

Mikrovesikel als interzelluläre Transport- und Kommunikationsvehikel der extrazellulären RNA

-

Charakterisierung von Mikrovesikeln aus stimulierten Mastzellen

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Vanessa Yvonne Tomalla

aus Wiesbaden

Gießen 2019

Aus dem Biochemischen Institut,
unter der Leitung von Prof. Dr. L. Schmitz,
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

1. Gutachter: Prof. Dr. K. T. Preissner
2. Gutachterin: PD Dr. B. Ahlemeyer

Tag der Disputation: 17. August 2020

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG	1
1.1 Extrazelluläre Vesikel	1
1.1.1 Mikrovesikel	1
1.1.2 Apoptotische Körper.....	1
1.1.3 Exosomen.....	2
1.1.4 Möglichkeiten der Unterscheidung extrazellulärer Vesikel	3
1.1.4.1 Unterscheidung extrazellulärer Vesikel mittels Durchflusszytometrie.....	3
1.1.4.2 Unterscheidung extrazellulärer Vesikel mittels Elektronenmikroskopie ..	4
1.2 Mikrovesikel.....	5
1.2.1 Aufbau der Mikrovesikel	5
1.2.2 Entstehung von Mikrovesikeln	6
1.2.2.1 Der Stimulus.....	6
1.2.2.2 Das Abschnüren.....	6
1.2.3 Transfer von Ribonukleinsäuren.....	7
1.3 Entzündung	8
1.3.1 Definition	8
1.3.2 Hypoxie und Entzündung	9
1.3.3 Rolle der Mikrovesikel in der Entzündung.....	10
1.3.4 Rolle der extrazellulären RNA (eRNA) in der Entzündung	10
1.4 Die Mastzelle	11
1.4.1 Die Mastzelle als Bestandteil des angeborenen Immunsystems.....	11
1.4.2 Charakteristika der Mastzelle	13
1.4.2.1 Das Sekretom der Mastzelle.....	14
1.4.2.2 RNA als Sekretionsmolekül der Mastzelle.....	15
1.5 Ziele dieser Doktorarbeit	17
2 MATERIAL UND METHODEN	18
2.1 Material	18
2.1.1 Reagenzien.....	18
2.1.2 Verbrauchsmaterial	20
2.1.3 Geräte.....	21
2.1.4 Kits.....	23

2.2 Methoden	23
2.2.1 Zellkulturtechnische Methoden	23
2.2.1.1 Zelllinien	23
2.2.1.1.1 Humane Mastzell-Linie 1.2.	24
2.2.1.1.2 THP-1-Zellen	25
2.2.1.2 Einfrieren der Zellen (Kryokonservierung)	25
2.2.1.3 Auftauen der Zellen	26
2.2.1.4 Bestimmung der Zellzahl	26
2.2.1.5 Apoptosetest	27
2.2.2 Isolierung von Mikrovesikeln	28
2.2.3 FACS-Analyse zur Quantifizierung und Charakterisierung isolierter Mikrovesikel	29
2.2.3.1 Färbung	29
2.2.3.2 Messung	29
2.2.3.3 Auswertung	30
2.2.4 RNA-Quantifizierung mittels Fluorometer	30
2.2.5 Immunfluoreszenzfärbung	31
2.2.5.1 Färbung von Mastzellen	32
2.2.5.1.1 Direkte und indirekte Immunfluoreszenz	32
2.2.5.1.2 Fluoreszenzmikroskopische Bildgebung	34
2.2.5.2 Färbung von Mikrovesikeln mit anschließender Stimulation	35
2.2.6 Elektronenmikroskopie	35
2.2.6.1 Einbettung der Proben	35
2.2.6.2 Immunhistochemische Färbung	36
2.2.6.3 Größenbestimmung der Mikrovesikel	37
2.2.7 Proteinnachweis mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot	37
2.2.7.1 Kolorimetrische Proteinbestimmung	37
2.2.7.2 Probenverarbeitung	38
2.2.7.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	39
2.2.7.4 Western Blot	40
2.2.7.5 Immunologischer Proteinnachweis	41
2.2.8 Stimulation von THP-1 mit Mikrovesikeln	42
2.2.9 Statistische Auswertung	42

3 ERGEBNISSE	43
3.1 Isolierung, Nachweis und Quantifizierung der Mikrovesikel	43
3.1.1 Schema der Isolierung von Mikrovesikeln mittels Zentrifugation	43
3.1.2 Durchflusszytometrie.....	43
3.1.2.1 Anteil der Annexin positiven und 7AAD negativen Vesikel	45
3.1.2.2 Nachweis eines Mastzell-spezifischen Oberflächenmarkers auf Mastzellen und ihren Mikrovesikeln	46
3.1.3 Elektronenmikroskopie	47
3.1.3.1 Größenbestimmung der Mikrovesikel	49
3.2 Stimuli der Mikrovesikelbildung	50
3.2.1 Zytotoxizität der Stimuli.....	50
3.2.2 Hypoxie.....	51
3.2.2.1 Zeitabhängigkeit der Mikrovesikel-Bildung unter Hypoxie	51
3.2.2.2 Vergleich zwischen 3 und 24 Stunden Hypoxie.....	51
3.2.2.3 Kalziumabhängigkeit der Mikrovesikel-Freisetzung unter Hypoxie	52
3.2.3 Induktoren der Degranulation	53
3.2.3.1 Hemmung der Mikrovesikel-Bildung durch Degranulationshemmer	53
3.2.4 Bestimmung der Mikrovesikel-Fraktion ohne Zentrifugation.....	55
3.3 Charakterisierung der Mikrovesikel	56
3.3.1 Mikrovesikel-assoziierte Ribonukleinsäuren.....	56
3.3.1.1 RNA-Quantifizierung der Mikrovesikel-assoziierten rRNA.....	56
3.3.1.2 Lokalisation der Mikrovesikel-assoziierten rRNA.....	57
3.3.1.2.1 Immunfluoreszenzfärbungen der ribosomalen RNA.....	57
3.3.1.2.2 Immunfluoreszenzfärbungen des ribosomalen Proteins L11 ...	59
3.3.1.2.3 Elektronenmikroskopische Aufnahmen der ribosomalen RNA ...	60
3.3.2 Mikrovesikel-assoziiertes Histamin.....	62
3.4 Hydrolyse der intravesikulären rRNA ohne Lyse der Mikrovesikel.....	63
3.4.1 Veränderung der Mikrovesikel-Anzahl durch Proteinase, DNase, RNase und Triton	63
3.4.2 Veränderung der RNA-Menge durch Proteinase, DNase, RNase und Triton	64
3.4.3 Elektronenmikroskopische Kontrolle der Hydrolyse der eRNA durch Triton und RNase	64
3.5 Analyse Mikrovesikel-assoziiierter Proteine.....	66
3.5.1 Proteinnachweis rRNA-assoziiierter Proteine mittels Western Blot Analyse	66

3.6 Stimulation von Makrophagen mit gefärbten Mikrovesikeln.....	68
3.6.1 Färbung der Mikrovesikel mit CM-DiI.....	68
3.6.2 Wechselwirkung zwischen Mikrovesikeln und Makrophagen	69
4 DISKUSSION	70
4.1 Stimulierte Mastzellen setzen Mikrovesikel frei.....	70
4.2 Kalzium-Abhängigkeit der Mikrovesikel-Bildung	71
4.2.1 Mikrovesikel-Bildung und Mastzelldegranulation als Kalzium-abhängige Prozesse.....	71
4.2.2 Hypoxie als potenter Stimulus der Mikrovesikel-Bildung	71
4.3 Mikrovesikel-assoziierte eRNA	73
4.3.1 Mikrovesikel-assoziierte eRNA ist intravesikuläre ribosomale RNA	73
4.3.2 Enzymatischer Abbau von Mikrovesikel-eRNA ohne Integritätsverlust der Mikrovesikel	75
4.4 Erhöhte Expression von Angiogenin in Mikrovesikeln unter Hypoxie	76
4.5 Mikrovesikel aus Mastzellen und ihre Interaktion mit anderen Zellen	78
4.5.1 Aufnahme der Mikrovesikel durch Makrophagen.....	78
4.5.2 Mikrovesikel aus Hypoxie-stimulierten Mastzellen und ihre Wirkung auf Makrophagen	79
4.5.3 Mikrovesikel und ihre Wirkung auf andere Zellen.....	79
4.6 Ausblick: Mikrovesikel aus Hypoxie-stimulierten Mastzellen und Tumorprogression.....	80
ZUSAMMENFASSUNG	82
SUMMARY.....	83
QUELLENVERZEICHNIS	84
NUTZUNGSGENEHMIGUNGEN	99
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	100
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	102
PUBLIKATION	105
ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION	106
DANKSAGUNG	107

1 Einleitung

1. 1 Extrazelluläre Vesikel

Bei extrazellulären Vesikeln (EV) handelt es sich um eine heterogene Gruppe Membranumgebener Kompartimente, die potentiell von allen Zellen abgegeben werden können (Buzas et al. 2014/ Thery et al. 2009). Zunächst wurde angenommen, dass diese Vesikel die Funktion eines „Müllbeutels“ einnehmen und der Beseitigung überflüssiger zellulärer Substanzen dienen (Johnstone et al. 1987). Heute rücken sie immer mehr in den Fokus der interzellulären Kommunikation und können in drei Subgruppen unterteilt werden (Lee et al. 2011/ Tual-Chalot et al. 2011):

- Mikrovesikel
- Apoptotische Körper
- Exosomen

1.1.1 Mikrovesikel

Mikrovesikel (MV) stellen mit einem Durchmesser von 100 bis 2000 nm eine Gruppe von Vesikeln dar, die durch Abknospung der Plasmamembran entstehen (Wu et al. 2013). Zur Bildung von MV gehören eine Umverteilung der membranären Phospholipide mit Translokation des Phosphatidylserins (PS) auf die Außenseite der Membran sowie die Kontraktion von Aktin und Myosin (Akers et al. 2013). Details finden sich in Kapitel 1.2.

