

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

Modifikation der Exosomenoberfläche mit neuartigen Proteinen mit Hilfe von GPI-Ankern

Dissertation

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



vorgelegt von

Angelika Cornelia Hildegard Blum
aus Schweinfurt

2019

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter:	Prof. Dr. Peter J. Nelson, PhD
Mitberichterstatter:	PD Dr. Kai Hell Prof. Dr. Markus J. Schwarz
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	05.12.2019

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	1
2	Einleitung.....	2
2.1	Mesenchymale Stammzellen.....	2
2.1.1	Definition.....	2
2.1.2	Mesenchymale Stammzellen und Wundheilung.....	2
2.2	Exosomen.....	3
2.2.1	Definition.....	3
2.2.2	Isolation und Charakterisierung.....	5
2.2.3	Entstehung und Freisetzung der Exosomen.....	5
2.2.4	Interaktionen der Exosomen mit den Zielzellen.....	6
2.2.5	Exosomen und Wundheilung.....	6
2.3	Verwendete Proteine.....	7
2.3.1	Besondere Modifikationen – Signalsequenzen.....	7
2.3.2	EGFP-myc-GPI.....	9
2.3.3	Überblick über die weiteren Proteine.....	9
2.3.4	Besonderheiten und Wirkung des GPI-Anker gekoppelten TIMP1.....	10
3	Zielsetzung.....	12
4	Material und Methoden.....	13
4.1	Material.....	13
4.1.1	Chemikalien und Reagenzien.....	13
4.1.2	Enzyme.....	14
4.1.3	Puffer.....	14
4.1.4	Kits.....	14
4.1.5	Antibiotika.....	15
4.1.6	Antikörper.....	15
4.1.6.1	Primäre Antikörper.....	15
4.1.6.2	Sekundäre Antikörper.....	15
4.1.7	Größenstandards.....	15
4.1.8	Bakterien.....	15

4.1.9	Zelllinie.....	15
4.1.10	Primer für die PCR	16
4.1.11	Sonstiges PCR Zubehör.....	16
4.1.12	Plasmide und Vektoren	16
4.1.13	Geräte.....	16
4.1.13.1	Zentrifugen	16
4.1.13.2	Power Supply	17
4.1.13.3	Inkubatoren.....	17
4.1.13.4	Weitere Geräte	17
4.1.13.5	Zubehör	17
4.1.14	Verbrauchsmaterialien.....	18
4.1.15	Software.....	18
4.1.16	Rezepte der im Labor hergestellten Reagenzien	18
4.1.16.1	Reagenzien für die Zellkultur	18
4.1.16.2	Reagenzien für die Mikrobiologie	18
4.1.16.3	Reagenzien für die Molekularbiologie.....	19
4.2	Methoden	20
4.2.1	Zellbiologische Methoden.....	20
4.2.1.1	Zellkultur der immortalisierten mesenchymalen Stammzellen (imMSC)	20
4.2.1.2	Kultivierung der imMSC	20
4.2.1.3	Einfrieren der imMSC	20
4.2.1.4	Bestimmung der Zellzahl	21
4.2.2	Klonierung.....	21
4.2.2.1	Bakterienkultur	21
4.2.2.2	Transformation von kompetenten Escherichia coli (Mach1).....	21
4.2.2.3	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	22
4.2.2.4	Gelelektrophorese.....	22
4.2.2.5	Gelextraktion	23
4.2.2.6	Konzentrationsmessung DNA	23
4.2.2.7	Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien	24

4.2.2.8	Überprüfung der generierten Plasmide	24
4.2.2.8.1	Testverdau.....	24
4.2.2.8.2	Sequenzierung	24
4.2.2.9	Gateway Cloning.....	25
4.2.2.9.1	BP-Rekombinationsreaktion.....	25
4.2.2.9.2	LR-Rekombinationsreaktion für 2 DNA-Fragmente.....	25
4.2.2.10	Transfektion der imMSC mit Hilfe von „Sleeping Beauty“ Transposase	25
4.2.3	Durchflusszytometrie	26
4.2.3.1	Expressionskontrolle der GPI-verankerten Proteine.....	26
4.2.3.2	Fluoreszenz abhängige Zellsortierung	27
4.2.4	Exosomen.....	27
4.2.4.1	Exosomenisolation.....	27
4.2.4.1.1	Exosomenisolation durch Ultrazentrifugation	27
4.2.4.1.2	Exosomenisolation mit dem Kit ExoSpin	28
4.2.4.2	Gesamtzelllysat.....	28
4.2.4.3	Proteinbestimmung nach Bradford.....	28
4.2.5	Western Blot	28
4.2.5.1	Vorbereitung und Gießen der Gele	29
4.2.5.2	Gelelektrophorese.....	29
4.2.5.3	Immunoblot	30
5	Ergebnisse.....	31
5.1	Planung.....	31
5.2	Zelllinien.....	33
5.2.1	Klonierung der Plasmide für die Transfektion.....	33
5.2.1.1	Klonierung der Entry Vektoren	33
5.2.1.2	Klonierung der Expressionsvektoren.....	34
5.2.2	Transfektion der immortalisierten mesenchymalen Stammzellen	34
5.2.3	Expressionskontrolle der Proteine auf der Zellmembran.....	35
5.2.3.1	Expressionskontrolle bei den TIMP-1-myc-GPI exprimierenden Zellen und deren Varianten	35

5.2.3.2	Expressionskontrolle bei den EGFP-myc-GPI exprimierenden Zellen	38
5.2.4	Optimierung der Expression von EGFP-myc-GPI	39
5.3	Exosomenisolation.....	41
5.3.1	Exosomenisolation durch Ultrazentrifugation	41
5.3.2	Exosomenisolation mit dem Kit ExoSpin	43
5.3.3	Nachweis der Exosomen durch Western Blot-Analyse	44
5.4	Expressionskontrolle der Proteine auf den Exosomen	45
6	Diskussion	48
7	Abkürzungsverzeichnis	52
8	Literaturverzeichnis	54
9	Danksagung	59

1 Zusammenfassung

Die Therapie von Gewebedefekten, wie zum Beispiel Hautwunden, stellt ein großes Aufgabengebiet in der Medizin dar. Um diese zu verbessern wurden die Auswirkungen von mesenchymalen Stammzellen aber auch von deren sezernierten Exosomen erforscht. Beide zeigten eine Verbesserung der Wundheilung sowohl in vitro als auch in vivo. Das in vorangegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe um Peter J. Nelson hergestellte und erforschte GPI (Glycosylphosphatidylinositol)-verankerte TIMP1 (tissue inhibitor of metalloproteinases 1) zeigte ebenfalls eine Verbesserung der Wundheilung. Um diese beiden Effekte gegebenenfalls kombinieren zu können, sollte das Fusionsprotein in den Exosomen exprimiert werden. In dieser Arbeit wurden zunächst imMSC (immortalisierte mesenchymale Stammzellen), die die Fusionsproteine TIMP1-myc-GPI, N-TIMP1-myc-GPI, vv-TIMP1-myc-GPI und EGFP-myc-GPI exprimieren, hergestellt. Anschließend wurden von den TIMP1-myc-GPI, den EGFP-myc-GPI und den nicht transfizierten imMSC Exosomen isoliert. Auf den aus den transfizierten, aber nicht auf den aus den untransfizierten imMSC stammenden Exosomen konnten die Fusionsproteine mittels Western Blot dargestellt werden. Somit konnte gezeigt werden, dass durch GPI-verankerte Proteine eine Modifikation der sezernierten Exosomen möglich ist. Dies stellt somit eine Möglichkeit dar die Exosomen für eine Therapie von Gewebedefekten zu optimieren.

2 Einleitung

2.1 Mesenchymale Stammzellen

2.1.1 Definition

Stammzellen sind undifferenzierte bis niedrigdifferenzierte Zellen, die die Fähigkeit besitzen sich selbst zu erneuern und sich zu unterschiedlichen Zellen zu entwickeln [2 – 4]. Diese lassen sich zum einen über ihre Potenz und zum anderen über ihre Herkunft einteilen. Aus totipotenten Stammzellen können sich alle embryonalen Gewebe sowie der embryonale Anteil der Plazenta entwickeln [4]. Pluripotente Stammzellen können sich zu allen Geweben des Embryos entwickeln. Im postnatalen Organismus existieren multipotente Stammzellen, die die Fähigkeit besitzen sich noch zu mehreren Zellen, aber nicht mehr zu allen Zellen des Organismus zu entwickeln. Außerdem existieren noch oligopotente und unipotente Stammzellen, die sich nur noch zu wenigen Zelltypen bzw. nur noch zu einem Zelltyp entwickeln können [3, 4]. Gewebespezifische Stammzellen wie zum Beispiel die Zellen im Stratum basale der Epidermis gewährleisten die ständige Erneuerung der Haut. [4, 5]

Mesenchymale Stammzellen sind multipotente adulte Stammzellen, die unter anderem aus dem Knochenmark, dem Fettgewebe und der Nabelschnur gewonnen werden können [2, 3]. Im Jahr 2006 wurden von der „International Society for Cellular Therapy (ISCT)“ minimale Kriterien, die die Vergleichbarkeit von Studien zu mesenchymalen Stammzellen gewährleisten sollen, erstellt. Hiernach müssen mesenchymale Stammzellen adhärent in Kunststoffzellkulturflaschen unter Standardbedingungen wachsen, die Oberflächenmarker CD44, CD73, CD90, CD105 exprimieren, dürfen die Oberflächenmarker CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79 oder CD19 und HLA-DR nicht exprimieren und müssen sich zu Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten in vitro differenzieren können [2, 6].

2.1.2 Mesenchymale Stammzellen und Wundheilung

Wundheilung ist durch verschiedene Stadien gekennzeichnet. Zunächst erfolgt bei Wunden die Blutstillung durch die Thrombozyten und die Gerinnungsfaktoren des Blutplasmas. Anschließend erfolgt die Inflammation mit Einschwemmung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten und einer Erhöhung der Kapillarpermeabilität. Hierbei wird die Wunde von Fremdmaterial wie zum Beispiel Bakterien gereinigt. Danach folgt die Proliferationsphase, in der sich das Granulationsgewebe bildet, neue Extrazellulärmatrix hergestellt und neue Gefäße sowie neue Epidermiszellen zum Wundverschluss erzeugt werden. Anschließend erfolgt dann der Umbau des neugebildeten Gewebes. Meist entsteht hierbei eine Narbe, die nicht so

hochwertig wie das ursprüngliche Gewebe ist [4, 5, 7]. Eine Verlängerung der Inflammationsphase und eine Dysfunktion verschiedener Zellen wie zum Beispiel der Fibroblasten werden als Ursache von chronischen Wunden diskutiert [5, 7].

In mehreren Studien wurde gezeigt, dass mesenchymale Stammzellen die Wundheilung beschleunigen und sogar optimieren [7 – 11]. Es wurde gezeigt, dass sie zwar auch proliferieren und somit neue Zellen zur Verfügung stellen, aber der größte Effekt durch parakrine Auswirkungen erzeugt wird [7, 8]. Sie erhöhen die Migration von Fibroblasten zur Wundregion [11] und somit die Geschwindigkeit des Wundverschlusses [9]. Auch produzieren mesenchymale Stammzellen eine Reihe von Faktoren, die die Angiogenese fördern wie zum Beispiel VEGF (vascular endothelial growth factor). Dadurch wird die Neubildung von Gefäßen im Wundgebiet und somit auch die Wundheilung gefördert [7 – 10]. Zudem wurde gezeigt, dass die Anwesenheit von mesenchymalen Stammzellen die Anzahl von freien Sauerstoffradikalen vermindert [8]. Zusätzlich modifizieren die mesenchymalen Stammzellen die Inflammationsreaktion und verhindern dadurch eine chronische Entzündung [7 – 9]. Zudem wurde durch Anwesenheit von mesenchymalen Stammzellen die Narbenbildung vermindert bzw. die narbenlose Heilung gefördert. Es wurden zum Beispiel Hautanhangsgebilde in den mit mesenchymalen Stammzellen behandelten verheilten Hautwunden gefunden, die bei narbiger Heilung nicht entstehen und auch die Dicke der neugebildeten Epidermis unterschiedlich [4, 5, 7 – 9].

Mesenchymale Stammzellen erzeugen somit eine Verbesserung der Wundheilung über verschiedene Mechanismen.

2.2 Exosomen

2.2.1 Definition

Exosomen sind kleine von fast allen Zellen sezernierte Vesikel. Sie besitzen eine Doppellipidmembran und sind ungefähr 30-100 nm groß. Die Größenangaben variieren je nach Publikation. Hier ist ein Mittelmaß für die Größe angegeben. Eine schematische Darstellung eines Exosoms ist in Abbildung 1 gezeigt. Exosomen sind in nahezu allen Körperflüssigkeiten zu finden wie z.B. in Blut, Speichel, Urin, Galle, Amnionflüssigkeit und Muttermilch [12 – 15]. Sie enthalten sowohl verschiedene Arten von Nukleinsäuren wie zum Beispiel unterschiedliche Arten von RNA als auch Proteine [12 – 15]. Auf Grund dieser Tatsache nimmt man an, dass Exosomen zur Zellkommunikation zwischen weit entfernten Zellen dienen [12 – 15].

In den Exosomen sind je nach der Ursprungszelle variierende Proteine enthalten. Aber es existieren auch Proteine, die auf den meisten Exosomen vorkommen wie z.B. RAB GTPasen, SNARE, Annexin, Flottilin, Alix, Tsg101, CD63, CD81 und weitere [12, 13, 15,

16]. Zudem hat man gesehen, dass in Exosomen Lipid Rafts und mit diesen Lipidflößen zusammenhängende Lipide, wie Cholesterin, Sphingolipide und Ceramid, und Proteine, wie Glycosylphosphatidylinositol verankerte Proteine und Flottilin, angereichert sind [15 – 18]. Lipid rafts bzw. Lipidflöße sind Mikrodomänen der Plasmamembran, in denen Sphingolipide, Cholesterin und verschiedene Membranproteine angereichert sind [19].

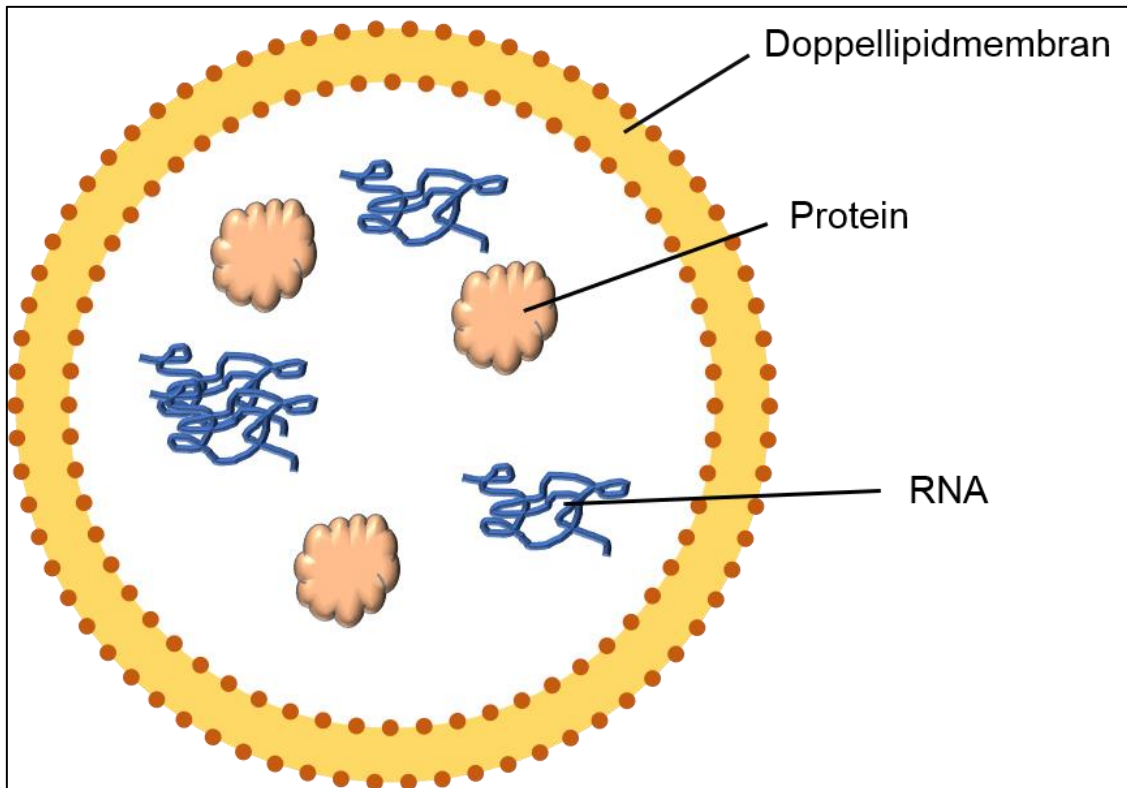


Abbildung 1 Schematische Darstellung eines Exosomes.

Auf dieser Abbildung ist ein Exosom mit seiner Doppellipidmembran und exemplarischem Inhalt dargestellt. Zur Vereinfachung der Grafik sind keine Membranproteine dargestellt. Die Größenrelationen sind frei gewählt und entsprechen nicht der Realität.

Definitionsgemäß entstehen Exosomen aus multivesikulären Körperchen. Der genaue Entstehungsmechanismus der multivesikulären Körperchen ist noch nicht bekannt. Es wurde in Studien beobachtet, dass innerhalb eines Zellkörperchens winzige Vesikel entstehen und zum Teil werden diese Vesikel durch Verschmelzen dieser Körperchen mit der Zellmembran freigesetzt. Andere Körperchen, ebenfalls mit Vesikeln bestückt, werden im Lysosom abgebaut. Auch dieser Mechanismus, weshalb eine Freisetzung und weshalb ein Abbau stattfindet, muss noch genauer erforscht werden. [12, 15]

Andere Vesikel, die durch Abstoßen von Zellmembranstücken entstehen, werden als Mikrovesikel bezeichnet. Diese werden meist größer als 100 nm beschrieben [12, 15]. Allerdings werden die Bezeichnungen, Exosom und Mikrovesikel, uneinheitlich verwendet [12, 15] und auch gestaltet sich die Differenzierung zwischen Exosomen und Mikrovesikel schwierig, da die Isolationsmethoden hauptsächlich über die Größe der

Vesikel funktionieren und es Größenüberschneidungen zwischen beiden Entitäten gibt [12, 15].

2.2.2 Isolation und Charakterisierung

Das meist genutzte und erste Verfahren zur Isolation von Exosomen ist die Ultrazentrifugation, auf die an späterer Stelle genauer eingegangen wird [13]. Zudem existieren weitere Isolationsprotokolle, die auf Ultrafiltration oder Immunoabsorption basieren [12, 13, 15]. Außerdem werden eine Reihe von kommerziell erhältlichen auf Polymeren basierende Kits zur Exosomenisolation eingesetzt [12, 13, 15, 18]. Diese ermöglichen eine schnellere Isolation. Allerdings ist noch offen, ob diese Kits weniger zwischen den verschiedenen Arten von extrazellulären Vesikeln diskriminieren als die anderen Isolationsmethoden [18].

Um die isolierten Exosomen abzubilden, benötigt man auf Grund ihrer geringen Größe, von ungefähr 30-100 nm, die Elektronenmikroskopie. Zur genaueren Charakterisierung der isolierten Vesikel stehen der Immunoblot, die Massenspektroskopie und neue hochauflösende Durchflusszytometriemethoden zur Verfügung [12, 13, 15].

Um eine Auflistung aller in extrazellulären Vesikeln vorhandenen Proteinen, Nukleinsäuren und Lipiden zu gewährleisten, wurden die Datenbanken ExoCarta [20], Vesiclepedia [21] und EVpedia [22] geschaffen. ExoCarta stellt Informationen ausschließlich zu Exosomen zur Verfügung, Vesiclepedia zu allen extrazellulären Vesikeln und EVpedia enthält Informationen zu extrazellulären Vesikeln von Pro- und Eukaryonten [21 – 23].

Im Jahr 2014 wurden von der „International Society for Extracellular Vesicles“ (ISEV) minimale experimentelle Anforderungen an Studien über extrazelluläre Vesikel, die die Vergleichbarkeit von Studien gewährleisten sollen, erstellt [24].

2.2.3 Entstehung und Freisetzung der Exosomen

Die genaue Entstehung und Freisetzung der Exosomen ist noch Gegenstand der aktuellen Forschung. Sie entstehen in Endosomen die zu multivesikulären Körperchen werden. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass hierfür der ESCRT Komplex (Endosomal sorting complex required for transport), Lipide wie Ceramid und Tetraspanine zur Biogenese benötigt werden. Allerdings ist noch nicht bewiesen, ob alle an der Biogenese der gleichen Sorte von Exosomen oder von verschiedenen Sorten beteiligt sind, da durch Inhibierung der Expression oder durch einen Knock-out eines der Proteinkomplexe maximal eine Reduzierung der Exosomensekretion aber kein vollständiger Stopp der Sekretion erzielt werden konnte [15 – 18]. Der ESCRT-Komplex besteht aus 4 Unterkomplexen und Hilfsproteinen wie Alix, TSG101 und VPS4. ESCRT-0 gruppiert Ubiquitin-abhängig den Inhalt, ESCRT-I und -II starten die Ausknospung der

intraendosomalen Vesikel und ESCRT-III ist für die Vesikelabspaltung verantwortlich [15 – 18].

Es wurde gezeigt, dass einige Rab GTPasen (RAB11, RAB27, RAB35) an dem Transport und der Freisetzung der multivesikulären Körperchen, also den Exosomen, beteiligt sind. Rab GTPasen sind in der Zelle für den Transport von Vesikeln verantwortlich. Für die Freisetzung von Vesikeln und normalen Lysosomen ist der SNARE-Komplex verantwortlich, ob und wie dieser, auch an der Freisetzung der multivesikulären Körperchen beteiligt ist, ist noch zu klären [15 – 18].

