-Proteinassays (Kap. 3.4.2) zu messen. Aus diesem Grund wurde entschieden, die jeweiligen Endpellets vor deren weiterer Analyse in gleichen Volumina PBS zu lösen, um eine Vergleichbarkeit der verschiedenen EV-Proben herstellen zu können. Es ist zu klären, warum andere Forschungsgruppen höhere Proteinmengen in vergleichbaren Zellkulturexperimenten und Anreicherungsverfahren in den Endpellets nachweisen konnten [154, 189]. Eine Möglichkeit könnte darin bestehen, dass der verwendete Lysepuffer (Kap. 2.2.1) von EV getragene Proteine weniger effizient löst. Subedi et al. (2019) empfehlen nach einer vergleichenden Analyse von sechs verschiedenen Lysepuffern die Verwendung eines *Radioimmunoprecipitation-Assay-Puffers* (RIPA-Puffer), um die Anzahl detektierbarer EV-assoziiierter Proteine zu maximieren [191]. Der RIPA-Puffer enthält als ionische Detergenzien SDS und Natriumdesoxycholat und als nicht-ionisches Detergens NP40, während der in dieser Arbeit verwendete Lysepuffer mit Triton X-100 und NP40 ausschließlich nicht-ionische und nicht-denaturierende Detergenzien enthält, was zu einer verminderten Lösung von EV-assoziierten Proteinen führen könnte [191].

Die morphologische Detailbeurteilung der in den verschiedenen Endpellets angereicherten EV erfolgte mit TEM (Abb. 4.11). Hierbei konnten Strukturen mit einer zentralen Aufhellung detektiert werden, die von einer Doppelmembran umgeben waren und somit eine EV-typische Morphologie (*Cup shape*) aufwiesen [125, 154, 156, 169, 192]. Neben den Vesikeln konnten Aufhellungen ohne Doppelmembran in einem Größenbereich von 5 bis 20 nm mittels TEM detektiert werden, die sich zum Teil auch an die Membran der identifizierten Vesikel anlagerten. Karimi et al. (2018) beschreiben vergleichbare Strukturen, die bei der Isolierung von EV aus humanem Blutserum und -plasma durch *Size-Exclusion Chromatography* (SEC) detektiert wurden. Diese wurden von Karimi et al. (2018) als Plasma- und Lipoproteine gedeutet [193]. Eine Möglichkeit, wie Plasma- und Lipoproteine zusammen mit den EV der verschiedenen Stimulationsgruppen in den Endpellets angereichert werden könnten, besteht darin, dass diese durch die Ovarialkarzinomzellen selbst produziert und sezerniert werden. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Plasma- und Lipoproteine dem bovinen Serumanteil des EV-depletierten Zellkulturmediums entstammen.

Nach Bewertung der Ergebnisse der NTA-, der Western-Blot- und der TEM-Untersuchungen gemäß den von der ISEV (2018) vorgeschlagenen Kriterien können die in den Endpellets (PMA und Cisplatin) angereicherten Partikel eindeutig als EV charakterisiert werden.

Die ISEV hat im Jahr 2018 neben diesen etablierten EV-Charakterisierungskriterien weitere Methoden zum Nachweis von EV vorgeschlagen. Hierzu gehört auch die Charakterisierung des Lipidprofils [82]. In der vorliegenden Arbeit wurde das Lipidprofil Cisplatin-induzierter EV mit Lipidomics analysiert. Hierbei zeigte sich, dass die Lipidprofile von EV und Donorzellen nicht übereinstimmen und auch die Lipidprofile der unter verschiedenen Cisplatin-Konzentrationen (0–7,5 μM) freigesetzten EV deutliche Unterschiede aufweisen (Abb. 4.12). Bei einem Vergleich der Lipidprofile von Donorzellen und EV (0–7,5 μM Cisplatin) zeigt sich, dass einige Phosphatidylcholine (PC) und Ether-verknüpfte Phosphatidylcholine (PC-O) vermehrt in den Donorzellen vorkommen, wohingegen sich Cholesterol und einige Sphingomyeline (SM) in den EV anreicherten. Diese Ergebnisse stimmen mit den von Skotland et al. (2020) publizierten Review-Daten überein. Dieses Review beinhaltet die Lipidprofile von konstitutiv sezernierten EV von neun verschiedenen Zelllinien (PC-3, Oli-neu, HepG2/C3a, B-Lymphozyten, Mastzellen, dendritische Zellen, Retikulozyten, Thrombozyten und Adipozyten). Gezeigt wurde, dass in EV im Vergleich zu ihren Donorzellen ebenfalls Cholesterol und SM und darüber hinaus Glykosphingomyeline (GSM) und Phosphatidylserin (PS) angereichert werden, wohingegen PC sowie zusätzlich Phosphatidylinositole (PI) vermehrt in den Donorzellen nachgewiesen werden konnten [127]. Abweichend von den durch Skotland et al. (2020) veröffentlichten Daten, die eine vergleichbare Abundanz von Phosphatidylethanolaminen (PE) in EV und Donorzellen beschrieben, konnte in dieser Arbeit PE im vergleichbaren Maß nur in Donorzellen und in mit 7,5 μM Cisplatin-induzierten EV detektiert werden. Vergleicht man die Lipidprofile der EV, die unter verschiedenen Cisplatin-Konzentrationen (0–7,5 μM) freigesetzt wurden, so könnte über eine Lipidanalyse eventuell sogar auf den Anteil an apoptotischen Körperchen geschlossen werden. Diese Annahme beruht darauf, dass die Kontroll-EV (NaCl) keinen oder nur einen geringen Anteil an apoptotischen Körperchen enthalten und dass dieser Anteil bei den unter 7,5 μM Cisplatin-Stimulation freigesetzten EV vermutlich deutlich erhöht ist, da Cisplatin konzentrationsabhängig den Zelltod induziert (Abb. 4.15 C). Wie in Abbildung 4.12 gezeigt, könnten PE (Cluster 2) und Lysophosphatidylethanolamine (LPE) (Cluster 6) als positive Marker und PC (Cluster 3) und einige SM (Cluster 5) als negative Marker für apoptotische Körperchen fungieren.

5.2 Dokumentation der EV-Anreicherung und Evaluation des methodenbedingten EV-Verlustes

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die EV-Anreicherung des von Théry et al. (2006) publizierten und entsprechend den Ergebnissen von Ashiru et al. (2010) und Chitadze et al. (2013) angepassten Protokolls (Kap. 3.3.1) zu dokumentieren und den methodenbedingten EV-Verlust zu evaluieren. Hierzu wurden die in Abbildung 4.3 dargestellten Überstände und Pellets auf ihre Partikelkonzentration (Abb. 4.6), -größe (Abb. 4.7 bis 4.9) und -dispersität (Abb. 4.4, 4.5) untersucht. Der EV-Verlust in den Zwischenpellets (Abb. 4.3) wurde zusätzlich mit Western Blot (Abb. 4.10) untersucht.

Es zeigte sich, dass die Partikelkonzentrationen in den Überständen Cisplatin- und PMA-behandelter Zellen zu Beginn der Prozessierung zunächst zunahmen und beginnend mit dem ersten 100.000 x g Ultrazentrifugationsschritt deutlich abnahmen (Abb. 4.6 A und C). Dahingegen nahmen die durchschnittlichen Partikelkonzentrationen in den Zwischenpellets während der Prozessierung kontinuierlich zu und erreichten ein Maximum im Endpellet P5 (Abb. 4.6 B und D). Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu der Annahme, dass die Anzahl der Partikel in den Überständen der verschiedenen Stimulationsgruppen zu Protokollbeginn am höchsten ist und durch Anreicherung von Partikeln in den Pellets kontinuierlich abnimmt. Diese Ergebnisse könnten darauf zurückgeführt werden, dass das in den Zellkulturexperimenten verwendete RPMI-Medium bei gleichem *Detection Threshold* (Kennzahl für die Messsensitivität der NTA) mehr Hintergrundsignale erzeugt als PBS. Da die Überstände während der Prozessierung jedoch zunehmend mit PBS verdünnt wurden, musste der *Detection Threshold* für die Messungen jeweils angepasst werden. Gross et al. (2016) konnten zeigen, dass die bei der Messung von NTA-Proben einstellbaren Parameter *Camera Level* und *Detection Threshold* maßgeblichen Einfluss auf die detektierbare Partikelkonzentration haben [194]. Da in dieser Arbeit bei den ersten, sehr Medium-reichen Überständen ein geringerer *Detection Threshold* gewählt werden musste, wurde dadurch die Menge detektierbarer Partikel herabgesetzt, was wiederum die Messung niedrigerer Partikelkonzentrationen in den Medium-reichen Überständen erklären könnte.

Die in den verschiedenen Überständen und Pellets enthaltenen Partikel (Abb. 4.3) wurden in Bezug auf ihre durchschnittliche Größe und Größenverteilung charakterisiert (Abb. 4.7, 4.8). Hierbei zeigte sich, dass in den verschiedenen Überständen im Laufe der Prozessierung sowohl in der PMA- als auch der Cisplatin-Stimulationsgruppe zunehmend kleinere Partikel nachgewiesen wurden (Abb. 4.9 A und C). Diese Beobachtung bestätigt, dass durch das verwendete Protokoll (Abb. 4.3) größere Partikel pelletiert werden und somit zunehmend kleinere Partikel in den Überständen verbleiben, die jedoch auch Fragmente größerer Partikel darstellen könnten. Eine Ausnahme bilden die Partikel aus den 2000 x g Pellets, welche kleiner waren als die in den 10.000 x g Pellets. Eine Begründung hierfür könnte sein, dass das 2000 x g Pellet aufgrund seines hohen RPMI-Medium-Anteils bei der NTA-Messung

zahlreiche Hintergrundsignale erzeugte, die von der NTA-Software als kleinere Partikel erfasst wurden. Eine Möglichkeit, dieses Problem zu umgehen, könnte darin bestehen, die in den verschiedenen Überständen und Pellets enthaltenen Partikel im gleichen Trägermittel zu lösen. Als Trägermittel kommt vor allem PBS (filtriert 0,1 μm) in Betracht, da es gemäß Erfahrungswerten unserer Arbeitsgruppe die Detektion von in ihm gelösten Partikeln optimal ermöglicht.

In den Abbildungen 4.4 und 4.5 wird gezeigt, dass die in den Überständen und den Endpellets enthaltenen Partikel der beiden Stimulationsgruppen weitgehend monodispers und die in den korrespondierenden Zwischenpellets angereicherten Partikel polydispers verteilt waren. Zusammenfassend unterstreichen die dargestellten Ergebnisse trotz der genannten methodenbedingten Messungenauigkeiten, dass das angewendete Protokoll geeignet ist, Partikel aus den genannten Überständen zu sedimentieren und in korrespondierenden Pellets anzureichern. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass durch das verwendete Protokoll kleinere Partikel während der Anreicherung selektiert werden und die Anreicherung von in Bezug auf ihre Größe homogenen Partikeln im Endpellet ermöglicht.

Ein entscheidendes Kriterium für die Protokollqualität ist die Beurteilung des methodenbedingten EV-Verlustes während der Anreicherung. Wie in Abbildung 4.3 dargestellt, könnten während der Protokolldurchführung EV verloren gehen, indem sie mit den Zwischenpellets verworfen oder nicht in ausreichendem Maß aus den Überständen sedimentiert werden. Daher wurden die in den Zwischenpellets beider Stimulationsgruppen (PMA und Cisplatin) angereicherten Partikel mittels Western Blot auf das Vorhandensein der positiven EV-Marker CD9, CD63 und HSP70 sowie des negativen EV-Markers Calnexin untersucht (Abb. 4.10). Diese Untersuchung ergab keinen Hinweis auf das Vorhandensein von EV in den Zwischenpellets, sodass ein relevanter EV-Verlust über die Zwischenpellets ausgeschlossen werden kann. Die Untersuchung der für einen möglichen EV-Verlust relevanten Überstände S4 und S5 (Abb. 4.3) mittels NTA ergab, dass sich in ihnen noch große Mengen kleiner Partikel nachweisen ließen, die nicht sedimentiert werden konnten (Abb. 4.4 bis 4.9). Dieser Partikelverlust wird insbesondere bei der Prozessierung der Zellkulturüberstände aus der Cisplatin-Stimulationsgruppe deutlich, bei welcher durchschnittlich etwa zehnmal mehr Partikel im Überstand S4 verblieben, als im Endpellet angereichert werden konnten (Abb. 4.6 C und D). Da die im Überstand S4 verbliebenen Partikel nicht sedimentiert werden konnten, war ein eindeutiger EV-Nachweis nicht möglich. Die Schwierigkeit, kleine Partikel mithilfe von differentieller Zentrifugation und Ultrazentrifugation anzureichern, ist bereits beschrieben worden [195].

5.3 Lagerungsfähigkeit von PMA- und Cisplatin-EV

Da das durch Théry et al. (2006) publizierte und entsprechend den Ergebnissen von Ashiru et al. (2010) und Chitadze et al. (2013) angepasste Protokoll (Kap. 3.3.1) zur Anreicherung von EV eine durchschnittliche Durchführungsdauer von etwa 6 h hat, war es von Interesse, die Lagerungsfähigkeit angereicherter EV zu testen. Die ISEV empfiehlt die Lagerung von EV bei -80 °C [180]. In verschiedenen Publikationen wurde zusätzlich der Einfluss von Trägermitteln auf die EV-Lagerungsfähigkeit untersucht [181, 182, 196, 197]. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Zucker, insbesondere Trehalose, die Kryostabilität und Funktionalität von EV positiv beeinflussen kann [182, 197]. Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen jedoch darauf hin, dass PMA- bzw. Cisplatin-EV, unabhängig von den verwendeten Trägermitteln, nach der Kryokonservierung keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu nicht-eingefrorenen EV zeigen (Abb. 4.13). Auch die Morphologie der EV beider Stimulationsgruppen war nach Kryokonservierung in den verschiedenen Trägermitteln vergleichbar (Abb. 4.11, 4.14). Somit konnte nicht nachgewiesen werden, dass Trehalose-Lösung im Vergleich zu PBS einen Vorteil bei der Kryokonservierung von EV bietet.

5.4 Durch PMA- und Cisplatin-Stimulation freigesetzte extrazelluläre Vesikel enthalten ADAM17

Die biologische Funktion von EV wird maßgeblich durch die von ihnen transportierten bzw. auf ihrer Oberfläche getragenen Moleküle bestimmt (Kap. 1.3.5). Zu diesen gehören Proteine, Lipide und Nukleotid-Stränge [85]. Die Metalloprotease ADAM17 ist ein in zahlreichen Tumoren vermehrt exprimiertes Protein, das mehr als 80 zum Teil potenziell tumorfördernde Substrate mittels *Ectodomain-Shedding* prozessieren kann und somit wichtigen Signaltransduktionsprozessen wie dem EGFR-, TNF- α - und IL-6-trans-Signalweg vorgeschaltet ist (Kap. 1.2.4, 1.2.5). Durch Aktivierung dieser Signalwege könnte ADAM17 u. a. zu einem vermehrten Tumorwachstum, einer gesteigerten Tumorzellmigration und speziell zu einer für die Therapie des Ovarialkarzinoms relevanten Chemotherapie-Resistenzbildung beitragen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ADAM17 (Proform, mature Form, Fragmente) mittels Western Blot in den Cisplatin- (0–10 μ M) und PMA- (2 h und 48 h Stimulationszeitraum) EV sowie der Medium-Kontrolle nachgewiesen werden (Abb. 4.16 und Abb. 4.17). Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den Ergebnissen verschiedener Publikationen, die zeigen, dass EV unterschiedlicher humaner Zelllinien ADAM17 tragen [118, 119, 123]. Mit der verwendeten Western-Blot-Analyse konnte jedoch kein Nachweis erbracht werden, ob ADAM17 auf der EV-Oberfläche vorliegt und dort eine Orientierung aufweist, die die katalytische Aktivität der Metalloprotease ermöglicht. Die Klärung dieser Frage ist Gegenstand aktueller Forschungen der Arbeitsgruppe Hedemann, Kiel.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die funktionelle Aktivität von ADAM17. Diese kann formal in eine rein katalytische und eine *Shedding*-Aktivität unterteilt werden. Hiermit ist gemeint, dass ADAM17 zum einen „unspezifisch“ kleine Peptide schneiden und zum anderen im Rahmen von zellulär reguliertem *Shedding* gezielt die Ektodomänen von Substraten durch proteolytische Spaltung freisetzen kann [45]. Verschiedene Kontrollmechanismen, durch die die *Shedding*-Aktivität von ADAM17 reguliert werden kann, sind in Kapitel 1.2.3 ausgeführt. Neben diesen regulatorischen Einflüssen kann die Metalloprotease ADAM17 selbst in einer funktionell inaktiven Proform und einer funktionell aktiven, maturen Form vorliegen [47]. Die Proform unterscheidet sich von der maturen Form durch eine das katalytische Zentrum der Metalloproteasedomäne inhibierende Prodomäne [46]. Von Black et al. konnte bereits im Jahr 1997 gezeigt werden, dass die Proform von ADAM17 aus insgesamt 824 Aminosäuren besteht [61]. Unter Kenntnis dieser Primärstruktur von ADAM17 lassen sich die theoretischen Molekulargewichte des Gesamtproteins sowie der verschiedenen Domänen und Regionen näherungsweise berechnen (Kap. 9.5). In Abbildung 5.1 ist die Domänenstruktur von ADAM17 mit den korrespondierenden Molekulargewichten dargestellt. Etwaige Abweichungen der Proteinmasse durch Glykolysierungen etc. wurden dabei nicht berücksichtigt. Das gezeigte Schema beruht auf den Untersuchungen von Black et al. (1997); die Einteilung in Domänen und Regionen wurde gemäß einer Veröffentlichung von Grötzinger et al. (2017) vorgenommen [45, 61].

	PD	MD	DLD	MPD	CR	TM	ZD
Domänenstruktur							
Masse in kDa	24,8	28,8	8,3	7	3	2,6	14,5

Abbildung 5.1: Domänenstruktur von ADAM17.

ADAM17 kann von ihrem N-terminalen Ende in eine Prodomäne (PD), eine Metalloproteasedomäne (MD), eine Disintegrin-like-Domäne (DLD), eine membranproximale Domäne (MPD), eine CANDIS-Region (CR), eine Transmembranregion (TM) und eine zytoplasmatische Domäne eingeteilt werden. Die auf Grundlage der Primärstruktur berechneten theoretischen Molekulargewichte der einzelnen Regionen sind angegeben. Der Einfluss posttranslationaler Modifikationen wurde dabei nicht berücksichtigt. Basierend auf Black et al. (1997), Domänenstruktur nach Grötzinger et al. (2017). Berechnung der Molekulargewichte siehe Anhang (Kap. 9.5).