1.1.2 Apoptotische Körper

Mit einer Größe von bis zu 4000 nm zählen die apoptotischen Körper zu den größten EV (György et al. 2011). Sie entstehen im Rahmen des programmierten Zelltods durch den Zerfall der Zelle. Dementsprechend können sie Zellorganellen, zytoplasmatische Proteine, DNA und RNA enthalten (Elmore 2007). Dabei wird die Bildung der apoptotischen Membranvesikel durch eine Rho-assoziierte Kinase (ROCK I), die durch Caspasen aktiviert wurde, eingeleitet (Coleman et al. 2001). Apoptotische Körper exprimieren ebenfalls PS an der Außenseite ihrer semi-permeablen Membran (Dignat-George et al. 2011).

1.1.3 Exosomen

Exosomen sind 40 bis 100 nm große EV, die im Gegensatz zu MV bereits innerhalb der Zelle in multivesikulären Körpern als intraluminale Vesikel entstehen (Abels et al. 2016). Diese bilden sich wiederum durch ein ins Zellinnere gerichtetes Abschnüren der endosomalen Membran. Entscheidend ist dabei der hohe Gehalt an Tetraspanin in der Membran sowie das Zusammenspiel verschiedener *endosomal sorting complexes required for transport proteins* (ESCRT-Proteine) (Pols et al. 2009/ Henne et al. 2011). Zur Freisetzung der Exosomen kommt es durch Fusion der multivesikulären Körper mit der Zellmembran (Exozytose). An diesem Prozess sind diverse rab-GTPasen sowie *soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor proteins* (SNARE-Proteine) beteiligt (Hsu et al. 2010/ Fader et al. 2009).

Abb. 1 gibt einen Überblick über die unterschiedlichen Formen der EV.

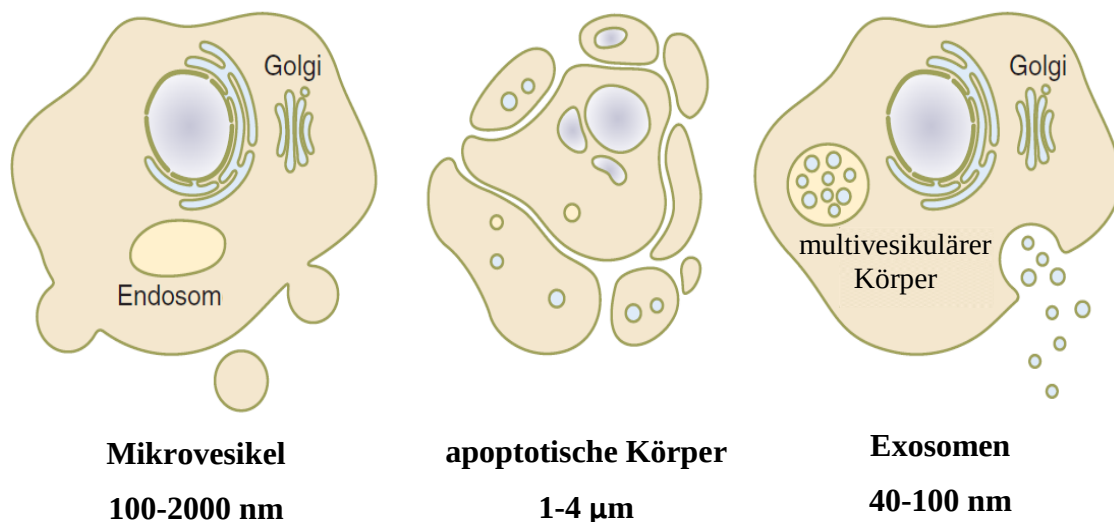


Abb. 1: Extrazelluläre Vesikel: Mikrovesikel, apoptotische Körper, Exosomen. Modifiziert nach Turturici et al. 2014. Die Genehmigung zur Nutzung der Abbildung wurde freundlicherweise von F. Geraci erteilt. Die schematische Darstellung zeigt die Bildung aller extrazellulären Vesikel. Mikrovesikel entstehen durch die Ausstülpung der Zellmembran und eine aktive Abknospung von der Zelle. Sie tragen auf ihrer Oberfläche zellspezifische Proteine und transportieren zytosolische Proteine und Ribonukleinsäuren (Lo Cicero et al. 2015/ Yanez-Mo et al. 2015). Apoptotische Körper bilden sich im Rahmen des programmierten Zelltodes. Sie enthalten neben zytoplasmatischen Proteinen, DNA und RNA auch Zellorganellen (Elmore 2007). Exosomen entstehen durch die Abschnürung intraluminaler Vesikel im frühen Endosom. Aus dem Endosom werden so multivesikuläre Körper, die durch Exozytose die beherbergten Exosomen freigeben (Abels et al. 2016). Exosomen enthalten neben zytosolischen Proteinen auch exosomale Proteine und miRNA.

Einleitung

1.1.4 Möglichkeiten der Unterscheidung extrazellulärer Vesikel

1.1.4.1 Unterscheidung extrazellulärer Vesikel mittels Durchflusszytometrie

In der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie (FACS) lassen sich EV durch ihre Größe, den Gehalt an Phosphatidylserin auf der Außenseite der Membran, die Anwesenheit von DNA und von spezifischen Markerproteinen gut voneinander abgrenzen (Mause et al. 2010). Für den Nachweis und die Charakterisierung von MV werden verschiedene Methoden angewandt. Hierzu gehören neben der Durchflusszytometrie der ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*), die funktionelle Koagulationsprobe (*functional coagulation assay*), die Elektronenmikroskopie, die Rasterkraftmikroskopie, die Konfokalmikroskopie, die Hochleistungsflüssigkeits-chromatographie, die Kapillarelektrophorese sowie die Massenspektrometrie (McVey et al. 2012). Die am häufigsten angewandte Methode zur Charakterisierung extrazellulärer Vesikel ist die Durchflusszytometrie (Chung et al. 2007/ Jy et al 2004 und 2010/ Owens et al. 2011/ Shet et al. 2008/ Simal et al. 2008). Tab. 1 fasst die Unterschiede zwischen Exosomen, Mikrovesikeln und apoptotischen Körpern zusammen.

	Exosomen	Mikrovesikel	Apoptotische Körper
Größe	40-100 nm	100-2000 nm	> 1000 nm
Zentrifugation	100.000 x g	10.000-20.000 x g	ca. 2.000 x g
Herkunft	multivesikuläre Körper der Zelle	Plasmamembran	Zellfragmente
Freisetzungstimulus	konstitutiv und/oder Zellaktivierung	Zellaktivierung und frühe Apoptose	Apoptose
Annexin V Bindungskapazität	keine	stark	stark
Markerprotein	Tetraspan-Protein CD63	Integrine, Selektine oder andere Antigene der Mutterzelle	Histone

Tab. 1: Unterscheidung extrazellulärer Vesikel nach Mause et al. 2010 und Cvjetkovic et al. 2014

Einleitung

1.1.4.2 Unterscheidung extrazellulärer Vesikel mittels Elektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopie stellt eine der wichtigsten Methoden zum Nachweis und zur Unterscheidung von EV dar. Neben der typischen Größe und Form der jeweiligen Vesikel (siehe Tab. 1) kann auch die Struktur der EV beurteilt werden. So beinhalten apoptotische Körper Zellorganellen, während MV und Exosomen keine Organellen in sich tragen. Des Weiteren können mit Hilfe von Immungoldfärbungen typische Oberflächenmarker nachgewiesen werden (Mause und Weber 2010). Dadurch gilt die Elektronenmikroskopie als Gold-Standard des Nachweises von EV (van der Pol et al. 2014).

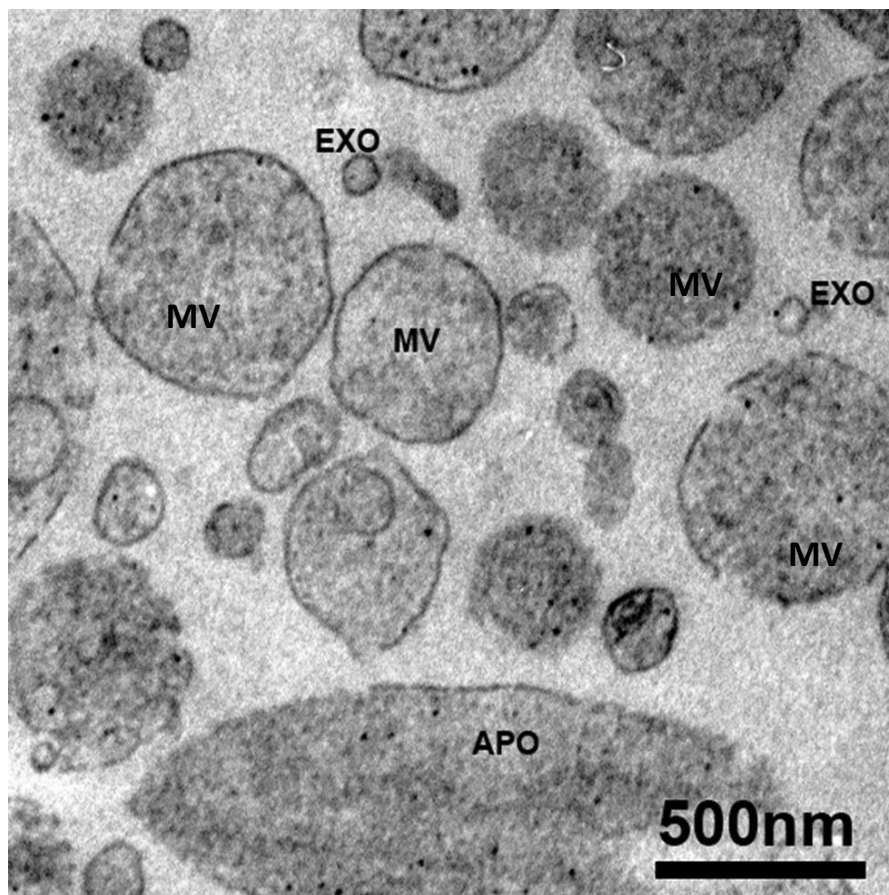


Abb. 2: Transmissionselektronenmikroskopie von EV. Das Bild wurde aus dem Artikel von Osteikoetxea et al. 2015 entnommen und darf freundlicherweise mit der Genehmigung von „The Royal Society of Chemistry“ genutzt werden. Der Originalartikel kann unter folgendem Link gefunden werden: <https://pubs.rsc.org/no/content/articlelanding/2015/ob/c5ob01451d>. Die EV wurden aus dem Überstand von Monozyten (THP-1) gewonnen. Dafür wurden die Zellen für 24 h in Serum-freien Medium kultiviert und anschließend wurde der zellfreie Überstand bei 100.000 x g für 60 min zentrifugiert. Die EV wurden mit Paraformaldehyd und Osmium-Tetraoxid fixiert. Auf dem Bild sind alle EV repräsentiert. APO: apoptotische Körper, MV: Mikrovesikel, EXO: Exosomen.