Ebenfalls wird der genaue Ablauf der Anreicherung von Proteinen und Nukleinsäuren in den Exosomen noch erforscht. Man nimmt an, dass hierfür verschiedene Rekrutierungsproteine während der Biogenese wie zum Beispiel Teile des ESCRT-Komplexes und Chaperone verantwortlich sind. Auch werden die Membranproteine wie zum Beispiel GPI-verankerte Proteine direkt während der Entstehung miteingefügt [15].

2.2.4 Interaktionen der Exosomen mit den Zielzellen

Für die Interaktion mit den Zielzellen gibt es verschiedene Möglichkeiten. Hier gäbe es zum einen den einfachen Kontakt über Rezeptorbindung, oder die Endozytose des kompletten Exosoms, oder auch die Verschmelzung der Exosomenmembran mit der Plasmamembran der Zielzelle. Nach Endozytose gibt es noch die Möglichkeiten, dass die Exosomenmembran mit der Membran des Endosoms verschmilzt und so der Inhalt in die Zelle abgegeben wird oder, dass das Exosom zum lysosomalen Abbau weitergeleitet wird.

In Studien konnte sowohl die Rezeptorbindung, als auch die Verschmelzung mit der Plasmamembran, als auch die Endozytose der Exosomen nachgewiesen werden [15, 25].

2.2.5 Exosomen und Wundheilung

In einigen Studien wurde gezeigt, dass von isolierten Exosomen ähnlich verbessernde Effekte auf die Wundheilung wie durch Stammzelltherapie ausgelöst werden [26 – 33]. Zum einen wurde gezeigt, dass durch eine Therapie mit extrazellulären Vesikeln von mesenchymalen Stammzellen, Exosomen mit eingeschlossen, die durch Ischämie ausgelöste akute Nierenschädigung gemindert wird [26, 28, 31]. Auch wurde die Entstehung einer chronischen Nierenschädigung im Anschluss an diese Prozedur seltener beobachtet [26, 28]. Positive Effekte wurden auch durch den Einsatz von Exosomen bei der Knochenheilung gezeigt. Durch die Injektion von Exosomen von mesenchymalen Stammzellen in den Frakturspalt beschleunigte sich der Frakturschluss im Mausmodell [27]. Es zeigte sich zudem ein protektiver Effekt von der Therapie mit Stammzelllexosomen bei der nekrotisierenden Enterokolitis im Mausmodell [30]. Ebenso konnte bei der Heilung von chronischen Wunden ein positiver Effekt erzielt werden. Hier

konnte, genau wie bei den mesenchymalen Stammzellen selbst, eine vermehrte Angiogenese und Fibroblastenmigration und -proliferation nachgewiesen werden [10, 32, 33]. Zudem zeigte die Anwesenheit von Exosomen von stimulierten Fibrozyten gute Ergebnisse in Bezug auf die Wundheilung von chronischen Wunden [29].

Alle Studien heben gemeinsam hervor, dass die Wirkung der Exosomen hauptsächlich durch den RNA-Inhalt der Exosomen hervorgerufen wurde und weniger durch die enthaltenen Proteine und durch die enthaltene RNA eine Veränderung der Genexpression der Zielzellen erzeugt wurde [26 – 33].

2.3 Verwendete Proteine

Die in dieser Arbeit verwendeten Proteine, TIMP1-myc-GPI, vv-TIMP1-myc-GPI, N-TIMP1-myc-GPI und EGFP-myc-GPI, bzw. ihre kodierenden DNA-Sequenzen wurden in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Peter Nelson erstellt [1, 34 – 42]. Dies sind rational designte Fusionsproteine, die aus dem MMP-Inhibitor TIMP1 bzw. aus auf diesem basierende Modifikationen und einem GPI-Anker bestehen (genaueres siehe im Kapitel 2.3.3) Als Kontrollprotein wurde ein ähnliches Konstrukt aus GFP und einem GPI-Anker verwendet (siehe Kapitel 2.3.2).

2.3.1 Besondere Modifikationen – Signalsequenzen

Diese Proteine weisen einige Besonderheiten auf. Sie besitzen mehrere Signalsequenzen. Eine Signalsequenz am N-Terminus gibt zu erkennen, dass das Protein zum Transport ins raue Endoplasmatische Retikulum (ER) bestimmt ist. Diese Signalsequenz besitzen unter anderem alle für die Sekretion und für die Plasmamembran bestimmten Proteine. An diese hydrophobe Signalsequenz bindet ein Signalerkennungspartikel (SRP) und unterbricht die weitere Translation bis das SRP an den SRP-Rezeptor der ER-Membran gebunden ist. Anschließend wird dieser Komplex zu einem Proteintranslokator (Sec61-Komplex) geschoben, sodass das Protein cotranslational in das raue endoplasmatische Retikulum überführt wird [19, 43]. Nach Beendigung dieses Vorgangs wird diese Signalsequenz durch eine Signalpeptidase abgespalten [19, 43]. Bei Proteinen mit mehreren ER-Signalsequenzen ist nur die Signalsequenz am Beginn eines Proteins mit Schnittstellen für die Peptidase ausgestattet, sodass nur die Startsignalsequenz am Proteinfang abgeschnitten werden kann [19]. Durch eine hydrophobe Transferstopsequenz wird, wenn vorhanden, die Überführung des Proteins in das ER gestoppt. Im ER bekommen die Proteine ihre endgültige Form. Zusätzlich werden Modifikationen der Proteine im ER durchgeführt - wie zum Beispiel die Kopplung an einen Glykosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker). Hierfür besitzen die Proteine eine zweite Signalsequenz am C-Terminus, so auch die in dieser Arbeit verwendeten Proteine [19, 43]. Dies ist eine zusätzliche

hydrophobe Aminosäuresequenz, also eine Transferstoppssequenz, direkt am C-terminalen Ende des Proteins, so dass die Proteine in der ER-Membran zunächst durch diese Sequenz verankert sind. Durch die angesprochene zweite Signalsequenz wird durch ein Enzym der Peptidanker durch einen GPI-Anker ersetzt [19]. GPI-Anker gekoppelte Proteine werden anschließend über den Golgi-Apparat zur Zellmembran transportiert und dort an der Außenseite eingebaut. Durch den GPI-Anker werden Proteine direkt an der Zelloberfläche exprimiert [19, 43, 44]. Es gibt verschiedene Varianten des GPI-Ankers mit einem gemeinsamen Grundgerüst. Dieses besteht aus Fettsäuren, über die die Verankerung in der Membran erfolgt, Phosphoinositol, einer Zuckerkette, die aus nicht-acetylierten Glukosamin und 3 Mannosemolekülen besteht, und Phosphoethanolamin, über das das jeweilige Protein durch eine Peptidbindung an dessen C-Terminus befestigt ist [44 – 46]. Dieses Grundgerüst wird durch zusätzliche Modifikationen je nach Zellart und Organismus mit zusätzlichen Kohlehydratresten, die über die Mannosemoleküle mit dem Grundgerüst verknüpft sind, versehen [46]. Eine schematische Darstellung ist in Abbildung 2 gezeigt.

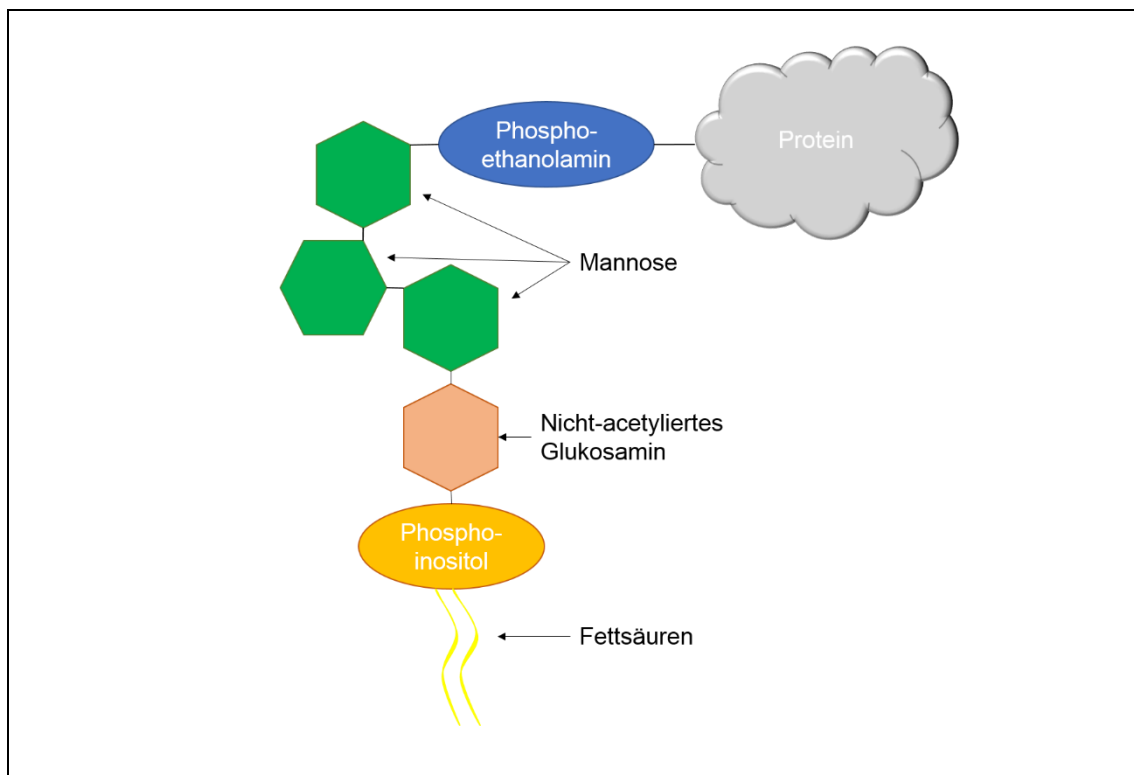


Abbildung 2 Grundgerüst eines Glycosylphosphatidylinositolankers.

Diese Abbildung ist angelehnt an die Schemazeichnungen von Tsai, Liu et al. 2012 [44] und Stevens 1995 [46]. Sie zeigt das gemeinsame Grundgerüst aller GPI-Anker aus Phosphoinositol, nicht-acetylierten Glukosamin, 3xMannose und Phosphoethanolamin. An Phosphoethanolamin ist das jeweilige Protein über seinen C-Terminus verbunden und über Phosphoinositol die Fettsäuren zur Verankerung in der Membran. Die Größenrelationen sind frei gewählt und entsprechen nicht der Realität.

Außerdem wurde bei jedem in dieser Arbeit verwendeten Protein zwischen Protein und GPIAnker ein myc-Tag eingebaut. Dieser zwischen geschaltete myc-Tag besitzt keine

eigene biologische Aktivität, sondern dient als gemeinsamer Angriffspunkt für den ebenfalls in Vorarbeiten hergestellten Antikörper Anti-myc [1]. Somit können mit einem einzigen monoklonalen Antikörper alle in dieser Arbeit verwendeten Proteine nachgewiesen werden.

2.3.2 EGFP-myc-GPI

GFP (green fluorescent protein) ist ein grünfluoreszierendes Protein, das bis auf seine grüne Fluoreszenz keine weitere biologische Aktivität aufweist. Das grünfluoreszierende Protein wurde in der Qualle *Aequorea victoria* als erstes von Shimomura et al. entdeckt [47 – 50]. Dieses Protein wurde anschließend intensiv erforscht und weiterentwickelt. Unter anderem wurde die grüne Fluoreszenz verbessert oder die Farbe der Fluoreszenz verändert [47, 48, 50].

In dieser Arbeit wurde eine Variante des GFP (EGFP: enhanced green fluorescent protein), die eine verbesserte grüne Fluoreszenz aufweist, als Kontrollprotein verwendet. Außerdem besitzt das hier verwendete Protein die im vorherigen Unterkapitel beschriebenen Signalsequenzen zur Sekretion und GPI-Anker-Kopplung, sowie den myc-Tag.

2.3.3 Überblick über die weiteren Proteine

TIMP1 (Tissue inhibitor of metalloproteinases-1) ist ein Hemmstoff von verschiedenen Proteinasen des Extrazellulärraums, an der Regulation des Gleichgewichts des Auf- und Abbaus der Extrazellulärmatrix und der Aktivierung/Inaktivierung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren beteiligt [1, 38]. Alle Proteine der TIMP-Familie besitzen eine N- und eine C-terminale Domäne, die unterschiedliche Wirkmechanismen aufweisen [1].

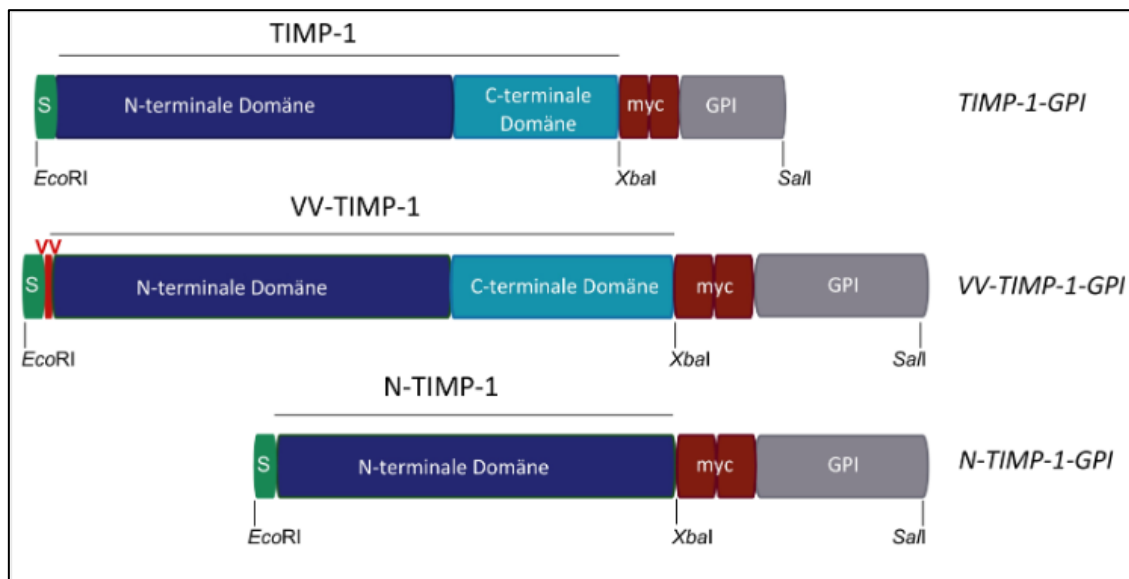


Abbildung 3 Schematische Darstellung der verwendeten Proteine
Diese Abbildung wurde aus der Arbeit von Nicole Rieth übernommen [1]. Sie zeigt eine schematische Darstellung der Sequenz der verwendeten Proteine. Die Signalsequenz für die Sekretion ist hier grün dargestellt, die für den GPI-Anker grau. Dunkelblau ist die N-terminale Domäne von TIMP1 und hellblau die C-terminale Domäne von TIMP1 dargestellt. myc-Tag ist in Rot dargestellt.

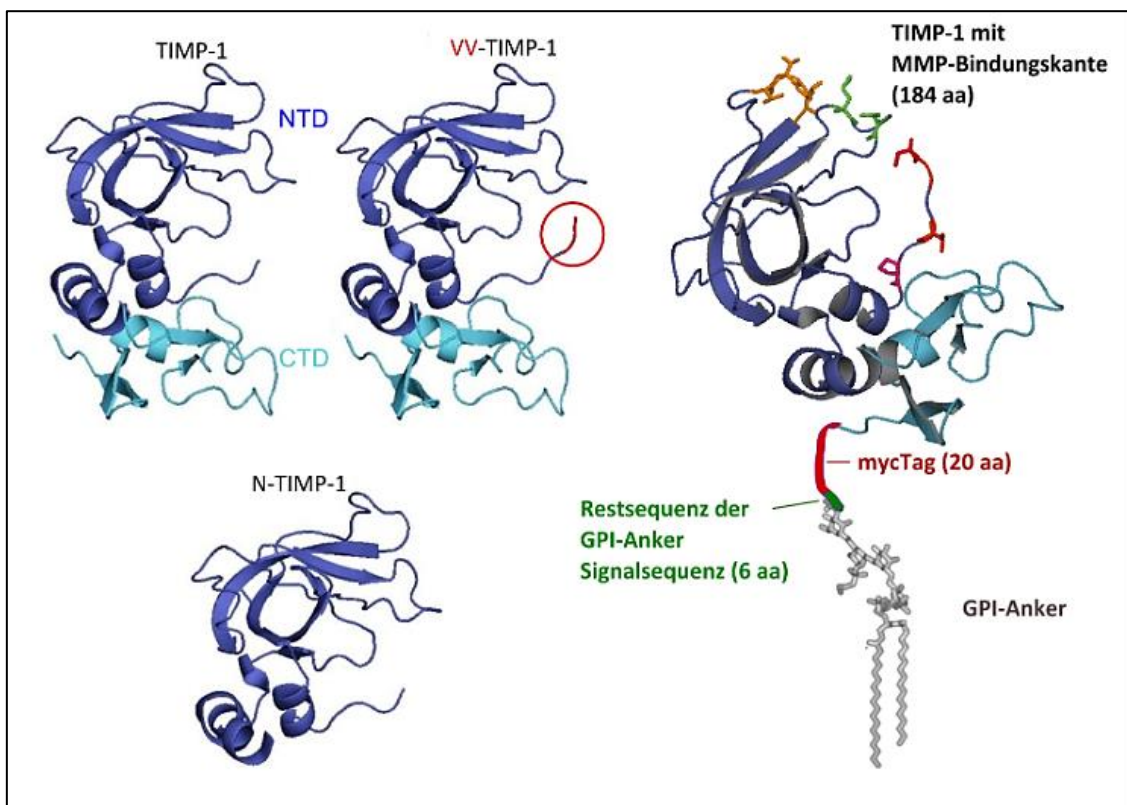


Abbildung 4 3-Dimensionale Darstellung der verwendeten Proteine
Diese Abbildung wurde ebenfalls aus der Arbeit von Nicole Rieth übernommen [1]. Sie zeigt eine 3-dimensionale Darstellung von TIMP1 und der Varianten vv-TIMP1 und N-TIMP1, sowie TIMP1-myc-GPI. Die N-terminale Domäne ist wieder in dunkelblau dargestellt und die C-terminale Domäne in hellblau.

N-TIMP1 und vv-TIMP1 sind Varianten von TIMP1, die erstellt wurden, um die unterschiedlichen Wirkweisen der beiden Domänen einzeln untersuchen zu können [1]. Vv-TIMP1 besitzt eine Mutation am Beginn der N-terminalen Domäne, so dass die Strukturveränderung eine Wirkung der N-terminalen Domäne verhindert [1]. Dadurch lässt sich durch vv-TIMP1 die Wirkungsweise der C-terminalen Domäne genauer erforschen. Bei N-TIMP1 fehlt die C-terminale Domäne [1]. Somit lässt sich mit diesem Protein die Wirkweise der N-terminalen Domäne isoliert untersuchen. Eine schematische Darstellung der Sequenz der verwendeten Proteine ist in Abbildung 3 und eine 3-dimensionale Darstellung der Proteine in Abbildung 4 gezeigt.

2.3.4 Besonderheiten und Wirkung des GPI-Anker gekoppelten

TIMP1

2004 wurde in einer Arbeit von Djafarzadeh et al. erstmals das GPI verankerte TIMP-1 (TIMP1-GPI) und seine zum Teil veränderten oder verstärkten Wirkungen dargestellt [38]. Hier wurde gezeigt, dass TIMP1-GPI, nach Inkorporierung in die Zellmembran, die Freisetzung von MMP-2 und MMP-9 in der Osteosarkomzellkultur hemmt und verschiedene Metalloproteinasen an die Zelloberfläche dieser Zellen gebunden wurden. Zudem zeigte sich eine stärkere Reduzierung der Endothelzellmigration durch

TIMP1-GPI als durch das ursprüngliche lösliche TIMP-1. Im Gegensatz dazu zeigte sich allerdings eine effektivere Induktion der mikrovaskulären Endothelzellproliferation bei TIMP-1-GPI. Auch wurde gezeigt, dass die Fibroblastenproliferation durch TIMP1-GPI stärker reduziert wird. Somit zeigte sich, dass abhängig vom Zelltyp entweder eine Hemmung oder eine Steigerung der Zellproliferation durch TIMP1-GPI ausgelöst wird [38].

In weiteren Arbeiten dieser Arbeitsgruppe wurde die Auswirkungen von TIMP1-GPI auf die Wundheilung erforscht [34 – 36]. Dermale Fibroblasten zeigten durch die Behandlung mit TIMP1-GPI eine verminderte Freisetzung von MMP-2 und -9. Diese beiden Metalloproteinasen konnten wiederum vermehrt an der Zelloberfläche gebunden dargestellt werden. Zudem zeigte sich eine Reduktion der Fibroblastenproliferation und eine vermehrte Neigung zur Apoptose. Auch zeigte sich die Expression der mRNA, die zur Translation von Proteinen, die mit einer Fibrose assoziiert werden, benötigt wird, verringert [35]. In einer weiteren Studie wurde das Verhalten von Mesothelzellen auf eine Behandlung mit TIMP1-GPI untersucht. Hier zeigte sich unter anderem in einem in vitro Versuch der Wundverschluss durch die Mesothelzellen bei vermehrter Mesothelzellproliferation extrem beschleunigt [36]. Keratinozyten zeigten ebenfalls eine vermehrte Proliferation unter TIMP1-GPI Behandlung [34]. In dieser Studie wurde ebenfalls eine Beschleunigung der Wundheilung in einem in vitro auf Keratinozyten basierten Experiment und einem in vivo Mausmodell unter TIMP1-GPI gezeigt [34].

In weiteren Studien wurde das Verhalten von verschiedenen Tumorzelllinien auf eine Behandlung mit TIMP1-GPI untersucht [1, 37, 39 – 42]. Hier zeigte sich eine Verminderung der Zellproliferation von Nierenzellkarzinomzellen [1, 39], Fibrosarkomzellen [42], Kolonkarzinomzellen [41] und Melanomzellen [40]. In der Arbeit von Nicole Rieth wurde durch die Erstellung von TIMP1-GPI Varianten, die auch in dieser Arbeit verwendet wurden, die Wirkweise der beiden TIMP1-Domänen untersucht. Durch die N-terminale Domäne wurde die Freisetzung der MMP und die Proliferation der Nierenzellkarzinomzellen gehemmt. Die C-terminale Domäne vermittelte die Hemmung der Migration der Fibrosarkomzellen.