Betrachtet man das Molekulargewicht der 824 Aminosäuren, so ergibt sich eine theoretische Gesamtmasse von ca. 93 kDa (siehe Anhang Kap. 9.5). In Western-Blot-Analysen von humanen Zellen migriert die Proform von ADAM17 jedoch meist zwischen 100 und 130 kDa [47, 55, 71, 73, 123]. Diese Abweichung ist auf posttranslationale Modifikationen, insbesondere Glykolysierungen zurückzuführen [46, 47]. Die Proform kann in Western-Blot-Analysen von der maturen Form (70–100 kDa) unterschieden werden [47, 55, 71, 73, 123].

In einem ersten Experiment wurde untersucht, ob Cisplatin die Bildung von ADAM17 stimuliert, was Voraussetzung für dessen theoretische EV-assoziierte Freisetzung wäre. In Abbildung 4.1 wird gezeigt,

dass die Abundanz von ADAM17 in den Zelllysaten Cisplatin-behandelter Zellen (0–10 μM) positiv mit steigender Cisplatin-Konzentration korreliert. Hierbei konnten bei etwa 120 kDa und 75 kDa liegende Banden detektiert werden, die in Einklang mit den zuvor genannten Publikationen als Proform und mature Form von ADAM17 beschrieben werden können [47, 55, 71, 73, 123]. Die Abundanz der maturen Form der Metalloprotease lag, unabhängig von der Cisplatin-Konzentration, deutlich über der der Proform. Dies könnte darauf zurückgeführt werden, dass ADAM17 unter Cisplatin-Stimulation stärker exprimiert und die Proform unmittelbar nach ihrer Synthese in die mature Form überführt wird. Durch ein vermehrtes Vorliegen der maturen Form von ADAM17 könnten auch mehr Substrate durch *Ectodomain-Shedding* freigesetzt werden, die die Proliferation und Differenzierung von Zellen anregen, Inflammations- sowie Regenerationsprozesse induzieren und dadurch die Gewebshomöostase fördern könnten (Kap. 1.2.4). Auf diesem Weg könnte ADAM17 ihr potenziell tumorförderndes Potenzial entfalten und zusätzlich eine Chemotherapie-Resistenzentwicklung begünstigen (Kap. 1.2.5). Diese Hypothese wird auch durch die Untersuchungen von Hedemann et al. (2021) gestützt, die nachweisen konnten, dass mit dem ADAM17-Inhibitor GW280264X behandelte Ovarialkarzinomzellen für eine Cisplatin-Behandlung sensitiviert wurden [198].

Auch in den aus den Überständen von PMA- bzw. Cisplatin-angereicherten EV konnten die beiden Formen von ADAM17 nachgewiesen werden (Abb. 4.16, 4.17). Es zeigte sich, dass die Proform von ADAM17 vornehmlich in EV, die aus den Überständen mit hohen Konzentrationen Cisplatin-behandelter Zellen (7,5 μM , 10 μM) angereichert wurden, nachweisbar war und nicht in den Kontrollen (NaCl, Medium, PMA, EtOH) detektiert werden konnte. Diese Beobachtung deckt sich mit den Untersuchungen von Groth et al. (2016), die die Proform von ADAM17 in PMA-induzierten EV von Lungenkarzinomzellen nicht nachweisen konnten [123]. Der Nachweis der Proform in den EV, die unter hohen Cisplatin-Konzentrationen (7,5 μM , 10 μM) freigesetzt wurden, steht in Einklang mit den Western-Blot-Analysen der Cisplatin-behandelten Donorzellen (Abb. 4.1), in denen ebenfalls die höchste Abundanz der Proform nach Stimulation mit hohen Cisplatin-Konzentrationen (7,5 μM , 10 μM) nachweisbar war. Es ist jedoch anzumerken, dass die im Western Blot analysierten EV-Proben nicht hinsichtlich der Proteinmenge standardisiert werden konnten (Kap. 3.4.1.3). Aus diesem Grund wurden, wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben, gleiche Mengen des Endpellets mittels Western Blot untersucht. Die Ergebnisse legen nahe, dass die zelluläre Synthese und die Freisetzung der Proform von ADAM17 positiv mit den verwendeten Cisplatin-Konzentrationen korreliert. Da die Abundanz der Proform von ADAM17 zusätzlich mit der Anzahl der freigesetzten EV in Wechselwirkung steht (Abb. 4.15 D), erscheint es wahrscheinlich, dass sie zumindest teilweise in EV enthalten ist. Auf diesem Weg könnte sie als eine Reserve für die Bildung der maturen Form von ADAM17 in Akzeptorzellen fungieren. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass die Proform von ADAM17 mehrheitlich ohne

EV-Assoziation vorliegt, beispielsweise an die mittels TEM detektierten Proteine gebunden, die keine Adhärenz mit den EV zeigten (Abb. 4.11, 4.14, 9.5, 9.6).

Mit Blick auf die Abundanz der maturen Form von ADAM17 in den verschiedenen EV-Anreicherungen der Cisplatin-Stimulationsgruppe zeigt sich, dass diese nach einer Stimulation mit 1 μM bis 2,5 μM Cisplatin am höchsten war und unter höheren Stimulationskonzentrationen in vermindertem Maß nachweisbar war (Abb. 4.17). Hieraus kann geschlossen werden, dass die Abundanz der maturen Form von ADAM17, anders als in den entsprechenden Zelllysaten, keine positive Korrelation mit der verwendeten Cisplatin-Konzentration oder der EV-Freisetzung zeigt (Abb. 4.1, Abb. 4.15 D, Abb. 4.17). In Anlehnung an die Untersuchungen von Groth et al. (2016) könnte somit gefolgert werden, dass die mature Form von ADAM17 mittels EV aus den Zellen ausgeschleust wird, wobei die in dieser Arbeit ermittelten Daten dafür sprechen, dass eine solche Freisetzung bei höheren Cisplatin-Konzentrationen in vermindertem Maß stattfindet [123]. Unter Berücksichtigung der Mengen freigesetzter EV (Abb. 4.15 D) zeigen die ermittelten Daten, dass das Verhältnis der Anzahl von EV zu der Abundanz der maturen Form in den Proben am größten ist, die nach Stimulation mit geringen Cisplatin-Konzentrationen angereichert wurden. In Anbetracht des Zellüberlebens unter Einwirkung von Cisplatin (Abb. 4.15 C) kann gefolgert werden, dass unter Cisplatin-Konzentrationen, die das Zellüberleben nur in geringem Maß einschränken, die größten Konzentrationen der maturen Form von ADAM17 detektiert werden konnten. In Bezug auf die in dieser Arbeit verwendete Zelllinie Igrov-1 sowie andere Ovarialkarzinom-Zelllinien konnte gezeigt werden, dass sie durch langsam steigende Chemotherapiekonzentrationen zunehmend resistent wurden [199, 200]. Die Ergebnisse könnten darüber hinaus eine Möglichkeit bieten, um über die Messung von EV-assoziiierter ADAM17 indirekt auf die realen Chemotherapiekonzentrationen im Tumorgewebe zu schließen. Durch ein solches Monitoring könnte eine optimale, individuelle Chemotherapiedosis während der Therapie des Ovarialkarzinoms appliziert werden.

Eine weitere Möglichkeit, die die erhöhte Abundanz der maturen Form von ADAM17 in den nach Stimulation mit geringen Konzentrationen Cisplatin (1 μM , 2,5 μM) angereicherten EV-Proben erklären könnte, ist, dass ADAM17 in EV-Proben, die aus den Überständen von mit hohen Konzentrationen Cisplatin (5–10 μM) stimulierten Zellen angereichert wurden, vermehrt proteolytisch fragmentiert wird. Hierfür spricht das Vorliegen eines etwa 18 kDa schweren Fragments, das vom verwendeten ADAM17-Antikörper erkannt wurde und positiv mit den verwendeten Cisplatin-Konzentrationen und der Anzahl freigesetzter EV korreliert (Abb. 4.15 D und 4.17). Auf dieses etwa 18 kDa und ein weiteres etwa 55 kDa ADAM17-Fragment wird im nächsten Abschnitt dieses Kapitels eingegangen. Es ist anzumerken, dass die in den Endpellets (Abb. 4.3) enthaltenen EV direkt nach ihrer Anreicherung mit einem Protease-Inhibitor-enthaltenden Puffer lysiert wurden; dies könnte dafür sprechen, dass möglicherweise ein proteolytischer Abbau von ADAM17 bereits während des 48-stündigen Stimula-

tionszeitraums bzw. während der EV-Anreicherung eintrat [43, 47, 123]. Dabei bleibt jedoch fraglich, warum die mature Form von ADAM17 in den Überständen von mit niedrigen Cisplatin-Konzentrationen stimulierten Zellen (1 μM , 2,5 μM) in geringerem Maß proteolytisch abgebaut wird als in den Überständen von mit höheren Cisplatin-Konzentrationen stimulierten Zellen (5 μM –10 μM). Eine solche verminderte Fragmentierung von maturer ADAM17 könnte eine verlängerte *Shedding*-Aktivität der Metalloprotease bewirken und auf diesem Weg potenziell in gesteigertem Maß tumorfördernd wirken.

Im Folgenden wird auf die in den Abbildungen 4.16 und 4.17 nachgewiesenen etwa 55 kDa (etwa 60 kDa im Zelllysats) und 18 kDa (etwa 22 kDa im Zelllysats) schweren Proteine eingegangen, die im Western Blot mithilfe des für die zytoplasmatische Domäne von ADAM17 spezifischen Antikörpers (ab39162, siehe Kap. 2.2.5) detektiert wurden. In verschiedenen Publikationen wurden bereits ADAM17-Fragmente mit vergleichbaren Proteinmassen nachgewiesen (kleines Fragment [43], großes Fragment [47, 123]). Aus diesem Grund wurden diese neben der Proform und maturen Form von ADAM17 detektierten Proteine als ADAM17-Fragmente bezeichnet. Berücksichtigt man, dass der verwendete Antikörper die zytoplasmatische Domäne von ADAM17 spezifisch bindet und dass die zytoplasmatische Domäne am C-terminalen Ende der Metalloprotease liegt, kann unter Kenntnis der aus der Primärstruktur abgeleiteten Molekulargewichte der verschiedenen Domänen und Regionen von ADAM17 (Abb. 5.1) in etwa auf den Ursprung der Fragmente geschlossen werden. Dementsprechend könnte das etwa 55 kDa bzw. 60 kDa schwere Fragment aus der zytoplasmatischen Domäne, der Transmembran-Domäne, der CANDIS-Region, der membranproximalen Domäne, der Disintegrin-like Domäne und Anteilen der Metalloproteasedomäne bestehen. Das etwa 18 kDa bzw. 22 kDa schwere Fragment könnte aus der zytoplasmatischen Domäne, der Transmembran-Domäne und einem Anteil der CANDIS-Region bzw. der Metalloproteasedomäne bestehen.

Die beiden Fragmente wiesen in den verschiedenen Proben eine unterschiedliche Abundanz auf (Abb. 4.16 und 4.17). So konnte gezeigt werden, dass die PMA-EV-Proben (Stimulationszeitraum 48 h) eine hohe Abundanz des 55-kDa-Fragments (ausgeprägt in zwei von drei Blots nachweisbar) aufwiesen. In den Cisplatin-EV-Proben konnte hingegen insbesondere das 18-kDa-Fragment in ausgeprägtem Maß detektiert werden. Auffällig war, dass die Abundanz des 18-kDa-Fragments in den EV-Proben der Cisplatin-Stimulationsgruppe positiv mit der verwendeten Cisplatin-Konzentration korrelierte. In verschiedenen Publikationen konnte gezeigt werden, dass ADAM17 proteolytisch abgebaut wird, wobei es auch Anhaltspunkte dafür gibt, dass mature ADAM17 sich auch selbst proteolytisch spalten kann. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Prozess durch die Zugabe von Metalloprotease-Inhibitoren (z. B. BB-94, TAPI-1) zum Lysepuffer vermindert werden kann [43, 47, 123].

In einer Publikation von Scharfenberg et al. (2020) wurde eine besondere Form der proteolytischen Spaltung von ADAM17 beschrieben [43]. Sie konnten zeigen, dass die *Sheddase* ADAM17 selbst durch ADAM8 vermitteltes *Ectodomain-Shedding* als funktionell aktives sADAM17 (lösliche Ektodomäne von ADAM17) freigesetzt werden kann. Interessanterweise konnte in den Lysaten von Zellen mit einem deutlichen sADAM17-Nachweis in den Überständen auch eine vermehrte Abundanz eines kleinen C-terminalen ADAM17-Fragments (< 25 kDa) nachgewiesen werden. Bei diesem Fragment könnte es sich um ein mit dem in dieser Arbeit detektierten 18 kDa (22 kDa in den Zelllysaten) vergleichbares Fragment handeln. In der Veröffentlichung von Scharfenberg et al. (2020) wird beschrieben, dass es sich bei diesem Fragment um den korrespondierenden, nach der Freisetzung von sADAM17 auf der Zellmembran verbleibenden Teil von ADAM17 handelt. Daraus könnte geschlossen werden, dass EV, welche unter höheren Konzentrationen Cisplatin entstehen, größere Mengen an sADAM17 freisetzen. Zu dieser Annahme passt auch die Beobachtung, dass die Proform und das 18-kDa-Fragment eine mit den verwendeten Cisplatin-Konzentrationen korrelierende Abundanz zeigten und dass die mature Form von ADAM17 in den EV-Proben, die unter höheren Cisplatin-Konzentrationen entstanden, nur in geringem Maß nachweisbar war (Abb. 4.17). Es ist anzumerken, dass der in dieser Arbeit verwendete ADAM17-Antikörper spezifisch den zytoplasmatischen Teil der Metalloprotease bindet und aus diesem Grund nicht für den Nachweis von sADAM17 geeignet ist. Eine Freisetzung von sADAM17 durch EV könnte im Tumorgewebe bzw. auch in der Etablierung metastatischer Nischen über die Prozessierung von Substraten wie z. B. AREG tumorfördernd wirken.

5.5 Durch Cisplatin-Stimulation freigesetzte extrazelluläre Vesikel werden von Ovarialkarzinomzellen aufgenommen

Extrazelluläre Vesikel können nach ihrer Freisetzung auf verschiedene Art und Weise ihr funktionelles Potenzial entfalten [103, 136, 156]. Insbesondere die Interaktionen zwischen EV und Zellen wurden in den letzten Jahrzehnten untersucht. Wie in Kapitel 1.3.2 beschrieben, können EV auf unterschiedliche Weise Einfluss auf Zellen nehmen. So können sie bereits mit auf ihrer Oberfläche getragenen Molekülen Rezeptoren der Zelloberfläche binden und aktivieren, auch ohne von diesen aufgenommen zu werden [103–106, 121]. Eine weitere Möglichkeit, wie EV die interzelluläre Kommunikation und Funktionalität von Zellen beeinflussen können, ist durch deren Aufnahme in Akzeptorzellen gegeben. Mathieu et al. (2019) beschreiben drei Phasen dieser Aufnahme, die in Abbildung 5.2 dargestellt sind [106].

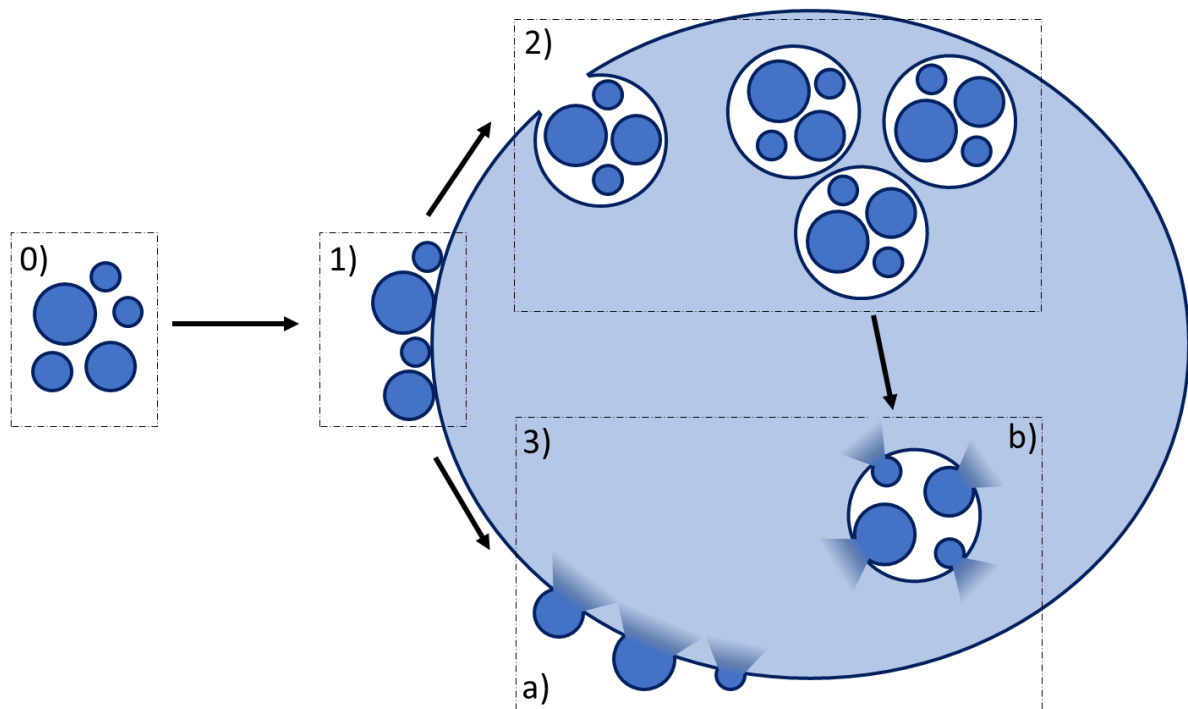


Abbildung 5.2: Aufnahme von EV in Akzeptorzellen nach Mathieu et al. (2019).

0) Freigesetzte EV; 1) die spezifische/unspezifische Interaktion von EV mit der Zelloberfläche; 2) Einschleusen von Vesikeln durch die Zellmembran, ggf. in Endosomen; 3) Freisetzung des EV-Inhalts in die Akzeptorzelle: 3a) direkte Fusion von EV-Membran und Zellmembran (durch direkte Membranfusion wird der Schritt 2 übersprungen); 3b) Freisetzung des EV-Inhalts aus den zuvor entstandenen Endosomen. Abbildung abgewandelt nach Mathieu et al. (2019) [106].