1.2 Mikrovesikel

1.2.1 Aufbau der Mikrovesikel

Entdeckt wurden MV 1967 von Peter Wolf. Er beschrieb sie als „Nebel um aktivierte Thrombozyten“ und beobachtete eine prokoagulatorische Wirkung (Wolf 1967). MV präsentieren auf ihrer Oberfläche ein breites Spektrum an Rezeptoren (z.B. Chemokinrezeptoren oder Glykoprotein IIb/IIIa) und Adhäsionsmolekülen (z.B. Integrine) und beinhalten Zytokine, mRNA, mircoRNA und viele weitere Proteine, die sich normalerweise im Zellinneren befinden (Camaioni et al. 2011/ Mack et al. 2000/ Salanova et al. 2007). Alle Bestandteile eines MV können nach Abknospung von der Mutterzelle mit anderen Zellen des Körpers interagieren und so Informationen von einer Zelle zur anderen weitergeben. Der Aufbau der MV ist abhängig vom Stimulus und der Mikroumgebung. Demnach ist es möglich, dass MV aus ein und derselben Zelle sich in ihrer Zusammensetzung unterscheiden (Beyer et al. 2010).

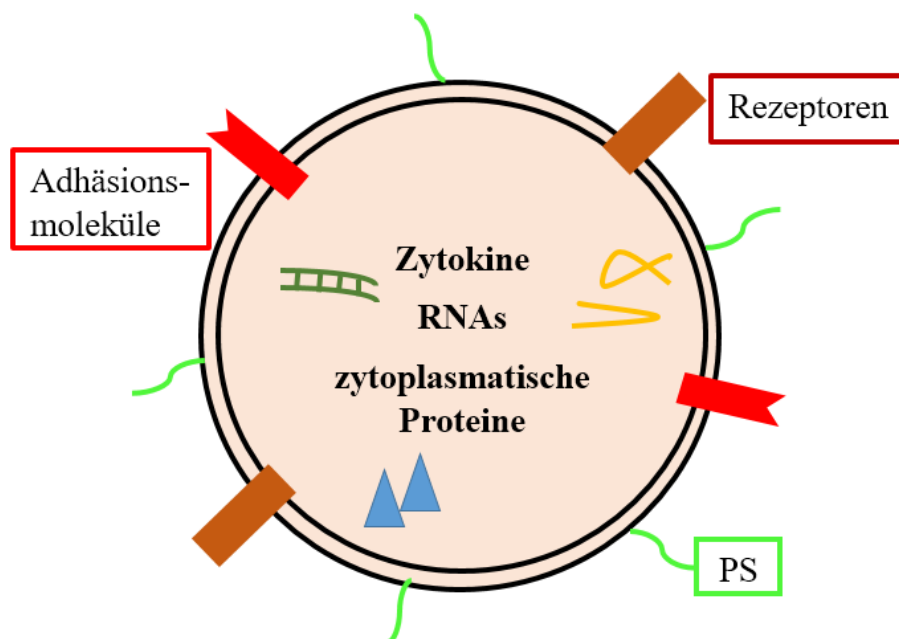


Abb. 3: Aufbau eines MV. MV sind von einer Phospholipid-Doppelschicht umgeben und enthalten eine Vielzahl zytosolischer Proteine, bioaktive Lipide und Ribonukleinsäuren. In ihrer Membran tragen sie zelltypspezifische Rezeptoren, Adhäsionsmoleküle, Transmembranproteine und viele andere Membranrezeptoren, die durch Fusion auf eine andere Zelle übertragen werden können. An ihrer Außenseite präsentieren MV Phosphatidylserin (PS), was neben Größe und Granularität als Marker für MV in der FACS-Analyse genutzt wird (Wu et al. 2013/ Garcia et al. 2005).

1.2.2 Entstehung von Mikrovesikeln

1.2.2.1 Der Stimulus

Obwohl MV sowohl im Plasma von Patienten als auch gesunder Personen zu finden sind, unterscheiden sie sich in Konzentration und Zusammensetzung verschiedener Subpopulationen bei Erkrankungen wie z.B. Atherosklerose, malignen Entartungen oder Infektionen (Morel et al. 2011).

Die Entstehung von MV wird durch verschiedene Stimuli initiiert. Auf der einen Seite kann sie im Rahmen einer Zellaktivierung als Reaktion auf proinflammatorische oder proapoptotische Mediatoren sowie auf Scherstress oder Hypoxie getriggert werden (Horstmann et al. 1999). Auf der anderen Seite werden MV auch ohne äußere Reize während der Zelldifferenzierung und -alterung sowie bei Apoptose frei. Unterschieden werden physiologische (z.B. körperliche Arbeit), pathologische (z.B. Viren und Bakterien) und experimentelle Stimuli (z.B. Phorbol ester) (Maus et al. 2010).

1.2.2.2 Das Abschnüren

Der Mechanismus der Mikrovesikelknospung als Reaktion der Zelle auf äußere Reize unterliegt initial einer intrazellulären Kalziumerhöhung. Hierdurch werden die Phospholipid-Translokasen „Floppase“ und „Scramblase“ aktiviert und eine spezielle Flippase - die Aminophospholipid-Translokase - inhibiert (Burnier et al. 2009/ Beyer et al. 2010). Dadurch kommt es zur Reorganisierung der Phospholipid-Asymmetrie der Membran, die mit einer Translokation des PS von innen nach außen einhergeht (Mause et al. 2010/ Lhermusier et al. 2011). Das PS kann nun zur Identifizierung von MV mittels Durchflusszytometrie genutzt werden, indem es fluoreszenz-markiertes Annexin V in Kalzium-abhängiger Weise bindet (Shet 2008).

Des Weiteren ist für die Knospung der Vesikel das Trennen der Membranproteine vom Zytoskelett essentiell. Diese Aufgabe übernehmen die kalziumsensitiven proteolytischen Enzyme Calpain und Gelsolin (Daleke et al. 2003/ Burnier et al. 2009/ Beyer et al. 2010). Es gibt Hinweise, dass Lipid-Rafts an der Trennung der MV von der Membran beteiligt sind und daher MV häufig an Stellen mit Lipid-Rafts ausknospen (Davizon et al. 2010).

1.2.3 Transfer von Ribonukleinsäuren

Neben Proteinen und bioaktiven Lipiden enthalten MV auch verschiedene Typen von Ribonukleinsäuren (RNA) (Skog et al. 2008/ Kyoung et al. 2017). Die genaue Zusammensetzung des Vesikelinhalts ist dabei abhängig von der Zelle, dem Stimulus und der Umgebung (Nolte-'t Hoen et al. 2012/ Kim et al. 2017). Die Umhüllung des Vesikelinhalts durch die Phospholipidmembran gewährleistet einen Schutz vor Proteasen, Nukleasen, Veränderungen des pH-Wertes und anderen äußeren Einflüssen (Mause et al. 2010).

Die in MV enthaltene RNA ist durch eine große Diversität gekennzeichnet, sodass folgende RNA-Entitäten in extrazellulären Vesikeln gefunden werden können:

- Messenger RNA (mRNA)
- microRNA (miRNA)
- ribosomale RNA (rRNA)
- lange nicht-kodierende RNA (lncRNA)
- zirkuläre RNA (circRNA)
- kleine nukleoläre RNA (*small nucleolar* RNA = snoRNA)
- kleine nukleäre RNA (*small nuclear* = snRNA)
- Transfer-RNA (tRNA)

MV spielen eine besondere Rolle im Rahmen der interzellulären Kommunikation, da sie durch Molekültransport interzellulär Informationen transferieren, die den Phänotyp anderer Zellen verändern (Ratajczak et al. 2016). So konnte beobachtet werden, dass von verletztem Lungen-, Herz-, Leber- und Hirngewebe freigesetzte MV von Knochenmarkszellen aufgenommen werden und dort zur Expression gewebespezifischer mRNA führen (Jang et al. 2004/ Renzulli et al. 2010). Ursächlich für diese Veränderungen ist der Transfer von mRNA, miRNA und Transkriptionsfaktoren durch MV (Aliotta et al. 2010). Auch MV von Tumorzellen, wie z.B. Glioblastomen, enthalten mRNA. So kann die von MV transferierte mRNA in Empfängerzellen translatiert werden und damit die Veränderung des Phänotyps der Zielzelle induzieren (Skog et al. 2008).

Einleitung

Dieser Kommunikationsweg hat nicht nur positive Auswirkungen, er kann auch in pathologische Prozesse involviert sein. Abb. 4 zeigt Beispiele für die vielfältigen Wirkungen von MV.