Alle hier aufgeführten Auswirkungen von TIMP1-GPI konnten nur auf TIMP1-GPI aber nicht auf das lösliche ursprüngliche TIMP1 zurückgeführt werden.

3 Zielsetzung

In den letzten Jahren stieg die Anzahl an Studien zur Exosombiologie und deren Wirkweise exponentiell an. Vor allem Exosomen von mesenchymalen Stammzellen werden intensiv in Bezug auf Wundheilung erforscht, da die Therapie von chronischen Wunden oder extensiver Narbenbildung immer noch ein Problem in der modernen Medizin darstellt [7, 10, 33].

In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Peter Nelson wurde in früheren Arbeiten herausgefunden, dass TIMP-1-GPI, ein Inhibitor von Metalloproteinasen, das Zellwachstum von Tumorzellen hemmt und die Wundheilung beschleunigen kann [1, 34 – 37].

Ist es möglich die Oberfläche von Exosomen so zu modifizieren, dass auf dieser spezifische Versionen von Proteinen mit Hilfe eines GPI-Ankers exprimiert werden und dadurch eventuell die therapeutische Effektivität einer auf Exsomen basierenden Therapie gesteigert wird?

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob diese Proteine in Exosomen exprimiert werden und man somit durch GPI-verankerte Proteine die Oberfläche von Exosomen modifizieren kann:

- Zuerst mussten Expressionsvektoren, die die Sequenzen der GPI-verankerten Proteine enthalten hergestellt werden.
- Danach musste eine stabile Expression dieser Proteine auf der Zelloberfläche der transformierten mesenchymalen Stammzellen nachgewiesen werden.
- Anschließend mussten Exosomen aus dem Kulturüberstand dieser Zellen isoliert werden.
- Zuletzt musste nachgewiesen werden, ob auf den isolierten Exosomen die Proteine ebenfalls exprimiert werden.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Name	Hersteller	Hauptsitz
Ammoniumsulfat	Roth	Karlsruhe
Aqua dest.	B.Braun	Melsungen
APS Pulver	BioRad	Hercules, California
Bacto Agar	BD Bioscience	Franklin Lakes, New Jersey
Bacto Trypton	BD Bioscience	Franklin Lakes, New Jersey
Bacto Yeast Extract	BD Bioscience	Franklin Lakes, New Jersey
Bromphenolblau	Sigma Aldrich	St. Louis, Missouri
Borsäure	Roth	Karlsruhe
Dikaliumhydrogenphosphat - Trihydrat	Roth	Karlsruhe
DPBS (= PBS)	PAN Biotech	Aidenbach
DMSO	Merck	Berlin
EDTA	Roth	Karlsruhe
Entwicklerlösung	AGFA	Mortsel, Belgien
Ethidiumbromidlösung	Roth	Karlsruhe
FACS Clean	BD Bioscience	Franklin Lakes, New Jersey
FACS Rinse	BD Bioscience	Franklin Lakes, New Jersey
FACS Flow	BD Bioscience	Franklin Lakes, New Jersey
FBS superior (entspricht FCS)	Biochrom (Merck)	Berlin
Fixierlösung	AGFA	Mortsel, Belgien
RPMI 1640, GlutaMAX	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA
RPMI 1640, ohne Phenolrot	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA
Glycerin	Roth	Karlsruhe
Glycin	Roth	Karlsruhe
Isobutanol	Roth	Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck	Berlin
Kaliumdihydrogenphosphat (Wasserfrei)	Merck	Berlin
Magermilchpulver	Roth	Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Merck	Berlin
Magnesiumsulfat	Merck	Berlin
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck	Berlin
Methanol	Merck	Berlin

NaCl	Merck	Berlin
Penicillin/Streptomycin	Biochrom (Merck)	Berlin
Rotiphorese Gel 30	Roth	Karlsruhe
SDS Pulver	Roth	Karlsruhe
TEMED	BioRad	Hercules, California
Trinatriumcitrat - Dihydrat	Merck	Berlin
Tris	Roth	Karlsruhe
Trypsin/EDTA	PAN Biotech	Aidenbach
tween20	Roth	Karlsruhe
Ultrapure Agarose	invitrogen (Thermo Fisher Scientific)	Waltham, MA
Western lightning puls ECL	Perkin Elmer	Waltham, MA

4.1.2 Enzyme

Name	Hersteller	Hauptsitz
EcoR V	NEB	Ipswich
Nco I	NEB	Ipswich
Bgl II	Roche	Basel
Phusion High Fidelity Polymerase (# F-530L)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA

4.1.3 Puffer

Name	Hersteller	Hauptsitz
3.1 Puffer	NEB	Ipswich
EB Puffer	QIAGEN	Hilden
NuPAGE LDS Sample Buffer (4x)	invitrogen (Thermo Fisher Scientific)	Waltham, MA
NuPAGE Transfer Buffer (20x)	invitrogen (Thermo Fisher Scientific)	Waltham, MA
Puffer M	Roche	Basel
TE Puffer, pH 8,0	QIAGEN	Hilden

4.1.4 Kits

Name	Hersteller	Hauptsitz
QIAquick® Gel Extraction Kit	QIAGEN	Hilden
Qubit dsDNA BR Assay Kits	Invitrogen (Thermo Fisher Scientific)	Waltham, MA
MultiSite Gateway® Pro 2.0 Kit for 2-fragment recombination	Invitrogen (Thermo Fisher Scientific)	Waltham, MA
innuPREP Plasmid Mini Kit	Analytik Jena	Jena
EndoFree Plasmid Maxi Kit	QIAGEN	Hilden
ExoSpin (EC01) für Zellkulturmedium/Speichel /Urin	Cell Guidance Systems	Cambridge, GB

Pierce BCA Protein Assay	Pierce (Thermo Fisher Scientific)	Waltham, MA
--------------------------	-----------------------------------	-------------

4.1.5 Antibiotika

Name	Hersteller	Hauptsitz
Kanamycin-Pulver	Roche	Basel
Ampicillin-Pulver	Roche	Basel
Chloramphenicol-Pulver	Roche	Basel
Geneticin/G418	Biochrom (Merck)	Berlin

4.1.6 Antikörper

4.1.6.1 Primäre Antikörper

Name	Hersteller	Hauptsitz
mIgG1	Sigma Aldrich	St. Louis, Missouri
Anti-TIMP1	Calbiochem (Merck)	Berlin
Anti-myc	vom Haus	
CD63 AK	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA
β-Aktin AK	Cell Signaling Technology	Cambridge, GB

4.1.6.2 Sekundäre Antikörper

Name	Hersteller	Hauptsitz
Anti-m/HRP	Dako (Agilent Technologies)	Santa Clara, California
Anti-mouse Ig R-PE(R439)	Dako (Agilent Technologies)	Santa Clara, California

4.1.7 Größenstandards

Name	Hersteller	Hauptsitz
1kbDNA Ladder	NEB	Ipswich
Magic Marker	invitrogen (Thermo Fisher Scientific)	Waltham, MA
PageRulerprestained Ladder	fermentas (Thermo Fisher Scientific)	Waltham, MA

4.1.8 Bakterien

Name	Hersteller	Hauptsitz
One Shot™ Mach1™ T1 Phage-Resistant Chemically Competent E. coli	invitrogen (Thermo Fisher Scientific)	Waltham, MA

4.1.9 Zelllinie

Zelllinie	Herkunft	Kulturmedium
L87/4 (L87: humane mesenchymale Stammzellen aus Knochenmark)	vom Haus	RPMI 1640, GlutaMAX + 10% FCS + 1 % P/S

Die in dieser Arbeit verwendeten immortalisierten mesenchymalen Stammzellen der Zelllinie L87 wurden von Thalmeier generiert (Thalmeier et. al. 1994). Diese Zellen wurden von einem gesunden 70 Jahre alten Mann durch eine Knochenmarksaspiration gewonnen und mit dem SV40 Konstrukt immortalisiert [51].

4.1.10 Primer für die PCR

Name	Sequenz
pEF-GPI-FW-attB5	GGGACAACCTTTGTATACAAAAGTTGTAGGTGTCGTGAGGAA TTC
pEF-GPI-RV-attB2	GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTGTGCGACTATAAT ACATTCATATACA

4.1.11 Sonstiges PCR Zubehör

Name	Hersteller	Hauptsitz
dNTPs	Fermentas (Thermo Fisher Scientific)	Waltham, MA

4.1.12 Plasmide und Vektoren

Name	Herkunft	Hauptsitz
pEF-TIMP1-myc-GPI	vom Haus	
pEF-vv-TIMP-1-myc-GPI	vom Haus	
pEF-N-TIMP-1mycGPI	vom Haus	
pEF-sEGFP-myc-GPI	vom Haus	
pDONR 221-P5-P2	QIAGEN	Hilden
pENTR221-CMV/TO.Pro	vom Haus	
pSBDEST.N	vom Haus	
pCMV(CAT)T7-SB100X	Addgene Plasmid #34879, Geschenk von Zsuzsanna Izsvak	Cambridge, MA

4.1.13 Geräte

4.1.13.1 Zentrifugen

Name	Hersteller	Hauptsitz
Biofuge pico	Heraeus	Hanau
Megafuge 1.0R	Heraeus	Hanau
Centrifuge 5402	Eppendorf	Hamburg
Centrifuge 5417R	Eppendorf	Hamburg
Rotana 460R	Hettich Zentrifugen	Tuttlingen
Optima L-70 Ultrazentrifuge	Beckman Coulter	Brea, Kalifornien

4.1.13.2 Power Supply

Name	Hersteller	Hauptsitz
Power Pac 300	BioRad	Hercules, California
Power Supply 3000Xi	BioRad	Hercules, California

4.1.13.3 Inkubatoren

Name	Hersteller	Hauptsitz
Brutschrank	Heraeus	Hanau
Brutschrank	Memmert	Schwabach
Schüttelinkubator (Bakterien)	Infors HT	Bottmingen

4.1.13.4 Weitere Geräte

Name	Hersteller	Hauptsitz
Mastercycler pro S	Eppendorf	Hamburg
Qubit Fluorometer	invitrogen (Thermo Fisher Scientific)	Waltham, MA
Thermomix comfort für 1,5ml Eppendorfgefäße	Eppendorf	Hamburg
SterilGARD Hood Class II Type A/B3	the Baker Company	Sanford, Maine
Gene Pulser/ Capacitance Extender	BioRad	Hercules, California
FACS Calibur	BD Bioscience	Franklin Lakes, New Jersey
Vortex-genie 2	Scientific Industries	Bohemia, New York
Sterilwerkbank	the Baker Company	Sanford, Maine
Roller RM 5	Assistent® (Glaswarenfabrik Karl Hecht)	Sondheim/Rhön
Röntgenfilmentwickler Curix 60	AGFA	Mortsel, Belgien
Horizontalschüttler KS501 digital	IKA Labortechnik	Staufen
Mikroskop Leica DMIL (Fluoreszenz)	Leica Microsystems	Wetzlar
Waage PJ 300	Mettler Toledo	Columbus, Ohio
Waage PJ 3000	Mettler Toledo	Columbus, Ohio
ELISA Reader GENios Plus	Tecan	Männedorf

4.1.13.5 Zubehör

Name	Hersteller	Hauptsitz
Ultrazentrifugenrotor 45 Ti	Beckman Coulter	Brea, Kalifornien, USA
Mighty Small II	Hoefer (Harvard Bioscience)	Holliston, MA
Noves Mini-Cell	invitrogen (Thermo Fisher Scientific)	Waltham, MA USA
Xcell II Blot Module	invitrogen (Thermo Fisher Scientific)	Waltham, MA USA
Gelelektrophoresekammer	MBT Mikro Bio Tec Brand	Gießen

Filmkassette Quanta III	DuPont (Thermo Fisher Scientific)	Waltham, MA USA
Neubauer-Zählkammer	Braun	Melsungen

4.1.14 Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller	Hauptsitz
Zellkulturröhrchen verschiedener Volumina	TPP	Trasadingen
Reaktionsgefäße verschiedene Größen	Eppendorf	Hamburg
Inoculation loops	NUNC (Sigma Aldrich)	St. Louis, Missouri
Einmalspatel steril	VWR	Radnor, Pennsylvania
Zellkulturplatten verschiedener Größen	TPP	Trasadingen
Zellkulturschalen verschiedener Größen	TPP	Trasadingen
Zellkulturflaschen verschiedene Größen	TPP	Trasadingen
Polypropylenröhrchen	Greiner bio-one	Kremsmünster, Oberösterreich
Electroporation Cuvettes 4mm	peqlab (VWR)	Radnor, Pennsylvania
Polycarbonate Ultrazentrifugenröhrchen	Beckman Coulter	Brea, California
Greiner 96well plates flat bottom transparent	Greiner bio-one	Kremsmünster, Oberösterreich
Whatmanpapier	Whatman (GE Healthcare)	Little Chalfont, GB
Immobilon P Membran (PVDF)	Millipore (Merck)	Berlin

4.1.15 Software

Name	Hersteller	Hauptsitz
CellQuest	BD Biosciences	Franklin Lakes, New Jersey
XFluor 4	Tecan	Männedorf
Microsoft Office 2016	Microsoft	Redmond, Washington
Citavi	Swiss Academic Software	Wädenswil

4.1.16 Rezepte der im Labor hergestellten Reagenzien

4.1.16.1 Reagenzien für die Zellkultur

Name	Rezeptur
PBS-EDTA (1,5 mM)	1,5 ml 0,5 M EDTA auf 500 ml PBS

4.1.16.2 Reagenzien für die Mikrobiologie

Name	Rezeptur
LB Medium	1 % Trypton 1 % NaCl 0,5 % Hefeextrakt Auf 1 Liter mit H ₂ O auffüllen Mit 1 M NaOH auf pH 7,2-7,3 einstellen

	autoklavieren
LB Medium (fest)	2x LB Medium ansetzen + Agar 3 %
SOC Medium	0,5 % Hefeextrakt 2 % Bactotrypton 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glukose Steril filtrieren
Einfriermedium für Bakterien (10x)	132,3 mM KH ₂ PO ₄ (wasserfrei) 21 mM Natriumzitat x 2 H ₂ O 3,7 mM MgSO ₄ x 7 H ₂ O 68,1 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 459,3 mM K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O 35,5 % Glycerin In H ₂ O autoklavieren

4.1.16.3 Reagenzien für die Molekularbiologie

Name	Rezeptur
TBE	90 mM Tris 2 mM Borsäure H ₂ O Mit 0,5 M EDTA auf pH 8,0 einstellen
Ladepuffer für Agarosegele (6x)	0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylen-Cyanol FF 30 % Glycerin H ₂ O
TBS (10x)	1,5 M NaCl 100 mM Tris Mit HCl auf pH 7,3 – 7,5
TBST	0,05 % Tween ²⁰ in TBS
Blockierlösung (Western Blot)	5 % Magermilchpulver in TBST
RIPA Puffer	50 mM Tris/HCL pH 7,4 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 % Triton X100 1 % Natriumorthovanadat 0,1 % SDS 1 mM CoCl ₂ Proteaseninhibitor (81 Tabletten/50 ml Roche complete # 04693116001)

4.2 Methoden

4.2.1 Zellbiologische Methoden

4.2.1.1 Zellkultur der immortalisierten mesenchymalen Stammzellen (imMSC)

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen mit sterilen Geräten und Medien an einer Sterilwerkbank ausgeführt. Die Zellen wurden alle bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank bebrütet. Alle Medien und Zusätze wurden vor der Verwendung im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

4.2.1.2 Kultivierung der imMSC

Alle mesenchymalen Stammzelllinien wurden in RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert.

Die Zellen wurden täglich unter dem Mikroskop beurteilt. Gleichzeitig wurde dabei geprüft, ob eine Kontamination mit Pilzen oder Bakterien vorlag. Ungefähr alle drei Tage wurden die Zellen im Verhältnis von 1 zu 6 auf Zellkulturflaschen mit einer Fläche von 75 cm² vereinzelt, um ein Überwachsen zu verhindern. Dabei wurde zuerst das Medium vorsichtig abgesaugt und danach die Zellen mit einer Phosphat-gepufferten Salzlösung (PBS) überspült, um die Mediumrückstände in der Flasche zu verringern. Zum Ablösen wurde entweder 2,5 ml Trypsin/EDTA oder PBS/EDTA verwendet. Zum Beschleunigen des Ablösevorgangs wurde die Flasche leicht beklopft. Durch Zugabe von 6-7 ml Medium wurde die Aktivität der Ablösesubstanz gestoppt.

Anschließend wurde die Zellsuspension in Zentrifugenröhrchen bei 200 g für drei Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Das Pellet wurde mit 3 ml Medium durch schonendes auf- und abpipettieren wieder zurück in Suspension gebracht. Davon wurden je auf eine neue 75 cm² Flasche 0,5 ml dieser Zellsuspension gegeben und mit 19,5 ml Medium gleichmäßig in der Flasche verteilt. Diese Flaschen wurden danach in den Brutschrank zurückgestellt.

Zur Selektion der transformierten Zelllinien wurde das Antibiotikum G418 in einer Konzentration von 500 µg/ml verwendet.

4.2.1.3 Einfrieren der imMSC

Zum Einfrieren wurde ein Teil, der resuspendierten Zellen, zu gleichen Teilen mit einem Gemisch aus 60 % FCS, 20 % DMSO (Dimethylsulfoxid) und 20 % Kulturmedium vermischt und in das Einfrierröhrchen gegeben, sodass die Endkonzentration des DMSO 10 % betrug. Zunächst wurden die Zellen bei -80 °C eingefroren. Zur längeren Lagerung wurden sie in der Dampfphase von flüssigem Stickstoff bei -160 °C eingefroren.

4.2.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Zur Zellzahlbestimmung wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Zum Zählen der lebendigen Zellen wurde die Zellsuspension zu gleichen Teilen mit Trypanblau gemischt, um die toten Zellen von den lebenden unterscheiden zu können. Beim Zählen der Zellen für ein Gesamtzelllysat wurden die toten Zellen mit einbezogen.

Die Zellen wurden mäanderförmig in 4 Quadranten gezählt. Die Zellzahl wurde auf folgende Weise berechnet:

$$[(\text{gezählte Zellen}) \times 2500 / 1\ 000\ 000] \times \text{Volumen der Zellsuspension} = \text{Zellzahl} \times 1\ \text{Millionen}$$

4.2.2 Klonierung

4.2.2.1 Bakterienkultur

Die transformierten *Escherichia coli* Kulturen wurden entweder auf Agarplatten oder in Flüssig-LB-Medium bei 37 °C kultiviert. Für die Selektionierung wurde das jeweilige Selektionsantibiotikum hinzugegeben. Als Selektionsantibiotika für die transformierten Bakterien dienten Kanamycin, Ampicillin und Chloramphenicol. Kanamycin wurde bei Bakterien, die mit einem Entry Vektor transformiert wurden, Ampicillin bei Bakterien, die mit einem Expressionsvektor transformiert wurden, und Chloramphenicol bei Bakterien, die mit dem „Sleeping Beauty“ Plasmid transformiert wurden, verwendet.

Um identische Klone zu gewinnen, wurden von den Agarplatten Einzelkolonien selektiert, die jeweils in einem Reagenzglaschen mit 1,5 ml LB Medium und auf einer Back-up-Agarplatte angeimpft wurden. Anschließend wurden sie wieder bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Zum Einfrieren der Bakterien wurden 900 µl der Bakteriensuspension (in LB-Medium) mit 100 µl des zehnfachkonzentrierten glycerinhaltigen Einfriermediums vermischt und bei -80 °C aufbewahrt.

4.2.2.2 Transformation von kompetenten *Escherichia coli* (Mach1)

Die eingefrorenen Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, um Stress für die Bakterien zu vermeiden. Anschließend wurden zu den Bakterien 11 µl der jeweiligen DNA Proben der BP-Rekombinationsreaktion oder LR-Rekombinationsreaktion zu den Bakterien hinzugefügt. Diese wurden für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde ein Hitzeschock mit 42 °C für 45 s durchgeführt und im Anschluss sofort wieder im Eis gekühlt. Zu den Bakterien wurde dann 250 µl S.O.C. Medium hinzugefügt und bei 37 °C auf einem Thermoschüttler mit 500 rpm für eine weitere Stunde inkubiert. Die so transformierten *E. coli* wurden dann auf einer Agarplatte, die mit dem jeweiligen Selektionsantibiotikum versehen war, ausplattiert und im Brutschrank bei 37 °C über Nacht inkubiert.

4.2.2.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Für die Durchführung einer Polymerase-Ketten-Reaktion wurde der Mastermix neunmal hergestellt. Dafür wurden für 500 ng Template (Doppelstrang-DNA, welche die gewünschte DNA-Sequenz enthält, die man amplifizieren möchte) 45 µl des 5 x High Fidelity Puffers, 36 µl dNTP, je 9 µl des Forward- und des Reverseprimers – hier in einer 1:10 Verdünnung – und 2,2 5µl der Phusion High Fidelity Polymerase hinzugefügt. Dieser Mix wurde dann mit destilliertem Wasser auf insgesamt 225 µl aufgefüllt und danach auf 8 PCR-Gefäße mit je 25 µl aufgeteilt.

Anschließend wurde am PCR-Gerät (Mastercycler pro S) das folgende Programm eingestellt.

Tabelle 1 PCR-Programm

Temperatur	Dauer	Funktion	Häufigkeit
98 °C	5 min	Denaturierung (Beginn)	1 x
98 °C	30 s	Denaturierung (je Zyklus)	30 x
55 °C	30 s	Annealing	
72 °C	35 s	Elongation	
72 °C	10 min	Elongation (nach dem letzten der 30 Zyklen)	1 x

Es wurden 30 Zyklen eingestellt. Für die Denaturierung der DNA-Doppelstränge zu Einzelsträngen wurde eine Temperatur von 98 °C gewählt. Diese wurde zu Beginn auf eine Dauer von 5 min 30 s festgelegt. Bei jedem weiteren Zyklus betrug die Dauer 30 s. Für das Annealing – die Anlagerung der Primer an den DNA-Einzelstrang – betrug die Temperatur 55 °C, die für die Primer spezifisch ausgewählt wurde. Diese Phase dauerte 30 s. Für die DNA-Synthese wurde eine Temperatur von 72 °C gewählt. Diese Phase dauerte pro Zyklus 35 s.