Entsprechend diesem Modell kommt es zu einer Interaktion zwischen EV- und Zelloberfläche. Anschließend fusionieren die EV direkt mit der Zellmembran und setzen ihren Inhalt in das Zytoplasma der Akzeptorzelle frei oder werden als intakte Vesikel endozytiert. Es gibt Hinweise, dass eine solche Aufnahme durch Mikro- und Makropinozytose oder auch Clathrin-abhängige und -unabhängige Endozytose vermittelt werden kann [106, 107, 201]. Die EV können daraufhin von Endosomen umschlossen im Zytoplasma vorliegen. Nachfolgend kann der EV-Inhalt in das Zytoplasma freigesetzt werden [106, 202, 203].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Aufnahme von unter PMA- (2 nM) bzw. Cisplatin-Stimulation (7,5 μ M) freigesetzten EV durch die Ovarialkarzinomzelllinie Igrov-1 qualitativ und quantitativ untersucht. Bei der qualitativen Untersuchung der EV-Aufnahme konnte mittels Lionheart™ FX Mikroskopie nachgewiesen werden, dass sich fluoreszenzmarkierte Cisplatin-EV an Igrov-1-Zellen anhefteten (Abb. 4.20). Im Verlauf der Untersuchung wurde zudem eine Übertragung vom Fluoreszenzfarbstoff auf die Tochterzellen von sich teilenden Zellen nachgewiesen, welche mit einer theoretischen Aufnahme von EV in die Ovarialkarzinomzellen vereinbar wäre. Die gewählte zwanzigfache Vergrößerung war jedoch nicht ausreichend, um die Aufnahmedynamik der EV in die Zellen eindeutig zu dokumentieren. Darüber hinaus war auffällig, dass viele fluoreszierende Partikel in den Zellkulturüberständen

detektiert werden konnten, die weit über den Größen der zuvor mittels NTA quantifizierten EV lagen (Abb. 9.7). Diese Beobachtung könnte ein Hinweis auf eine Aggregation der untersuchten Cisplatin-EV sein.

Mittels *Imaging*-Durchflusszytometrie konnten nach Inkubation von Igrov-1-Zellen mit fluoreszenzmarkierten PMA- bzw. Cisplatin-EV fluoreszierende Kompartimente in den Akzeptorzellen nachgewiesen werden. Diese Beobachtung spricht mit hoher Wahrscheinlichkeit dafür, dass die fluoreszenzmarkierten EV in die Ovarialkarzinomzellen aufgenommen wurden und entsprechend dem Modell von Mathieu et al. (2019) in Endosomen vorlagen [106]. Auf Basis dieser Ergebnisse kann aber nicht auf die intrazelluläre Dynamik dieser Kompartimente geschlossen werden. So besteht die Möglichkeit, dass die EV zwar in die Zellen aufgenommen wurden, nicht aber ihren Inhalt aus den Endosomen freisetzen. Es wäre auch möglich, dass es sich bei den intrazellulären Kompartimenten bereits um Lysosomen handelt, die die EV samt ihrem Inhalt abbauen [106, 202]. Nach Untersuchungen von Luga et al. (2012) besteht auch die Möglichkeit, dass aufgenommene EV „recycelt“ und wieder aus den Zellen freigesetzt werden [106, 204]. Gegen diese Theorie spricht jedoch, dass nach einer 14-stündigen Inkubation mit den genannten EV deutlich mehr Zellen fluoreszierende Kompartimente aufwiesen als nach einer 4-stündigen Inkubation.

Neben der qualitativen Aufnahme der PMA- und Cisplatin-EV in die Akzeptorzellen wurde auch eine quantitative Analyse durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass nach einer 14-stündigen Inkubationszeit signifikant mehr Zellen Cisplatin-EV aufnahmen als PMA-EV. Eine ähnliche Tendenz zeigte sich bereits nach einer 4-stündigen Inkubation der Zellen mit den entsprechenden EV (Abb. 4.22). Diese Beobachtung spricht dafür, dass Cisplatin-EV im Vergleich zu PMA-EV in gesteigertem Maß in Ovarialkarzinomzellen aufgenommen oder zumindest in vermindertem Maß nach deren Aufnahme wieder von diesen freigesetzt wird. In beiden Fällen könnten diese Ergebnisse dafürsprechen, dass Cisplatin-EV durch ihre erhöhte Aufnahme bzw. ihr vermehrtes intrazelluläres Auftreten auch in gesteigertem Maß die funktionellen Eigenschaften der Akzeptorzellen beeinflussen. Darüber hinaus ist von Interesse, durch welche Eigenschaften diese erhöhte Cisplatin-EV-Aufnahme in die Ovarialkarzinomzellen vermittelt wurde. Es wurden bereits verschiedene Zell-Oberflächenmoleküle beschrieben, die mit einer vermehrten EV-Aufnahme assoziiert sind [30, 202, 205, 206]. In einer Publikation von Bonsergent et al. (2021) wird jedoch resümiert, dass keiner dieser Faktoren die Aufnahme von EV in Zellen ausreichend erklärt [202]. Ein Lipid, welches in Bezug auf Cisplatin-EV von besonderem Interesse sein könnte, ist Phosphatidylserin (PS). Es ist bekannt, dass PS von apoptotischen Zellen (Cisplatin induziert die Apoptose [23, 24]) als ein „*Eat-me-signal*“ vermehrt auf der äußeren Membran präsentiert wird und PS die Phagozytose von apoptotischen Körperchen begünstigt [53, 207]. Darüber hinaus wurde bereits von Skotland et al. (2017) gezeigt, dass EV verschiedener Zellen PS anreichern (Kap. 1.3.5) [131]. Ein Nachweis von PS wäre auch von Interesse,

da gezeigt werden konnte, dass PS-positive EV auf verschiedene Weise tumorfördernd wirken können und PS auch Einfluss auf die Aktivität der Metalloprotease ADAM17 nehmen kann [45, 51, 150, 208].

Um den Mechanismus der EV-Aufnahme zu untersuchen, wurden die Zellen vor der EV-Behandlung mit Latrunculin A, einem die Polymerisation von Aktin hemmenden Makrolid-Toxin, behandelt. Hierbei zeigte sich, dass Latrunculin A die Aufnahme von EV beider Stimulationsgruppen stark einschränkte (Abb. 4.22). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit verschiedenen Publikationen, die ebenfalls eine Verminderung der EV-Aufnahme in Akzeptorzellen bei Hemmung des Zytoskelett-Umbaus zeigten [107, 209–211]. Daher kann darauf geschlossen werden, dass die Aufnahme der EV in die Ovarialkarzinomzellen zumindest zu Teilen durch Aktin-abhängige Endozytose vermittelt wird. In den so entstandenen Endosomen könnte ADAM17 Substrate *shedden*, die wiederum die Tumorprogression fördern könnten. Eine solche endosomale Aktivität von ADAM17 konnte beispielsweise von Ostalecki et al. (2016) nach einer Stimulation von 293T-Zellen mit PMA nachgewiesen werden [212]. Neben der Aufnahme von EV in Endosomen besteht die Möglichkeit, dass EV-Membran und Zellmembran fusionieren und der EV-Inhalt in die Akzeptorzelle eingebracht wird. Transmembranproteine wie ADAM17 könnten auf diesem Weg in der „richtigen“ Orientierung in die Membran der Akzeptorzellen übertragen werden und dort tumorfördernde Substrate durch *Ectodomain-Shedding* freisetzen.

5.6 Extrazelluläre Vesikel aus Patientinnen-Aszites enthalten ADAM17

Aszites ist ein häufiges Symptom des Ovarialkarzinoms und kann etwa bei einem Drittel der Patientinnen nachgewiesen werden [183–185]. Das Auftreten von Aszites ist dabei mit früheren Rezidiven und einer insgesamt schlechteren Prognose assoziiert [184, 213]. Es gibt starke Hinweise dafür, dass Aszites auf vielfältige Weise die Tumorprogression fördern kann [184, 185]. Beispielsweise konnten Bains et al. (2018) zeigen, dass Zell-depletierte Aszites ein ausgeprägtes immunsuppressives Potenzial besitzt, welches nicht ausreichend durch das Vorhandensein verschiedener untersuchter Zytokine erklärbar ist. Es besteht daher die Möglichkeit, dass extrazelluläre Vesikel neben weiteren Zytokinen und Zellen zum tumorfördernden Potenzial von Aszites beitragen und darüber hinaus die Entstehung von Chemotherapieresistenzen begünstigen [77, 184, 185].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in einem initialen Experiment untersucht, ob und wenn ja, in welchem Maß EV unter Verwendung des durch Théry et al. (2006) publizierten und entsprechend den Ergebnissen von Ashiru et al. (2010) und Chitadze et al. (2013) angepassten Protokolls (Kap. 3.3.1) aus einer Aszitesprobe angereichert werden können. Hierbei zeigte sich, dass aus 1 ml Patientinnen-Aszites etwa $4,8 \times 10^8$ Partikel nach Anreicherung detektiert werden konnten. Vergleichbare Partikelmengen konnten aus jeweils 10 ml Überstand von mit PMA (2 nM) bzw. Cisplatin (7,5 μ M) behandelten Zellen angereichert werden (Abb. 4.6 B und D). Daraus kann abgeleitet werden, dass die

Aszitesprobe eine deutlich höhere Partikelkonzentration aufwies als die zuvor untersuchten Zellkulturüberstände.

Diese Beobachtung steht im Einklang mit Untersuchungen von Mitra et al. (2021), die vergleichbare EV-Konzentrationen in malignem Aszites von Ovarialkarzinom-Patientinnen detektierten [214]. Dahingegen konnten Yamamoto et al. (2018) deutlich mehr EV aus Aszitesproben anreichern (bis zu $3,2 \times 10^{12} \times \text{ml}^{-1}$) [215]. Es ist anzumerken, dass die EV in den Untersuchungen von Mitra et al. (2021) mittels Exoquick (System Biosciences) angereichert und mittels qNano gemessen wurden, wohingegen in den Untersuchungen von Yamamoto et al. (2018) differentielle Zentrifugation und Ultrazentrifugation angewendet wurden und die Konzentrations- und Größenmessung mit NTA erfolgte [214, 215]. Es kann davon ausgegangen werden, dass verschiedene Aszitesproben unterschiedliche EV-Konzentrationen aufweisen und dass die verwendeten Anreicherungs- sowie Messmethoden einen deutlichen Einfluss auf die ermittelten EV-Konzentrationen nehmen. Aus diesem Grund wäre es von Interesse, verschiedene Anreicherungs- und Messmethoden zu vergleichen und die Variation von EV-Konzentrationen in malignem Aszites zu untersuchen, um auf dieser Basis optimale Bedingungen für zukünftige Forschungsvorhaben zu schaffen [109].

Die aus der Aszitesprobe angereicherten Partikel wurden hinsichtlich der durchschnittlichen Größen- und Größenverteilung analysiert. Hierbei zeigte sich, dass die angereicherten Partikel eine weitgehend monodisperse Verteilung bei einer durchschnittlichen Größe von etwa 212 nm aufwiesen. Damit zeigten sie eine vergleichbare Dispersität wie die EV der PMA- bzw. Cisplatin-Stimulationsgruppen (Abb. 4.4, 4.5). Ihre durchschnittliche Größe (212 nm) übertraf jedoch deutlich die durchschnittlichen EV-Größen der PMA- bzw. Cisplatin-Stimulationsgruppe (169 nm bzw. 186 nm) (Abb. 4.7, 4.8). Auch im Vergleich mit den durchschnittlichen Größen von Aszites-EV, die in verschiedenen Publikationen beschrieben wurden, sind die in dieser Arbeit angereicherten Partikel verhältnismäßig groß [214–216]. In Untersuchungen von Yamamoto et al. (2018) wurden deutlich kleinere Partikel aus Aszites von Ovarialkarzinom-Patientinnen angereichert (durchschnittlich $113 \pm 11,5$ nm), obwohl der Aszites mit vergleichbaren Zentrifugations- und Ultrazentrifugationszyklen prozessiert und die EV ebenfalls mittels NTA untersucht wurden [215]. Auch Mitra et al. (2021) konnten mehrheitlich kleinere EV in einem Größenbereich von 40 bis 140 nm nachweisen. Diese Größenunterschiede könnten möglicherweise auf eine natürliche Schwankungsbreite innerhalb unterschiedlicher Aszitesproben zurückgeführt werden. Dazu muss angemerkt werden, dass sowohl Yamamoto et al. (2018) als auch Mitra et al. (2021) lediglich Aszites von einem kleinen Patientinnenkollektiv analysierten (Yamamoto et al. (2018) $n=3$, Mitra et al. (2021) $n=5$) [214, 215]. Aufgrund der in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse besteht aber auch die Möglichkeit, dass die im Endpellet angereicherten Partikel (Abb. 4.3) während der Ultrazentrifugation aggregierten und größere Komplexe bildeten [113, 182]. Eine solche Komplex-

bildung könnte, wie in der Publikation von Linares et al. (2015) beschrieben, elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden [113].

In Western-Blot-Analysen der aus Aszites angereicherten Partikel konnten im Vergleich zu unprozessierten Aszitesproben zwei positive EV-Marker (HSP70 und CD63) detektiert werden (Abb. 4.19). Der Nachweis von zwei positiven EV-Markern ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass sich mit großer Wahrscheinlichkeit mittels des verwendeten Protokolls EV anreichern lassen. Eine eindeutige Charakterisierung von EV entsprechend den ISEV-Kriterien setzt jedoch den Nachweis von drei positiven und einem negativen EV-Marker voraus. Da die Aszitesuntersuchung nicht Schwerpunkt dieser Arbeit war, könnte in Folgeexperimenten die Einhaltung dieser Mindeststandards überprüft werden. Ein negativer EV-Marker, der bei der Arbeit mit Aszites-EV von besonderer Bedeutung sein könnte, betrifft die Gruppe der Apolipoproteine. Diese besitzen eine hohe Abundanz im Blut und könnten die aus Aszites angereicherten EV-Proben verunreinigen [82].

Im Rahmen der weiteren Charakterisierung der angereicherten Aszitespartikel wurde die Abundanz der Metalloprotease ADAM17 mit deren Vorkommen in der unprozessierten Aszitesprobe verglichen. Die im Kapitel 4.4 beschriebenen und in Abbildung 4.19 dargestellten Ergebnisse stehen im Einklang mit der Annahme, dass EV aus malignem Aszites mature ADAM17 tragen. Sie könnten auf diesem Weg an der Prozessierung von tumorfördernd wirkenden Substraten wie z. B. sIL-6R- α und AREG beteiligt sein und zur Tumorprogression sowie zur Chemotherapie-Resistenzbildung beitragen (Kap. 1.2.5).

Neben der hohen Abundanz der maturen Form von ADAM17 in den angereicherten Aszitespartikeln fiel auf, dass das 60/55-kDa-Fragment eine deutlich geringere Abundanz zeigte als in dem unprozessierten Aszites (Abb. 4.19). Dies könnte dafürsprechen, dass EV-assoziierte ADAM17 in geringerem Maß zu diesem Fragment abgebaut wird. Interessanterweise zeigte das 22/18-kDa-Fragment eine vergleichbare Abundanz in den Lysaten des unprozessierten Aszites und den korrespondierenden angereicherten Partikeln. Dies könnte, wie unter 5.3 beschrieben, darauf hinweisen, dass ADAM17 bereits vor der Aszitesabnahme, der Lagerung oder auch Prozessierung und Lyse fragmentiert wird. Es könnte aber auch, wie von Scharfenberg et al. (2020) publiziert, auf eine durch ADAM8 vermittelte Freisetzung von sADAM17 hinweisen [43]. In Folgeexperimenten sollte daher untersucht werden, ob sADAM17 in unprozessiertem Aszites nachgewiesen werden kann.

Die im Rahmen dieses initialen Experiments erhobenen Ergebnisse zeigen, dass ADAM17 mit großer Wahrscheinlichkeit EV-assoziiert in malignem Aszites vorliegt. Darüber hinaus bieten die Ergebnisse Hinweise darauf, dass sADAM17 von EV freigesetzt werden könnte (Abb. 4.16, 4.17 und 4.19 sowie Kap. 5.3 und 5.5).

5.7 Ausblick

Aus den Ergebnissen und deren Diskussion ergeben sich weitere Fragestellungen, die in über diese Arbeit hinausgehenden Folgeexperimenten untersucht werden sollten. Hierdurch soll das methodische Vorgehen weiter optimiert werden, um die Beteiligung von EV und ADAM17 an der Entstehung von Chemotherapieresistenzen im Ovarialkarzinom noch detaillierter evaluieren zu können.

Bei der Untersuchung des EV-Verlustes unter Verwendung des von Théry et al. (2006) publizierten und entsprechend den Ergebnissen von Ashiru et al. (2010) und Chitadze et al. (2013) angepassten Protokolls (Kap. 3.3.1) konnte nachgewiesen werden, dass sich nach den Ultrazentrifugationsschritten noch große Mengen kleiner Partikel in den Überständen befanden (Abb. 4.6–4.8). Es wird empfohlen, in einer weiteren Protokolloptimierung den gezeigten Partikelverlust durch eine längere Zentrifugationsdauer zu minimieren und dadurch insbesondere die Anreicherung von kleinen EV (< 200 nm) zu maximieren.

Die Lipidomics-Untersuchung von nach Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen Cisplatin (0–7,5 μ M) freigesetzten EV ergab, dass sich deren Lipidprofile von denen unbehandelter Igrov-1-Zellen unterscheiden. Es konnte auch gezeigt werden, dass verschiedene Cisplatin-Konzentrationen einen Einfluss auf die Lipidzusammensetzung der EV nehmen (Abb. 4.12). Da in dieser Arbeit ein Schwerpunkt auf den Einfluss von Cisplatin auf die EV-Freisetzung gelegt wurde, sollte in Folgeexperimenten auch die Lipidkomposition von PMA-EV untersucht werden. Zusätzlich sollten die EV beider Stimulationsgruppen massenspektrometrisch gemäß den von Skotland et al. (2017) publizierten Metaanalysedaten auf den Gehalt an Glykosphingomyelinen, Phosphatidylinositolen und Phosphatidylserin untersucht werden [131]. Erkenntnisse aus diesen Folgeexperimenten könnten dazu beitragen, die von der ISEV vorgeschlagenen Mindeststandards zur Charakterisierung von EV zu erweitern, ggf. den Anteil von apoptotischen Körperchen in EV-Proben zu evaluieren und diese von anderen unter Apoptose freigesetzten EV zu unterscheiden [82].