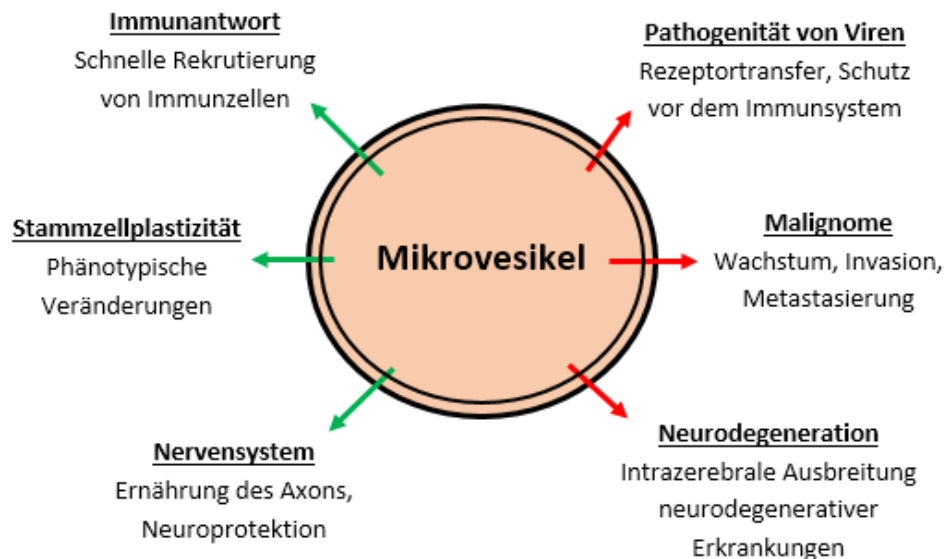


Abb. 4: Beispiele für die vielfältigen Wirkungen von Mikrovesikeln durch RNA-Transfer. Angelehnt an Lee et al. 2012. MV werden von nahezu jeder Zelle gebildet. Dabei kann die Übertragung genetischer Information Teil positiver (grüne Pfeile) oder negativer (rote Pfeile) Prozesse sein (Ratajczak et al. 2016/ Jang et al. 2004/ Renzulli et al. 2010/ Skog et al. 2008).

1.3 Entzündung

1.3.1 Definition

Eine Entzündung ist eine Reaktion des Körpers auf schädigende Reize. Dabei kann es sich um Pathogene (Viren, Bakterien, Parasiten), chemische oder physikalische Noxen sowie um einen nekrotischen Zelluntergang handeln. Durch die Aktivierung des Immunsystems versucht der Körper den auslösenden Reiz zu eliminieren und den Heilungsprozess einzuleiten (Majno et al. 2004). Ein Wechselspiel von Zellen und Entzündungsmediatoren führt zum Auftreten der fünf klassischen Zeichen einer Entzündung: Wärme (Calor) und Rötung (Rubor) durch Vasodilatation, Schwellung (Tumor) durch Erhöhung der Gefäßpermeabilität, Schmerzen (Dolor) durch einen erhöhten Gewebedruck und Sensibilisierung von Nozizeptoren und

Einleitung

Funktionseinschränkungen (Functio laesa). Wechselwirkungen zwischen Leukozyten und dem Gefäßendothel sorgen im Rahmen einer Entzündungsreaktion für die Auswanderung (Diapedese) von Immunzellen aus dem Gefäß in das Gewebe. Kann der Körper eine lokale Entzündung nicht begrenzen, kommt es zur Aktivierung des gesamten Immunsystems und damit zu einer systemischen Entzündungsreaktion (Speckmann et al. 2008).

1.3.2 Hypoxie und Entzündung

Der Körper muss sich an hypoxische Bedingungen anpassen, um den Schaden durch den Entzug des essentiellen Substrats Sauerstoff (O_2) einzugrenzen. Hierbei sind die Hypoxie und die Entzündung sowohl auf molekularer als auch auf zellulärer Ebene ineinander verflochtene Prozesse (Eltzschig et al. 2001).

O_2 ist für das Leben ein essentielles Molekül. Entsteht ein Mangel an O_2 , sprechen wir von Hypoxie. In vivo entsteht sie dort, wo Veränderungen der Perfusion zu einem signifikanten Abfall des Sauerstoffpartialdrucks im Gewebe führen. Funktionell gesehen gibt es nur da einen Mangel, wo das O_2 -Angebot den Bedarf nicht mehr decken kann (Nizet et al. 2009). In gesunden Geweben herrscht ein Sauerstoffpartialdruck von 20-70 mmHg (2,5-9 % O_2), wobei die Schwankungen durch die unterschiedlichen Abstände zur nächsten Sauerstoffquelle - dem Blutgefäß - zu erklären sind. In nekrotischem Gewebe hingegen ist der Sauerstoffspiegel deutlich erniedrigt ($\leq 2,5$ %), sodass eine adäquate Antwort des Körpers auf die hypoxischen Konditionen für den Erhalt der Gewebshomöostase sowie das zelluläre Überleben notwendig ist (Bosco et al. 2011).

Bei der Hypoxie-induzierten Inflammation, wie sie z.B. bei der Höhenkrankheit auftritt, kommt es aufgrund des Sauerstoffmangels zum erhöhten Serumspiegel an den proinflammatorischen Proteinen IL-6, IL-6-Rezeptor und C-reaktives Protein (Grocott et al. 2009). Außerdem können nach einer kurzen hypoxischen Phase eine Erhöhung der vaskulären Permeabilität sowie eine Akkumulation proinflammatorischer Zellen beobachtet werden (Rosenberg et al. 2009/ Eckle et al. 2008).

Auf der anderen Seite kann auch eine entzündliche Läsion zur Gewebshypoxie führen. Dabei beeinflusst die Hypoxie aktiv die Umgebung des entzündlichen Gewebes, u.a. durch die Aktivierung Hypoxie-regulierter Gene (Eltzschig et al. 2001).

1.3.3 Rolle der Mikrovesikel in der Entzündung

Patienten, die unter einer Entzündung leiden, weisen in fast allen Körperflüssigkeiten erhöhte Konzentrationen verschiedener MV auf. Daraus lässt sich schließen, dass MV als Biomarker für eine Reihe von entzündlichen Krankheiten wie z.B. Atherosklerose, Diabetes mellitus Typ 2, Lupus erythematoses, Morbus Crohn oder rheumatoider Arthritis dienen können (Amabile et al. 2010/ Chironi et al. 2009/ Simak 2011/ Pirro et al. 2008). Da MV Charakteristika der Mutterzelle auf ihrer Oberfläche tragen, können sie identifiziert werden und Hinweise auf v.a. kardiometabolische Erkrankungen geben (Chen et al. 2018). Auch infektiöse Erkrankungen, wie z.B. Malaria, können von erhöhten MV-Spiegeln begleitet sein (Owens et al. 2011/ Ghosh et al. 2008).

1.3.4 Rolle der extrazellulären RNA (eRNA) in der Entzündung

Bereits um die Jahrtausendwende konnte gezeigt werden, dass unter pathologischen Bedingungen der eRNA-Gehalt im Blut erhöht ist und der eRNA-Nachweis im Blut u.a. eine neue Möglichkeit der Tumordiagnose darstellt (Kopreski et al. 1999). Unsere Arbeitsgruppe konnte beweisen, dass körpereigene eRNA, die im Rahmen einer Gewebe- oder Gefäßläsion freigesetzt wird, als entzündlicher Mediator wirkt. Hierbei handelt es sich um ribosomale RNA, die extrazellulär andere Zellen des Immunsystems alarmiert. Dabei führt z.B. die Interaktion mit Monozyten/Makrophagen zur Freisetzung von TNF α aus seiner membranverankerten Vorform (Fischer et al. 2013). Des Weiteren wirkt eRNA prothrombotisch und erhöht die endotheliale Gefäßpermeabilität (Kannemeier et al. 2007/ Fischer et al. 2007 und 2014). Neben der direkten Gewebeläsion ist auch Hypoxie ein potenter Stimulus zur Freisetzung der eRNA.