Nach dem letzten Zyklus wurde diese Temperatur noch für 10 min beibehalten, bevor die Amplifizierung der DNA-Sequenz beendet wurde.

4.2.2.4 Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA wurden Agarosegele verwendet. Um eine aussagekräftige Auftrennung der DNA nach ihrer Größe zu erhalten, wurden die 2 %igen Agarosegele für DNA bis zu einer Größe von 800 Basenpaaren (bp) verwendet und die 0,6 %igen Agarosegele für DNA, die über einer Kilobase (kb) groß waren. Für eine bessere Auftrennung von DNA zwischen 800 bp und 1 kb wurden zum Teil 1 %ige Agarosegele angefertigt.

Die Gele wurden in einer Mikrowelle verflüssigt und auf einen Gelschlitten gegossen und mit einem Kunststoffkamm wurden Taschen zur Beladung des Gels geschaffen. Nach

dem sich das Gel verfestigt hatte, wurde der Schlitten mit dem Gel in der Elektrophoresekammer befestigt und mit Elektrophoresepuffer übergossen. Um die Größe der DNA zu bestimmen, wurde eine Referenz-DNA-Leiter auf die erste Spur aufgetragen. Dafür wurden 10 µl der Referenzsubstanz mit 2 µl Ladepuffer in die erste Geltasche eingefüllt. Um die DNA auf dem Gel sichtbar werden zu lassen wurden pro 5 µl DNA 1 µl Ladepuffer, der Ethidiumbromid enthält, hinzugefügt.

Zur Auftrennung wurde eine Spannung von 160 V bis zur optimalen Auftrennung der DNA an die Kammer angelegt.

Wurde die Gelelektrophorese zur Aufreinigung der nach einer PCR erhaltenen DNA verwendet, wurde die Bande, die auf der gewünschten Höhe zu liegen kam, unter schwachen UV-Licht identifiziert und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die ausgeschnittene Bande wurde auf Reaktionsgefäße verteilt. Anschließend wurde unter stärkeren UV-Licht das Restgel auf einem Foto festgehalten.

Wurde die Gelelektrophorese im Anschluss eines Testverbaus, der zur Kontrolle der generierten Plasmid-DNA diente, durchgeführt, wurde das Gel unter starkem UV-Licht fotografiert und anschließend beurteilt.

4.2.2.5 Gelextraktion

Um die in den Elektrophoresegelen enthaltene DNA zu extrahieren, wurde das QIAquick® Gel Extraktions Kit von Qiagen verwendet.

Die Gelextraktion wurde nach dem im Kit enthaltenen Protokoll durchgeführt.

4.2.2.6 Konzentrationsmessung DNA

Die Konzentration der DNA wurde mit dem Qubit dsDNA BR Assay Kit gemessen. Hierfür wurde zuerst die Farbstofflösung hergestellt, die zu jeder Probe hinzugefügt werden muss. Das beiliegende BR Reagent musste mit dem beiliegenden BR Puffer 1:200 verdünnt werden. Es wurden immer zuerst zur Kalibrierung des Geräts zwei mitgelieferte Standards vermessen. Hierfür wurden zu 10 µl Standardlösung 190 µl Farbstofflösung hinzugegeben und für zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Bei den Proben wurde, um das Probenmaterial zu sparen, zu 1 µl Probe 199 µl Farbstofflösung hinzugefügt und auch für zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Kalibrierung mit den zwei Standards wurden die Proben gemessen. Um die Konzentration der Ausgangsprobe zu erhalten, musste anschließend noch die Verdünnung der Probe, die durch die Zugabe der Farbstofflösung entstanden ist, mit einberechnet werden. Die Verdünnung der Probe entspricht einem Verhältnis von 1:200.

4.2.2.7 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Hierfür wurde für 1,5 ml Flüssigbakterienkulturen das innuPREP Plasmid Mini Kit von Analytik Jena und für 50 ml Flüssigbakterienkulturen das EndoFree Plasmid Maxi Kit von QIAGEN verwendet.

Das LB-Medium für die Flüssigbakterienkulturen wurde am Vortag mit dem benötigten transformierten *E. coli* angeimpft und nach Zugabe des jeweiligen Selektionsantibiotikums über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator bebrütet.

Die Durchführung erfolgte nach den in den jeweiligen Kits enthaltenen Protokollen. Beim Kit innuPREP Plasmid Mini Kit von Analytik Jena wurde allerdings anstatt des im Kit enthaltenen „Elution Buffer P“ 50 µl des TE Puffers aus dem EndoFree Plasmid Maxi Kit von QIAGEN zum eluieren der im Säulchen gebundenen DNA verwendet.

Für die Durchführung aller Zentrifugationsschritte des innuPREP Plasmid Mini Kits wurde die Zentrifuge Biofuge pico von Heraeus mit einer Maximalgeschwindigkeit von 13000 rpm verwendet.

Für alle Zentrifugationsschritte beim EndoFree Plasmid Maxi Kit wurde die Zentrifuge Megafuge 1.0R von Heraeus verwendet.

Die so gewonnene Plasmid-DNA wurde bei 4 °C für die Kurzzeitlagerung oder bei -20 °C für die Langzeitlagerung aufbewahrt.

4.2.2.8 Überprüfung der generierten Plasmide

Alle Plasmide wurden nach jedem Klonierungsschritt vor der Weiterverwendung auf ihre Korrektheit überprüft. Hierfür wurden zwei Methoden nacheinander angewandt. Zuerst wurde ein Testverdau mit Restriktionsenzymen durchgeführt. Dieser wurde anschließend durch eine Gelelektrophorese aufgetrennt und eine der Präparationen mit den richtigen Bandengrößen wurde zur Sequenzierung verschickt, um auch kleine DNA-Veränderungen zu detektieren.

4.2.2.8.1 Testverdau

Hierfür wurden geeignete Restriktionsenzyme ausgewählt. Es wurden pro 1 µg DNA eine Einheit Enzym zugegeben. Außerdem wurde der vom Hersteller empfohlene Puffer zugegeben. Zudem wurde darauf geachtet, dass die Gesamtmenge der Enzyme 10 % des Ansatzes nicht überschritten, um unspezifischen DNA-Verdau zu vermeiden. Dieser Ansatz wurde für eine Stunde auf dem Thermoschüttler bei 37 °C und 500 rpm inkubiert und anschließend wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt.

4.2.2.8.2 Sequenzierung

Alle Sequenzierungen wurden von der Firma GATC Biotech übernommen. Diese führte Sequenzierungen nach Sanger durch.

4.2.2.9 Gateway Cloning

Für die Klonierung der Plasmide wurde das Klonierungssystem Gateway der Firma Invitrogen verwendet. Dies unterteilt sich in eine BP-Rekombinationsreaktion, in der die Entry Klone hergestellt werden, und in eine LR-Rekombinationsreaktion, in der die fertigen Expressionsklone hergestellt werden. Dieses Klonierungssystem basiert auf der Rekombinationsreaktion des Bakteriophagen Lambda, mit dem die Genomsequenzen mit der gewünschten Orientierung in die Expressionsplasmide integriert werden können [52 – 54].

4.2.2.9.1 BP-Rekombinationsreaktion

Bevor die BP-Rekombinationsreaktion gestartet werden konnte, wurde durch eine PCR, mit geeigneten Primern, die Konstrukt-DNA vervielfältigt und mit den für die BP-Rekombinationsreaktion benötigten attB Enden versehen.

Anschließend wurde die BP-Reaktion, wie im MultiSite Gateway® Pro Handbuch beschrieben, durchgeführt. Die BP-Reaktion wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und am nächsten Tag durch die Zugabe der im Kit enthaltenen Proteinase K und anschließender Inkubation bei 37 °C für 10 min beendet.

Es wurde der Donor-Vektor pDONOR 221-P5-P2 der Firma Invitrogen und die Konstrukte, welche schon im Labor vorhanden waren, verwendet.

Anschließend wurde das entstandene Plasmid in kompetente E. coli (Mach1) überführt, die für diese Zwecke im Labor hergestellt wurden [53, 54]. Als anschließendes Selektionsantibiotikum diente Kanamycin.

4.2.2.9.2 LR-Rekombinationsreaktion für 2 DNA-Fragmente

Zur Herstellung der Expressionsvektoren wurden ein von Carsten Jäckel modifizierter Destination Vektor pSBDEST.N [53, 54] und zwei Entry Klone, ein Promoter und das jeweilige Konstrukt, verwendet. Als Promotor wurde ein CMV/TO-Promotor verwendet [53, 54].

Die LR-Rekombinationsreaktion wurde, wie im MultiSite Gateway® Pro Handbuch beschrieben, durchgeführt. Das LR-Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Rekombinationsreaktion durch die Zugabe der im Kit enthaltenen Proteinase K und anschließender Inkubation bei 37 °C für 10 min beendet.

Die so generierten Expressionsvektoren wurden dann in kompetente E. coli (Mach1) zur Vervielfältigung überführt. Zur Selektion wurde das Antibiotikum Ampicillin verwendet.

4.2.2.10 Transfektion der imMSC mit Hilfe von „Sleeping Beauty“ Transposase

Alle imMSC wurden durch Elektroporation mit dem Wunschplasmid transfiziert. Um eine höhere Effizienz zu erlangen, wurde die Transposase „Sleeping Beauty“ (SB100)

verwendet. Diese integrierte das Wunschfragment zwischen den Erkennungssequenzen (ITR) in die Zielzellen-DNA [53, 54].

Die imMSC wurden am Vortag gesplittet, so dass sie am Folgetag wieder 80-90 % konfluent in einer 75 cm² Flasche gewachsen waren. Diese Zellen wurden mit Trypsin-EDTA abgelöst, zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in 400 µl PBS resuspendiert und in eine Elektroporationsküvette überführt. Zu den Zellen wurden 30 µg des Wunschplasmids und 90 µl SB100 Plasmid zu den Zellen gegeben und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Elektroporation bei 960 µF und 200 V durchgeführt und die Zellen erneut für 10 min auf Eis inkubiert. Diese nun transformierten imMSC wurden danach wieder in eine neue 25 cm² Flasche überführt, mit ihrem benötigten Zellkulturmedium versehen und zurück in den Brutschrank gestellt. Nach 24 h wurde der erste Mediumwechsel mit einem Zusatz des Antibiotikums G418 in einer Konzentration von 500 µg/ml durchgeführt. Die transfizierten Zellen wurden anschließend nur noch im Selektionsmedium kultiviert.

4.2.3 Durchflusszytometrie

4.2.3.1 Expressionskontrolle der GPI-verankerten Proteine

Zur Kontrolle der stabilen Expression der GPI-verankerten TIMP-1 Varianten und auch des GPI-verankerten EGFP wurden mehrere Durchflusszytometrie-Messungen durchgeführt.

Die zu messenden Zellen wurden mit PBS-EDTA abgelöst, zentrifugiert und in PBS resuspendiert, sodass eine Konzentration von ca. 1 Millionen Zellen pro 100 µl erreicht wurde.

Als Kontrollen wurden die Zellen ungefärbt und eine Probe mit einem Antikörperisotyp mitgeführt, um unspezifische Bindungen oder Eigenfluoreszenz zu detektieren beziehungsweise auszuschließen.

Die Zelllinie L87-CMV/TO-EGFP-myc-GPI enthält durch das integrierte grünfluoreszierende Protein einen Störfaktor bei der Antikörperfärbung. Als ungefärbte Annäherung wurde zusätzlich eine mit TIMP1 transfizierte L87 Zelllinie mitgeführt.

Bei der ersten Expressionskontrolle wurden, um herauszufinden, ob der Antikörper gegen TIMP1 direkt und der Antikörper gegen die myc-Sequenz, vergleichbar sind, Färbungen mit Anti-TIMP1 und Anti-myc als Primärantikörper durchgeführt. Bei allen anderen Kontrollen wurden nur noch Färbungen mit Anti-myc als Primärantikörper durchgeführt. Als Sekundärantikörper wurde immer ein Anti-Maus-Immunglobulin-PE Antikörper verwendet.

Zu den Proben wurden bei der ersten Färbung eine Menge von Antikörpern (pro Probe je ein Antikörper - Anti-mIgG1 als Isotyp, Anti-TIMP1 oder Anti-myc) hinzugefügt, um zu einer Endkonzentration von 10 µg Antikörper/ml zu gelangen. Die Antikörper wurden mit

den Zellen vermischt und für eine Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 4 °C kalten PBS gewaschen. Die ungefärbten Zellen wurden einmalig mit kühlem PBS gewaschen. Danach wurde der mit dem Fluoreszenzfarbstoff R-Phycoerythrin (R-PE) konjugierte Sekundärantikörper, aus Hasen gewonnen gegen Maus-Immunglobuline, (Anti-mIg-R-PE) ebenfalls in der Menge hinzugefügt, um zu einer Endkonzentration von 10 µg Antikörper/ml zu gelangen, und dieser mit den Zellen vermischt. Es folgte ebenfalls eine Inkubation auf Eis für 30 min. Vor der Messung am Durchflusszytometer wurden die Zellen noch zweimal mit 4 °C kalten PBS gewaschen. Zur Detektion der mit dem Farbstoff R-PE markierten Zellen wurde der Laserdetektorkanal FL2 verwendet. Zur Detektion der grünen Fluoreszenz der Zellen mit der EGFP-Expression wurde der Laserdetektorkanal FL1 verwendet.

4.2.3.2 Fluoreszenz abhängige Zellsortierung

Die Fluoreszenz abhängige Zellsortierung der Zelllinie L87-CMV/TO-EGFP-myc-GPI wurde freundlicherweise von Josef Mysliwietz im Labor der Arbeitsgruppe von Prof. Elfriede Nößner durchgeführt.

4.2.4 Exosomen

4.2.4.1 Exosomenisolation

Die Exosomen wurden durch Ultrazentrifugation nach dem Protokoll von Thery et al. [13] und mit Hilfe des Kits ExoSpin von cell guidance systems isoliert.

4.2.4.1.1 Exosomenisolation durch Ultrazentrifugation

Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Außerdem wurden von jedem Überstand 500 µl für eventuelle spätere Kontrollschritte aufgehoben.

Die Zellen wurden zwei Tage vor der geplanten Exosomenisolation auf 300 cm² Zellkulturflaschen verteilt, sodass sie am Folgetag 70-80 % konfluent gewachsen waren. An diesem Vortag wurde ein Mediumwechsel zu 50 ml von einem FCS freien RPMI Medium durchgeführt, um eine Kontamination von Exosomen aus dem FCS zu vermeiden, wie im Protokoll empfohlen.

Am Versuchstag wurde das Medium in 50 ml Zentrifugenröhrchen umgefüllt und bei 300 x g für 10 min in der Zentrifuge Rotana 460R (Hettich Zentrifugen) zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, in ein neues Zentrifugenröhrchen gegeben und mit 2000 x g für 20 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand erneut abpipettiert und auf Ultrazentrifugenröhrchen verteilt. Die gegenüberliegenden Ultrazentrifugenröhrchen wurden immer mit Hilfe einer Waage austariert und zur Orientierung markiert. Die Ultrazentrifuge Optima L-70 (Beckman Coulter) wurde mit dem Rotor 45 Ti betrieben. Die erste Zentrifugation an der Ultrazentrifuge wurde mit 10.000 x g für 30 min

durchgeführt. Diese ersten Zentrifugationsschritte dienten zum Reinigen des Überstands mit den Exosomen von Zellschrott.

Der erneut gewonnene Überstand wurde abpipettiert und auf neue Zentrifugenröhrchen verteilt. Danach erfolgte eine weitere Zentrifugation mit 100.000 x g für 70 min. Ab hier befanden sich die Exosomen im Pellet und der Überstand wurde jeweils verworfen. Das nicht sichtbare Pellet wurde mit 10 ml PBS aufgenommen und alle Exosomenpellets einer Zelllinie wurden in ein Ultrazentrifugenröhrchen überführt und dieses mit PBS aufgefüllt. Dies diente als Waschschrift. Anschließend wurde erneut mit 100.000 x g für 70 min zentrifugiert. Dieses Pellet wurde in 200 µl aufgenommen und für kurze Zeit bei 4 °C gelagert und für die Langzeitlagerung zu 20 µl Aliquots bei -20 °C eingefroren.

4.2.4.1.2 *Exosomenisolation mit dem Kit ExoSpin*

Die Exosomenisolation wurde nach Herstellerprotokoll der Firma Cell Guidance Systems durchgeführt.

4.2.4.2 **Gesamtzelllysate**

Von je einer 300 cm² Zellkulturflasche einer Zelllinie wurde für die spätere Analyse ein Gesamtzelllysate angefertigt. Dafür wurden die Zellen mit PBS-EDTA abgelöst und einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in der Neubauerzählkammer gezählt. Zu den Zellen wurde eine angemessene Menge Lyse Puffer (RIPA-Puffer) hinzugefügt und durch auf und ab pipettieren vermischt. Anschließend wurde diese zähflüssige Masse in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 1 h auf Eis inkubiert. Danach wurde die Masse für 20 min bei 4 °C und 16000 rpm in der Zentrifuge Centrifuge 5402 von Eppendorf zentrifugiert. Der Überstand wurde zu je 50 µl bei -20 °C eingefroren.

4.2.4.3 **Proteinbestimmung nach Bradford**

Hierfür wurde das Kit Pierce BCA Protein Assay, wie im Protokoll von They et al. 2006 empfohlen [13], verwendet. Dieses Kit besteht aus zwei Komponenten, die erst kurz vor Gebrauch vermischt wurden. Vom BCA Standard und von den Proben wurden Verdünnungsreihen erstellt und je 25 µl in ein Well der 96-well Platte gegeben. Anschließend wurden 200 µl des Reagenzgemischs hinzugegeben und beides vermischt. Nach einer 30-minütigen Inkubation wurde die Absorption bei 570 nm im ELISA Reader GENios Plus (Tecan) gemessen und anhand einer Eichkurve, die über die Standardverdünnungsreihe ermittelt wurde, die Konzentration der Proben berechnet.

4.2.5 **Western Blot**

Der Western Blot diente zur Analyse der isolierten Exosomen und der angefertigten Gesamtzelllysate.

4.2.5.1 Vorbereitung und Gießen der Gele

Zuerst wurde die Kammer zum Gießen der Gele zusammengebaut und in den Gelgießstand fixiert. Als Trenngel wurde ein 12 %iges Gel verwendet. Hierfür wurden 3,3 ml destilliertes Wasser, 4 ml eines 30 %igen Acrylamidmixes, 2,5 ml Tris Puffer (1,5 M; pH 8,8), 100 µl 10 %iges SDS, 100 µl 10 %iges APS und 10 µl TEMED benötigt. Die zur Polymerisation benötigten Reagenzien APS (Polymerisationsinitiator) und TEMED (Polymerisationskatalysator) wurden immer erst kurz vor dem Gießen hinzugefügt.

Tabelle 2 Trenngelzusammensetzung

12 %iges Trenngel:	
H ₂ O dest.	3,3 ml
30 % Acrylamidmix	4 ml
Tris Puffer (1,5 M, pH 8,8)	2,5 ml
10 % SDS	100 µl
10 % APS	100 µl
TEMED	10 µl

Nachdem das Trenngel bis zur Markierung in die Gießkammer gefüllt war, wurde es mit Isobutanol (mit Wasser ausgeschüttelt) überschichtet, um eine glatte blasenfreie Oberfläche zu bekommen. Anschließend wurde das 5 %ige Sammelgel vorbereitet. Hierfür wurden 3,4 ml destilliertes Wasser, 0,83 ml eines 30 %igen Acrylamidmix, 0,63 ml Tris Puffer (1 M, pH 6,8), 50 µl 10 %iges SDS, 50 µl 10 %iges APS und 5 µl TEMED benötigt.

Tabelle 3 Sammelgelzusammensetzung

5 %iges Sammelgel:	
H ₂ O dest.	3,4 ml
30 % Acrylamidmix	0,83 ml
Tris Puffer (1 M, pH 6,8)	0,63 ml
10 % SDS	50 µl
10 % APS	50 µl
TEMED	5 µl

Nach dem Festwerden des Trenngels wurde das Isobutanol abgegossen und das zuvor vorbereitete Sammelgel in die Kammer gefüllt, der Kamm zum Formen der Geltaschen hinzugefügt und für weitere 30 min zum Festwerden stehen gelassen.

4.2.5.2 Gelelektrophorese

Zu den Proben wurde im Verhältnis 3:1 ein nicht reduzierender 4 x Ladepuffer (ohne Mercaptoethanol) [NuPAGE LDS Sample Buffer (4 x), Invitrogen] hinzugefügt und alles für 15 min bei 50 °C auf einen Thermoschüttler gestellt. Währenddessen wurde das Gel für die Gelelektrophorese vorbereitet, in die Elektrophoresekammer gespannt und der

Elektrophoresepuffer hinzugefügt. In die erste Geltasche wurden zwei Größenstandards (1,5 µl MagicMarker von Invitrogen und 1,5 µl PageRulerprestainedLadder von Fermentas) hinzugefügt. In die weiteren Taschen wurden die mit Ladepuffer versetzten Proben gefüllt und anschließend die Elektrophorese gestartet. Dazu wurde zuerst die Probe bei 80 V in das Sammelgel einlaufen gelassen und anschließend die Spannung auf 120 V erhöht. Diese Gelelektrophorese wurde so lange laufen gelassen bis die blaue Farbstofffront kurz vor Ende des Gels nach ungefähr eineinhalb Stunden angekommen war.