Ein weiteres Ergebnis dieser Arbeit war, dass fluoreszenzmarkierte PMA- bzw. Cisplatin-EV von Igrov-1-Zellen aufgenommen werden (Abb. 4.18–4.20). In der *Live-Cell*-Mikroskopie wurden zum Teil sehr große fluoreszierende Partikel in den Überständen detektiert, bei denen es sich um EV-Aggregate oder um Farbstoffreste handeln könnte. In Folgeexperimenten könnten die EV nach Fluoreszenzmarkierung und Anreicherung (Kap. 3.5.1) erneut mittels NTA analysiert werden, um durch die Größenbestimmung Hinweise auf eine mögliche Aggregation zu erhalten. Eine Differenzierung, ob es sich bei den detektierten Präzipitaten um EV-Aggregate oder um Farbstoffreste handelt, könnte elektronenmikroskopisch erfolgen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ADAM17 (Proform, mature Form, Fragmente) in von Igrov-1-Zellen nach Stimulation mit PMA (2 nM) bzw. Cisplatin (0–10 μ M) freigesetzten EV sowie in aus Aszites angereicherten Partikeln detektiert werden. Es war jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit, die funktionelle Aktivität der nachgewiesenen ADAM17 zu untersuchen. Daher sollte in sich an diese Arbeit anschließenden Folgeexperimenten geklärt werden, ob insbesondere EV-assoziierte ADAM17 funktionell aktiv ist. Eine Möglichkeit, die *Shedding*-Aktivität von EV-assoziiierter ADAM17 zu untersuchen, wäre, wie von Stoeck et al. (2006) beschrieben, den Umsatz eines ADAM17-Substrates wie TNF- α photometrisch zu messen [118].

Neben der Proform und der maturen Form von ADAM17 konnten auch zwei ADAM17-Fragmente von 22/18 kDa bzw. 60/55 kDa identifiziert werden. Da der Nachweis dieser Fragmente unter Verwendung eines Antikörpers, der die zytoplasmatische Domäne von ADAM17 spezifisch bindet, erbracht wurde, kann daraus gefolgert werden, dass die Fragmente einem Teil des C-terminalen Anteils von ADAM17 entstammen. In Folgeexperimenten sollten diese Fragmente spezifisch aufgereinigt und anschließend massenspektrometrisch untersucht werden [217]. Eine solche Analyse der Fragmente könnte beispielsweise Auskunft darüber geben, wie ADAM17 proteolytisch gespalten wird und ob das 22/18-kDa-Fragment den membranständigen C-terminalen Rest von ADAM17 nach ADAM8-vermittelter Freisetzung von sADAM17 darstellt. In Anlehnung an die Publikationen von Schlöndorff et al. (2000), Groth et al. (2016) und Scharfenberg et al. (2020) könnte darüber hinaus diese proteolytische Spaltung von ADAM17 in Fragmente durch die Verwendung von verschiedenen Metalloprotease-Inhibitoren näher charakterisiert werden [43, 47, 123]. Auch der direkte Nachweis von sADAM17 aus den Zellkulturüberständen könnte Aufschluss über die Herkunft des 22/18-kDa-Fragments geben. Ein Nachweis von sADAM17 wäre zusätzlich von Interesse, da sie parakrin und membranunabhängig über die Prozessierung von Substraten potenziell tumorfördernd wirken könnte.

Zusammenfassend wurde auf Basis der in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse eine Hypothese abgeleitet, wie EV-assoziierte ADAM17 ihre potenziell tumorfördernden Eigenschaften entfalten könnte. Diese hypothetischen Mechanismen werden in Abbildung 5.3 dargestellt.

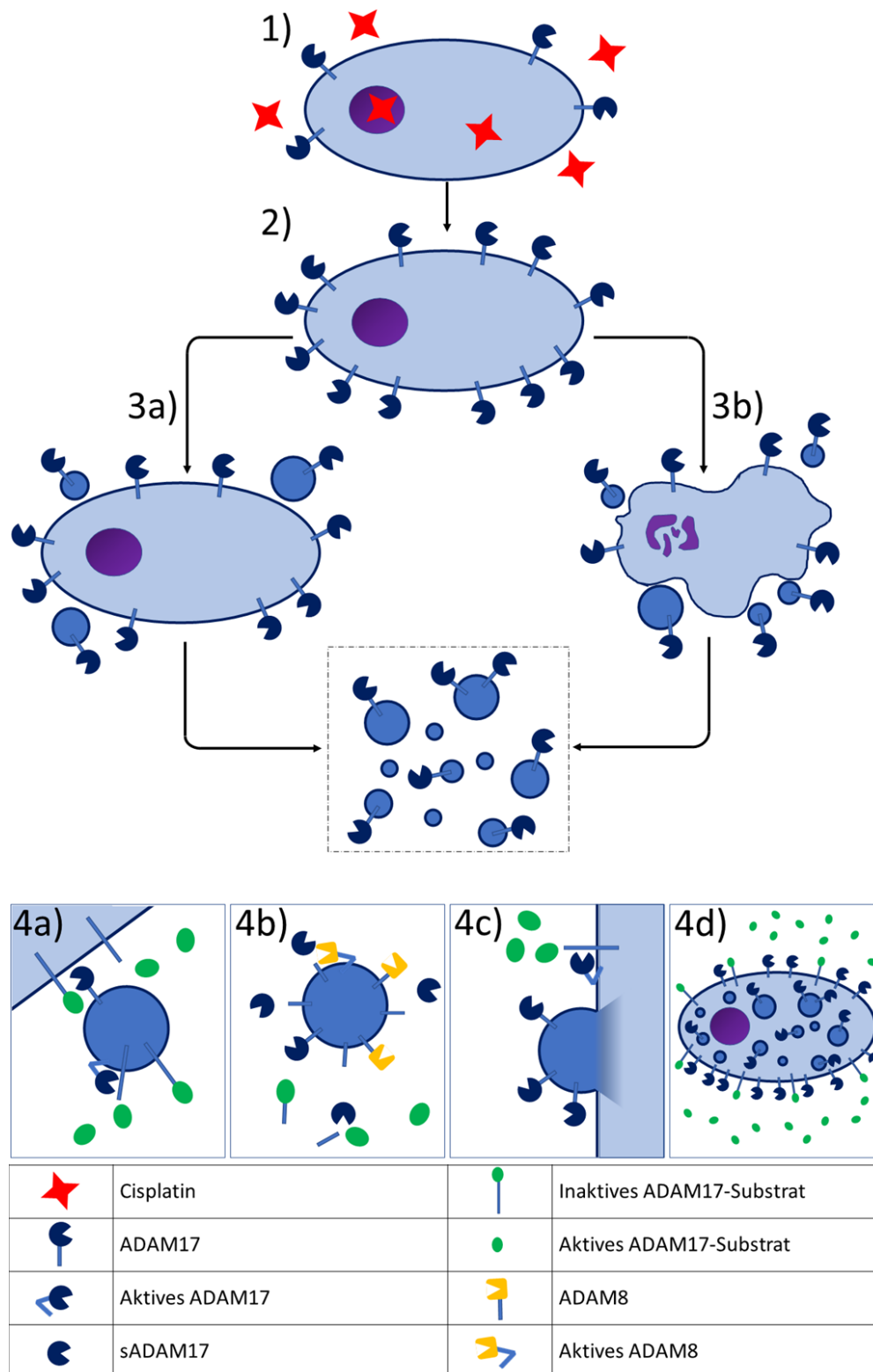


Abbildung 5.3: Hypothetisches Modell, auf welchen Wegen Cisplatin-EV-assoziierte ADAM17 tumorfördernd wirken könnte.

1) Cisplatin-Behandlung von Tumorzellen. 2) Vermehrte Bildung von ADAM17 in den Tumorzellen. 3a) Freisetzung von EV-assoziiierter ADAM17 durch lebende (chemoresistente) Tumorzellen. 3b) Freisetzung von EV durch apoptotische Tumorzellen. 4a) EV-assoziierte ADAM17 könnte auf der Membran von EV und Zellen vorhandene Substrate *shedden*. 4b) EV-assoziierte ADAM17 könnte durch ADAM8-Shedding als sADAM17 freigesetzt werden und Substrate *shedden*. 4c) EV-assoziierte ADAM17 könnte durch Membranfusion von EV und Zelle auf der Membran von Akzeptorzellen Substrate *shedden*. 4d) EV-assoziierte ADAM17 könnte nach deren Aufnahme in Akzeptorzellen in die Zellmembran integriert werden und dort Substrate *shedden*.

Es konnte gezeigt werden, dass Cisplatin die Neusynthese von maturer ADAM17 in Igrov-1-Zellen konzentrationsabhängig stimuliert (Abb. 5.3, 1 und 2). Es ist wahrscheinlich, dass diese gesteigerte Expression von maturer ADAM17 mit einem erhöhten Umsatz an ADAM17-Substraten einhergeht. Es gibt zwei Möglichkeiten, wie die Cisplatin-behandelten Zellen reagieren könnten: Entweder gehen sie in Apoptose (Abb. 5.3, 3b) oder zeigen eine ausreichende Resistenz gegen das Chemotherapeutikum und bleiben am Leben (Abb. 5.3, 3a). In beiden Fällen kommt es jedoch zu einer Freisetzung von EV, die wahrscheinlich bei Stimulation mit höheren Cisplatin-Konzentrationen einen größeren Anteil an apoptotischen Körperchen oder anderen Apoptose-induzierten EV enthalten. Unabhängig von der Art ihrer Entstehung kann gemäß den Ergebnissen dieser Arbeit davon ausgegangen werden, dass die freigesetzten EV ADAM17 aufweisen. Nach ihrer Freisetzung könnte EV-assoziierte ADAM17 auf verschiedene Weise über den Umsatz von Substraten tumorfördernd wirken. Es besteht die Möglichkeit, dass ADAM17 ihre Substrate direkt von der EV- bzw. der Zellmembranen *sheddet* (Abb. 5.3, 4a). ADAM17 könnte auch durch ADAM8-vermitteltes *Shedding* von der EV-Oberfläche freigesetzt werden und anschließend als aktives, lösliches sADAM17 vorliegen (Abb. 5.3, 4b). Es könnte auch sein, dass durch eine Fusion von Zellen und EV ADAM17 in die Membran von Akzeptorzellen eingebracht wird und dort Substrate *sheddet* (Abb. 5.3, 4c). Auch nach einer endozytotischen Aufnahme von EV könnte EV-assoziierte ADAM17 in die Zellmembran übertragen werden (Abb. 5.3, 4d).

Unabhängig von der Art der Übertragung von ADAM17 bzw. der Freisetzung von sADAM17 könnte sich der Einflussradius der Metalloprotease durch EV stark erweitern. Es ist möglich, dass auf diesem Weg ADAM17 auch auf ADAM17-defiziente Nachbarzellen übertragen wird und dort tumorfördernde Substrate wie AREG *sheddet*. Dieser Mechanismus wäre insbesondere im Tumormikromilieu sowie in metastatischen Nischen fatal, da dort auf diese Weise hohe Wachstumsfaktor-Konzentrationen ausgeschüttet werden könnten. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass mit Wachstumsfaktoren stimulierte Zellen wiederum vermehrt ADAM17-haltige EV freisetzen und dadurch sowohl das Tumorwachstum als auch die Entstehung von Chemotherapieresistenzen begünstigen.

Auf Basis dieser Erkenntnisse könnten Tests entwickelt werden, die die Prognose des Ovarialkarzinoms verbessern könnten, indem die Entstehung von Chemotherapieresistenzen frühzeitig detektiert und unter Umständen umgangen werden könnte. Ein langfristiges Ziel bleibt, eine solche Testung aus Urin oder Blut durchführen zu können, da Aszites nicht bei allen Ovarialkarzinom-Patientinnen vorhanden und in der Regel erst bei fortgeschrittener Krankheit nachweisbar ist.

6 Zusammenfassung

Das Ovarialkarzinom besitzt trotz verbesserter Therapiekonzepte immer noch eine fatale Prognose, die auf einen späten Diagnosezeitpunkt und die Entstehung von Chemotherapieresistenzen zurückgeführt werden kann. Extrazelluläre Vesikel und die Metalloprotease ADAM17 könnten an der Chemotherapie-Resistenzentwicklung im Ovarialkarzinom beteiligt sein.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das verwendete Protokoll zur Anreicherung von Partikeln aus den Überständen PMA- bzw. Cisplatin-stimulierter Ovarialkarzinomzellen geeignet ist. Diese Partikel konnten unter Anwendung der Mindeststandards der ISEV (2018) eindeutig als mehrheitlich kleine EV charakterisiert werden. Diese Charakterisierung wurde durch eine massenspektrometrische Lipidprofilanalyse ergänzt, die deutliche Unterschiede zwischen Zellen und EV in der Lipidzusammensetzung aufzeigte und auch innerhalb der durch verschiedene Cisplatin-Konzentrationen induzierten EV variierte.

Der Zusammenhang von Zelltod, EV-Freisetzung und ADAM17-Abundanz wurde unter Cisplatin- bzw. PMA-Stimulation untersucht. Es zeigte sich, dass Cisplatin in Abhängigkeit vom Zelltod und PMA unabhängig vom Zelltod eine EV-Freisetzung induziert. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine Cisplatin-Behandlung von Igrov-1-Zellen konzentrationsabhängig die Neusynthese maturer ADAM17 stimuliert. Die dabei freigesetzten Cisplatin-EV zeigten die höchste Abundanz an maturer ADAM17 nach Stimulation mit geringen Cisplatin-Konzentrationen (1 μ M, 2,5 μ M). Es konnten zwei ADAM17-Fragmente in den Zell- und EV-Lysaten detektiert werden. Von diesen korrelierte die Abundanz eines 18 kDa schweren Fragments positiv mit den verwendeten Cisplatin-Konzentrationen.

Die Aufnahme von PMA- bzw. Cisplatin-EV in Igrov-1-Zellen wurde qualitativ und quantitativ nachgewiesen. Dieser Aufnahmeprozess ist zeitabhängig und wird zumindest teilweise durch Aktin-abhängige Endozytose vermittelt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Cisplatin-EV im Vergleich mit PMA-EV deutlich effizienter durch die Akzeptorzellen aufgenommen wurden.

In einem initialen Experiment konnte nachgewiesen werden, dass die in Zellkulturexperimenten erhobenen Daten auch auf Patientinnen-Aszites übertragbar sind. Hierbei zeigte sich, dass aus malignem Aszites einer Ovarialkarzinom-Patientin mit großer Wahrscheinlichkeit ADAM17-tragende EV angereichert werden konnten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben die Grundlage dafür geschaffen, die Bedeutung von EV-assoziiierter ADAM17 bei der Entstehung von Chemotherapieresistenzen im Ovarialkarzinom weiter aufzuklären. Durch ein besseres Verständnis der Entstehung von Chemotherapieresistenzen könnten diagnostische Tests entwickelt werden, um deren Entstehung frühzeitig zu erkennen bzw. gezielte Therapien zu schaffen, um dadurch die Prognose des Ovarialkarzinoms zu verbessern.

7 Abstract

Despite improved therapy concepts, ovarian cancer still has a fatal prognosis, which can be attributed to late diagnosis and the development of chemotherapy resistance. Extracellular vesicles (EV) and the metalloprotease ADAM17 may be involved in the development of chemotherapy resistance in ovarian cancer.

It was shown that the protocol used in this thesis, was suitable for enriching particles from the supernatants of PMA- or cisplatin-stimulated ovarian cancer cells. These particles could mostly be characterized as small EV using the minimum standards of ISEV (2018). This characterization was complemented by lipid mass spectrometry, which revealed clear differences in lipid composition between cells and EV and also varied within EV, which were induced by different cisplatin concentrations.

The relationship of cell death, EV release and ADAM17 abundance was analysed under cisplatin or PMA stimulation. Cisplatin was shown to induce EV release in response to cell death and PMA was shown to induce EV release independently of cell death. Furthermore, cisplatin treatment of Igrov-1 cells was shown to stimulate the synthesis of mature ADAM17 in a concentration-dependent manner. The released cisplatin-EV showed the highest abundance of mature ADAM17 after stimulation with low cisplatin concentrations (1 μ M; 2.5 μ M). Two ADAM17 fragments were detected in the cell lysates as well as in EV lysates. Of these, the abundance of an 18 kDa fragment correlated positively with the cisplatin concentrations used.

The uptake of PMA or cisplatin EV into Igrov-1 cells was detected qualitatively and quantitatively. This uptake process is time-dependent and mediated, at least in part, by actin-dependent endocytosis. In addition, it was shown that cisplatin EV were taken up significantly more efficiently by the acceptor cells compared to PMA EV.

In an initial experiment, it was demonstrated that the data collected in cell culture experiments are also applicable to patient ascites. It was shown that the protocol used is, with a high probability, suitable for enriching ADAM17-bearing EV from malignant ascites of ovarian cancer patients.

The results of this thesis lay the foundation for further research concerning the importance of EV-associated ADAM17 in the development of chemotherapy resistance in ovarian cancer. A better understanding of the mechanism and drivers of chemotherapy resistance could result in new diagnostic tests that could help to unmask chemotherapy resistance already at an early stage. Based on these findings, targeted therapies could be developed to improve ovarian cancer prognosis.