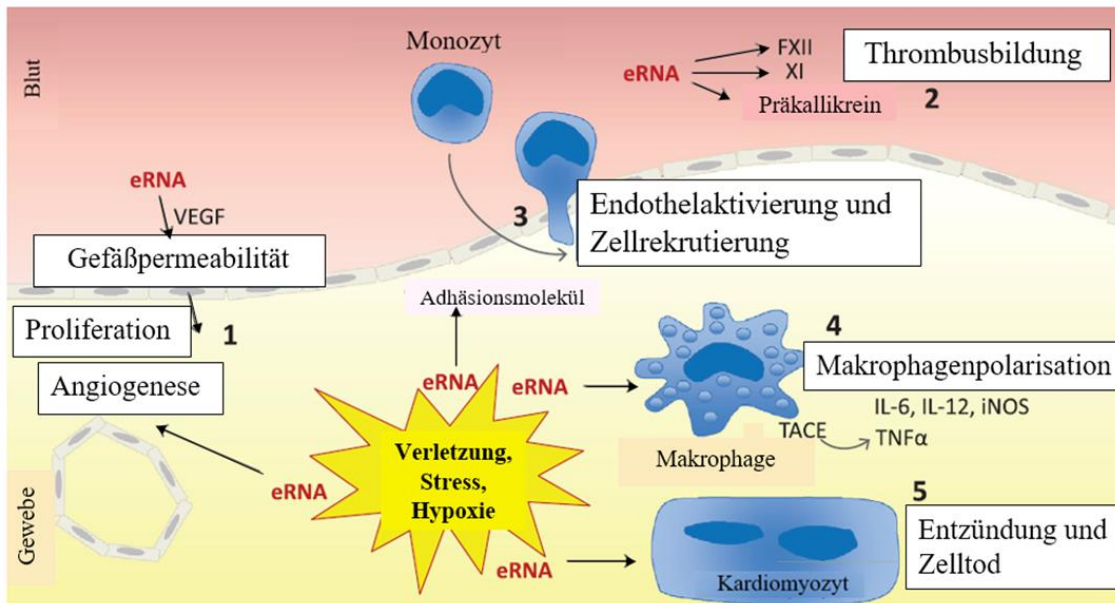


Abb. 5: Einfluss extrazellulärer RNA (eRNA) auf vaskuläre Homöostase und kardiovaskuläre Pathologien. Modifiziert nach Zernecke und Preissner 2016. Die Genehmigung zur Verwendung und Modifizierung der Abbildung wurde freundlicherweise von K.T. Preissner erteilt. In Stresssituationen, wie z.B. Hypoxie, Verletzung oder Entzündung kommt es zur Freisetzung von RNA. Wirkungen von eRNA: **(1)** Gefäßpermeabilitätserhöhung: eRNA wirkt als Kofaktor/Korezeptor von VEGF und als Induktor der Vaskulo- und Angiogenese. **(2)** Koagulation und Thrombusbildung. **(3)** Leukozytenrekrutierung: eRNA erhöht die Expression bestimmter Adhäsionsmoleküle. **(4)** M1-Polarisation von Makrophagen und erhöhte Expression von Zytokinen wie Tumornekrose Faktor α (TNF- α), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-12 (IL-12), induzierbarer NO-Synthase (iNOS). eRNA sorgt über die Aktivierung des TNF- α konvertierenden Enzyms (TACE) für eine Freisetzung des aktiven TNF- α . **(5)** Im Rahmen des Ischämie-Reperfusionsschadens bewirkt eRNA einen vermehrten kardiomyozytären Zelltod.

1.4 Die Mastzelle

1.4.1 Die Mastzelle als Bestandteil des angeborenen Immunsystems

Unser Körper ist täglich pathogenen Keimen und gewebeschädigenden Substanzen ausgesetzt. Um sich zu wehren und zu regenerieren, verfügt der Mensch über multiple Abwehrmechanismen, die in ein angeborenes und ein adaptives Immunsystem unterteilt werden. Während die unspezifische angeborene Immunantwort in der Keimbahn-DNA verankert ist und kurzzeitig ablaufen kann, bedarf das adaptive Immunsystem eines Gen-Rearrangements, um sich mit B- und T-Lymphozyten sowie Antikörpern spezifisch gegen Antigene richten zu können (Janeway et al. 1998).

Einleitung

Das angeborene Immunsystem besteht aus löslichen Faktoren wie z.B. dem Komplementsystem, Zytokinen, Akute-Phase-Proteinen, Lysozymen sowie einer zellulären Abwehrlinie, zu der Granulozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, Natürliche Killerzellen und Mastzellen gehören (Janeway et al. 1998).

Die Immunantwort des adaptiven Systems entwickelt sich langsamer, ist dafür aber gekennzeichnet durch Antigenspezifität und Gedächtnisbildung. Zum adaptiven Immunsystem gehören Antikörper, B-Zellen sowie CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten (Dranoff 2004).

Mastzellen sind perivaskuläre Zellen, die im Falle einer Pathogeninvasion oder bei Gewebeschädigung als eine der ersten Alarm-Zellen des Immunsystems fungieren (Cardamone et al. 2016). Mit ihrer Vielzahl an Oberflächenrezeptoren reagieren sie auf *pathogen-associated molecular patterns* = PAMPs (z.B. LPS) und *damage-associated molecular patterns* = DAMPs (z.B. Nukleinsäuren) mit der Freisetzung immunmodulierender und antibakterieller Proteine (Metcalf et al. 1997). Mastzellen sezernieren Cathelicidine sowie diverse Proteasen (z.B. Tryptase) und wirken somit direkt antimikrobiell (Di Nardo et al. 2003/ Galli et al. 2015). Die von Mastzellen freigesetzten Mediatoren Histamin, Prostaglandin und Bradykinin führen zu einer Vasodilatation mit Erhöhung der Gefäßpermeabilität und konsekutiver Ödembildung. Zudem wirken Chemokine und Leukotriene chemotaktisch auf Leukozyten und stimulieren ihre Marginalisation sowie das Rollen der Leukozyten auf den Endothelzellen und unterstützen damit ihre Extravasation (Metz und Maurer 2007). Des Weiteren induzieren Mastzellmediatoren die Freisetzung lysosomaler Enzyme aus den nun gewebeständigen Leukozyten sowie die Bildung von Sauerstoffradikalen (St John und Abraham 2013). Durch Expression co-stimulatorischer Oberflächenproteine (z.B. CD40L oder CD86) wirken Mastzellen auch regulatorisch auf die Immunantwort von B- und T-Zellen (Gri et al. 2012).

Die Funktion der Mastzelle im Immunsystem spielt jedoch nicht nur eine Rolle bei der Immunabwehr. Unsere Arbeitsgruppe konnte in Zusammenarbeit mit Chilo et al. (2016) zeigen, dass Mastzellen durch die Rekrutierung und Modulierung der Funktion von Leukozyten maßgeblich an der Arteriogenese beteiligt sind. Durch ihre immunmodulierende Funktion unterstützen Mastzellen den Körper somit bei der Ausbildung natürlicher Bypässe.

1.4.2 Charakteristika der Mastzelle

Mastzellen gehören zur Gruppe der Leukozyten und teilen mit den basophilen Granulozyten eine gemeinsame Vorläuferzelle. Ihre unreife Form zirkuliert im Blut und differenziert sich nach der Migration ins vaskularisierte Gewebe mit Hilfe von verschiedenen Zytokinen, wie z.B. dem Stammzellfaktor (SCF) zur adulten Mastzelle (Urb et al. 2012).

Mastzellen unterscheiden sich von anderen ausgereiften Blutzellen durch die Expression des SCF-Rezeptors, einer Rezeptor-Tyrosinkinase, die auch c-kit oder CD117 genannt wird. Dieser Rezeptor wird physiologischerweise in hämatopoetischen Stammzellen exprimiert und ist nach der Zellausreifung nur noch auf Mastzellen zu finden (Escribano et al. 1998). Mastzellen beinhalten zahlreiche zytoplasmatische Granula, die Proteasen, lysosomale Enzyme und verschiedene Zytokine enthalten (Theoharides et al. 2017). Bei den bekannten Botenstoffen handelt es sich u.a. um positiv geladene Amine, wie z.B. Histamin und Serotonin sowie die Proteasen Tryptase, Chymase und Carboxypeptidase (Pejler et al. 2007). Sie liegen gebunden an Glykosaminoglykane dicht gepackt in den Granula vor. Neben den Granula-assoziierten Mediatoren, die präformiert gespeichert sind, gibt es zum einen *de-novo* synthetisierte Lipidmediatoren (Prostaglandin D2 und Leukotriene) sowie ebenfalls *de-novo* synthetisierte Zytokine wie Interleukin 1 und 6, Tumornekrosefaktor α (TNF α) und *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) (Prussin et al. 2003, Grützkau et al. 1998, Galli 1993, Barrett 1992).

Im Rahmen einer Allergie erfolgt die Aktivierung der Mastzelle durch die Bindung eines allergenspezifischen Immunglobulins E (IgE) an den membranständigen IgE-Rezeptor (Fc ϵ -Rezeptor). Weitere Rezeptoren, deren Aktivierung zur Degranulation der Mastzelle führen, sind *Toll-like-Rezeptoren* (TLR), G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und Komplementrezeptoren. Die Aktivierung all dieser Rezeptoren verursacht einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration und eine Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) (Gilfillan et al. 2006).

Obwohl Mastzellen v.a. wegen ihrer Rolle bei der allergischen Reaktion und ihrer antiparasitären Funktion bekannt sind (Galli et al. 2010), stellen sie mehr als nur eine „Allergiezelle“ dar. Dies erklärt, weshalb den Mastzellen bei bestimmten Krankheitsbildern eine wichtige Rolle zugesprochen wird (Theoharides et al. 2012).

Einleitung

Sie befinden sich häufig in der Haut, den Atemwegen und dem Gastrointestinaltrakt und sind dort Teil der ersten Abwehrlinie gegen pathogene Keime. Abb. 6 gibt einen Überblick über Krankheiten, bei denen Mastzellen eine wichtige pathogenetische Rolle spielen.

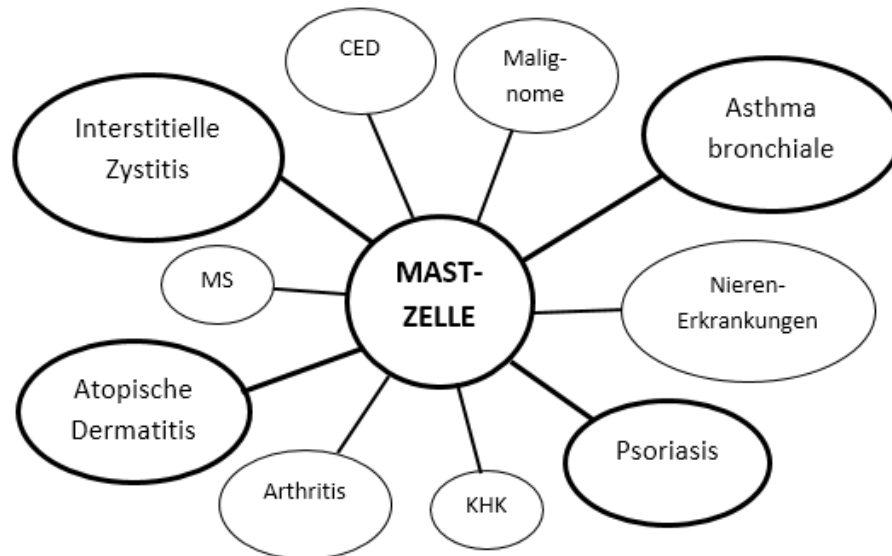


Abb. 6: Die Rolle der Mastzelle in entzündlichen Erkrankungen. Angelehnt an Theoharides et al. 2012. Die Abbildung zeigt die Beteiligung der Mastzelle an diversen entzündlichen Erkrankungen, wie z.B. Asthma bronchiale, chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen sowie kardiovaskuläre Erkrankungen (Theoharides und Cochrane 2004/ Wooley 2003/ Özdamar 1996/ DeBruin 2015). KHK = koronare Herzkrankheit, MS = multiple Sklerose, CED = chronisch-entzündliche Darmerkrankung.