4.2.5.3 Immunoblot

Nach der Gelelektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine vom Gel auf eine Immobilon P Membran (PVDF) von Millipore (Merck) mit dem NuPAGE Transfer Puffer von Invitrogen in eine Blotkammer mit einer Spannung von 30 V transferiert. Dieser Schritt dauerte eine Stunde. Anschließend wurde die Membran in Milch, die mit TBST (Tris buffered saline + Tween20) versetzt wurde, für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Als Primärantikörper wurden zum einen ein spezifischer TIMP1-Antikörper, ein CD63-Antikörper zur Exosomendetektion, und ein β -Aktin-Antikörper verwendet. Die Membran wurden jeweils über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler mit den Antikörpern inkubiert. Anschließend wurde die Membran viermal für 10 min mit TBST gewaschen und für 1 h bei Raumtemperatur ein Anti-mouse HRP Antikörper als Sekundärantikörper hinzugefügt. Danach wurde die Membran erneut viermal für 10 min mit TBST und zweimal für 5 min mit TBS (Tris buffered saline) gewaschen.

Um die Banden sichtbar werden zu lassen, wurde die Membran in der Dunkelkammer für 1 min in einem Chemilumineszenzreagenz (ECL von Perkin Elmer), das aus zwei Einzelkomponenten (Enhanced luminol reagent und Oxidizing reagent) besteht, die zu gleichen Teilen gemischt wurden, inkubiert. Nach dem Trocknen wurde die Membran auf einen Röntgenfilm in eine Röntgenfilmkassette - bis die optimale Belichtungszeit erreicht war - gelegt. Danach wurde der Röntgenfilm im Röntgenfilmentwickler Curix 60 der Firma Agfa entwickelt.

5 Ergebnisse

5.1 Planung

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob mit Hilfe von GPI-verankerten Proteinen eine Modifikation von Exosomen möglich ist. Dies könnte eine Möglichkeit darstellen, die Oberfläche von Exosomen mit biologisch aktiven Proteinen zu versehen, um eine zellfreie Therapieform herzustellen. Sollte dies funktionieren, könnten die GPI-verankerten Proteine auf den Exosomen eine noch bessere Wundheilung bedingen. In früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Nelson wurde herausgefunden, dass durch das Hinzufügen von isolierten GPI-verankerten Proteinen zu Zellen eine Modifikation von deren Zelloberflächen möglich ist [1, 34 – 38, 42]. Zudem sind GPI-verankerte Proteine in Lipidflößen angereichert [19] und Lipidflöße in der Exosomenmembran enthalten [15]. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass allein durch die Expression von GPI-verankerten Proteinen auf der Zellmembran der transformierten Zellen, die GPI-verankerten Proteine mit in die von diesen Zellen sezernierten Exosomen eingebaut werden.

Eine schematische Abbildung des gewünschten Exosoms mit den GPI-verankerten Proteinen ist in Abbildung 5 dargestellt.

Als Proteine wurden die in Vorarbeiten hergestellten GPI-verankerten Proteine TIMP1-myc-GPI, sowie die Kontrollproteine: N-TIMP1-myc-GPI, vv-TIMP1-myc-GPI und EGFP-myc-GPI, ausgesucht, da TIMP1-GPI eine positive Auswirkung auf die Wundheilung zeigte [34]. EGFP-myc-GPI, ein grünfluoreszierendes Protein, wurde als Hauptkontrollprotein, ohne eigene intrinsische Auswirkungen auf den Zellorganismus, bestimmt. N-TIMP1-myc-GPI ist eine Variante von TIMP1-myc-GPI, bei der nur die N-terminale Domäne von TIMP1 enthalten ist, um die Auswirkungen dieser Domäne isoliert erforschen zu können. Bei vv-TIMP1-myc-GPI ist eine Mutation in der N-terminalen Domäne, 2 Valinreste zusätzlich, durchgeführt worden, um die Wirkung der N-terminalen Domäne zu beeinflussen und somit die Auswirkungen der C-terminalen Domäne genauer beurteilen zu können. Alle ausgewählten Proteine enthalten einen myc-Tag, der als Angriffspunkt für einen gemeinsamen Antikörper dient und auch keine eigene intrinsische Aktivität besitzt. Diese Varianten und auch der eingeschobene myc-Tag wurden im Rahmen der Arbeit von Nicole Rieth erstellt [1]. Als Zielzellen wurden mesenchymale Stammzellen ausgewählt, da diese und deren Exosomen ebenfalls eine positive Auswirkung auf die Wundheilung zeigten [7, 33].

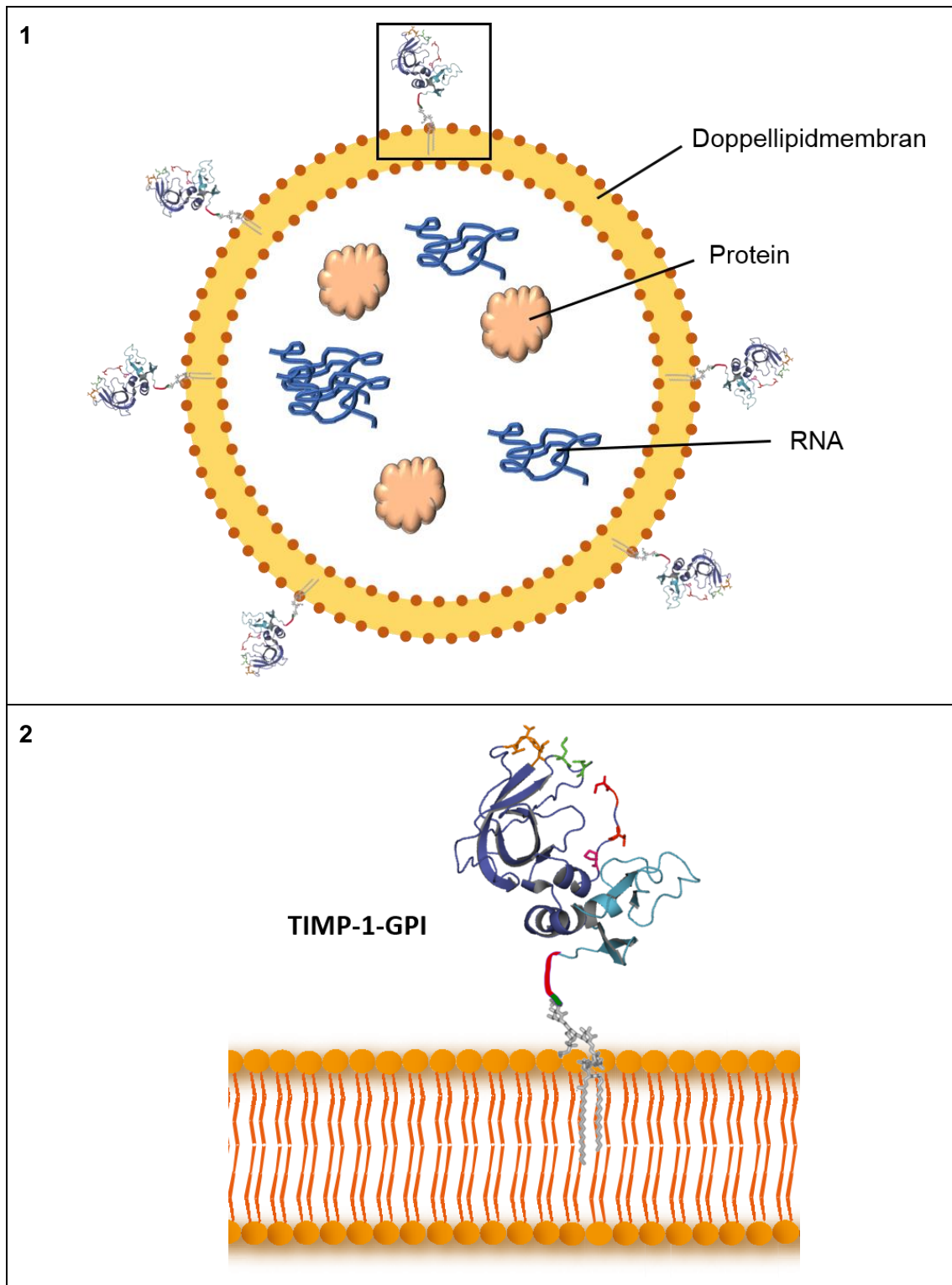


Abbildung 5 Schematische Darstellung des gewünschten Exosoms

1 Exosom mit TIMP1-GPI an der Oberfläche.

2 Vergrößerung des Ausschnitts aus 1. Hier ist die Doppellipidmembran, auf der TIMP1 über einen GPI-Anker befestigt ist, dargestellt.

Die Grafiken wurden mit Hilfe von PowerPoint erstellt. Die Grafik aus 2 wurde freundlicherweise von Prof. Dr. P. J. Nelson zur Verfügung gestellt.

5.2 Zelllinien

5.2.1 Klonierung der Plasmide für die Transfektion

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob GPI-verankerte Proteine in den von den Zellen generierten Exosomen exprimiert werden. Hierfür wurden Zellen so verändert, dass sie die vordefinierten GPI-verankerten Proteine exprimieren.

Die verwendeten Plasmide, die die kodierende DNA-Sequenz für die Proteine TIMP1-myc-GPI, N-TIMP1-myc-GPI, vv-TIMP1-myc-GPI und EGFP-myc-GPI enthalten, wurden in Vorarbeiten des Labors [38] u.a. im Rahmen der Arbeit von N. Rieth hergestellt [1].

Als Klonierungsmethode wurde die Multi Site Gateway® Technologie angewandt. Diese Technologie wurde im Rahmen der Arbeit von C. Jäkel für die AG Nelson optimiert. Ein Destination-Vektor wurde von ihm so modifiziert, dass unterschiedliche Selektions-Antibiotikakassetten und Erkennungssequenzen für die Transposase „Sleeping Beauty“ integriert wurden [53, 54].

Alle Plasmide wurden per Testverdau kontrolliert und je eine Probe pro Konstrukt zur Sequenzierung versandt.

5.2.1.1 Klonierung der Entry Vektoren

Zur Klonierung der Entry Vektoren benötigt man einen Donor Vektor und die kodierende DNA-Sequenz (CDS) der Proteine. Diese DNA-Sequenzen wurden durch eine PCR amplifiziert und dabei mit den attB Enden, die für die MultiSite Gateway® Technologie benötigt werden, versehen. Die kodierende DNA-Sequenzen der Proteine wurden aus den Vektoren pEF-TIMP1-myc-GPI, pEF-vv-TIMP-1-myc-GPI, pEF-N-TIMP-1myc-GPI, pEF-sEGFP-myc-GPI mit den in Kapitel 4.1.10 angegebenen Primern amplifiziert. Als Donor Vektor wurde der Vektor pDONOR221-P5-P2 verwendet. In der MultiSite Gateway BP Rekombinationsreaktion wurden die Entry Vektoren hergestellt und in kompetenten E.coli amplifiziert. Aus den Bakterien wurden die Vektoren durch die in Kapitel 4.2.2.7 beschriebenen Isolationsmethoden gewonnen. Die in dieser Arbeit erstellten Entry Vektoren sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4 Entry Vektoren

Fertiger Entry Vektoren	Name der Proteine
pENTR221-TIMP1-myc-GPI	TIMP1-myc-GPI
pENTR221-vv-TIMP1-myc-GPI	vv-TIMP-1-myc-GPI
pENTR221-N-TIMP1-myc-GPI	N-TIMP-1myc-GPI
pENTR221-EGFP-myc-GPI	sEGFP-myc-GPI

5.2.1.2 Klonierung der Expressionsvektoren

Zur Klonierung der Expressionsvektoren wurden zwei Entry Vektoren und ein Destination Vektor verwendet. Der erste Entry Vektor war der Promotor und der zweite einer der in der Tabelle 4 aufgelisteten Entry Vektoren. Als Promotor wurde immer der CMV/TO Promoter gewählt, den man prinzipiell blockieren könnte, um die Expression der GPI-verankerten Proteine zu vermindern. Dieser wurde verwendet, da vor der Transfektion nicht vorhersehbar war, ob die gewählte Zelllinie durch die dauerhafte Expression der TIMP1-Klone in ihrem Wachstum beeinträchtigt oder ein normales Wachstum zeigen würde. In dieser Arbeit zeigte sich, dass die dauerhafte Expression der GPI-Anker gekoppelten Proteine das Wachstum der L87 Zellen nicht beeinflusst. Der verwendete Entry Vektor für den Promotor (pENTR221-CMV/TO.Pro) wurde im Rahmen der Arbeit von C. Jäckel erstellt [53, 54]. Als Destination Vektor wurde der ebenfalls im Rahmen der Arbeit von C. Jäckel erstellte Vektor pSBDEST.N verwendet, der als Besonderheit Angriffspunkte für die Transposase „Sleeping Beauty“ enthält [53, 54]. Die Expressionsvektoren wurden durch die Multi Site Gateway LR Rekombinationsreaktion hergestellt. Diese sind in Tabelle 5 aufgelistet und wurden wie im vorausgehenden Kapitel beschrieben amplifiziert.

Tabelle 5 Expressionsvektoren

Fertiger Expressionsvektor	Erster Entry Vektor	Zweiter Entry Vektor
pSB.N.CMV/TO.TIMP1-myc-GPI	pENTR221-CMV/TO.Pro	pENTR221-TIMP1-myc-GPI
pSB.N.CMV/TO.vv-TIMP1-myc-GPI	pENTR221-CMV/TO.Pro	pENTR221-vv-TIMP1-myc-GPI
pSB.N.CMV/TO.N-TIMP1-myc-GPI	pENTR221-CMV/TO.Pro	pENTR221-N-TIMP1-myc-GPI
pSB.N.CMV/TO.EGFP-myc-GPI	pENTR221-CMV/TO.Pro	pENTR221-EGFP-myc-GPI

5.2.2 Transfektion der immortalisierten mesenchymalen Stammzellen

Als Zielzellen wurde die Zelllinie L87, eine immortalisierte mesenchymale Stammzelllinie (imMSC), ausgewählt, da Exosomen aus Stammzellen ähnliche Eigenschaften in Bezug auf Wundheilung aufweisen wie TIMP1-myc-GPI [26, 33, 34].

Als Transfektionsmethode wurde die klassische Elektroporation (siehe Kapitel 4.2.2.10) gewählt. Um die Effektivität des Einbaus der gewünschten Plasmide in das Genom der imMSC zu steigern, wurde das Plasmid pCMV(CAT)T7-SB100X, über das die

Transposase „Sleeping Beauty“ exprimiert wird, nach dem Protokoll siehe Kapitel 4.2.2.10 transient mit in die imMSC transfiziert. Die Bezeichnung der klonierten Zelllinien sind in Tabelle 6 dargestellt. Das Wachstum der Zellen wurde täglich unter dem Mikroskop beurteilt. Am ersten Tag nach der Transfektion waren einige tote Zellen zu sehen. Die überlebenden Zellen erholten sich anschließend schnell und zeigten ein normales Wachstum, das dem vor der Transfektion glich.

Tabelle 6 Klonierte Zelllinien

Resultierende Zelllinie	Enthaltender Expressionsvektor
L87-CMV/TO.TIMP1-myc-GPI	pSB.N.CMV/TO.TIMP1-myc-GPI
L87-CMV/TO.vv-TIMP1-myc-GPI	pSB.N.CMV/TO.vv-TIMP1-myc-GPI
L87-CMV/TO.N-TIMP1-myc-GPI	pSB.N.CMV/TO.N-TIMP1-myc-GPI
L87-CMV/TO.EGFP-myc-GPI	pSB.N.CMV/TO.EGFP-myc-GPI

5.2.3 Expressionskontrolle der Proteine auf der Zellmembran

Die Expression wurde mit der Durchflusszytometrie nach Anfärben der GPI-verankerten Proteine mit Primär- und Sekundärantikörper nach dem Protokoll in Kapitel 4.2.3.1 kontrolliert. Als Primärantikörper wurde hauptsächlich der Antikörper, der gegen den myc-Tag gerichtet ist, verwendet. In einem ersten Experiment wurde, um die Bindungseigenschaft von Anti-myc und Anti-TIMP1 zu vergleichen, noch eine Probe mit Anti-TIMP1 als Primärantikörper mitgeführt. Als Sekundärantikörper wurde der Antikörper Anti-mouse IgG R-PE(R439) verwendet. Dieser Antikörper ist mit dem rot-orangen Farbstoff R-PE konjugiert. Dieser wurde mit dem Laserdetektorkanal FL2 des Gerätes FACS Calibur der Firma BD Bioscience detektiert. Zur Detektion der grünen Fluoreszenz der Zelllinie L87-CMV/TO.EGFP-myc-GPI wurde der Laserdetektorkanal FL1 verwendet.

5.2.3.1 Expressionskontrolle bei den TIMP-1-myc-GPI exprimierenden Zellen und deren Varianten

Zuerst wurden die Primärantikörper Anti-TIMP1 und Anti-myc in der Durchflusszytometrie mit einander verglichen. Hierbei zeigte sich kein Unterschied (Daten sind in dieser Arbeit nicht dargestellt). Anschließend wurde für alle weiteren Expressionskontrollen als Primärantikörper Anti-myc verwendet.

Hierbei zeigte sich eine konstante Expression der Proteine TIMP1-myc-GPI, vv-TIMP1-myc-GPI und N-TIMP1-myc-GPI über einen längeren Zeitraum. Die Ergebnisse von höheren Zellpassagen sind in Abbildung 6 exemplarisch dargestellt. In dieser Abbildung ist ersichtlich, dass die Flächen der ungefärbten Zellen (graue Linie) und der Färbung mit dem Antikörper-Isotyp mIgG1 + Sekundärantikörper (blaue Fläche) fast identisch

sind. Damit wurde bewiesen, dass der Mausantikörper nicht unspezifisch an den zu analysierenden Zellen bindet. Die rote Linie stellt die mit dem Sekundärantikörper Anti-mouse Ig R-PE (R439) gefärbten Zellen dar. Durch den deutlichen Fluoreszenzunterschied wurde die Expression der Proteine bewiesen.

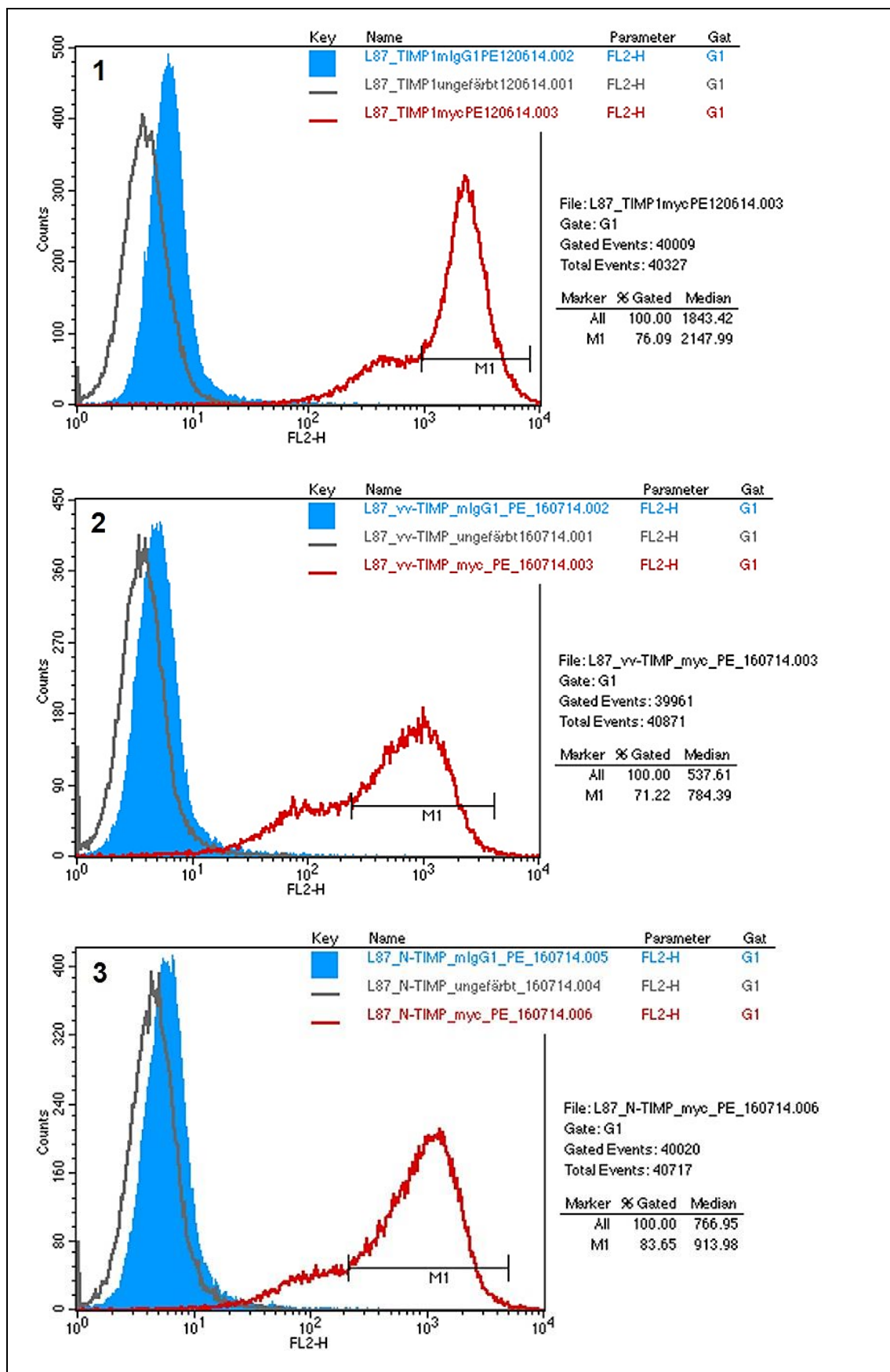


Abbildung 6 Expressionskontrolle der Proteine.