8 Literaturverzeichnis

1. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg) Krebs in Deutschland 2015/2016. 12. Ausgabe: S.1–163
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL et al. (2021) Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*: S.1–41
3. Torre LA, Trabert B, DeSantis CE et al. (2018) Ovarian cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin* 68: S.284–296
4. Cibula D, Widschwendter M, Májek O et al. (2011) Tubal ligation and the risk of ovarian cancer: Review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 17: S.55–67
5. Beral V, Doll R, Hermon C et al. (2008) Ovarian cancer and oral contraceptives: Collaborative reanalysis of data from 45 epidemiological studies including 23,257 women with ovarian cancer and 87,303 controls. *Lancet* 371: S.303–314
6. John EM, Whittemore AS, Harris R et al. (1993) Characteristics relating to ovarian cancer risk: Collaborative analysis of seven U.S. case-control studies. Epithelial ovarian cancer in black women. Collaborative Ovarian Cancer Group. *J Natl Cancer Inst* 85: S.142–147
7. Buttmann-Schweiger N, Kraywinkel K (2019) Epidemiologie von Eierstockkrebs in Deutschland. *Der Onkologe* 25: S.92–98
8. Leitzmann MF, Koebnick C, Danforth KN et al. (2009) Body mass index and risk of ovarian cancer. *Cancer* 115: S.812–822
9. Chen VW, Ruiz B, Killeen JL et al. (2003) Pathology and classification of ovarian tumors. *Cancer* 97: S.2631–2642
10. Prat J (2017) Pathology of borderline and invasive cancers. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 41: S.15–30
11. Fathalla MF (1971) Incessant ovulation-a factor in ovarian neoplasia? *Lancet* 2: S.163
12. Kurman RJ, Shih I-M (2011) Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer-shifting the paradigm. *Hum Pathol* 42: S.918–931
13. The Cancer Genome Atlas Research Network (2011) Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* 474: S.609–615
14. Lilyquist J, LaDuca H, Polley E et al. (2017) Frequency of mutations in a large series of clinically ascertained ovarian cancer cases tested on multi-gene panels compared to reference controls. *Gynecol Oncol* 147: S.375–380
15. Harter P, Hauke J, Heitz F et al. (2017) Prevalence of deleterious germline variants in risk genes including BRCA1/2 in consecutive ovarian cancer patients (AGO-TR-1). *PLoS One* 12: e0186043
16. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren, Langversion 4.0, 2020, AWMF-Registernummer: 032/035OL. <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/ovarialkarzinom/>
17. Berek JS, Kehoe ST, Kumar L et al. (2018) Cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *Int J Gynaecol Obstet* 143 Suppl 2: S.59–78
18. Du Bois A, Reuss A, Pujade-Lauraine E et al. (2009) Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: A combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials: by the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzinom (AGO-OVAR) and the Groupe d'Investigateurs Nationaux Pour les Etudes des Cancers de l'Ovaire (GINECO). *Cancer* 115: S.1234–1244
19. Du Bois A, Lück H-J, Meier W et al. (2003) A randomized clinical trial of cisplatin/paclitaxel versus carboplatin/paclitaxel as first-line treatment of ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 95: S.1320–1329

20. Gore ME, Fryatt I, Wiltshaw E et al. (1989) Cisplatin/carboplatin cross-resistance in ovarian cancer. *Br J Cancer* 60: S.767–769
21. Gupta N, Xu Z, El-Sehemy A et al. (2013) Notch3 induces epithelial-mesenchymal transition and attenuates carboplatin-induced apoptosis in ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol* 130: S.200–206
22. Agarwal R, Kaye SB (2003) Ovarian cancer: Strategies for overcoming resistance to chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 3: S.502–516
23. Barry MA, Behnke CA, Eastman A (1990) Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. *Biochem Pharmacol* 40: S.2353–2362
24. Wang X, Martindale JL, Holbrook NJ (2000) Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis. *J Biol Chem* 275: S.39435–39443
25. Pfisterer J, Plante M, Vergote I et al. (2006) Gemcitabine plus carboplatin compared with carboplatin in patients with platinum-sensitive recurrent ovarian cancer: An intergroup trial of the AGO-OVAR, the NCIC CTG, and the EORTC GCG. *J Clin Oncol* 24: S.4699–4707
26. Foley OW, Rauh-Hain JA, del Carmen MG (2013) Recurrent epithelial ovarian cancer: An update on treatment. *Oncology (Williston Park)* 27: S.288–294, 298
27. Pfisterer J, Ledermann JA (2006) Management of platinum-sensitive recurrent ovarian cancer. *Semin Oncol* 33: S.12–16
28. Jung J-G, Shih I-M, Park JT et al. (2016) Ovarian Cancer Chemoresistance Relies on the Stem Cell Reprogramming Factor PBX1. *Cancer Res* 76: S.6351–6361
29. Brasseur K, Gévry N, Asselin E (2017) Chemoresistance and targeted therapies in ovarian and endometrial cancers. *Oncotarget* 8: S.4008–4042
30. Hoshino R, Chatani Y, Yamori T et al. (1999) Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. *Oncogene* 18: S.813–822
31. Kalaany NY, Sabatini DM (2009) Tumours with PI3K activation are resistant to dietary restriction. *Nature* 458: S.725–731
32. Zunke F, Rose-John S (2017) The shedding protease ADAM17: Physiology and pathophysiology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1864: S.2059–2070
33. Hedemann N, Rogmans C, Sebens S et al. (2018) ADAM17 inhibition enhances platinum efficiency in ovarian cancer. *Oncotarget* 9: S.16043–16058
34. Rawlings ND, Barrett AJ, Thomas PD et al. (2018) The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Res* 46: D624–D632
35. Edwards DR, Handsley MM, Pennington CJ (2008) The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med* 29: S.258–289
36. Goos M (2010) ADAM-17: The enzyme that does it all. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 45: S.146–169
37. Bode W, Gomis-Ruth F-X, Stockler W (1993) Astacins, serralytins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. *FEBS Letters* 331: S.134–140
38. Huxley-Jones J, Clarke T-K, Beck C et al. (2007) The evolution of the vertebrate metzincins; insights from *Ciona intestinalis* and *Danio rerio*. *BMC Evol Biol* 7: S.63
39. Rogmans C, Kuhlmann JD, Hugendieck G et al. (2021) ADAM17-A potential blood-based biomarker for detection of early-stage ovarian cancer. *Cancers (Basel)* 13: 5563
40. Lichtenthaler SF, Lemberg MK, Fluhrer R (2018) Proteolytic ectodomain shedding of membrane proteins in mammals—hardware, concepts, and recent developments. *EMBO J* 37: e99456
41. Hooper NM, Karran EH, Turner AJ (1997) Membrane protein secretases. *Biochem J* 321: S.265–279
42. Lambrecht BN, Vanderkerken M, Hammad H (2018) The emerging role of ADAM metalloproteinases in immunity. *Nat Rev Immunol* 18: S.745–758

43. Scharfenberg F, Helbig A, Sammel M et al. (2020) Degradome of soluble ADAM10 and ADAM17 metalloproteases. *Cell Mol Life Sci* 77: S.331–350
44. Brown MS, Ye J, Rawson RB et al. (2000) Regulated intramembrane proteolysis: A control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* 100: S.391–398
45. Grötzinger J, Lorenzen I, Düsterhöft S (2017) Molecular insights into the multilayered regulation of ADAM17: The role of the extracellular region. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1864: S.2088–2095
46. Borroto A, Ruiz-Paz S, La Torre TV de et al. (2003) Impaired trafficking and activation of tumor necrosis factor- α -converting enzyme in cell mutants defective in protein ectodomain shedding. *J Biol Chem* 278: S.25933–25939
47. Schlöndorff J, Becherer JD, Blobel CP (2000) Intracellular maturation and localization of the tumour necrosis factor α convertase (TACE). *Biochem J* 347: S.131–138
48. Tellier E, Canault M, Rebsomen L et al. (2006) The shedding activity of ADAM17 is sequestered in lipid rafts. *Exp Cell Res* 312: S.3969–3980
49. Luo C, Wang K, Liu DQ et al. (2008) The functional roles of lipid rafts in T cell activation, immune diseases and HIV infection and prevention. *Cell Mol Immunol* 5: S.1–7
50. Devaux PF (1991) Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes. *Biochemistry* 30: S.1163–1173
51. Sommer A, Kordowski F, Büch J et al. (2016) Phosphatidylserine exposure is required for ADAM17 sheddase function. *Nat Commun* 7: 11523
52. Segawa K, Nagata S (2015) An apoptotic 'eat me' signal: Phosphatidylserine exposure. *Trends Cell Biol* 25: S.639–650
53. Fadok VA, Bratton DL, Frasch SC et al. (1998) The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ* 5: S.551–562
54. Jong K de, Rettig MP, Low PS et al. (2002) Protein kinase C activation induces phosphatidylserine exposure on red blood cells. *Biochemistry* 41: S.12562–12567
55. Lorenzen I, Lokau J, Korpys Y et al. (2016) Erratum: Control of ADAM17 activity by regulation of its cellular localisation. *Sci Rep* 6: 35067
56. Blumberg PM (1988) Protein kinase C as the receptor for the phorbol ester tumor promoters: sixth Rhoads memorial award lecture. *Cancer Res* 48: S.1–8
57. Peschon JJ, Slack JL, Reddy P et al. (1998) An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science* 282: S.1281–1284
58. Chalaris A, Adam N, Sina C et al. (2010) Critical role of the disintegrin metalloprotease ADAM17 for intestinal inflammation and regeneration in mice. *J Exp Med* 207: S.1617–1624
59. Sibilias M, Wagner EF (1995) Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. *Science* 269: S.234–238
60. Schneider MR, Wolf E (2009) The epidermal growth factor receptor ligands at a glance. *J Cell Physiol* 218: S.460–466
61. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ et al. (1997) A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. *Nature* 385: S.729–733
62. Kalliolias GD, Ivashkiv LB (2016) TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat Rev Rheumatol* 12: S.49–62
63. Grell M, Douni E, Wajant H et al. (1995) The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 83: S.793–802
64. Hunter CA, Jones SA (2015) IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol* 16: S.448–457
65. Taga T, Hibi M, Hirata Y et al. (1989) Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell* 58: S.573–581

66. Taga T, Kishimoto T (1997) Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol* 15: S.797–819
67. Jones SA, Rose-John S (2002) The role of soluble receptors in cytokine biology: The agonistic properties of the sIL-6R/IL-6 complex. *Biochimica et biophysica acta* 1592: S.251–263
68. Riethmueller S, Somasundaram P, Ehlers JC et al. (2017) Proteolytic origin of the soluble human IL-6R in vivo and a decisive role of N-Glycosylation. *PLoS Biol* 15: e2000080
69. Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144: S.646–674
70. Ringel J, Jesnowski R, Moniaux N et al. (2006) Aberrant expression of a disintegrin and metalloproteinase 17/tumor necrosis factor-alpha converting enzyme increases the malignant potential in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Res* 66: S.9045–9053
71. Blanchot-Jossic F, Jarry A, Masson D et al. (2005) Up-regulated expression of ADAM17 in human colon carcinoma: Co-expression with EGFR in neoplastic and endothelial cells. *J Pathol* 207: S.156–163
72. Ni S-S, Zhang J, Zhao W-L et al. (2013) ADAM17 is overexpressed in non-small cell lung cancer and its expression correlates with poor patient survival. *Tumour Biol* 34: S.1813–1818
73. McGowan PM, Ryan BM, Hill ADK et al. (2007) ADAM-17 expression in breast cancer correlates with variables of tumor progression. *Clin Cancer Res* 13: S.2335–2343
74. Tanaka Y, Miyamoto S, Suzuki SO et al. (2005) Clinical significance of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and a disintegrin and metalloprotease 17 expression in human ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 11: S.4783–4792
75. Kulbe H, Hagemann T, Szlosarek PW et al. (2005) The inflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha regulates chemokine receptor expression on ovarian cancer cells. *Cancer Res* 65: S.10355–10362
76. Lo C-W, Chen M-W, Hsiao M et al. (2011) IL-6 trans-signaling in formation and progression of malignant ascites in ovarian cancer. *Cancer Res* 71: S.424–434
77. Carvalho S, Lindzen M, Lauriola M et al. (2016) An antibody to amphiregulin, an abundant growth factor in patients' fluids, inhibits ovarian tumors. *Oncogene* 35: S.438–447
78. Charles KA, Kulbe H, Soper R et al. (2009) The tumor-promoting actions of TNF-alpha involve TNFR1 and IL-17 in ovarian cancer in mice and humans. *J Clin Invest* 119: S.3011–3023
79. Witsch E, Sela M, Yarden Y (2010) Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology (Bethesda)* 25: S.85–101
80. Chargaff E, West R (1946) The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *J Biol Chem* 166: S.189–197
81. Gould SJ, Raposo G (2013) As we wait: Coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* 2: 20389
82. Théry C, Witwer KW, Aikawa E et al. (2018) Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): A position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles* 7: 1535750
83. Witwer KW, Théry C (2019) Extracellular vesicles or exosomes? On primacy, precision, and popularity influencing a choice of nomenclature. *J Extracell Vesicles* 8: 1648167
84. Cocucci E, Meldolesi J (2015) Ectosomes and exosomes: Shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends Cell Biol* 25: S.364–372
85. Yáñez-Mó M, Siljander PR-M, Andreu Z et al. (2015) Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles* 4: 27066
86. van Niel G, D'Angelo G, Raposo G (2018) Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19: S.213–228
87. Bebelman MP, Smit MJ, Pegtel DM et al. (2018) Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer. *Pharmacol Ther* 188: S.1–11

88. Colombo M, Raposo G, Théry C (2014) Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 30: S.255–289
89. Henne WM, Buchkovich NJ, Emr SD (2011) The ESCRT pathway. *Dev Cell* 21: S.77–91
90. Raiborg C, Stenmark H (2009) The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature* 458: S.445–452
91. Stuffers S, Sem Wegner C, Stenmark H et al. (2009) Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs. *Traffic* 10: S.925–937
92. Bari R, Guo Q, Xia B et al. (2011) Tetraspanins regulate the protrusive activities of cell membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 415: S.619–626
93. Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S et al. (2008) Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* 319: S.1244–1247
94. van Meer G, Vaz WLC (2005) Membrane curvature sorts lipids. Stabilized lipid rafts in membrane transport. *EMBO Rep* 6: S.418–419
95. Hsieh W-T, Hsu C-J, Capraro BR et al. (2012) Curvature sorting of peripheral proteins on solid-supported wavy membranes. *Langmuir* 28: S.12838–12843
96. Tian A, Baumgart T (2009) Sorting of lipids and proteins in membrane curvature gradients. *Biophys J* 96: S.2676–2688
97. Villarroya-Beltri C, Baixauli F, Mittelbrunn M et al. (2016) ISGylation controls exosome secretion by promoting lysosomal degradation of MVB proteins. *Nat Commun* 7: S.13588
98. Südhof TC, Rothman JE (2009) Membrane fusion: Grappling with SNARE and SM proteins. *Science* 323: S.474–477
99. McMahon HT, Boucrot E (2015) Membrane curvature at a glance. *J Cell Sci* 128: S.1065–1070
100. Nabhan JF, Hu R, Oh RS et al. (2012) Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: S.4146–4151
101. Piccin A, Murphy WG, Smith OP (2007) Circulating microparticles: Pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev* 21: S.157–171
102. Crescitelli R, Lässer C, Szabó TG et al. (2013) Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: Apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. *J Extracell Vesicles* 2: 20677
103. Rivoltini L, Chiodoni C, Squarcina P et al. (2016) TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-armed exosomes deliver proapoptotic signals to tumor site. *Clin Cancer Res* 22: S.3499–3512
104. Martínez-Lorenzo MJ, Anel A, Gamen S et al. (1999) Activated human T cells release bioactive Fas ligand and APO2 ligand in microvesicles. *J Immunol* 163: S.1274–1281
105. Buzás EI, Tóth EÁ, Sódar BW et al. (2018) Molecular interactions at the surface of extracellular vesicles. *Semin Immunopathol* 40: S.453–464
106. Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavieu G et al. (2019) Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat Cell Biol* 21: S.9–17
107. Mulcahy LA, Pink RC, Carter DRF (2014) Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles* 3: 24641
108. Osteikoetxea X, Németh A, Sódar BW et al. (2016) Extracellular vesicles in cardiovascular disease: Are they Jedi or Sith? *J Physiol* 594: S.2881–2894
109. Konoshenko MY, Lekchnov EA, Vlassov AV et al. (2018) Isolation of extracellular vesicles: General methodologies and latest trends. *Biomed Res Int* Volume 2018: 8545347
110. Gardiner C, Di Vizio D, Sahoo S et al. (2016) Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: Results of a worldwide survey. *J Extracell Vesicles* 5: 32945

111. Mateescu B, Kowal E, van Balkom BWM et al. (2017) Obstacles and opportunities in the functional analysis of extracellular vesicle RNA - an ISEV position paper. *J Extracell Vesicles* 6: 1286095
112. Théry C, Amigorena S, Raposo G et al. (2006) Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* 30: 3.22.1-3.22.29
113. Linares R, Tan S, Gounou C et al. (2015) High-speed centrifugation induces aggregation of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* 4: 29509
114. Webber J, Clayton A (2013) How pure are your vesicles? *J Extracell Vesicles* 2: 19861
115. Lötvall J, Hill AF, Hochberg F et al. (2014) Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: A position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracell Vesicles* 3: 26913
116. Denzer K, Kleijmeer MJ, Heijnen HF et al. (2000) Exosome: From internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *J Cell Sci* 113 Pt 19: S.3365–3374
117. Kalra H, Simpson RJ, Ji H et al. (2012) Vesiclepedia: A compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS Biol* 10: e1001450
118. Stoeck A, Keller S, Riedle S et al. (2006) A role for exosomes in the constitutive and stimulus-induced ectodomain cleavage of L1 and CD44. *Biochem J* 393: S.609–618
119. Lee J-H, Ostalecki C, Zhao Z et al. (2018) HIV activates the tyrosine kinase Hck to secrete ADAM protease-containing extracellular vesicles. *EBioMedicine* 28: S.151–161
120. Li W, Zhang X, Wang J et al. (2017) TGFβ1 in fibroblasts-derived exosomes promotes epithelial-mesenchymal transition of ovarian cancer cells. *Oncotarget* 8: S.96035–96047
121. Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W et al. (1996) B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* 183: S.1161–1172
122. Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J et al. (2008) Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol* 10: S.619–624
123. Groth E, Pruessmeyer J, Babendreyer A et al. (2016) Stimulated release and functional activity of surface expressed metalloproteinase ADAM17 in exosomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1863: S.2795–2808
124. Zhang H-G, Liu C, Su K et al. (2006) A membrane form of TNF-alpha presented by exosomes delays T cell activation-induced cell death. *J Immunol* 176: S.7385–7393
125. Arnold P, Lückstädt W, Li W et al. (2020) Joint reconstituted signaling of the IL-6 receptor via extracellular vesicles. *Cells* 9: 1307
126. Higginbotham JN, Demory Beckler M, Gephart JD et al. (2011) Amphiregulin exosomes increase cancer cell invasion. *Curr Biol* 21: S.779–786
127. Skotland T, Sagini K, Sandvig K et al. (2020) An emerging focus on lipids in extracellular vesicles. *Adv Drug Deliv Rev* 159: S.308–321
128. Obeid LM, Linardic CM, Karolak LA et al. (1993) Programmed cell death induced by ceramide. *Science* 259: S.1769–1771
129. Gassart A de, Geminard C, Fevrier B et al. (2003) Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. *Blood* 102: S.4336–4344
130. Yang S-T, Kreutzberger AJ, Lee J et al. (2016) The role of cholesterol in membrane fusion. *Chemistry and Physics of Lipids* 199: S.136–143
131. Skotland T, Ekroos K, Kauhanen D et al. (2017) Molecular lipid species in urinary exosomes as potential prostate cancer biomarkers. *Eur J Cancer* 70: S.122–132
132. Hough KP, Wilson LS, Trevor JL et al. (2018) Unique lipid signatures of extracellular vesicles from the airways of asthmatics. *Sci Rep* 8: 10340
133. Valadi H, Ekström K, Bossios A et al. (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 9: S.654–659