1.4.2.1 Das Sekretom der Mastzelle

Die Aktivierung der Mastzelle erfolgt über verschiedene Stimuli. Dazu gehören Allergene (Quervernetzung von an FC ϵ RI gebundenem IgE), Pathogene (Erkennung durch *Pattern Recognition* Rezeptoren (PRRs)) und Bindung von Kalziumkanal-Liganden (Rivera et al. 2008/ Vukman et al. 2017).

Für die Freisetzung unterschiedlicher Botenstoffe bedient sich die Mastzelle unterschiedlicher Mechanismen (= Sekretom der Mastzelle) (Vukman et al. 2017). Am bekanntesten ist hierbei die Degranulation, bei der präformierte Moleküle wie Histamin, Heparin und β -Hexosaminidase freigesetzt werden (Hogan et al. 1997). Die Exozytose der Granula bedarf einer Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels, der Aktivierung

Einleitung

von Proteinkinase C (PKC), der Hydrolyse von Adenosintriphosphat und Guanosintriphosphat sowie der Reorganisation des Zytoskeletts (Wernersson et al. 2014). Alternativ zur Freisetzung aller Granula, kann die Mastzelle selektiv Granula freisetzen, indem sich kleine Vesikel von größeren Granulaformationen separieren. Dieser Vorgang wird als „piecemeal degranulation“ (PMD) - also eine stückchenweise Degranulation - bezeichnet (Dvorak et al. 1991). Des Weiteren sind Mastzellen in der Lage durch *de novo* Synthese und Exozytose von Mediatoren direkt und spezifisch auf äußere Stimuli zu reagieren (Wernersson et al. 2014). Ein weiterer Mechanismus der interzellulären Kommunikation besteht in der Granula-unabhängigen Vesikelfreisetzung in Form von Exosomen, Mikrovesikel und Apoptosekörpern (Kowal et al. 2016).

1.4.2.2 RNA als Sekretionsmolekül der Mastzelle

Mithilfe von elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass in humanen Mastzellen sowohl Granula als auch zytoplasmatische Organellen, wie z.B. Adiposome (*lipid bodies*), mit Ribosomen und RNA räumlich assoziiert sind (Dvorak et al. 2000 und 2003).

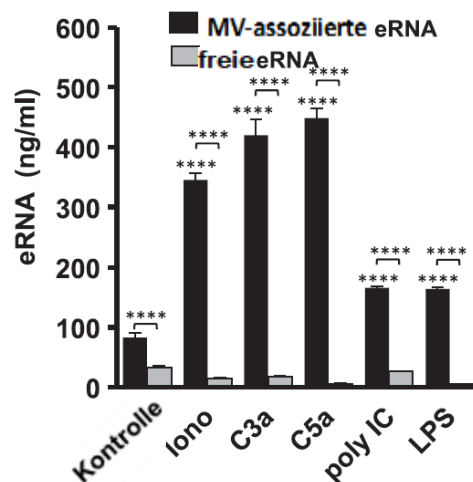


Abb. 7: Freisetzung ribosomaler RNA aus stimulierten Mastzellen. Die Überstände aus stimulierten Mastzellen wurden auf ihren eRNA-Gehalt überprüft. Hierfür wurden humane Mastzellen (HMC-1.2.) für jeweils eine Stunde mit Ionomycin (1,5 μ M), den Komplementfaktoren C3a (250 ng/ml) und C5a (100 ng/ml), Poly(I:C) (5 μ g/ml) und LPS (1 μ g/ml) stimuliert. Danach wurden die Überstände bei 21.000 x g zentrifugiert und der RNA-Gehalt der MV dem RNA-Gehalt des MV-freien Überstandes gegenüber gestellt. Es zeigt sich, dass der größte Anteil der eRNA MV-assoziiert ist. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung, $n \geq 3$ (nach Elsemüller, Tomalla et al., 2019).

Einleitung

Zu den potenten Induktoren der Mastzelldegranulation gehören u.a. Hypoxie, Ionomycin und die Komplementfaktoren C3a und C5a. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass diese Stimulantien, neben der Degranulation der Mastzelle, auch die Freisetzung von eRNA induzieren. Abb. 7 zeigt, dass die freigesetzte RNA vor allem MV-assoziiert ist (Else Müller, Tomalla et al. 2019). Diese Beobachtung war der Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit.

1.5 Ziele dieser Doktorarbeit

Hypoxie, Ionomycin und die Komplementfaktoren C3a und C5a sind potente Induktoren der Mastzell-Degranulation. Diese Stimulantien induzieren neben der Freisetzung von Inhaltsstoffen der Granula auch die Freisetzung von eRNA. Um die Assoziation zwischen MV und eRNA genauer zu erforschen, stellten sich folgende zentrale Fragen für diese Arbeit:

1. Welche Stimulantien induzieren die MV-Bildung?
 - a. Hypoxie?
 - b. Bekannte Induktoren der Degranulation?
2. Wie hängen Degranulation und MV-Bildung zusammen?
 - a. Sind Stimuli der Mastzell-Degranulation auch Induktoren der MV-Bildung?
 - b. Ist die MV-Bildung - wie auch die Mastzelldegranulation - Kalzium-abhängig?
 - c. Können Degranulations-Hemmer auch die MV-Bildung inhibieren?
3. eRNA und RNA-assoziierte Proteine in MV
 - a. Ist eRNA den MV außen angelagert oder ist sie intravesikulär zu finden?
 - b. Können neben RNA auch RNA-assoziierte Proteine wie das ribosomale Protein L11, RNasen oder RNase-Inhibitoren gefunden werden?
4. Gibt es eine Methode, mit der die MV-assoziierte eRNA degradiert wird, ohne die Integrität der Vesikel zu zerstören?

Für die Versuche wurde die humane Mastzelllinie HMC-1.2. in der Zellkultur verwendet. Zur Charakterisierung der Mastzellen und der aus ihrem Überstand gewonnen MV wurden vorrangig die Durchflusszytometrie und die Elektronen- sowie Immunfluoreszenz-Mikroskopie verwendet. Mittels Western Blot Analysen gelang der Nachweis einer RNase und eines RNase-Inhibitors in der Zelle, den MV und im Überstand stimulierter Mastzellen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien

10x Roti®-Block	Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Aceton $\geq 99,7\%$	Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Agarose NEEO Ultra-Qualität, Roti®agarose für die DNA/RNA- Elektrophorese	Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Bovines Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
acetyliertes BSA (10%)	Aurion, Wageningen (Niederlande)
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), $\geq 99\%$	Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Essigsäure 100%	Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Ethanol $\geq 99,5\%$	Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Glycerin	Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Kaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
Methanol	Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Milchpulver	Sigma Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
MPC Protein-Fällungsreagenz	Epicentre, Madison, Wisconsin (USA)
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Thermo Fisher Scientific (Gibco), Waltham, Massachusetts (USA)
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
Proteinase K	PEQLAB, Erlangen (Deutschland)

Material und Methoden

RiboLock RNase-Inhibitor (40U/µl, 2500U)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts (USA)
RNA Lysepuffer T (aus peqGOLD RNA Kit)	PEQLAB, Erlangen (Deutschland)
RNase A (10mg/ml)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts (USA)
Salzsäure 1N, 2N	Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Schwefelsäure $\geq 95\%$	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
Natriumlaurylsulfat (SDS) ultra pure	Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
Gewebe- und Zelllyselösung	Epicentre Madison, Wisconsin (USA)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
β -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
4-Nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminid (pNAG)	Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Compound 48/80	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg (Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Glycin	Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Ionomycin,	Calbiochem, Darmstadt (Deutschland)
Annexin V Binding Buffer	BD Pharmingen, Franklin Lakes, New Jersey (USA)
Hoechst 33342 10 mg/ml	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen), Carlsbad, Kalifornien (USA)
ProLong Gold antifade reagent	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien (USA)

Material und Methoden

2.1.2 Verbrauchsmaterial

6-Well-Zellkulturplatte	Greiner Bio-One, Kremsmünster, (Österreich)
BBL GasPak Dry Anaerobic Indicator Strips	BD Pharmingen, Franklin Lakes, New Jersey (USA)
10 ml Luer Solo Spritze	Braun, Melsungen (Deutschland)
Kanüle 0,9 x 70 mm	Terumo, Leuven (Belgien)
Trypan Blue Dye 0,4%	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien (USA)
Counting Slides, Dual Chamber for Cell Counter	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien (USA)
Zellkulturplatte 100 x 20 mm	Greiner Bio-One, Kremsmünster (Österreich)
Zellschaber 16 cm	Sarstedt, Newton North Carolina (USA)
Chamber Slides (8-Well, Permanox-Slide)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts (USA)
Deckgläser	Roth, Karlsruhe (Deutschland)
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits for 200 and 1000 Reactions	Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien (USA)
96-Well Platten	Greiner Bio-One, Kremsmünster (Österreich)
GoTaq® G2 Green Master Mix	Promega, Madison, Wisconsin (USA)
Steriles Wasser	Braun, Melsungen, Deutschland
Pipettenspitzen, 1000 µl	Greiner Bio-One, Kremsmünster, (Österreich)
200 µl	Gilson, Middleton, Wisconsin (USA)
10 µl	Biozym, Hessisch Oldendorf (Deutschland)
Combitips, Combitips Eppendorf advanced 10 ml, 5 ml, 2,5 ml, 1 ml, 0,5 ml	Eppendorf, Hamburg (Deutschland)