1 Expressionskontrolle von TIMP1-myc-GPI bei der Zelllinie L87-CMV/TO.TIMP1-myc-GPI (Passage 18)

2 Expressionskontrolle von vv-TIMP1-myc-GPI bei der Zelllinie L87-CMV/TO.vv-TIMP1-myc-GPI (Passage 13)

3 Expressionskontrolle von N-TIMP1-myc-GPI bei der Zelllinie L87-CMV/TO.N-TIMP1-myc-GPI (Passage 17)

Die graue Linie stellt jeweils die detektierten ungefärbten Zellen dar, die blaue Fläche die detektierten mit einem Antikörper-Isotyp und Sekundärantikörper gefärbten Zellen und die rote Linie die mit dem Primärantikörper und dem Farbstoff R-PE gefärbten Zellen dar.

Hierbei zeigt sich jeweils eine deutliche Fluoreszenz der mit Anti-myc und dem Sekundärantikörper gefärbten Zellen. Dadurch wurde die Expression der jeweiligen Proteine bewiesen.

5.2.3.2 Expressionskontrolle bei den EGFP-myc-GPI exprimierenden Zellen

Zur Expressionskontrolle des Proteins EGFP-myc-GPI wurde einerseits wie zur Detektionskontrolle der anderen Proteine vorgegangen (Protokoll siehe 4.2.3.1) und andererseits die grüne Eigenfluoreszenz im FL1-Kanal gemessen. Zur Kontrolle bei der Messung der grünen Eigenfluoreszenz wurde die Zelllinie L87-CMV/TO.TIMP1-myc-GPI (ungefärbt) mitgeführt, die keine eigene grüne Fluoreszenz erzeugt. In Abbildung 7 sind die Ergebnisse dargestellt. Die mitgeführten Proben, die mit einem Mausantikörperisotyp und dem Sekundärantikörper gefärbt waren, zeigte auch hier, dass der Mausantikörper nicht unspezifisch an die Zelloberfläche bindet, da die Messung der ungefärbten Zellen und der Isotypfärbung fast identisch verlief. Somit sind die Ergebnisse der Messung auswertbar. Es zeigte sich ein Fluoreszenzunterschied im Kanal FL2 zwischen den ungefärbten und mit dem Sekundärantikörper gefärbten Zellen. Die Expression des Proteins EGFP-myc-GPI wurde hiermit bewiesen. Allerdings zeigte sich bei der Fluoreszenzmessung im Kanal FL1 für die grüne Eigenfluoreszenz kein so deutlicher Unterschied für alle EGFP-myc-GPI exprimierenden Zellen, wie bei der Antikörperfärbung gemessen. Dies wurde darauf zurückgeführt, dass die Zellen zwar EGFP-myc-GPI exprimieren, da es einen eindeutigen Nachweis für die Bindung der Antikörper an das Protein gibt (siehe Abbildung 7 Bild 1), aber die grüne Eigenfluoreszenz der Zellen unterschiedlich stark ausgeprägt ist und eine schwache Eigenfluoreszenz nicht detektierbar ist.

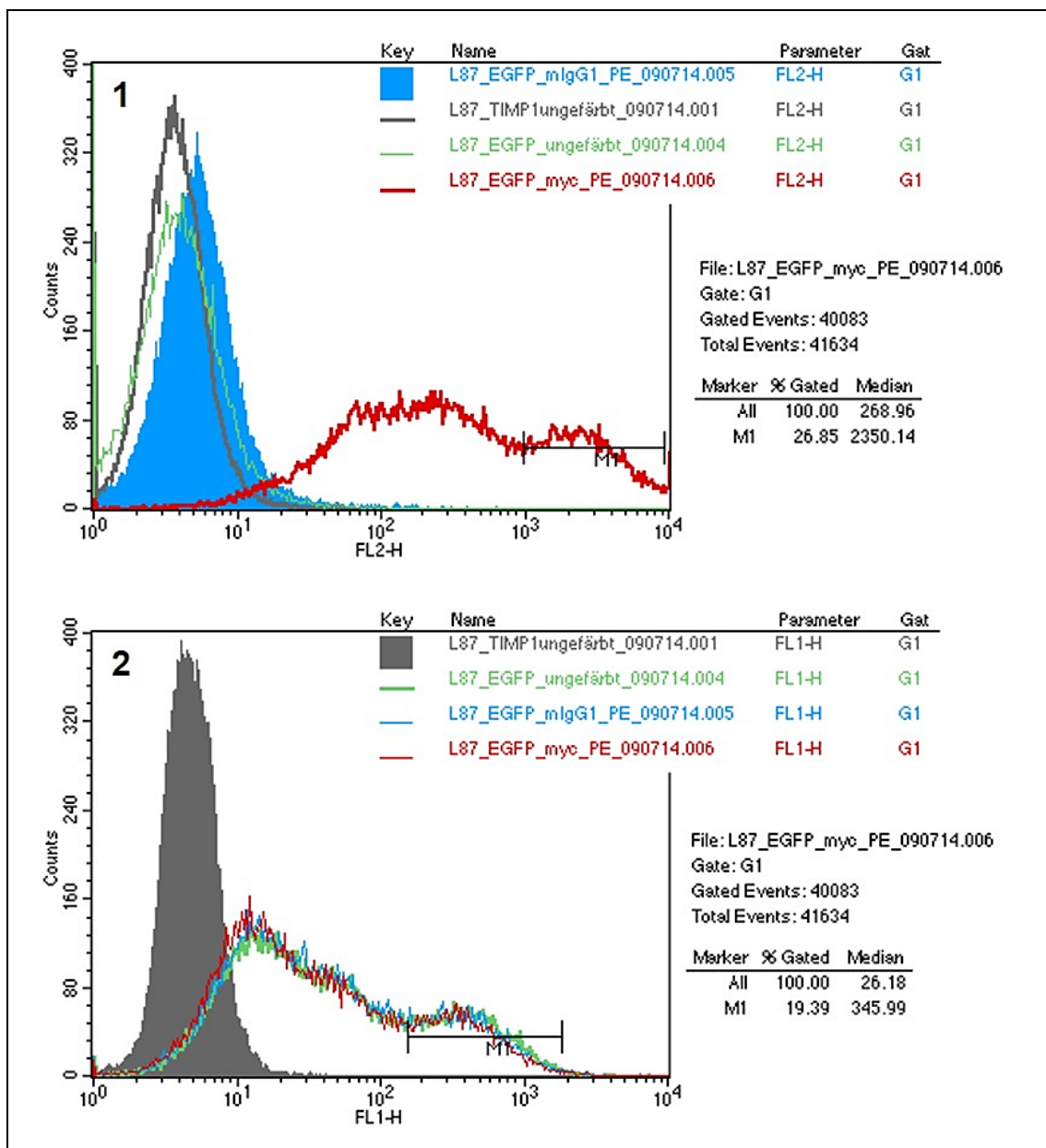


Abbildung 7 Expressionskontrolle von EGFP-myc-GPI bei der Zelllinie L87-CMV/TO.EGFP-myc-GPI (Passage 20).

1 Messung der Fluoreszenz des R-PE Farbstoffs

2 Messung der grünen Eigenfluoreszenz

Die Zelllinie L87-CMV/TO.TIMP1-myc-GPI ist in der Abbildung grau dargestellt, die ungefärbte Zelllinie L87-CMV/TO.EGFP-myc-GPI grün, die Antikörper-Isotyp- + Sekundärantikörperfärbung blau und die Färbung mit Anti-myc + Sekundärantikörper rot.

Hierbei zeigt sich ein Unterschied im FL2 Kanal für die Fluoreszenz des R-PE Farbstoffs. Die Expression von EGFP-myc-GPI wurde hierdurch bewiesen. Allerdings zeigte die Messung im FL1 Kanal für die grüne Eigenfluoreszenz, dass die Zellen eine unterschiedlich starke Eigenfluoreszenz besitzen und sich somit nicht so deutlich von der ungefärbten Zelllinie L87-TIMP1-myc-GP, die keine grüne Eigenfluoreszenz erzeugt, unterscheidet.

5.2.4 Optimierung der Expression von EGFP-myc-GPI

In den Experimenten zeigte sich eine unterschiedlich starke Eigenfluoreszenz der Zelllinie L87-CMV/TO.EGFP-myc-GPI (siehe 5.2.3.2). Auch zeigte sich, dass in der Fluoreszenzmikroskopie nicht alle Zellen eine sichtbare grüne Eigenfluoreszenz aufwiesen. Dies ist exemplarisch in Abbildung 8 auf den Bildern 1 und 2 für die erste

Zellpassage nach Transfektion dargestellt. Im Vergleich der Bilder 1 und 2 sieht man, dass nicht alle Zellen eine sichtbare grüne Eigenfluoreszenz aufweisen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine Zellsortierung freundlicherweise von Herrn Josef Mysliwietz im Labor der Arbeitsgruppe von Prof. Elfriede Nößner durchgeführt. Anschließend wurde der Erfolg durch die Fluoreszenzmikroskopie kontrolliert. Hierbei zeigte sich, dass nach der Zellsortierung alle Zellen eine grüne Eigenfluoreszenz aufweisen. Dies ist exemplarisch in Abbildung 8 auf Bild 3 (Lichtmikroskopie) und 4 (Fluoreszenzmikroskopie) für die dritte Zellpassage nach Sortierung gezeigt. Im Vergleich der Bilder 3 und 4 sieht man nun eine grüne Eigenfluoreszenz aller Zellen.

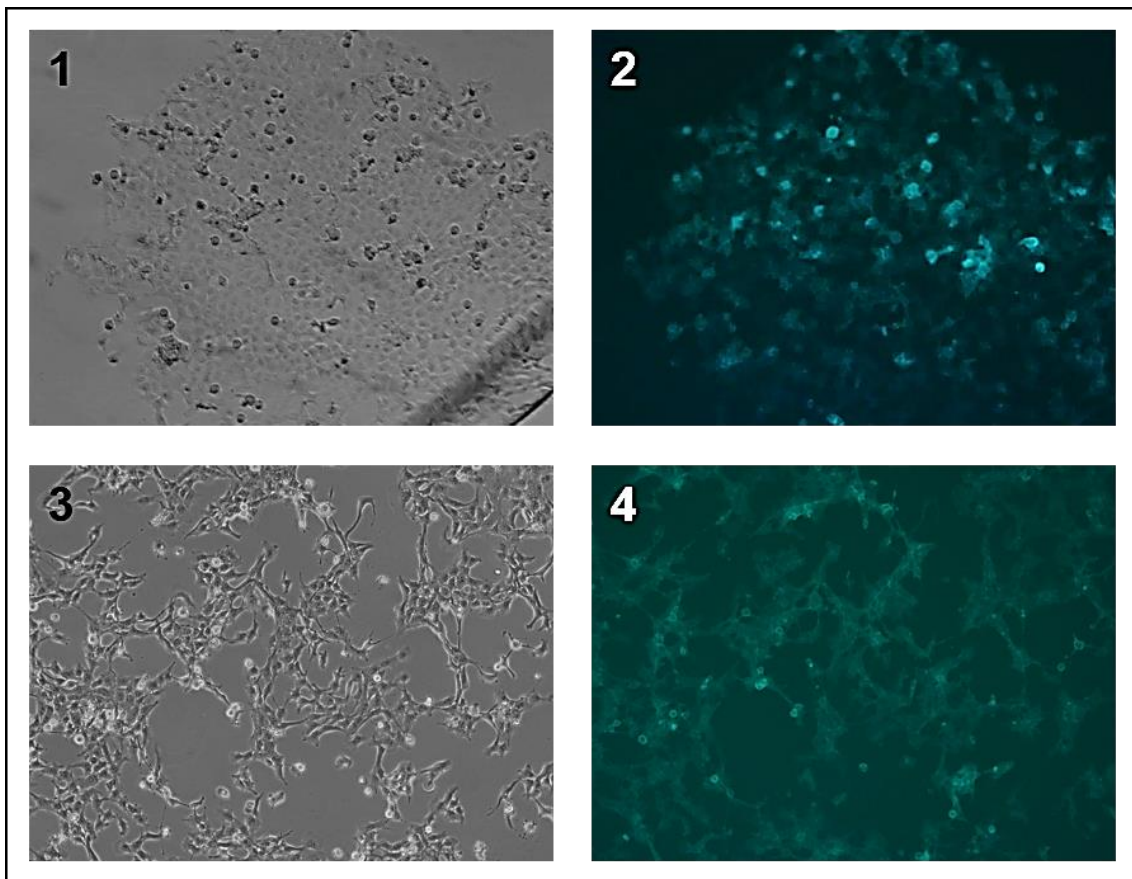


Abbildung 8 Fluoreszenzmikroskopie der Zelllinie L87-CMV/TO.EGFP-myc-GPI.

1 Lichtmikroskopisches Bild der ersten Zellpassage nach Transfektion

2 Fluoreszenzmikroskopisches Bild der ersten Zellpassage nach Transfektion

3 Lichtmikroskopisches Bild der dritten Zellpassage nach Sortierung

4 Fluoreszenzmikroskopisches Bild der dritten Zellpassage nach Sortierung

Im Vergleich der Bilder 1 und 2 zeigt sich, dass nicht alle Zellen eine sichtbare grüne Eigenfluoreszenz aufweisen. Nach der Zellsortierung zeigt sich im Vergleich der Bilder 2 und 4, dass nun alle Zellen eine sichtbare Eigenfluoreszenz aufweisen.

Anschließend wurde noch eine Durchflusszytometrie-Analyse von den EGFP-myc-GPI im Vergleich zu TIMP1-myc-GPI exprimierenden imMSC in Bezug auf die grüne Eigenfluoreszenz der EGFP-myc-GPI durchgeführt. Die Zelllinie L87 CMVTO-TIMP1-myc-GPI wurde hier als eine Beispielzelllinie, die keine eigene grüne Fluoreszenz

aufweist, verwendet. Dies ist in Abbildung 9 gezeigt. Hier sieht man, dass nach der Zellsortierung eine deutliche grüne Eigenfluoreszenz messbar ist.

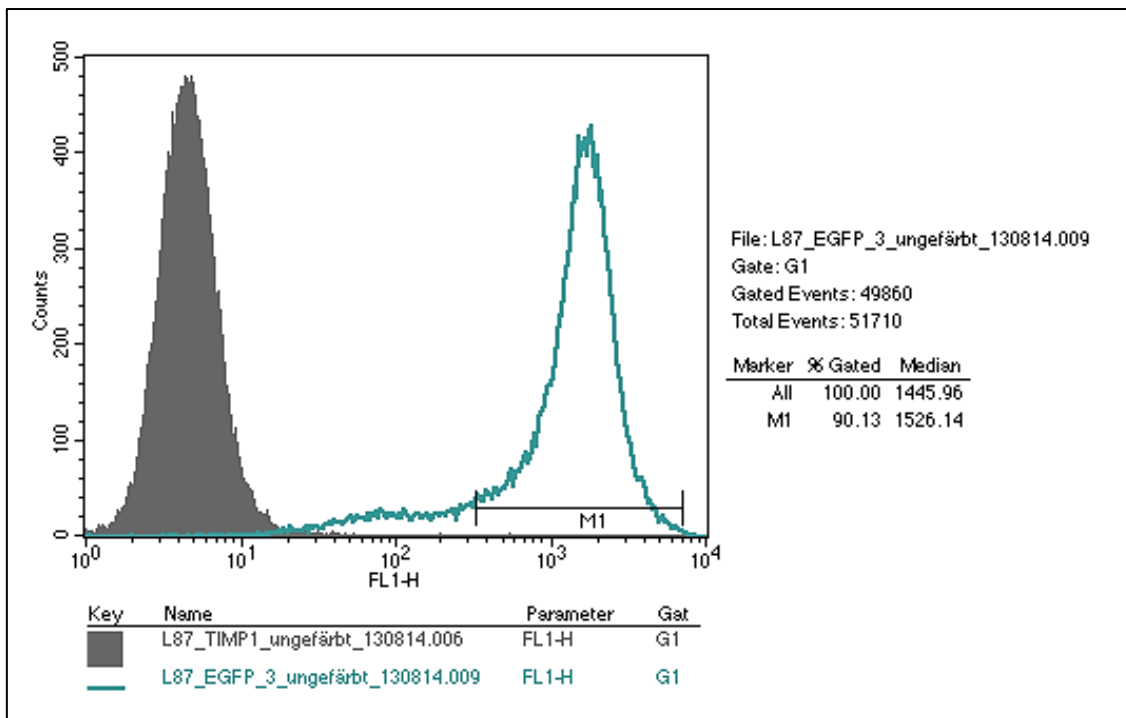


Abbildung 9 Vergleich der Eigenfluoreszenz der Zelllinien L87 CMVTO-TIMP1-myc-GPI und L87 CMVTO-EGFP-myc-GPI.

Es wurde die vierte Zellpassage nach der Zellsortierung der L87 CMVTO-EGFP-myc-GPI-Zellen hierfür verwendet. Die Zelllinie L87 CMVTO-TIMP1-myc-GPI wurde als Beispielzelllinie ohne grüne Eigenfluoreszenz verwendet. Nach der Zellsortierung ist nun ein deutlicher Unterschied in der grünen Eigenfluoreszenz zu sehen.

5.3 Exosomenisolation

Im nächsten Schritt wurden dann von den Zelllinien Exosomen isoliert. Hierfür wurde zuerst die klassische Methode der Ultrazentrifugation [13] angewandt und zu einem späteren Zeitpunkt das Kit Exo Spin verwendet.

Anschließend wurden die Proteinkonzentrationen der erhaltenen Exosomenisolate durch die Methode nach Bradford (siehe 4.2.4.3) bestimmt.

Danach wurde zum Nachweis der Anwesenheit von Exosomen in der erhaltenen Probe ein Western Blot (Protokoll siehe 4.2.5) durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass der Exosomenmarker CD63 in allen Exosomenisolaten und auch in den Gesamtzelllysaten vorhanden war.

5.3.1 Exosomenisolation durch Ultrazentrifugation

Hierfür wurden die Zelllinien 24 h mit einem FCS-freien Medium versehen, um eine Kontamination mit den Exosomen aus dem FCS zu vermeiden. Anschließend wurde der Medienüberstand gesammelt. Durch unterschiedliche Zentrifugationsschritte, die sich

durch Geschwindigkeit und Dauer unterschieden, wurden die Exosomen von den anderen Bestandteilen des Zellkulturmediums gereinigt. Durch die ersten beiden Zentrifugationsschritte bei 300 x g und 2000 x g für jeweils 10 min wurden die im Überstand enthaltenen lebenden und toten Zellen entfernt. In einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 10 000 x g für 30 min wurde der übrige Zellschrott entfernt. Sowohl die lebenden und toten Zellen als auch der Zellschrott befanden sich im resultierenden Pellet. Somit wurde jeweils das Pellet verworfen und der Überstand weiterverwendet. Bei der darauffolgenden Zentrifugation bei 100 000 x g für 70 min wurden die Exosomen und die noch enthaltenen Proteine im Pellet gesammelt. Hier wurde dann der Überstand verworfen. Das erhaltene Pellet wurde zum Reinigen in PBS resuspendiert und bei einer weiteren Zentrifugation bei 100 000 x g für 70 min wurden im Pellet die gereinigten Exosomen gesammelt. Dieses von den kontaminierenden Proteinen befreite Exosomenpellet wurde anschließend in PBS aufgenommen und in Aliquotes zur Lagerung bei -20 °C aufgehoben. Für die weitere Analyse der Exosomen wurden wenige Aliquotes bei 4 °C für kurze Zeit gelagert. Eine Übersicht über die unterschiedlichen Zentrifugationen ist in Abbildung 10 dargestellt.

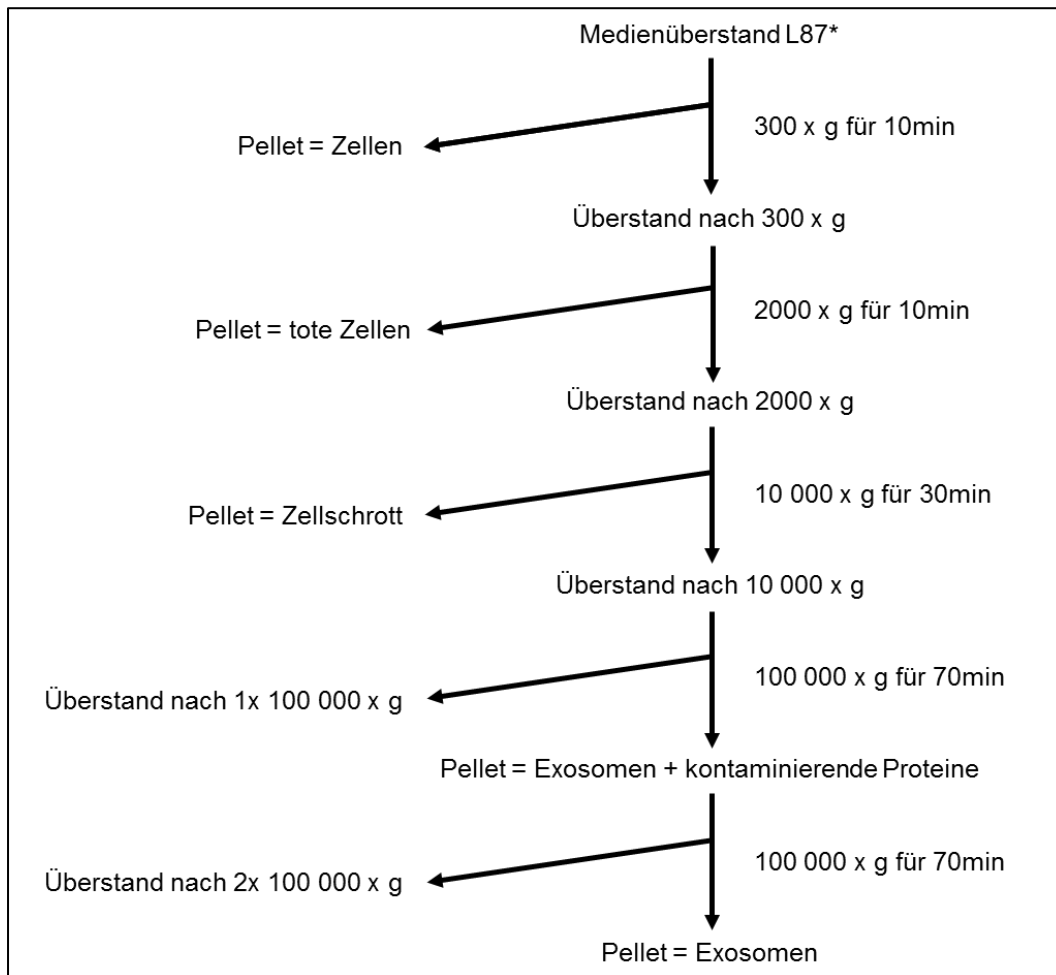


Abbildung 10 Übersicht über die einzelnen Zentrifugationsschritte. In der Mitte sind die jeweils weiter verwendeten Materialien angegeben, links die verworfenen Materialien und rechts die Geschwindigkeit und die Dauer der Zentrifugation. Abbildung modifiziert nach They et al. 2006
 * Zuvor wurden die Medienüberstände von den unterschiedlichen in dieser Arbeit verwendeten L87 Zelllinien oder der Ursprungszelllinie L87 gesammelt

5.3.2 Exosomenisolation mit dem Kit ExoSpin

Um eine schnellere Variante der Exosomenisolation aus dem Zellkulturüberstand zu testen wurde das Isolationskit ExoSpin von Cell Guidance Systems ausgewählt. In diesem Kit wurden in den ersten Zentrifugationsschritten die lebenden und toten Zellen sowie der Zellschrott entfernt. Anschließend wurde durch die Zugabe eines Puffers die Exosomenfraktion ausgefällt. Durch eine weitere Zentrifugation wurde die Exosomenfraktion von der restlichen Suspension getrennt. Das resuspendierte Pellet musste danach noch durch ein Säulchen gereinigt und anschließend aus dem Säulchen durch PBS gelöst werden. Die so erhaltenen Exosomen wurden nachfolgend mit den Exosomen, die durch die Ultrazentrifugation gewonnen wurden, durch einen Western Blot verglichen.