134. Balaj L, Lessard R, Dai L et al. (2011) Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nat Commun* 2: 180
135. Mittelbrunn M, Gutiérrez-Vázquez C, Villarroya-Beltri C et al. (2011) Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun* 2: 282
136. Takahashi A, Okada R, Nagao K et al. (2017) Exosomes maintain cellular homeostasis by excreting harmful DNA from cells. *Nat Commun* 8: 15287
137. Nassar W, El-Ansary M, Sabry D et al. (2016) Umbilical cord mesenchymal stem cells derived extracellular vesicles can safely ameliorate the progression of chronic kidney diseases. *Biomaterials Research* 20: S.1–11
138. Kordelas L, Rebmann V, Ludwig A-K et al. (2014) MSC-derived exosomes: a novel tool to treat therapy-refractory graft-versus-host disease. *Leukemia* 28: S.970–973
139. Sengupta V, Sengupta S, Lazo A et al. (2020) Response to Lim et al. re: "Exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells as treatment for severe COVID-19". *Stem Cells Dev* 29: S.879–881
140. Nguyen VVT, Witwer KW, Verhaar MC et al. (2020) Functional assays to assess the therapeutic potential of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* 10: e12033
141. Graves LE, Ariztia EV, Navari JR et al. (2004) Proinvasive properties of ovarian cancer ascites-derived membrane vesicles. *Cancer Res* 64: S.7045–7049
142. Baran J, Baj-Krzyworzeka M, Weglarczyk K et al. (2010) Circulating tumour-derived microvesicles in plasma of gastric cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 59: S.841–850
143. Mitchell PJ, Welton J, Staffurth J et al. (2009) Can urinary exosomes act as treatment response markers in prostate cancer? *J Transl Med* 7: 4
144. Wei P, Wu F, Kang B et al. (2020) Plasma extracellular vesicles detected by Single Molecule array technology as a liquid biopsy for colorectal cancer. *J Extracell Vesicles* 9: 1809765
145. Hinshaw DC, Shevde LA (2019) The tumor microenvironment innately modulates cancer progression. *Cancer Res* 79: S.4557–4566
146. Han L, Lam EW-F, Sun Y (2019) Extracellular vesicles in the tumor microenvironment: Old stories, but new tales. *Mol Cancer* 18: 59
147. Giusti I, Di Francesco M, D'Ascenzo S et al. (2018) Ovarian cancer-derived extracellular vesicles affect normal human fibroblast behavior. *Cancer Biol Ther* 19: S.722–734
148. Meng Y, Kang S, Fishman DA (2005) Lysophosphatidic acid stimulates fas ligand microvesicle release from ovarian cancer cells. *Cancer Immunol Immunother* 54: S.807–814
149. Labani-Motlagh A, Israelsson P, Ottander U et al. (2015) Differential expression of ligands for NKG2D and DNAM-1 receptors by epithelial ovarian cancer-derived exosomes and its influence on NK cell cytotoxicity. *Tumor Biol.* 37: S.5455–5466
150. Kelleher RJ, Balu-Iyer S, Loyall J et al. (2015) Extracellular vesicles present in human ovarian tumor microenvironments induce a phosphatidylserine-dependent arrest in the T-cell signaling cascade. *Cancer Immunol Res* 3: S.1269–1278
151. Czystowska-Kuzmich M, Sosnowska A, Nowis D et al. (2019) Small extracellular vesicles containing arginase-1 suppress T-cell responses and promote tumor growth in ovarian carcinoma. *Nat Commun* 10: 3000
152. Zhou J, Li X, Wu X et al. (2018) Exosomes released from tumor-associated macrophages transfer miRNAs that induce a Treg/Th17 cell imbalance in epithelial ovarian cancer. *Cancer Immunol Res* 6: S.1578–1592
153. Nakamura K, Sawada K, Kinose Y et al. (2017) Exosomes promote ovarian cancer cell invasion through transfer of CD44 to peritoneal mesothelial cells. *Mol Cancer Res*: S.78–92
154. Samuel P, Mulcahy LA, Furlong F et al. (2018) Cisplatin induces the release of extracellular vesicles from ovarian cancer cells that can induce invasiveness and drug resistance in bystander cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 373: 20170065

155. Liu Y, Cao X (2016) Characteristics and significance of the pre-metastatic niche. *Cancer Cell* 30: S.668–681
156. Chen X, Zhou J, Li X et al. (2018) Exosomes derived from hypoxic epithelial ovarian cancer cells deliver microRNAs to macrophages and elicit a tumor-promoted phenotype. *Cancer Lett* 435: S.80–91
157. Yi H, Ye J, Yang X-M et al. (2015) High-grade ovarian cancer secreting effective exosomes in tumor angiogenesis. *Int J Clin Exp Pathol* 8: S.5062–5070
158. Nakamura K, Sawada K, Kobayashi M et al. (2019) Role of the exosome in ovarian cancer progression and its potential as a therapeutic target. *Cancers (Basel)* 11: 1147
159. Feng W, Dean DC, Hornicek FJ et al. (2019) Exosomes promote pre-metastatic niche formation in ovarian cancer. *Mol Cancer* 18: 124
160. Safaei R, Larson BJ, Cheng TC et al. (2005) Abnormal lysosomal trafficking and enhanced exosomal export of cisplatin in drug-resistant human ovarian carcinoma cells. *Mol Cancer Ther* 4: S.1595–1604
161. Pink RC, Samuel P, Massa D et al. (2015) The passenger strand, miR-21-3p, plays a role in mediating cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol* 137: S.143–151
162. Crow J, Atay S, Banskota S et al. (2017) Exosomes as mediators of platinum resistance in ovarian cancer. *Oncotarget* 8: S.11917–11936
163. Zhu X, Shen H, Yin X et al. (2019) Macrophages derived exosomes deliver miR-223 to epithelial ovarian cancer cells to elicit a chemoresistant phenotype. *J Exp Clin Cancer Res* 38: 81
164. Huang H-L, Hsing H-W, Lai T-C et al. (2010) Trypsin-induced proteome alteration during cell subculture in mammalian cells. *J Biomed Sci* 17: 36
165. Huang X, Weimer J, Wurmb-Schwark N von et al. (2016) Alteration of STR profiles in ovarian carcinoma cells during primary culture. *Arch Gynecol Obstet* 294: S.369–376
166. Strober W (2015) Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol* 111: A3.B.1–A3.B.3
167. Ashiru O, Boutet P, Fernández-Messina L et al. (2010) Natural killer cell cytotoxicity is suppressed by exposure to the human NKG2D ligand MICA*008 that is shed by tumor cells in exosomes. *Cancer Res* 70: S.481–489
168. Chitadze G, Lettau M, Bhat J et al. (2013) Shedding of endogenous MHC class I-related chain molecules A and B from different human tumor entities: Heterogeneous involvement of the "a disintegrin and metalloproteases" 10 and 17. *Int J Cancer* 133: S.1557–1566
169. Arnold P, Himmels P, Weiß S et al. (2014) Antigenic and 3D structural characterization of soluble X4 and hybrid X4-R5 HIV-1 Env trimers. *Retrovirology* 11: 42
170. Matyash V, Liebisch G, Kurzchalia TV et al. (2008) Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. *J Lipid Res* 49: S.1137–1146
171. Kielkopf CL, Bauer W, Urbatsch IL (2020) Bradford Assay for Determining Protein Concentration. *Cold Spring Harb Protoc* 4: 102269
172. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: S.680–685
173. Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: S.4350–4354
174. Burnette WN (1981) "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry* 112: S.195–203
175. Lettau M, Armbrust F, Dohmen K et al. (2018) Mechanistic peculiarities of activation-induced mobilization of cytotoxic effector proteins in human T cells. *Int Immunol* 30: S.215–228

176. Nornadiah Mohd Razali, Yap Bee Wah (2011) Power comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling tests. *Journal of Statistical Modeling and Analytics* 2: S.21–33
177. Holm (1979) A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian Journal of Statistics* 6: S.65–70
178. Friedman (1937) The use of ranks to avoid the assumption of normality implicit in the analysis of variance. *Journal of the American Statistician Association* 32: S.675–701
179. Dunn (1964) Multiple comparisons using rank sums. *Technometrics* 6: S.241–252
180. Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT et al. (2013) Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles* 2: 20360
181. Jeyaram A, Jay SM (2017) Preservation and storage stability of extracellular vesicles for therapeutic applications. *AAPS J* 20: 1
182. Bosch S, Beaurepaire L de, Allard M et al. (2016) Trehalose prevents aggregation of exosomes and cryodamage. *Sci Rep* 6: 36162
183. Ayantunde AA, Parsons SL (2007) Pattern and prognostic factors in patients with malignant ascites: a retrospective study. *Ann Oncol* 18: S.945–949
184. Kipps E, Tan DSP, Kaye SB (2013) Meeting the challenge of ascites in ovarian cancer: new avenues for therapy and research. *Nat Rev Cancer* 13: S.273–282
185. Ahmed N, Stenvers KL (2013) Getting to know ovarian cancer ascites: opportunities for targeted therapy-based translational research. *Front Oncol* 3: S.256
186. Caruso S, Poon IKH (2018) Apoptotic cell-derived extracellular vesicles: more than just debris. *Front Immunol* 9: S.1486
187. Battistelli M, Falcieri E (2020) Apoptotic bodies: particular extracellular vesicles involved in intercellular communication. *Biology (Basel)* 9: 21
188. Simpson RJ, Mathivanan S (2012) Extracellular microvesicles: The need for internationally recognised nomenclature and stringent purification criteria. *Proteomics & Bioinformatics* 5: 2
189. Vera N, Acuña-Gallardo S, Grünenwald F et al. (2019) Small extracellular vesicles released from ovarian cancer spheroids in response to cisplatin promote the pro-tumorigenic activity of mesenchymal stem cells. *Int J Mol Sci* 20: 4972
190. Wada I, Rindress D, Cameron PH et al. (1991) SSR alpha and associated calnexin are major calcium binding proteins of the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* 266: S.19599–19610
191. Subedi P, Schneider M, Philipp J et al. (2019) Comparison of methods to isolate proteins from extracellular vesicles for mass spectrometry-based proteomic analyses. *Analytical Biochemistry* 584: 113390
192. Keklikoglou I, Cianciaruso C, Güç E et al. (2018) Chemotherapy elicits pro-metastatic extracellular vesicles in breast cancer models. *Nat Cell Biol* 21: S.190–202
193. Karimi N, Cvjetkovic A, Jang SC et al. (2018) Detailed analysis of the plasma extracellular vesicle proteome after separation from lipoproteins. *Cell Mol Life Sci* 75: S.2873–2886
194. Gross J, Sayle S, Karow AR et al. (2016) Nanoparticle tracking analysis of particle size and concentration detection in suspensions of polymer and protein samples: Influence of experimental and data evaluation parameters. *Eur J Pharm Biopharm* 104: S.30–41
195. Takov K, Yellon DM, Davidson SM (2019) Comparison of small extracellular vesicles isolated from plasma by ultracentrifugation or size-exclusion chromatography: yield, purity and functional potential. *J Extracell Vesicles* 8: 1560809
196. Lőrincz ÁM, Timár CI, Marosvári KA et al. (2014) Effect of storage on physical and functional properties of extracellular vesicles derived from neutrophilic granulocytes. *J Extracell Vesicles* 3: 25465

197. Kreke, Michelle (Marina Del Rex, CA, US), Smith, Rachel (Cary, NC, US), Hanscome, Peter (East Stroudsburg, PA, US), Peck, Kiel (Los Angeles, CA, US), Ibrahim, Ahmed (2016) Processes for producing stable exosome formulations (14/958804)
198. Hedemann N, Herz A, Schiepers JH et al. (2021) ADAM17 inhibition increases the impact of cisplatin treatment in ovarian cancer spheroids. *Cancers (Basel)* 13: 2039
199. Godwin AK, Meister A, O'Dwyer PJ et al. (1992) High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase of glutathione synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: S.3070–3074
200. Ma J, Maliepaard M, Kolker HJ et al. (1998) Abrogated energy-dependent uptake of cisplatin in a cisplatin-resistant subline of the human ovarian cancer cell line IGROV-1. *Cancer Chemother Pharmacol* 41: S.186–192
201. Costa Verdera H, Gitz-Francois JJ, Schiffelers RM et al. (2017) Cellular uptake of extracellular vesicles is mediated by clathrin-independent endocytosis and macropinocytosis. *J Control Release* 266: S.100–108
202. Bonsergent E, Grisard E, Buchrieser J et al. (2021) Quantitative characterization of extracellular vesicle uptake and content delivery within mammalian cells. *Nat Commun* 12: S.1864
203. Joshi BS, Beer MA de, Giepmans BNG et al. (2020) Endocytosis of extracellular vesicles and release of their cargo from endosomes. *ACS Nano* 14: S.4444–4455
204. Luga V, Zhang L, Vitoria-Petit AM et al. (2012) Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration. *Cell* 151: S.1542–1556
205. Christianson HC, Svensson KJ, van Kuppevelt TH et al. (2013) Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: S.17380–17385
206. Antonyak MA, Li B, Boroughs LK et al. (2011) Cancer cell-derived microvesicles induce transformation by transferring tissue transglutaminase and fibronectin to recipient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: S.4852–4857
207. Mariño G, Kroemer G (2013) Mechanisms of apoptotic phosphatidylserine exposure. *Cell Res* 23: S.1247–1248
208. Keller S, König A-K, Marmé F et al. (2009) Systemic presence and tumor-growth promoting effect of ovarian carcinoma released exosomes. *Cancer Lett* 278: S.73–81
209. Svensson KJ, Christianson HC, Wittrup A et al. (2013) Exosome uptake depends on ERK1/2-heat shock protein 27 signaling and lipid raft-mediated endocytosis negatively regulated by caveolin-1. *J Biol Chem* 288: S.17713–17724
210. Du Feng, Zhao W-L, Ye Y-Y et al. (2010) Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic* 11: S.675–687
211. Escrevente C, Keller S, Altevogt P et al. (2011) Interaction and uptake of exosomes by ovarian cancer cells. *BMC cancer* 11: S.1–10
212. Ostalecki C, Wittki S, Lee J-H et al. (2016) HIV Nef- and Notch1-dependent endocytosis of ADAM17 induces vesicular TNF secretion in chronic HIV infection. *EBioMedicine* 13: S.294–304
213. Lopez, R.I., Paul, J., Atkinson, R., Soukop, M. et al. Prognostic factor analysis, for patients with no evidence of disease after initial chemotherapy for advanced epithelial ovarian carcinoma. *International Journal of Gynecological Cancer* 6: S.8–14
214. Mitra A, Yoshida-Court K, Solley TN et al. (2021) Extracellular vesicles derived from ascitic fluid enhance growth and migration of ovarian cancer cells. *Sci Rep* 11: 9149
215. Yamamoto CM, Oakes ML, Murakami T et al. (2018) Comparison of benign peritoneal fluid- and ovarian cancer ascites-derived extracellular vesicle RNA biomarkers. *Journal of ovarian research* 11: S.1–9
216. Yokoi A, Yoshioka Y, Yamamoto Y et al. (2017) Malignant extracellular vesicles carrying MMP1 mRNA facilitate peritoneal dissemination in ovarian cancer. *Nat Commun* 8: 14470

217. Reid GE, McLuckey SA (2002) 'Top down' protein characterization via tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 37: S.663–675
218. Reiß, K., Evers, A. (2011) ADAM17 (ADAM metallopeptidase domain 17). <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/ADAM17ID572ch2p25.html>. Accessed 05 Dec 2021
219. Düsterhöft S, Jung S, Hung C-W et al. (2013) Membrane-proximal domain of a disintegrin and metalloprotease-17 represents the putative molecular switch of its shedding activity operated by protein-disulfide isomerase. *J Am Chem Soc* 135: S.5776–5781
220. Düsterhöft S, Höbel K, Oldefest M et al. (2014) A disintegrin and metalloprotease 17 dynamic interaction sequence, the sweet tooth for the human interleukin 6 receptor*. *J Biol Chem* 289: S.16336–16348
221. AAT Bioquest I "Quest Calculate™ Peptide and Protein Molecular Weight Calculator.". <https://www.aatbio.com/tools/calculate-peptide-and-protein-molecular-weight-mw>. Accessed 30 Jul 2021

9 Anhang

9.1 Charakterisierung von PMA- und Cisplatin-EV mittels *Nanoparticle Tracking Analysis*

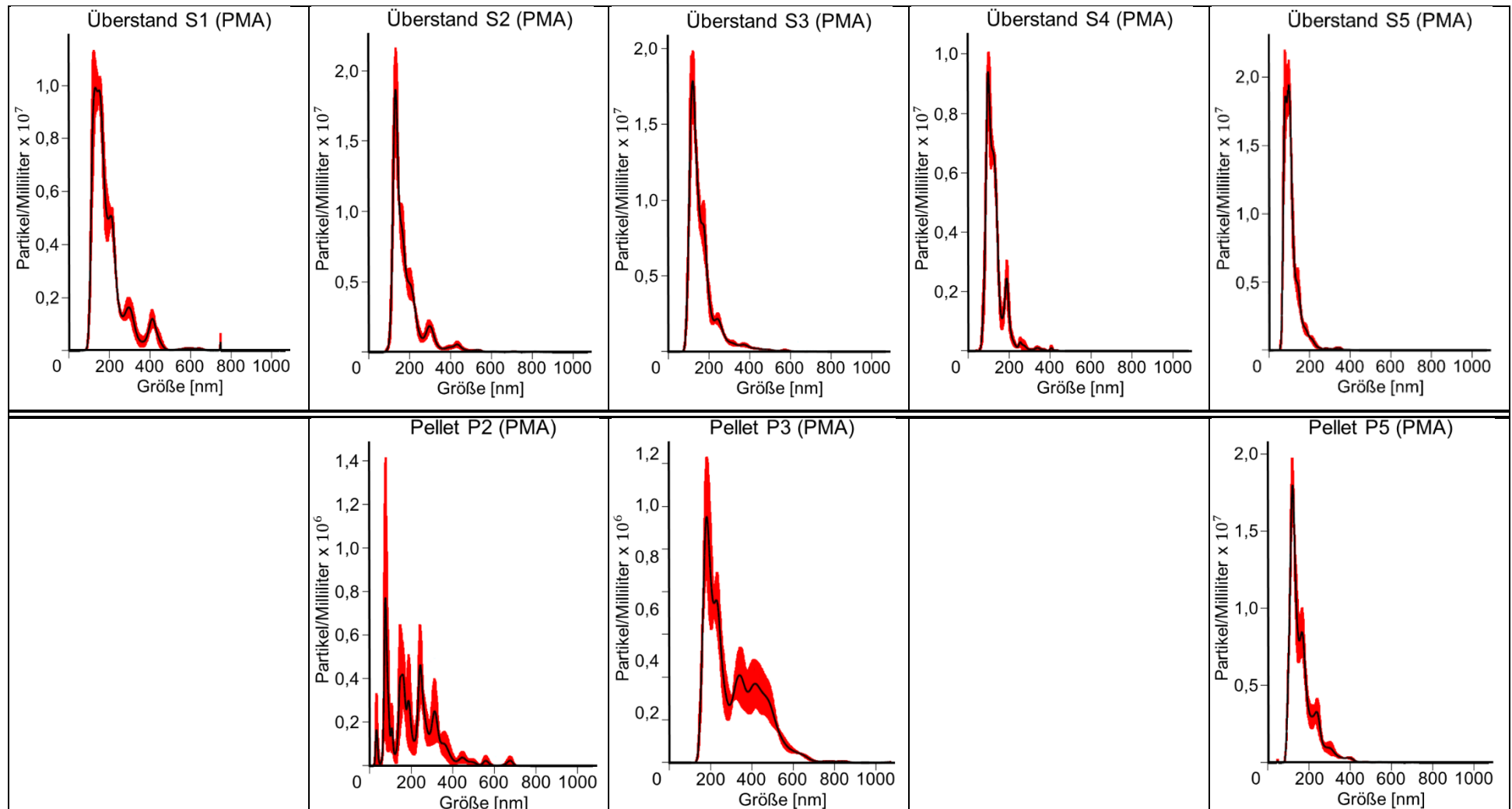


Abbildung 9.1: NTA zur Bestimmung der Größe und Konzentration von Partikeln in Überständen und Pellets nach PMA-Stimulation von Igrov-1-Zellen und deren Prozessierung gemäß Anreicherungsprotokoll (2/3).