Material und Methoden

Reaktionsgefäße, Cellstar Polypropylene Tubes 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster (Österreich)
Sterile Pipette mit Spitze 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster (Österreich)
Laborfilm, Parafilm	Roth, Karlsruhe (Deutschland)
MaxiSorp 96-Well-Platten	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts (USA)
Kodak BioMax MR Film	Kodak Rochester, New York (USA)
Deckgläser, 100 Stück, 24x60 mm	Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Zellsieb, 100 µm	Sigma Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
Sterilfilter 0,22 µm	Merck Millipore, Burlington, Massachusetts (USA)

2.1.3 Geräte

NanoDrop UV-Vis-Spektralphotometer 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts (USA)
Thermocycler T3000	Biometra, Göttingen (Deutschland)
Gel Imager	Intas, Göttingen (Deutschland)
Mikrowelle	Clatronic, Kempen (Deutschland)
Elektrophoresekammer	PEQLAB, Erlangen (Deutschland)
Zentrifugen Heraeus Fresco 21 Centrifuge Heraeus Fresco 17 Centrifuge Heraeus Labofuge 400R Functionline	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts (USA)
Zellzähler, TC 10 Automated Cell Counter	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien (USA)
Vortexer, Charley 2	Süd-Laborbedarf, Gautingen (Deutschland)
Mikrozentrifuge, MiniStar silverline	VWR, Radnor, Pennsylvania (USA)
Pipetten, Pipetman Classic P2, P10, P20, P100, P200, P1000	Gilson, Middleton, Wisconsin (USA)

Material und Methoden

Wasseraufbereitungssystem, Milli-Q	Merck Millipore, Burlington, Massachusetts (USA)
Flockeneisbereiter AF 200	Scotsman, Venon Hills, Illinois (USA)
ELISA Plate Reader, EL-808 Ultra microplate reader	BioTek Instruments, Winooski, Vermont (USA)
Gefrierschrank -80°C	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts (USA)
Heizblock, TS1 Thermo Shaker	Biometra, Jena (Deutschland)
Elektrische Pipette	Eppendorf, Hamburg (Deutschland)
CO ₂ -Inkubator	Sanyo, Osaka, Japan
Biologische Sicherheitswerkbänke, SAFE 2020	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts (USA)
Qubit 2.0. Fluorometer	Thermo Fisher Scientific (Life Technologies), Carlsbad, Kalifornien (USA)
Durchflusszytometer, BD FACSCanto™	BD Pharmingen, Franklin Lakes, New Jersey (USA)
Ultramikrotom, Reichert Ultracut E	Reichert, heute Leica Microsystems, Wetzlar (Deutschland)
Transmissionselektronenmikroskop EM 902	Zeiss, Oberkochen (Deutschland)
Slow-Scan 2K CCD Kamera	Tröndle TRS, Moorenweis (Deutschland)
Ultraschallgerät, Sonifier Modell 250	Branson Ultrasonics, St. Louis, Missouri (USA)

2.1.4 Kits

Molecular Probes Qubit RNA HS Assay Kit	Thermo Fisher Scientific (Life Technologies), Carlsbad, Kalifornien (USA)
ECL Prime Western Blotting Detection Reagent Kit	GE Healthcare, Chicago, Illinois (USA)
PE Annexin V Apoptosis Detection Kit with 7-AAD	BioLegend, San Diego, Kalifornien (USA)
LR-White embedding Kit	Sigma Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturtechnische Methoden

2.2.1.1 Zelllinien

2.2.1.1.1 Humane Mastzell-Linie 1.2.

Diese humane Mastzelllinie stammt von einem an Mastozytose erkrankten Patienten und wurde für unsere Versuche freundlicherweise von Joseph H. Butterfield (Mayo Clinic & Mayo Foundation, Rochester USA) zur Verfügung gestellt (Butterfield et al, 1988). Die Zellen werden häufig zur Untersuchung von Mastzellen verwendet, da viele Schlüsselfunktionen und Hauptcharakteristika der humanen Mastzelle enthalten sind. So bilden HMC-1 weiterhin Mastzell-typische Mediatoren wie Histamin, Tryptase oder Heparin und exprimieren ähnliche Oberflächen-Antigene wie humane Mastzellen (Nilsson et al. 1994).

Zwei Mutationen in der Rezeptortyrosinkinase KIT sorgen bei der HMC-1-Zelllinie für eine kontinuierliche Phosphorylierung und damit für eine Aktivierung des Rezeptors. Rezeptortyrosinkinasen spielen eine wichtige Rolle bei der Proliferation und dem Überleben der Mastzellen. Die aktivierende Mutation sorgt nun für eine Wachstumsfaktor-unabhängige Proliferation (Sundstrom et al. 2003).

Material und Methoden

Die Kultivierung der HMC-1 erfolgte in Iscove`s **M**odified **D**ulbecco`s **M**edium (IMDM) unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum (FCS), 1% Penicillin/Streptomycin (P/S) und 0,01% Thioglycerol bei einer Zelldichte von 1 - 2 Millionen Zellen/ml bei 37° C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit.

Kulturmedium

Iscove`s Modified Dulbecco`s Medium (IMDM)	Thermo Fisher Scientific (Gibco), Waltham, Massachusetts (USA)
10% Fetales Kälberserum (FCS)	Fetal Bovine Serum HyClone, Thermo Fisher Scientific (Gibco), Waltham, Massachusetts (USA)
1% Penicillin-Streptomycin (P/S)	Thermo Fisher Scientific (Gibco), Waltham, Massachusetts (USA)
0,01% Thioglycerol (1,2 mM)	BioReagent Sigma, München (Deutschland)

Je nach Wachstumsgeschwindigkeit wurden die Zellen zwei- bis dreimal pro Woche gesplittet, indem sie für 5 Minuten bei 200 x g zentrifugiert und in 37° C warmem Zellkulturmedium aufgenommen wurden. Die Kultivierung der HMC-1 erfolgte in Kulturflaschen (75 cm²) bei 37° C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit. Nach 3 Tagen wurden die Zellen im Verhältnis 1:10 passagiert.

2.2.1.1.2 THP-1

Diese humane Monozytenzelllinie wurde aus einem Patienten mit akuter Monozytenleukämie isoliert (Auwerx 1991). Die Zellen wurden bei 37° C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit in 75 cm² großen Kulturflaschen kultiviert. Das Passagieren der Zellen erfolgte nach spätestens drei Tagen im Verhältnis 1:3, indem die Zellsuspension bei 200 x g für 5 Minuten zentrifugiert und die Zellen in frischem Medium aufgenommen wurden.

Material und Methoden

Kulturmedium RPMI- Vollmedium

Roswell Park Memorial Institute Medium 1640 + Phenolrot (RPMI)	Thermo Fisher Scientific (Gibco), Waltham, Massachusetts (USA)
10% FCS	Thermo Fisher Scientific (Gibco), Waltham, Massachusetts (USA)
1% L-Glutamin	Thermo Fisher Scientific (Gibco), Waltham, Massachusetts (USA)
1% P/S	Thermo Fisher Scientific (Gibco), Waltham, Massachusetts (USA)

Zur Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen wurde nach einem Zentrifugationsschritt (200 x g, 5 min, Raumtemperatur) das entstandene Pellet aus THP-1-Zellen in frischem RPMI-Vollmedium aufgenommen und auf eine Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml Medium verdünnt. Als nächstes wurde Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) hinzugegeben, sodass es in einer Endkonzentration von 5 ng/ml Medium vorlag. PMA sorgte innerhalb von 48 Stunden für eine Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen (Chanput et al, 2014). Jeweils 2 ml der Zellsuspension wurden in jedes Well einer 6-Well-Platte gegeben und bei 37° C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert.

2.2.1.2 Einfrieren der Zellen (Kryokonservierung)

Zelllinien können durch die Lagerung in flüssigem Stickstoff langfristig aufbewahrt werden. Da es sich dabei jedoch für die Zellen um einen strapaziösen Vorgang handelt, ist es wichtig, zum Medium einen Kälteschutz, z.B. Dimethylsulfoxid (DMSO), hinzuzugeben. DMSO sowie zusätzliches Serum verhindern die schädliche Kristallbildung im Rahmen der Kryokonservierung. Es wurden zwei Lösungen, die durch einen 0,22 µm Spritzenvorsatzfilter steril filtriert wurden, zum Einfrieren hergestellt:

Lösung A: Kulturmedium mit 20% DMSO, **Lösung B:** Kulturmedium mit 40% FCS

Material und Methoden

500 µl von Lösung A wurden in sterile Kryoröhrchen überführt und auf Eis gekühlt. Danach wurde die einzufrierende Zellsuspension bei 200 x g für 5 min zentrifugiert und das erhaltene Zellpellet in 1 ml kalter Lösung B resuspendiert. Dann wurden 500 µl der Zellsuspension in die vorbereiteten Kryoröhrchen pipettiert, sodass die Zellsuspension eine Endkonzentration von 10% DMSO und 20% FCS aufwies. Um ein schonendes Einfrieren zu gewährleisten, wurden die Kryoröhrchen für mindestens 2 h in einen mit Isopropanol gefüllten Gefrierbehälter bei -80° C gelagert. Anschließend erfolgte zur dauerhaften Lagerung die Überführung der Zellen in einen Flüssigstickstofftank.