5.3.3 Nachweis der Exosomen durch Western Blot-Analyse

Zum Nachweis der Exosomen wurde eine Western Blot Analyse ausgewählt. Als Exosomenmarker wurde das Tetraspanin CD63 ausgewählt. CD63 wurde als Marker unter anderem von Thery et al. 2006 propagiert [12 – 15].

Die aus den Zelllinien L87-CMV/TO.TIMP1-myc-GPI, L87-CMV/TO.EGFP-myc-GPI und der untransfizierten Zelllinie L87 isolierten Exosomen und dem Gesamtzelllysat, der verwendeten Zelllinien, wurden nach dem im Kapitel 4.2.5 dargestellten Protokoll durch eine SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Anschließend wurde die Membran mit einem Antikörper gegen CD63 und danach mit dem Sekundärantikörper Anti-m/HRP gefärbt. Durch eine Chemilumineszenzreagenz und einen Röntgenfilm wurden anschließend die Proteinbanden sichtbar gemacht. Hierbei zeigte sich eine große Bande im erwarteten Bereich bei 50 bis 60 kDa, sowohl bei den durch Ultrazentrifugation gewonnenen Exosomen als auch bei den durch das Kit gewonnen Exosomen. Zudem konnte CD63 auch im Gesamtzelllysat nachgewiesen werden. Dies ist exemplarisch in Abbildung 11 gezeigt.

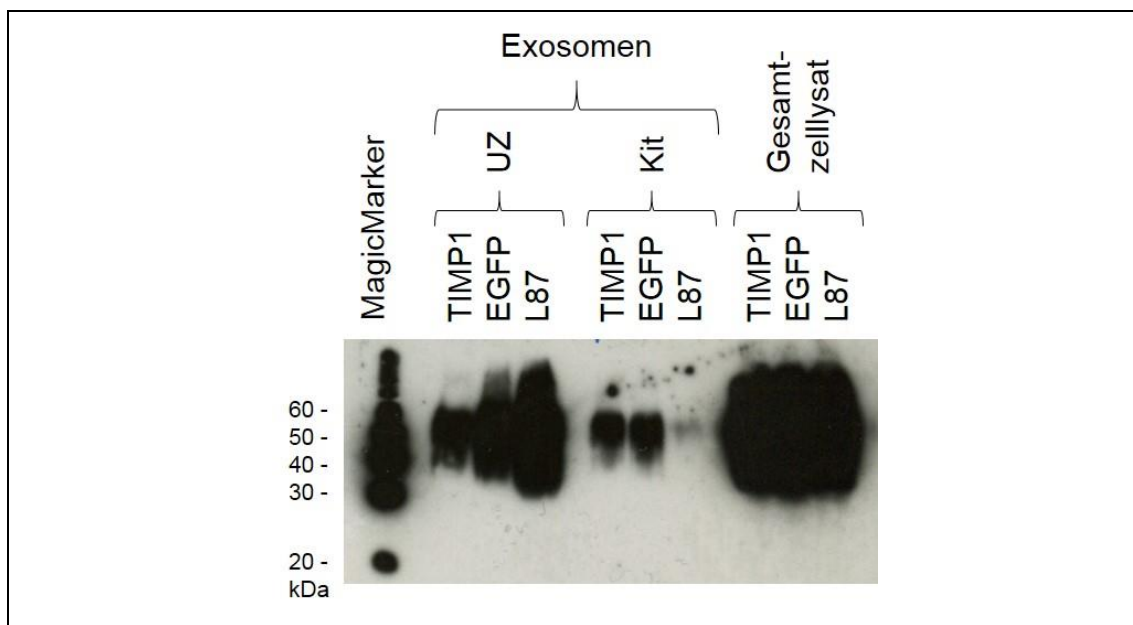


Abbildung 11 Western Blot - Färbung mit Anti-CD63.

Die durch Ultrazentrifugation oder mit dem Kit ExoSpin aus dem Zellkulturüberstand der Zelllinien L87-CMV/TO.TIMP1-myc-GPI, L87-CMV/TO.EGFP-myc-GPI und L87 gewonnenen Exosomen wurden in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mit dem Antikörper Anti-CD63 gefärbt. Anschließend wurden die Banden durch eine Chemilumineszenzsystem auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

(TIMP1: Zelllinie L87-CMV/TO.TIMP1-myc-GPI. EGFP: Zelllinie L87-CMV/TO.EGFP-myc-GPI. L87: untransfizierte Zelllinie. UZ: Ultrazentrifugation; Kit: ExoSpin von Cell Guidance Systems)

5.4 Expressionskontrolle der Proteine auf den Exosomen

Zur Kontrolle, ob die GPI-verankerten Proteine auch auf den Exosomen zu finden sind, wurde ebenfalls ein Western Blot (Protokoll siehe 4.2.5) durchgeführt. Hierbei zeigten sich die für diese Proteine typischen Banden bei 40 und 60 kDa nach der Entwicklung der Röntgenfilme.

In Abbildung 12 ist der Röntgenfilm zum Western Blot der ersten Exosomenisolation durch Ultrazentrifugation dargestellt. Die Exosomen wurden aus dem Zellkulturüberstand der Zelllinie L87-CMV/TO.TIMP1-myc-GPI durch Ultrazentrifugation gewonnen und anschließend das ganze Isolat in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf eine Membran transferiert und nacheinander mit den Primärantikörpern Anti-TIMP1 und Anti- β -Actin und dem Sekundärantikörper Anti-m/HRP gefärbt. Danach wurden die Banden durch die Chemilumineszenzreagenz (ECL) auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht. Dadurch wurden die Banden bei ungefähr 40 und 60 kDa für TIMP1-myc-GPI sichtbar. β -Actin konnte nur im Gesamtzelllysat der Herkunftszellen der Exosomen nachgewiesen werden.

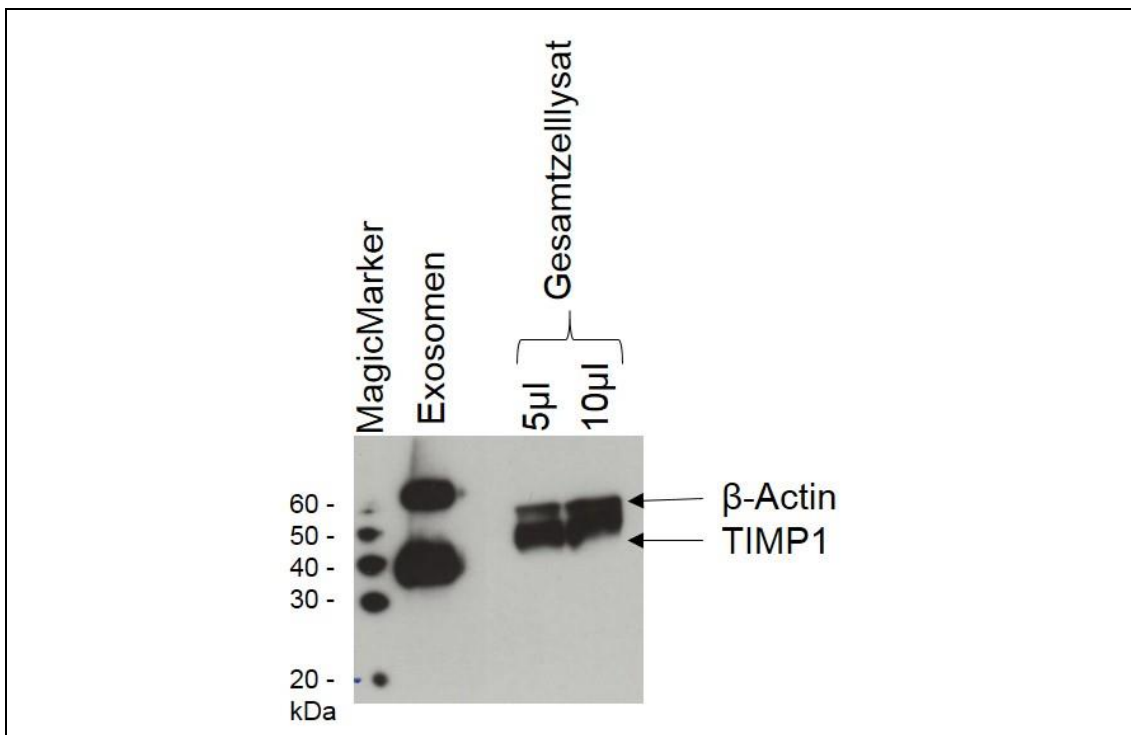


Abbildung 12 Western Blot - Färbung mit Anti-TIMP1.

Die durch Ultrazentrifugation aus dem Zellkulturüberstand der Zelllinie L87-CMV/TO.TIMP1-myc-GPI gewonnenen Exosomen wurden in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mit dem Antikörper Anti-TIMP1 gefärbt. Anschließend wurden die Banden durch ein Chemilumineszenzsystem auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

Die Western Blot Analysen wurden nach jeder Exosomenisolation erneut durchgeführt. Exemplarisch ist in Abbildung 13 ein Bild einer weiteren Analyse dargestellt. Hierbei wurden die Exosomen, die durch Ultrazentrifugation aus dem Zellkulturüberstand der Zelllinien L87-CMV/TO.TIMP1-myc-GPI, L87-CMV/TO.EGFP-myc-GPI und L87 gewonnen wurden, durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Zur Färbung wurden als Primärantikörper Anti-TIMP1, Anti-myc und Anti-CD63 verwendet. Anschließend wurden die Banden durch ein Chemilumineszenzsystem auf den Röntgenfilmen festgehalten. Hierbei zeigte sich, dass TIMP1 nur auf den Exosomen der Zelllinie L87-CMV/TO.TIMP1-myc-GPI nachgewiesen werden konnte. Der in allen in dieser Arbeit verwendeten Proteine enthaltene myc-Tag konnte sowohl bei den Exosomen der Zelllinie L87-CMV/TO.TIMP1-myc-GPI als auch bei den Exosomen der Zelllinie L87-CMV/TO.EGFP-myc-GPI, aber nicht bei den Exosomen der untransfizierten Zelllinie L87 nachgewiesen werden. In einer Färbung mit Anti-CD63 konnte CD63 in allen drei Proben nachgewiesen werden. Daraus wurde geschlossen, dass in allen drei Proben Exosomen vorhanden waren.

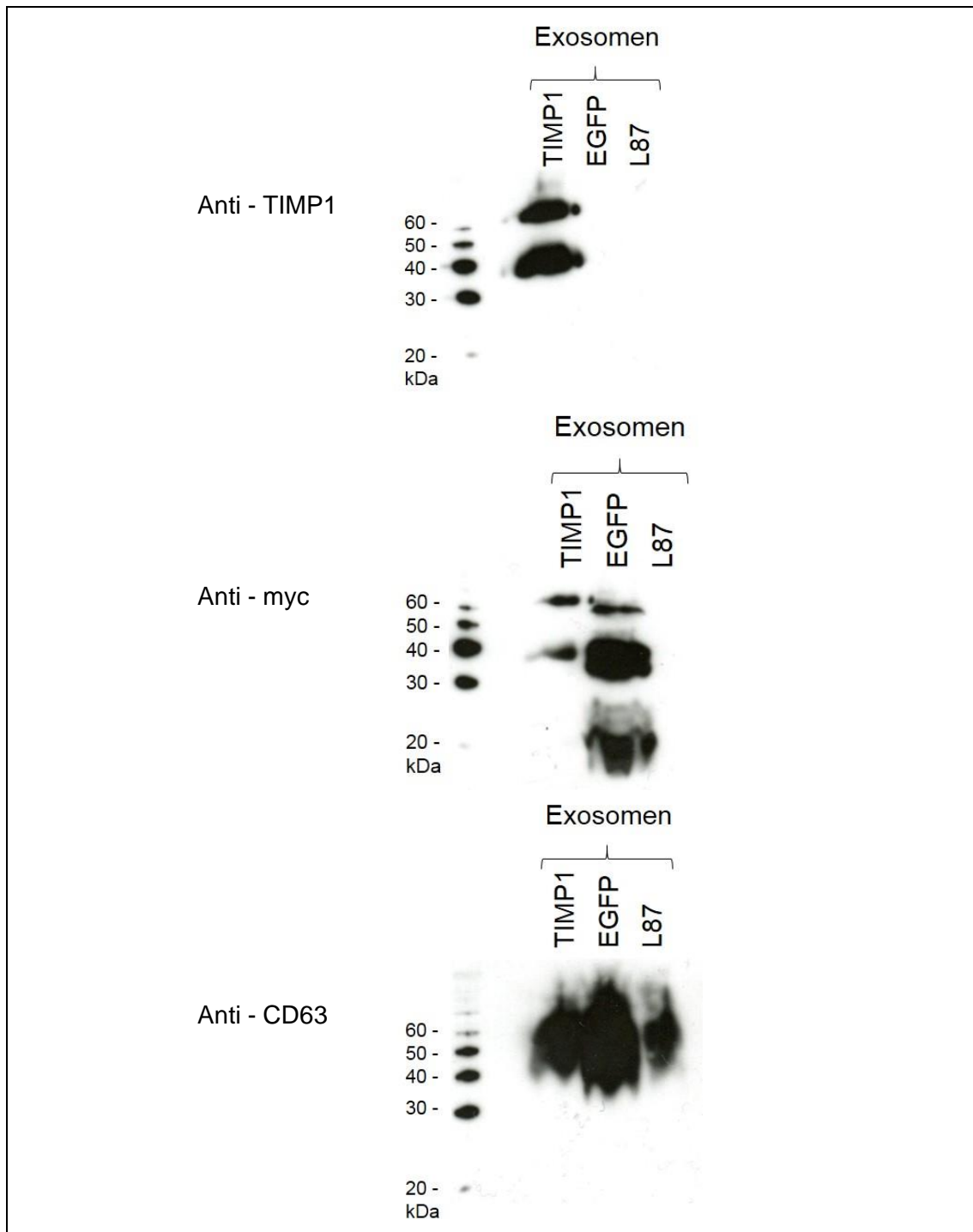


Abbildung 13 Western Blot

Die durch Ultrazentrifugation aus dem Zellkulturüberstand der Zelllinien L87-CMV/TO.TIMP1-myc-GPI, L87-CMV/TO.EGFP-myc-GPI und L87 gewonnen Exosomen wurden in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mit den Antikörpern Anti-TIMP1, Anti-myc und Anti-CD63 gefärbt. Anschließend wurden die Banden durch ein Chemilumineszenzsystem auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

Oben: Färbung mit Anti-TIMP1.

Mitte: Färbung mit Anti-myc.

Unten: Färbung mit Anti-CD63.

(**TIMP1:** von der Zelllinie L87-CMV/TO.TIMP1-myc-GPI isolierte Exosomen; **EGFP:** von der Zelllinie L87-CMV/TO.EGFP-myc-GPI isolierte Exosomen; **L87:** von der untransfizierten Zelllinie L87 isolierte Exosomen)

6 Diskussion

Wunden bzw. Wundbehandlung ist ein großer Bereich in der Medizin. Hierzu gehören nicht nur die chronischen Wunden, sondern auch akute durch Traumata entstandene Wunden, wie zum Beispiel Verbrennungen oder auch Operationswunden. Die Verbesserung der Wundheilung ist ein ständiges Ziel in der Medizin. Viele Produkte, die zu einer verbesserten Wundheilung führen sollen sind mittlerweile auf dem Markt [55 – 57]. Hierzu gehören verbesserte Verbandsmaterialien, die je nach Bedarf Feuchtigkeit aufnehmen oder abgeben bzw. ein ausgeglichenes Feuchtigkeitsniveau im Wundbereich erhalten, spezielle Wundgele und auch Vakuumpumpen [55, 56]. Doch auch durch diese Therapie gelingt nicht immer eine schnelle Wundheilung. Störfaktoren der Wundheilung sind zum Beispiel Infektionen, fortgeschrittenes Alter, Mangelernährung, Immunsuppression, Adipositas oder Begleiterkrankungen wie Diabetes mellitus, Herzinsuffizienz oder Tumoren [58]. Diese führen zu einer verlängerten Entzündungsphase in der Wunde und insgesamt zu einer Dysregulation der zur Heilung beitragenden Prozesse. Beispiele für zum Teil schwierig therapierbare Wunden sind zum einen der Dekubitus, ein Hautdefekt, der durch dauerhaften Druck ausgelöst wurde, chronische venöse oder arterielle Ulzera an den Extremitäten, die durch venöse oder arterielle Insuffizienz bedingt sind, und große oder tiefe Wundflächen bei großen Traumata wie zum Beispiel großflächigen Verbrennungen oder anderen Unfällen. Für diese Wunden tritt meist zusätzlich eine chirurgische Therapie in hierfür spezialisierten Zentren hinzu. Hierbei werden zum einen nekrotische Anteile entfernt und eine bessere arterielle Versorgung hergestellt und zum anderen auch Hauttransplantationen durchgeführt. Doch auch dies führt nicht in allen Fällen zur Wundheilung [55, 57].

Mesenchymale Stammzellen zeigten sich in verschiedenen Studien sowohl in vitro als in vivo oder auch in den noch selten durchgeführten klinischen Studien als eine neue viel versprechende Therapieoption [7 – 11, 55]. Es zeigte sich ein schnellerer Wundverschluss sowie auch eine Abheilung von chronischen Wunden [7, 55]. Dieser Mechanismus wurde zum einen auf die Proliferation und Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen und zum anderen Teil auf parakrine Effekte zurückgeführt. Die parakrinen Effekte scheinen hierbei den größten Anteil an der Verbesserung der Wundheilung zu haben [7 – 11, 59]. Mesenchymale Stammzellen fördern die Migration und Proliferation von Fibroblasten und Keratinozyten. Dies vermittelt einen beschleunigten Wundverschluss und eine verbesserte Reepithelisierung. Zudem wird die Angiogenese und auch die Gefäßstabilität unter anderem durch gesteigerte Expression von VEGF (vascular endothelial growth factor) und HGF (hepatocyte growth factor) gefördert. Zusätzlich modulieren sie die Inflamationsreaktion durch die Hemmung proinflammatorischer Zytokine wie TNF α

und die Steigerung antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10. Hierdurch wird der Übergang der Inflammations- in die Proliferationsphase unterstützt. IL-10 und HGF zeigen selbst eine antifibrotische Wirkung, in dem sie die TGF β 1 Sekretion und dadurch die überschießende Kollagenproduktion bzw. Narbenbildung minimieren. Zudem vermindern mesenchymale Stammzellen die freien Sauerstoffradikale im Wundmilieu. Einige Studien zeigten, dass durch diesen Einfluss der mesenchymalen Stammzellen die Bildung von Narbengewebe verringert und die Regeneration der ursprünglichen Epidermis mit Hautanhangsgebilden gefördert wird [8, 9, 11, 59].

Exosomen von mesenchymalen Stammzellen zeigten eine ähnliche wundheilungsfördernde Wirkung wie mesenchymale Stammzellen selbst [25, 32, 33]. Durch diese wurde die Proliferation und Migration von Fibroblasten gefördert [32, 33]. Ebenso zeigte sich eine gesteigerte Proliferation und Gefäßformation von Endothelzellen durch Zugabe von Exosomen [32, 33]. Shabbir et al. demonstrierte, dass eine Reihe von Wachstumsfaktoren nach der Behandlung mit Exosomen eine vermehrte Expression zeigen. Hierzu gehören HGF (hepatocyte growth factor), IGF1 (insulin like growth factor 1), NFG (nerve growth factor) und SDF1 (stromal derived growth factor 1). Für VEGF (vascular endothelial growth factor) zeigte sich in dieser Studie allerdings keine signifikante Erhöhung [32]. Zhang et al. führte einen in vivo Wundheilungsversuch mit Exosomen an Ratten durch. Hier führte die Exosomentherapie zu einer gesteigerten Reepithelisierung, zu vermehrten Hautanhangsgebilden und zu einer vermehrten Gefäßneubildung [33]. Eine heilungsfördernde Wirkung von Exosomen wurde auch in anderen Geweben wie zum Beispiel am Herzen, der Niere, den Knochen oder auch dem Darm gefunden [10, 26 – 28, 30, 60, 61].