Die Überstände PMA-stimulierter (2 nM) Igrov-1-Zellen wurden prozessiert (Abb. 4.3). Die Überstände S1_{PMA} bis S5_{PMA} und die Pellets P2_{PMA}, P3_{PMA}, P5_{PMA} wurden mittels NTA untersucht. Die gezeigten Daten entstammen einem Experiment; jeder Graph repräsentiert mindestens drei unabhängige Messungen. Experimentdurchführung zwei von drei.

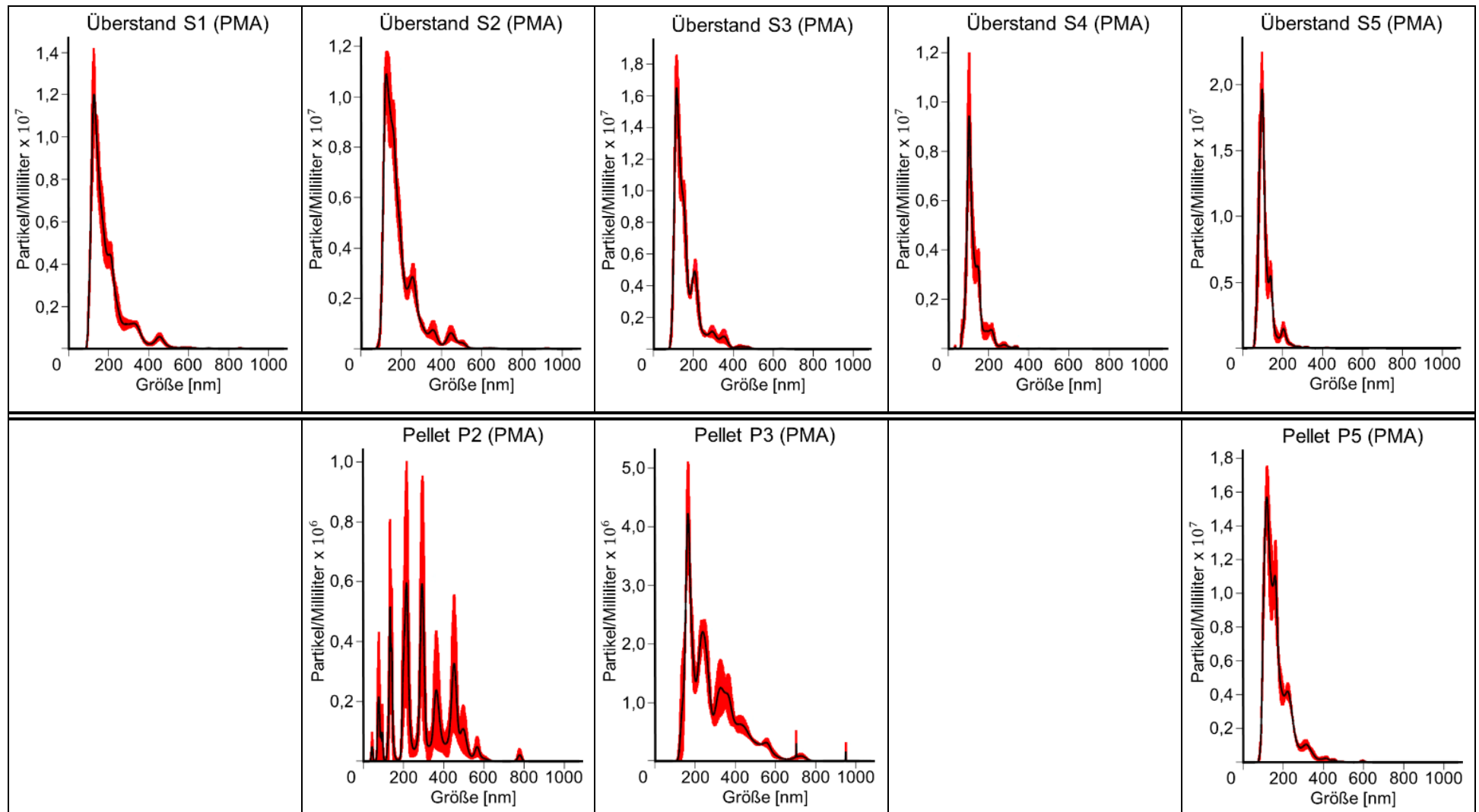


Abbildung 9.2: NTA zur Bestimmung der Größe und Konzentration von Partikeln in Überständen und Pellets nach PMA-Stimulation von Igrov-1-Zellen und deren Prozessierung gemäß Anreicherungsprotokoll (3/3).

Die Überstände PMA-stimulierter (2 nM) Igrov-1-Zellen wurden prozessiert (Abb. 4.3). Die Überstände S1_{PMA} bis S5_{PMA} und die Pellets P2_{PMA}, P3_{PMA}, P5_{PMA} wurden mittels NTA untersucht. Die gezeigten Daten entstammen einem Experiment; jeder Graph repräsentiert mindestens drei unabhängige Messungen. Experimentdurchführung drei von drei.

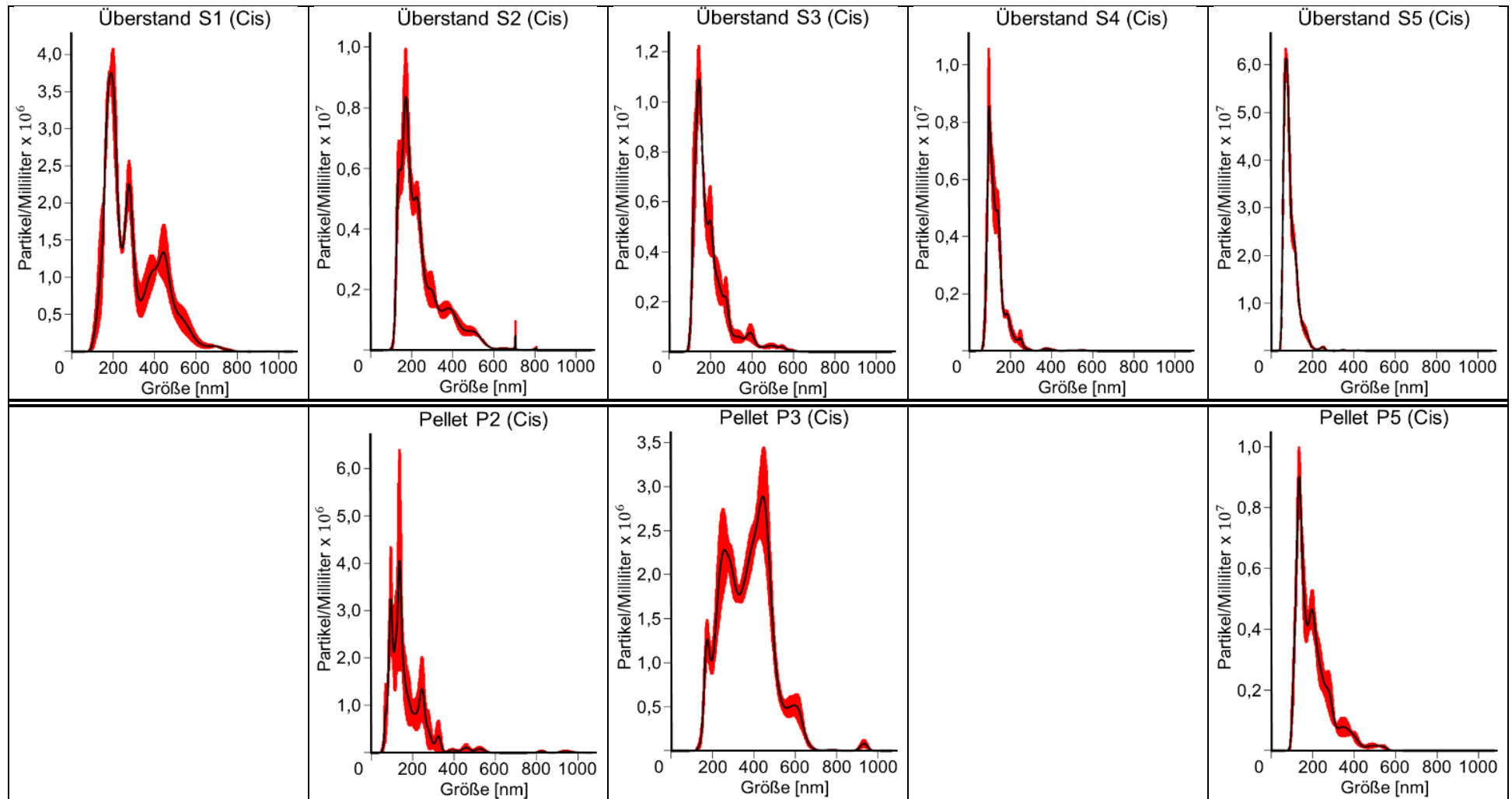


Abbildung 9.3: NTA zur Bestimmung der Größe und Konzentration von Partikeln in Überständen und Pellets nach Cisplatin-Stimulation von Igrov-1-Zellen und deren Prozessierung gemäß Anreicherungsprotokoll (2/3).

Die Überstände Cisplatin-stimulierter (7,5 μ M) Igrov-1-Zellen wurden prozessiert (Abb.4.3). Die Überstände S1_{Cis} bis S5_{Cis} und die Pellets P2_{Cis}, P3_{Cis}, P5_{Cis} wurden mittels NTA untersucht. Die gezeigten Daten entstammen einem Experiment, jeder Graph repräsentiert mindestens drei unabhängige Messungen. Experimentdurchführung zwei von drei.

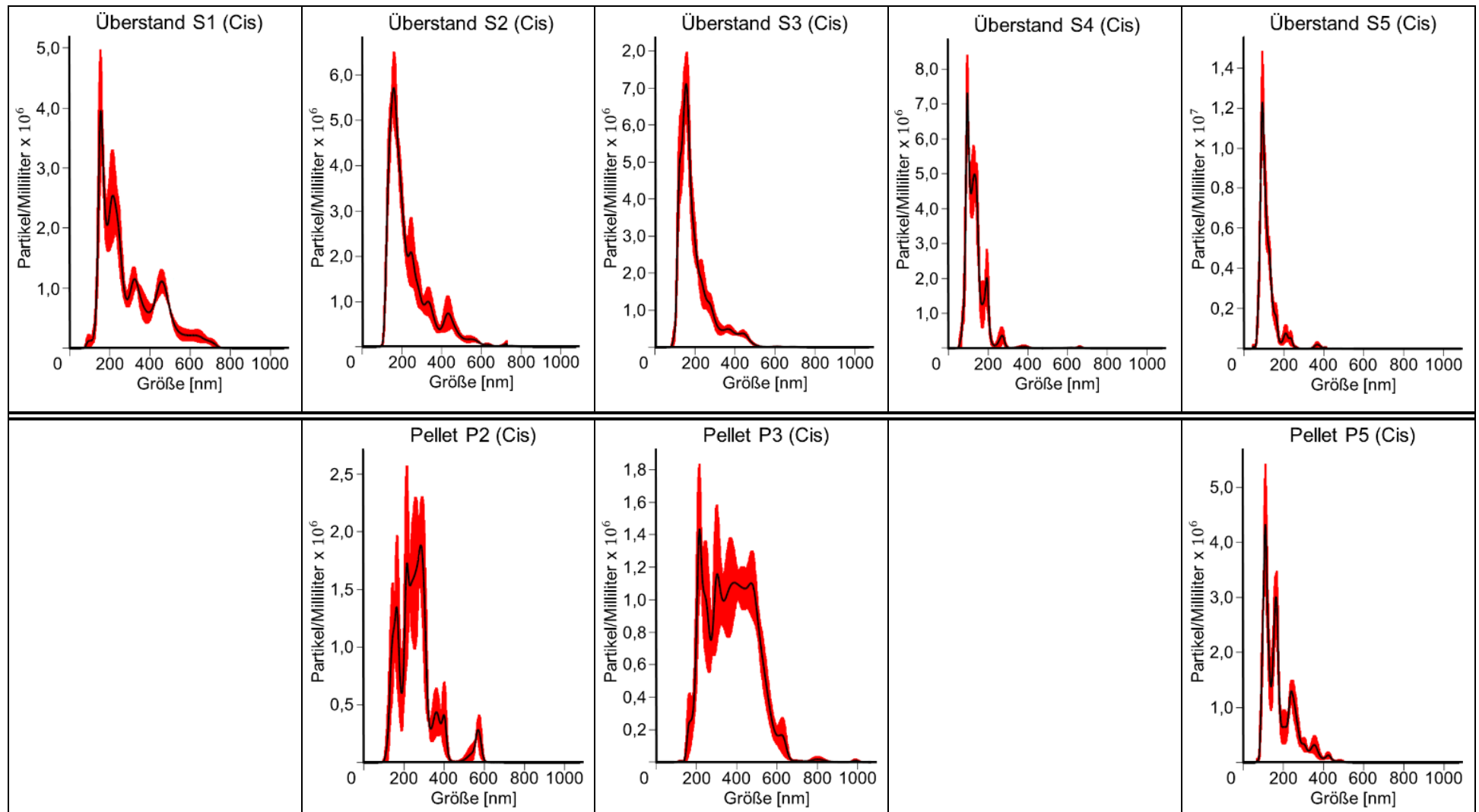


Abbildung 9.4: NTA zur Bestimmung der Größe und Konzentration von Partikeln in Überständen und Pellets nach Cisplatin-Stimulation von Igrov-1-Zellen und deren Prozessierung gemäß Anreicherungsprotokoll (3/3).

Die Überstände Cisplatin-stimulierter (7,5 μ M) Igrov-1-Zellen wurden prozessiert (Abb. 4.3). Die Überstände S1_{Cis} bis S5_{Cis} und die Pellets P2_{Cis}, P3_{Cis}, P5_{Cis} wurden mittels NTA untersucht. Die gezeigten Daten entstammen einem Experiment; jeder Graph repräsentiert mindestens drei unabhängige Messungen. Experimentdurchführung drei von drei.

9.2 Transmissionselektronenmikroskopische Übersichtsaufnahmen zur EV-Charakterisierung

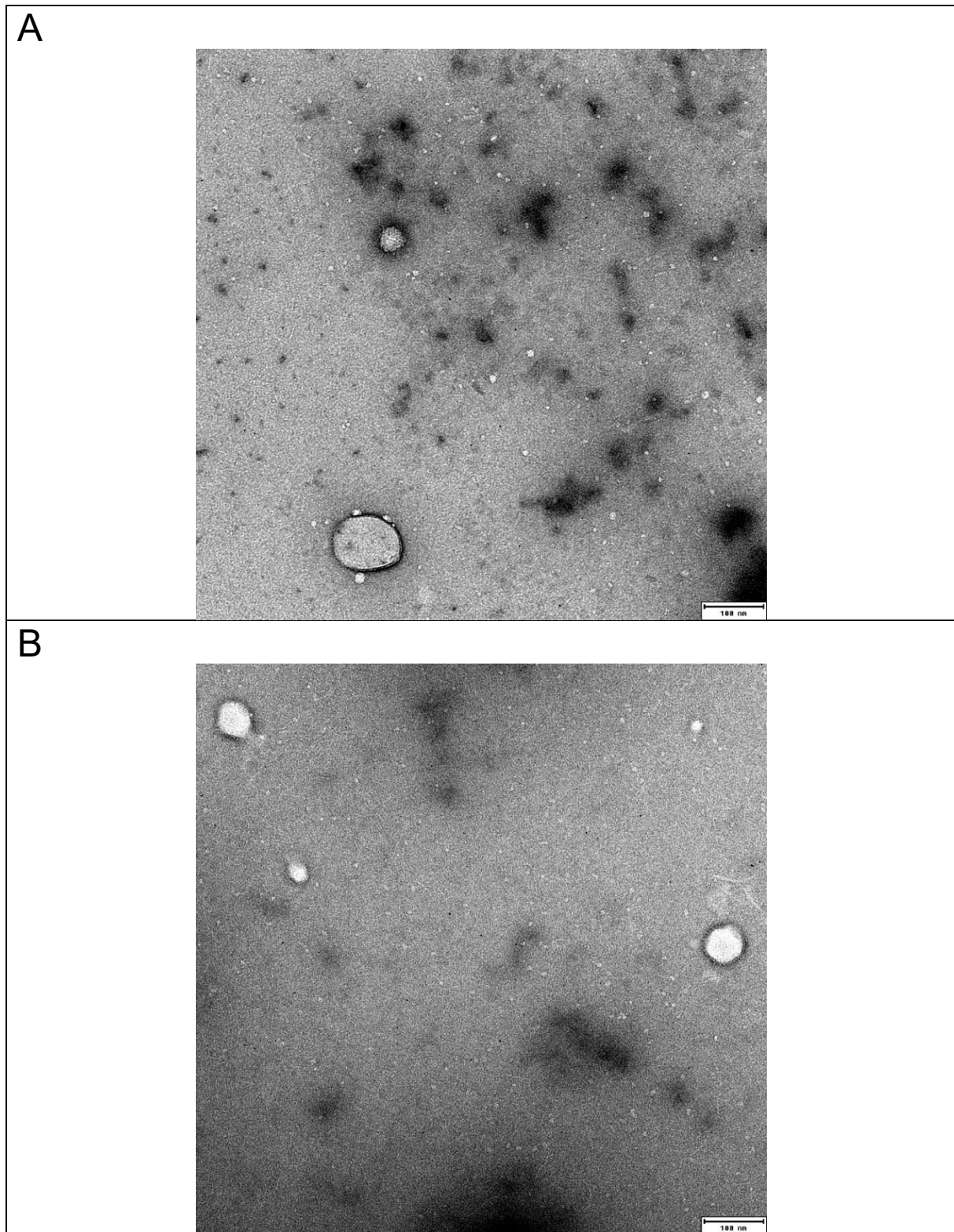


Abbildung 9.5: Elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahmen von Partikeln der Pellets P5_{PMA} und P5_{CIS}. Ein Teil der Pellets P5_{PMA} (A) und P5_{CIS} (B) (Kap. 3.3.3) wurden in PBS aufgenommen und für 18 Tage bei -80 °C kryokonserviert (Kap. 3.3.3, 4.2.3). Die angereicherten Partikel wurden mit einer halbgesättigten Uranylacetat-Lösung gefärbt (*negative staining*) und anschließend mittels Transmissionselektronenmikroskopie visualisiert. Maßstab 100 nm.

9.3 Transmissionselektronenmikroskopische Übersichtsaufnahmen zur Beurteilung der EV-Lagerungsfähigkeit

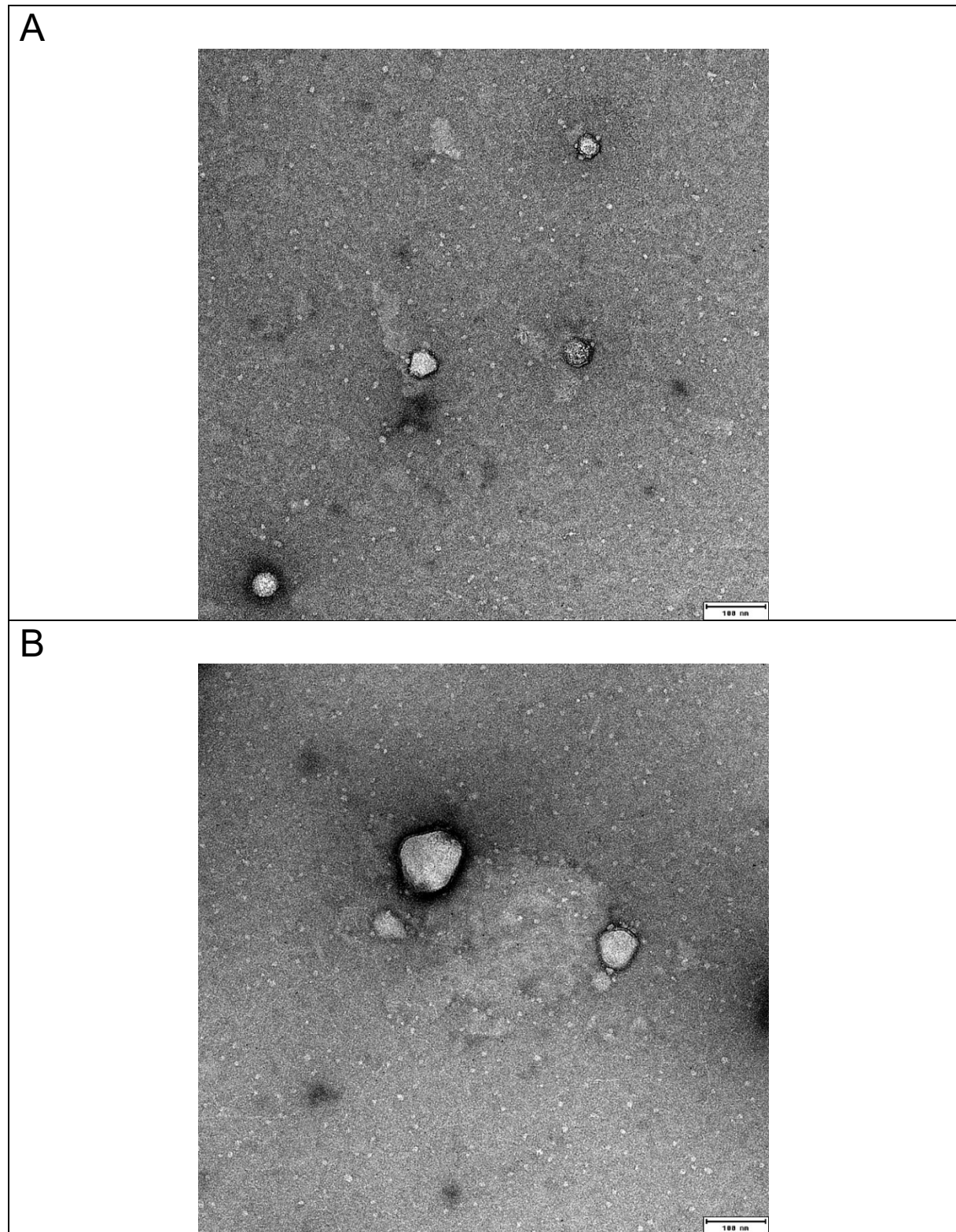


Abbildung 9.6: Elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahmen von in Trehalose suspendierten Partikeln der Pellets P5_{PMA} und P5_{Cis}.

Ein Teil der Pellets P5_{PMA} (A) und P5_{Cis} (B) (Kap. 3.3.3) wurde in 25 mM Trehalose aufgenommen und für 18 Tage bei -80 °C kryokonserviert (Kap. 3.3.3, 4.2.3). Die angereicherten Partikel wurden mit einer halbgesättigten Uranylacetat-Lösung gefärbt (*negative staining*) und anschließend mittels Transmissionselektronenmikroskopie visualisiert. Maßstab 100 nm.

9.4 Bestimmung der Konzentration und durchschnittlichen Größe von EV als Vorbereitung der EV-Aufnahmeexperimente

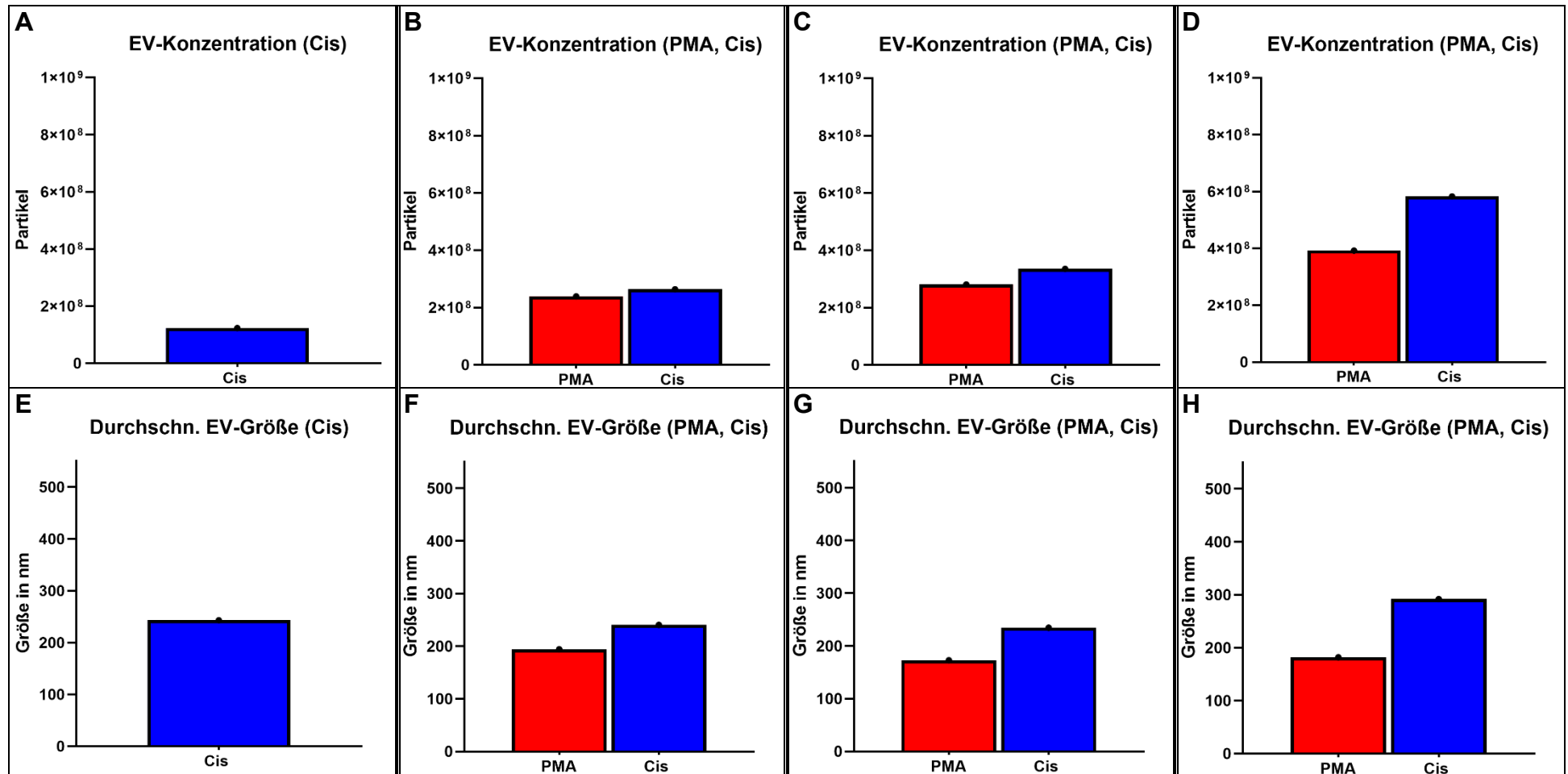


Abbildung 9.7: NTA zur Bestimmung der EV-Konzentrationen und durchschnittlichen EV-Größen als Vorbereitung der EV-Aufnahmeexperimente (Kap. 4.5).

Die Zellkulturüberstände mit PMA- (2 nM) und Cisplatin-behandelten (7,5 μ M) Igrov-1-Zellen wurden unter Verwendung des in Abb. 4.3 dargestellten Protokolls prozessiert. Dargestellt sind die Konzentration sowie die durchschnittlichen Größen der für das *Live-Cell Imaging*-Experiment (Kap. 4.5.1) (A, E), sowie der für die Imaging-Durchflusszytometrie-Experimente (Kap. 4.5.2) (B, F; C, G; D, H) verwendeten EV. Alle Partikelmengen wurden gemäß der Anzahl ausgebrachter Zellen ($3,5 \times 10^6$) normiert (Kap. 3.1.4, 3.3.2).

9.5 Berechnung der Domänenstruktur von ADAM17

9.5.1 Aminosäuresequenz und Domänenstruktur von ADAM17

10	20	30	40	50	60
MRQSLFLTS	VVPFVLAPRP	PDDPGFGPHQ	RLEKLDSSL	DYDILSLSNI	QQHSVRKRD
70	80	90	100	110	120
QTSTHVELL	TFSALKRHFK	LYLTSSTERF	SQNFKVVVVD	GKNESEYTVK	WQDFFTGHV
130	140	150	160	170	180
GEPDSRVLAH	IRDDDVIIRI	NTDGAEYNIE	PLWRFVNDTK	DKRMLVYKSE	DIKNVSRLOS
190	200	210	220	230	240
PKVCGYLVKVD	NEELLPKGLV	DREPPEELVH	RVKRRADPD	PK	NTCKLLV
250	260	270	280	290	300
RGEESTTNY	LIELIDRVDD	IYRNTSWDNA	GFKGYGIQIE	QIRILKSPQE	VKPGEKHYNM
310	320	330	340	350	360
AKSYPNEEKD	AWDVKMLLEQ	FSFDIAEEAS	KVCLAHLFTY	QDFDMGTLGL	AYVGSPRANS
370	380	390	400	410	420
HGGVCPKAYY	SPVGKKNIYL	NSGLTSTKNY	GKTILTKEAD	LVTTHLGHN	FGAEHDPDGL
430	440	450	460	470	480
AECAPNEDQG	GKYVMYPIAV	SGDHENNKMF	SNCSKQSIYK	TIESKAQECF	QERSNKV
490	500	510	520	530	540
SRVDEGEECD	PGIMYLNNDT	CCNSDCTLKE	GVQCSDRNSP	CCKNCQFETA	QKKCQEAINA
550	560	570	580	590	600
TCKGVSCTG	NSSECPPGN	AEDDTVCLDL	GKCKDGKCIP	FCEREQQLES	CACNETDNSC
610	620	630	640	650	660
KVCCRDLGR	CVPYVDAEQK	NLFLRKGKPC	TVGFCDMNGK	CEKRVQDVIE	RFWDFIDQLS
670	680	690	700	710	720
INTFGKFLAD	NIVGSVLVFS	LIFWIPFSIL	VHCV	DKKLDK	QYESLSLFHP
730	740	750	760	770	780
SASVRIKPF	PAPQTPGRLQ	PAPVIPSAPA	APKLDHQMD	TIQEDPSTDS	HMDDEDGFEKD
790	800	810	820		
PFPNSSAAK	SFEDLTDHPV	TRSEKAASFK	LQRQNRVDSK	ETEC	

Abbildung 9.8: Aminosäuresequenz und Domänenstruktur der Metalloprotease ADAM17.

Die Aminosäuresequenz (NCBI Reference Sequence: NP_003174.3) von ADAM17 wurde entsprechend Dr. Astrid Evers und Prof. Dr. Karina Reiss (2011) [218] in eine Prodomäne (türkis), eine Metalloproteasedomäne (grün), eine Disintegrin-like-Domäne (lila), eine Transmembrandomäne (grau) und eine zytoplasmatische Domäne (petrol) eingeteilt. Zusätzlich wurde eine membranproximale Domäne (gelb), eine CANDIS-Region (rot) entsprechend Grötzinger et al. (2017) unterschieden [45, 219, 220].

9.5.2 Berechnung der Molekularen Massen der Domänen von ADAM17

Die Berechnung der molekularen Massen der verschiedenen in Kapitel 9.5.1 bzw. in Abbildung 9.8 dargestellten Domänen von ADAM17 wurde mit dem Programm *Quest Calculate™ Peptide and Protein Molecular Weight Calculator* (<https://www.aatbio.com/tools/calculate-peptide-and-protein-molecular-weight-mw>) durchgeführt [221]. Es ist anzumerken, dass etwaige Veränderungen der Proteinmasse durch Glykolisierungen etc. nicht berücksichtigt wurden.

Tabelle 2: Eigene Berechnung des molekularen Gewichts der verschiedenen ADAM17-Domänen, entsprechend einer Einteilung von Grötzinger et al. (2017)

	molekulares Gewicht
Prodomäne	24,8 kDa
Metalloproteasedomäne	28,8 kDa
Disintegrin-like-Domäne	8,3 kDa
Membranproximale Domäne	7,0 kDa
CANDIS-Region	3,0 kDa
Transmembrandomäne	2,6 kDa
zytoplasmatische Domäne	14,5 kDa
Gesamt Protein	93,0 kDa

9.6 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Dirk Bauerschlag, der mir die Bearbeitung dieses spannenden Dissertationsthemas anvertraute und ausgezeichnete Rahmenbedingungen für dessen Bearbeitung schuf. Ich danke ihm zudem, für die zahlreichen motivierenden persönlichen Gespräche, für seinen inspirierenden translationalen Ansatz in Forschungsvorhaben und die Fülle guter Ratschläge mit welchen er mein Promotionsvorhaben unterstützte. Dazu bin ich unserem Kooperationspartner Prof. Dr. Ottmar Janßen vom Institut für Immunologie zu großem Dank verpflichtet, der mich in seinem Labor aufnahm, mir half Kontakte zu anderen Instituten aufzubauen und mich in konstruktiven Diskussionen förderte und forderte. Dankbar bin ich auch für die Unterstützung durch meine Betreuer Dr. Nina Hedemann und Dr. Marcus Lettau die mich mit ihrer Begeisterung für extrazelluläre Vesikel und ADAM17 ansteckten, mich in zahlreiche experimentelle Methoden einwiesen und mich bei der Planung meiner Arbeit unterstützten. Ich bedanke mich bei allen vier, dass sie mir bei Fragen zu jeder Zeit mit Geduld und Verständnis zur Verfügung standen.

Ich bedanke mich auch bei Prof. Dr. Nicolai Maass, dem Direktor der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe. Mir hat es große Freude bereitet in seiner Abteilung zu arbeiten und zu promovieren. Darüber hinaus gilt mein Dank Dr. Martina Böttner, Dr. Philipp Arnold und Frank Lichte vom anatomischen Institut für den fachlichen Austausch sowie die Erstellung transmissionselektronenmikroskopischer Aufnahmen. Ich danke auch Dr. Dominik Schwudke und seiner Arbeitsgruppe für die Durchführung von Lipidextraktionen sowie deren massenspektrometrische Analyse. Des Weiteren danke ich Dr. Hinrich Hansen und Frau Mila Lobastova für das zur Verfügung stellen eines Protokolls zur Fluoreszenzmarkierung von EV.

Ich bedanke mich auch bei Dr. Inken Flörkemeier, Catharina Verkooyen, Sigrid Hamann, Doris Karow und Frank Rösel für ihre tatkräftige Unterstützung und kraftgebende Pausen. Darüber hinaus bedanke ich mich bei den wunderbaren Doktoranden und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Hedemann und des Instituts für Immunologie.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Freundinnen und Freunden und meiner Familie für ihre Geduld, ihre Liebe und rückhaltlose Unterstützung bedanken.

9.7 Publikationen

Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht

Originalarbeiten

Hugendieck G, Lettau M, Andreas S, Neumann S, Reinhard N, Arnold P, Theilig F, Bastian L, Rogmans C, Weimer J, Flörkemeier I, Wesch D, Arnold N, Maass N, Janssen O, Bauerschlag D, Hedemann N (submitted 10/2022) Chemotherapy-induced release of ADAM17 bearing EV as a potential resistance mechanism in Ovarian Cancer. Journal of extracellular vesicles

Rogmans C, Kuhlmann JD, Hugendieck G, Link T, Arnold N, Weimer J, Flörkemeier I, Rambow AC, Lieb W, Maass N, Bauerschlag D, Hedemann N (2021) ADAM17-A potential blood-based biomarker for detection of early-stage ovarian cancer. Cancers (Basel) 13: 5563

Tagungsbeiträge:

Hugendieck G, Lettau M, Janßen O, Arnold N, Maass N, Bauerschlag D, Hedemann N, Chemotherapie-induzierte Exosomenfreisetzung im Ovarialkarzinom – spielt die Metalloprotease ADAM17 eine Rolle in der Resistanzvermittlung? 11. Wissenschaftliches Symposium der AGO-TraFo, Oktober 2019.

Poster:

Hedemann N, Feuerborn J, Rogmansm C, Tribian N, Herz A, Treeck L, Hugendieck G, Yousry C, Yanni Y, Weimer J, Arnold N, Maass N, Bauerschlag D. A Disintegrin and Metalloprotease 17 (ADAM17) induzierte Wachstumsfaktorfreisetzung in der Platin-Resistenz-Entstehung des Ovarialkarzinoms. 113. Tagung der NGGG, Juni 2019.

9.8 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere hiermit an Eides Statt, dass meine Dissertation, abgesehen von Ratschlägen meines Betreuers und meiner Betreuerin und meiner sonstigen akademischen Lehrer, nach Form und Inhalt meine eigene Arbeit ist, dass ich keine anderen als die in der Arbeit aufgeführten Quellen und Hilfsmittel benutzt habe, und dass meine Arbeit bisher keiner anderen akademischen Stelle als Dissertation vorgelegen hat, weder ganz noch in Teilen.

Datum, Unterschrift Doktorand