Ebenso zeigte das GPI-verankerte TIMP1 in den vorausgegangen Arbeiten in der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. P.J. Nelson eine Förderung der Wundheilung [34 – 36]. Djafarzadeh et al. führten zunächst in vitro Versuche mit Fibroblasten durch [35]. Diese zeigten durch eine Behandlung mit TIMP-GPI eine verminderte Serum- oder TNF α induzierter Proliferation. Zudem wurde eine vermehrte Apoptoseneigung induziert. Bei genauerer Analyse stellte sich heraus, dass sich das Gleichgewicht der pro- und antiapoptischen Proteine in Richtung der Pro-Apoptose verschoben hatte. Auch zeigte sich die Expression der mRNA von einigen Fibrose assoziierten Genen wie zum Beispiel TGF β 1 und Fibronectin verringert [35]. Am Mausmodell zeigte sich ebenso eine Beschleunigung der Wundheilung durch TIMP1-GPI [34]. Keratinozyten wurden durch TIMP1-GPI zur Proliferation und Migration stimuliert. Daneben senkte TIMP1-GPI die Migration und Matrixsekretion von dermalen Myofibroblasten. Zudem wurde nach Zugabe von TIMP1-GPI eine verminderte Konzentration von aktivem TGF β 1 gemessen [34].

Somit wurde überlegt, ob man die positiven Auswirkungen von Exosomen und TIMP1-GPI kombinieren könne. In dieser Arbeit wurde zunächst untersucht ob man mit Hilfe eines GPI-Ankers die Oberfläche von Exosomen modifizieren kann. Aufgrund der Anreicherung von Lipidflößen und somit auch von GPI-verankerten Proteinen in der Exosomenmembran wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine Expression von GPI-verankerten Proteinen in den Exosomen produzierenden Zellen eine Modifikation der Exosomenmembran ermöglicht. Es wurde in FACS-Analysen gezeigt, dass durch die Gateway-Technologie und der Einsatz der Transposase „Sleeping Beauty“ eine stabile Expression von TIMP1-myc-GPI, N-TIMP1-myc-GPI und vv-TIMP1-myc-GPI in den imMSC erreicht wurde. Bei der Transfektion mit dem Plasmid mit EGFP-myc-GPI zeigte sich trotz gleichem Transfektionsprotokoll eine heterogene Expression. Anschließend wurden Exosomen aus dem Zellkulturüberstand durch Ultrazentrifugation nach dem Protokoll von C. Théry [13] isoliert. In Western Blot Analysen konnten die Exosomen durch Anfärbung des Tetraspanins CD63, ein Exosomenmarker, nachgewiesen werden. In weiteren Western Blot Analysen konnten auf den Exosomen auch die verwendeten Proteine TIMP1-myc-GPI und EGFP-myc-GPI nachgewiesen werden. Somit konnte demonstriert werden, dass durch die Expression von GPI-verankerten Proteinen eine Modifikation der Exosomenmembran möglich ist. Anschließend wurden noch einzelne Vorversuche mit der Fibrosarkomzelllinie HT1080 und den isolierten Exosomen durchgeführt. Hier konnten in einem MTT Assay keine signifikanten Unterschiede in der Proliferation durch die Zugabe der isolierten Exosomen festgestellt werden (nicht aufgeführte Daten).

Einige Studien legten nahe, dass es Unterschiede in den Exosomeninhalten je nach Herkunft der mesenchymalen Stammzellen aber auch der Kulturbedingungen gibt [10, 15, 60, 62]. Zum Beispiel zeigten Roccaro et al., dass Exosomen von mesenchymalen Stammzellen, die in Kontakt mit Zellen des Multiplen Myeloms waren, die Proliferation der Multiplen Myelomzellen fördern, und, dass die Exosomen von mesenchymalen Stammzellen, die keinen Kontakt zu Multiplen Myelomzellen aufwiesen, die Proliferation der Multiplen Myelomzellen hemmen [62]. Möglicherweise waren in den in dieser Arbeit isolierten Exosomen Stoffe enthalten, die dem erhofften Ziel der Verminderung des Fibrosarkomzellwachstums, entgegenwirkten und somit die Wirkung von TIMP1-myc-GPI aufhoben. Auch könnte die Art der Interaktion der Exosomen mit den Zielzellen die Ursache der fehlenden Auswirkung gewesen sein, da TIMP1-myc-GPI seine Wirkung nur nach Inkorporation in die Zielzellmembran ausüben kann. Dies heißt, dass nur wenn die Exosomenmembran mit der Zielzellmembran verschmilzt auch eine Wirkung von TIMP1-myc-GPI erzielt werden kann.

Daher sind weitere Studien notwendig, um ein genaueres Verständnis bezüglich der Entstehung und Beladung der Exosomen zu bekommen, um anschließend gezielt die

jeweilige Erkrankung mit Hilfe dieser Exosomen zu therapieren. Zusätzlich ist auch eine genauere Kenntnis über die Regulierung der Interaktionen zwischen Exosom und Zielzelle notwendig. Um eine sichere Therapie mit Stammzell-Exosomen zu gewährleisten ist auch eine genaue Analyse der Exosomen produzierenden Stammzellen nötig, da durch die Gegenwart von Tumorzellen oder Krankheiten in dem Herkunftsorganismus eine Modifikation dieser Zellen durch Exosomen der erkrankten Zellen ebenfalls vermutet wird [12, 60, 62].

Trotz allem stellen Stammzell-exosomen eine mögliche zellfreie Therapieoption von Gewebedefekten in der Zukunft dar, die allerdings momentan noch weiterer Forschung bedarf. In dieser Arbeit konnte eine Variante zur Modifikation von Stammzell-exosomen gezeigt werden, um diese für die zukünftige Therapie optimieren zu können.

7 Abkürzungsverzeichnis

AG	Arbeitsgruppe
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaare
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i> , verbesserte Chemilumineszenzreagenz
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i> , Grünfluoreszierendes Proteien mit verbesserter Fluoreszenz
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i> , Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESCRT	<i>Endosomal sorting complex required for transport</i> , endosomaler Sortierungskomplex benötigt für den Transport
FACS	<i>Fluorescence activated cell scanner</i> , Zellsortierer, der über die Fluoreszenz arbeitet
FCS	Fötale Kälberserum
FW	<i>forward</i> , vorwärts
GFP	<i>green fluorescent protein</i> , grünfluoreszierendes Protein
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i> , Hepatozyten-Wachstumsfaktor
IGF1	<i>insulin like growth factor 1</i> , Wachstumsfaktor, der dem Insulin strukturell sehr ähnlich ist
IL	Interleukin
imMSC	immortalisierte mesenchymale Stammzellen
kb	Kilobase
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NFG	<i>nerve growth factor</i> , Nervenwachstumsfaktor
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
P/S	Penizillin/Streptomycin
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
R-PE	R-Phycoerythrin
RV	<i>reverse</i> , rückwärts
SDF1	stromal cell-derived factor 1,
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SRP	<i>signal recognition particle</i> , Signalerkennungspartikel
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> , Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween ²⁰
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGFβ1	<i>transforming growth factor beta</i> , Transformierender Wachstumsfaktor beta
TIMP1	<i>tissue inhibitor of metalloprotease 1</i> , gewebespezifischer Metalloproteaseninhibitor
TNFα	<i>tumor necrosis factor alpha</i> , Tumornekrosefaktor-α

UV	Ultraviolett
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> , Wachstumsfaktor, der die unter anderem die Angiogenese fördert
VV-	zwei Valinreste

8 Literaturverzeichnis

- [1] Rieth N. Modulation des proteolytischen Mikromilieus von Tumoren mittels GPI-verankerter TIMP-1-Varianten; 2011
- [2] Kobolak J, Dinnyes A, Memic A et al. Mesenchymal stem cells. Identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche. *Methods* 2016; 99: 62–68. doi:10.1016/j.ymeth.2015.09.016
- [3] National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services. Stem Cell Basics | stemcells.nih.gov. Im Internet: <https://stemcells.nih.gov/info/basics.htm>; Stand: 10.08.2017
- [4] Lüllmann-Rauch R. Taschenlehrbuch Histologie. 10 Tabellen. 3. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2009
- [5] Grundmann E, Roessner A, Bohle RM, Dombrowski F, Feiden W, Fink LJ, Fischer H-P, Geißinger E, Knüchel-Clarke R, Kreipe HH, Jechorek D, Länger F, Lindemann-Docter K, Marx A, Müller JG, Müller-Hermelink HK, Pfeifer U, Rüdiger T, Saeger W, Hrsg. Allgemeine Pathologie und Grundlagen der speziellen Pathologie. [mit dem Plus im Web ; Zugangscode im Buch ; mit virtuellem Mikroskop online]. 11. Aufl. München: Elsevier Urban & Fischer; 2010
- [6] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8: 315–317. doi:10.1080/14653240600855905
- [7] Maxson S, Lopez EA, Yoo D et al. Concise review. Role of mesenchymal stem cells in wound repair. *Stem Cells Transl Med* 2012; 1: 142–149. doi:10.5966/sctm.2011-0018
- [8] Jackson WM, Nesti LJ, Tuan RS. Mesenchymal stem cell therapy for attenuation of scar formation during wound healing. *Stem Cell Res Ther* 2012; 3: 20. doi:10.1186/sct111
- [9] Lee DE, Ayoub N, Agrawal DK. Mesenchymal stem cells and cutaneous wound healing. Novel methods to increase cell delivery and therapeutic efficacy. *Stem Cell Res Ther* 2016; 7: 37. doi:10.1186/s13287-016-0303-6
- [10] Dittmer J, Leyh B. Paracrine effects of stem cells in wound healing and cancer progression (Review). *Int J Oncol* 2014; 44: 1789–1798. doi:10.3892/ijo.2014.2385
- [11] Smith AN, Willis E, Chan VT et al. Mesenchymal stem cells induce dermal fibroblast responses to injury. *Exp Cell Res* 2010; 316: 48–54. doi:10.1016/j.yexcr.2009.08.001

- [12] Vlassov AV, Magdaleno S, Setterquist R et al. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1820: 940–948. doi:10.1016/j.bbagen.2012.03.017
- [13] Théry C, Amigorena S, Raposo G et al. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* 2006; Chapter 3: Unit 3.22. doi:10.1002/0471143030.cb0322s30
- [14] Shahabipour F, Barati N, Johnston TP et al. Exosomes. Nanoparticulate tools for RNA interference and drug delivery. *J Cell Physiol* 2017; 232: 1660–1668. doi:10.1002/jcp.25766
- [15] Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles. Exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 2013; 200: 373–383. doi:10.1083/jcb.201211138
- [16] Simons M, Raposo G. Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol* 2009; 21: 575–581. doi:10.1016/j.ceb.2009.03.007
- [17] Harding CV, Heuser JE, Stahl PD. Exosomes. Looking back three decades and into the future. *J Cell Biol* 2013; 200: 367–371. doi:10.1083/jcb.201212113
- [18] Kowal J, Tkach M, Théry C. Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr Opin Cell Biol* 2014; 29: 116–125. doi:10.1016/j.ceb.2014.05.004
- [19] Alberts B, Jaenicke L. *Molekularbiologie der Zelle*. [mit Cell biology interactive]. 4. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH; 2004
- [20] Keerthikumar S, Chisanga D, Ariyaratne D et al. ExoCarta. A Web-Based Compendium of Exosomal Cargo. *J Mol Biol* 2016; 428: 688–692. doi:10.1016/j.jmb.2015.09.019
- [21] Kalra H, Simpson RJ, Ji H et al. Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS Biol* 2012; 10: e1001450. doi:10.1371/journal.pbio.1001450
- [22] Kim D-K, Lee J, Kim SR et al. EVpedia: a community web portal for extracellular vesicles research. *Bioinformatics* 2015; 31: 933–939. doi:10.1093/bioinformatics/btu741
- [23] Mathivanan S, Simpson RJ. ExoCarta. A compendium of exosomal proteins and RNA. *Proteomics* 2009; 9: 4997–5000. doi:10.1002/pmic.200900351
- [24] Lötvall J, Hill AF, Hochberg F et al. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions. A position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracell Vesicles* 2014; 3: 26913. doi:10.3402/jev.v3.26913
- [25] Than UTT, Guanzon D, Leavesley D et al. Association of Extracellular Membrane Vesicles with Cutaneous Wound Healing. *Int J Mol Sci* 2017; 18. doi:10.3390/ijms18050956

- [26] Biancone L, Bruno S, Deregibus MC et al. Therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived microvesicles. *Nephrol Dial Transplant* 2012; 27: 3037–3042. doi:10.1093/ndt/gfs168
- [27] Furuta T, Miyaki S, Ishitobi H et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Promote Fracture Healing in a Mouse Model. *Stem Cells Transl Med* 2016; 5: 1620–1630. doi:10.5966/sctm.2015-0285
- [28] Gatti S, Bruno S, Deregibus MC et al. Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia-reperfusion-induced acute and chronic kidney injury. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26: 1474–1483. doi:10.1093/ndt/gfr015
- [29] Geiger A, Walker A, Nissen E. Human fibrocyte-derived exosomes accelerate wound healing in genetically diabetic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 467: 303–309. doi:10.1016/j.bbrc.2015.09.166
- [30] Rager TM, Olson JK, Zhou Y et al. Exosomes secreted from bone marrow-derived mesenchymal stem cells protect the intestines from experimental necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 2016; 51: 942–947. doi:10.1016/j.jpedsurg.2016.02.061
- [31] Riazifar M, Pone EJ, Lötvall J et al. Stem Cell Extracellular Vesicles. Extended Messages of Regeneration. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2017; 57: 125–154. doi:10.1146/annurev-pharmtox-061616-030146
- [32] Shabbir A, Cox A, Rodriguez-Menocal L et al. Mesenchymal Stem Cell Exosomes Induce Proliferation and Migration of Normal and Chronic Wound Fibroblasts, and Enhance Angiogenesis In Vitro. *Stem Cells Dev* 2015; 24: 1635–1647. doi:10.1089/scd.2014.0316
- [33] Zhang J, Guan J, Niu X et al. Exosomes released from human induced pluripotent stem cells-derived MSCs facilitate cutaneous wound healing by promoting collagen synthesis and angiogenesis. *J Transl Med* 2015; 13: 49. doi:10.1186/s12967-015-0417-0
- [34] Djafarzadeh R, Conrad C, Notohamiprodjo S et al. Cell surface engineering using glycosylphosphatidylinositol anchored tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 stimulates cutaneous wound healing. *Wound Repair Regen* 2014; 22: 70–76. doi:10.1111/wrr.12132
- [35] Djafarzadeh R, Notohamiprodjo S, Rieth N et al. Treatment of dermal fibroblasts with GPI-anchored human TIMP-1 protein moderates processes linked to scar formation. *J Invest Dermatol* 2013; 133: 803–811. doi:10.1038/jid.2012.375
- [36] Djafarzadeh R, Sauter M, Notohamiprodjo S et al. Recombinant GPI-anchored TIMP-1 stimulates growth and migration of peritoneal mesothelial cells. *PLoS ONE* 2012; 7: e33963. doi:10.1371/journal.pone.0033963

- [37] Notohamiprodjo S. Selektive Zelloberflächenmodulation von Nierenzellkarzinomen mit Glykosylphosphatidylinositol-verankertem TIMP-1 hemmt die TGF-[Beta]1-Aktivierung und senkt die Expression regulatorischer ID-Gene; 2014
- [38] Djafarzadeh R, Mojaat A, Vicente AB et al. Exogenously added GPI-anchored tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) displays enhanced and novel biological activities. *Biol Chem* 2004; 385: 655–663.
doi:10.1515/BC.2004.081
- [39] Djafarzadeh R, Noessner E, Engelmann H et al. GPI-anchored TIMP-1 treatment renders renal cell carcinoma sensitive to FAS-mediated killing. *Oncogene* 2006; 25: 1496–1508. doi:10.1038/sj.onc.1209188
- [40] Djafarzadeh R, Milani V, Rieth N et al. TIMP-1-GPI in combination with hyperthermic treatment of melanoma increases sensitivity to FAS-mediated apoptosis. *Cancer Immunol Immunother* 2009; 58: 361–371. doi:10.1007/s00262-008-0559-5
- [41] Raggi MC, Djafarzadeh R, Muenchmeier N et al. Peritumoral administration of GPI-anchored TIMP-1 inhibits colon carcinoma growth in Rag-2 gamma chain-deficient mice. *Biol Chem* 2009; 390: 893–897. doi:10.1515/BC.2009.098
- [42] Bao Q, Niess H, Djafarzadeh R et al. Recombinant TIMP-1-GPI inhibits growth of fibrosarcoma and enhances tumor sensitivity to doxorubicin. *Target Oncol* 2014; 9: 251–261. doi:10.1007/s11523-013-0294-5
- [43] Rassow J. *Biochemie. 50 Tabellen. 2. Aufl.* Stuttgart: Thieme; 2008
- [44] Tsai Y-H, Liu X, Seeberger PH. Chemical biology of glycosylphosphatidylinositol anchors. *Angew Chem Int Ed Engl* 2012; 51: 11438–11456.
doi:10.1002/anie.201203912
- [45] Gpi Anchor Structure (04.06.2018). Im Internet: <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/proteomics/post-translational-analysis/glycosylation/structures-symbols/gpi-anchor-structure.html>; Stand: 09.06.2018
- [46] Stevens VL. Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol membrane anchors. *Biochem J* 1995; 310 (Pt 2): 361–370
- [47] Chalfie M. Green fluorescent protein. *Photochem Photobiol* 1995; 62: 651–656
- [48] Tsien RY. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 509–544.
doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.509
- [49] Shimomura O. The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *J Microsc* 2005; 217: 1–15. doi:10.1111/j.0022-2720.2005.01441.x
- [50] Zhang G, Gurtu V, Kain SR. An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 227: 707–711. doi:10.1006/bbrc.1996.1573

- [51] Thalmeier K, Meissner P, Reisbach G et al. Establishment of two permanent human bone marrow stromal cell lines with long-term post irradiation feeder capacity. *Blood* 1994; 83: 1799–1807
- [52] Invitrogen. MultiSite Gateway® Pro Manual
- [53] Jäckel C, Nogueira MS, Ehni N et al. A vector platform for the rapid and efficient engineering of stable complex transgenes. *Sci Rep* 2016; 6: 34365. doi:10.1038/srep34365
- [54] Jaeckel C. Modulation of the renal homeostatic milieu by mononuclear phagocytes in diabetic nephropathy; 2017
- [55] Hanson SE, Bentz ML, Hematti P. Mesenchymal stem cell therapy for nonhealing cutaneous wounds. *Plast Reconstr Surg* 2010; 125: 510–516. doi:10.1097/PRS.0b013e3181c722bb
- [56] Bausewein C, Roller S, Voltz R, Hrsg. Leitfaden Palliativmedizin - Palliative Care. Klinikleitfaden. 3. Aufl. München, Jena: Elsevier Urban & Fischer; 2007
- [57] Dixit S, Baganizi DR, Sahu R et al. Immunological challenges associated with artificial skin grafts. Available solutions and stem cells in future design of synthetic skin. *J Biol Eng* 2017; 11: 49. doi:10.1186/s13036-017-0089-9
- [58] Müller M. Chirurgie für Studium und Praxis. Unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges und der mündlichen Examina in den Ärztlichen Prüfungen ; 2012/13. 11. Aufl. Breisach am Rhein: Med. Verl.- und Informationsdienste; 2011
- [59] Hocking AM, Gibran NS. Mesenchymal stem cells. Paracrine signaling and differentiation during cutaneous wound repair. *Exp Cell Res* 2010; 316: 2213–2219. doi:10.1016/j.yexcr.2010.05.009
- [60] Phinney DG, Pittenger MF. Concise Review. MSC-Derived Exosomes for Cell-Free Therapy. *Stem Cells* 2017; 35: 851–858. doi:10.1002/stem.2575
- [61] Lai RC, Yeo RWY, Lim SK. Mesenchymal stem cell exosomes. *Semin Cell Dev Biol* 2015; 40: 82–88. doi:10.1016/j.semcdb.2015.03.001
- [62] Roccaro AM, Sacco A, Maiso P et al. BM mesenchymal stromal cell-derived exosomes facilitate multiple myeloma progression. *J Clin Invest* 2013; 123: 1542–1555. doi:10.1172/JCI66517.

9 Danksagung

Zu allererst möchte ich mich herzlichst bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Peter J. Nelson für die Bereitstellung des Doktorarbeitsthemas, der hervorragenden Unterstützung während der Labor- und Schreibearbeit und seine unendliche Geduld bedanken.

Auch möchte ich mich bei allen Assistentinnen im Labor, Monika Hofstetter, Anke Fischer, Alexandra Wechselberger und Silke Rohrer, für ihre unermüdliche Unterstützung bei der Laborarbeit bedanken. Besonders möchte ich mich bei Monika Hofstetter für die Unterstützung bei allen proteinrelevanten Tätigkeiten (Western Blot, Proteinbestimmung etc.), der unermüdlichen Unterstützung bei der Exosomenisolation und den aufmunternden Gesprächen bedanken.

Ein Dankeschön gilt auch Dr. Carsten Jäckel für die Bereitstellung des Klonierungssystems und die Unterstützung bei den ersten Klonierungsversuchen. Bei allen weiteren Doktoranden, die mit mir im Labor tätig waren (Nadja, Christiane, Anna und Nicole) möchte ich mich ebenfalls für alle unterstützenden und aufmunternden Gespräche bedanken.

Mein Dank gilt auch Prof. Elfriede Nößner und ihrem Labormitarbeiter Josef Mysliwietz für die Zellsortierung meiner EGFP-myc-GPI exprimierenden Zellen.

Auch bedanke ich mich bei Bruno Luckow für die vielen lehrreichen und interessanten Gespräche.

Für ihr stetig offenes Ohr möchte ich mich gerne bei Katharina Witte bedanken.

Zu guter Letzt aber definitiv nicht weniger herzlich möchte ich mich bei meiner Familie für die nicht ermüdende Unterstützung und ihre unendliche Liebe bedanken.

Eidesstattliche Versicherung

Angelika Cornelia Hildegard Blum

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:
Modifikation der Exosomenoberfläche mit neuartigen Proteinen mit Hilfe von GPI-Ankern

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Oberstreu, den 10.03.2019

Ort, Datum

Angelika Cornelia Hildegard Blum

Unterschrift