2.2.1.3 Auftauen der Zellen

Um eingefrorene Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurde das entsprechende Kryoröhrchen aus dem Flüssigstickstofftank entnommen und unter ständigem Schütteln im Wasserbad bei 37° C aufgetaut. Danach sollte die aufgetaute Zellsuspension schnell in 10 ml Kulturmedium überführt werden, um die toxischen Wirkungen des DMSO zu minimieren. Nach einer Zentrifugation (200 x g, 5 min) erfolgte die Aufnahme in 10 ml frischem Kulturmedium sowie die Überführung in eine Kulturflasche (25 cm²). Die Zellen inkubierten im Brutschrank bei 37° C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit und wurden täglich auf Wachstum und Zellviabilität überprüft. Sobald eine Zelldichte von 1-2 Mio/ml erreicht wurde, konnten die Zellen wie beschrieben kultiviert werden.

2.2.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Um die Zellzahl und die Vitalität der Zellen auf eine schnelle Art und Weise zu bestimmen, wurden die Zellen trypanisiert. Hierbei wurde ein blauer Farbstoff (Trypan Blue Dye 0,4%) im Verhältnis 1:1 zur Zellsuspension gegeben. Die Substanz wird von lebenden Zellen nicht aufgenommen, während abgestorbene Zellen den Farbstoff aufgrund der geschädigten Zellmembran aufnehmen. Der automatische Zellzähler TC10 der Firma BioRad ermittelt innerhalb von 30 s sowohl die Gesamtzellzahl als auch den Lebendzellanteil. Hierbei wird wie bei einem herkömmlichen Hämozytometer vorgegangen. Unter Berücksichtigung der Verdünnung des Farbstoffes mit der Zellsuspension, wird die Zellzahl pro Milliliter in einem Zählquadrat einer Zählkammer bestimmt. Dies erfolgte anhand folgender Formel:

$$\text{Mittelwert der Zellzahl pro Quadrat} = \frac{\text{Anzahl der Quadrate}}{\sum \text{Zellzahl aller Quadrate}}$$

Die Zellkonzentration wurde vom Gerät in Zellzahl pro Milliliter angegeben.

Die Gesamtzellzahl konnte daraufhin wie folgt berechnet werden:

$$\text{Gesamtzellzahl} = \text{Zellzahl pro Milliliter} \times \text{Volumen der Zellsuspension}$$

Das Ausmaß der Zellschädigung konnte durch die Zählung der trypanisierten Zellen vor und nach der Stimulation mit Hilfe des automatischen Zellzählers unterstützt werden. So konnte nach jeder Stimulation die Toxizität des Stimulus ermittelt werden.

2.2.1.5 Apoptosetest

Mit Hilfe des *PE Annexin V Apoptosis Detection Kits* von BioLegend können die initialen Prozesse einer Apoptose der Zellen festgehalten werden. Hierbei wird die Translokation des PS von der Innenseite der Plasmamembran nach außen detektiert. 10.000 Zellen pro Well wurden in einer 96-Well Platte bei 37° C, 5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach einer Stunde wurden die jeweiligen Stimuli (siehe 2.2.2) hinzugefügt, dabei betrug das Endvolumen aus Zellsuspension und Stimulus 100 µl/Well. Als nächstes wurden 10 µl Apopxin™ Green zu 1 ml Probenpuffer gegeben und gut gemischt. 100 µl dieser Lösung wurden nun zu jeder Probe pipettiert. Nach einer einstündigen Inkubation im Dunkeln erfolgte die Zentrifugation der Platte bei 200 x g für zwei Minuten.

Bindet das in der Lösung enthaltene Apopxin™ an PS, kann die dabei emittierte Fluoreszenz im Fluorometer gemessen werden. Der Fluoreszenzfarbstoff hat ein Absorptionsmaximum von 490 nm und ein Emissionsmaximum von 525 nm.

2.2.2 Isolierung von Mikrovesikeln

Für die Stimulation zur Generierung von MV wurden Mastzellen in indikatorfreiem RPMI-Medium aufgenommen und es folgte eine Verdünnung der Zellen auf eine Dichte von 4×10^6 Zellen/ml. Jeweils 4 ml der verdünnten Zellsuspension wurden in 100 mm x 20 mm große Petrischalen gegeben. Nach einer einstündigen Ruhephase der Zellen erfolgte ihre Stimulation. Sollte eine Inhibition der MV-Bildung erreicht werden, fand vor der Stimulation eine einstündige Inkubation der Mastzellen mit einer inhibitorischen Substanz statt.

Stimulation:

- 0,5, 1, 2, 3, 8, 24 Stunden Hypoxie (2 % O₂, 5 % CO₂, 37° C)
- Ionomycin (1,5 µM, 1 h)
- Aktivierte Komplementfaktoren C3a und C5a
(C3a = 250 µg/ml, C5a = 100 µg/ml, jeweils 1 h)
- Polyinosinic:Polycytidylic Säure Poly IC (5 µg/ml, 1 h)
- Lipopolysaccharid (1 µg/ml, 1 h)

Inhibition:

- 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraacidische Säure = BAPTA
(20 µM, 1 h)
- Wortmanin (10 µM, 1 h)
- Cromolyn (10 µg/ml, 1 h)

Danach wurden die Zellsuspensionen zentrifugiert (2 x 10 min, 300 x g) und der zellfreie Überstand, in dem sich u.a. die MV befanden, vorsichtig in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Der Überstand wurde bei 21.000 x g und Raumtemperatur für 40 min in Eppendorf-Reaktionsgefäßen zentrifugiert. Bei diesem Vorgang entstand ein Pellet, das hauptsächlich MV enthielt. Während der Überstand verworfen wurde, wurden die MV-Pellets mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS, s.S. 32) gewaschen und anschließend erneut zentrifugiert (21.000 x g, 40 min, Raumtemperatur). Die entstandenen Pellets wurden nun entweder in PBS resuspendiert oder in einfach-konzentriertem Annexin V bindenden Puffer gelöst.

2.2.3 FACS-Analyse zur Quantifizierung und Charakterisierung isolierter MV

Die FACS-Analyse (*fluorescence-activated cell sorting*) ist eine spezielle Form der Durchflusszytometrie, bei der Fluoreszenz-markierte Zellen oder Partikel analysiert werden. Hierbei dient die Analyse der Bestimmung der Reinheit und der Menge der isolierten MV.

2.2.3.1 Färbungen

Die Suspension aus MV und Annexin V bindendem Puffer wurde kurz vor der Messung mit Annexin V und 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min wurden zusätzlich *AccuCount Fluorescent Particles* hinzugegeben. Diese dienen bei der Messung als Referenzpartikel. Da ihre Konzentration bekannt ist, lässt sich mit ihrer Hilfe die Anzahl der MV in der Suspension berechnen.

PE Annexin V	7AAD Viability Staining Solution	Spherotech AccuCount Fluorescent Particles, 7,3 µm
Konzentration: 40 ng/ml	Konzentration: 500 ng/ml	ca. 1 Mio Partikel/ml

Mit dem Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin (PE) gekoppeltes Annexin V bindet an PS, welches MV an ihrer Außenseite tragen und ermöglicht so ihre Erkennung durch das Gerät. 7-AAD ist ein fluoreszierender DNA-Interkalator und erlaubt die Detektion der späten Apoptose.

2.2.3.2 Messung

Bei der Messung werden die Partikel/Zellen durch eine Kapillare gesaugt und gelangen einzeln in die Durchflusszelle. Dort werden sie durch Laserstrahlen unterschiedlicher Richtung und Wellenlänge bestrahlt und die von den Partikeln ausgehenden Lichtsignale von Detektoren erfasst. Dabei handelt es sich sowohl um Fluoreszenz- als auch um Streulichtsignale. Somit können bestimmte Eigenschaften, wie z.B. das Vorhandensein von PS auf der Außenseite, sowie Größe und Granularität der Vesikel simultan erfasst werden. Die Lichtstreuung wird in Vorwärts- (FSC = *Forward Scatter*) und Seitwärtsstreulicht (SSC = *Sideward Scatter*) unterteilt. Das Vorwärtsstreulicht ist im

flachen Winkel (0° - 10°) gebeugtes Licht und ist abhängig von der Vesikelgröße, während das Seitwärtsstreulicht, das im rechten Winkel abgelenktem Licht entspricht, ein Maß für die Granularität und Struktur der Vesikel ist.

Gleichzeitig kann die Messung der Fluoreszenz erfolgen. Das Fluoreszenzlicht entsteht durch Zellbestandteile selbst oder durch mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugierte Antikörper. Die Fluoreszenzfarbstoffe besitzen unterschiedliche Absorptions- und Emissionsspektren, sodass in einer Messung mehrere Signale zeitlich parallel registriert werden können. Durch Setzen von Grenzen wird der Anteil der Annexin V positiven und 7-AAD-negativen Vesikel gegenüber den anderen Signalen dargestellt.

2.2.3.3 Auswertung

Die so erfassten Streu- und Emissionsspektren werden in elektrische Signale konvertiert und in Form von Histogrammen gespeichert. Die Auswertung der digitalisierten Daten erfolgt mit der Diva Software.

2.2.4 RNA-Quantifizierung mittels Fluorometer

Die RNA-Quantifizierung mit Hilfe des Photometers bietet sich vor allem für geringe RNA-Mengen an. Hierfür wurde das *Master Pure RNA Purification Kit* der Firma Epicentre verwendet. Jeweils 100 μ l der Probe wurden als Triplikate in Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben. Als nächstes wurden zu jeder Probe 400 μ l einer Zelllyse-Lösung sowie 1 μ l Proteinase K gegeben. Dieser Schritt dient der Lyse der noch in der Probe vorhandenen Zellen und dem enzymatischen Abbau der Proteine wie z.B. RNasen. Danach wurden die Reaktionsgefäße in einem Heizblock (65° C, 500 rpm, 15 min) inkubiert und anschließend für 10 min auf Eis gestellt. Die darauf folgende Zugabe von 250 μ l MPC-Proteinfällungslösung ermöglichte nach gründlichem Vortexen und einem Zentrifugationsschritt ($10.000 \times g$, 4° C, 10 min) die Entfernung der Proteine aus dem Überstand. Danach konnten 600 μ l Isopropanol zur Probe pipettiert werden. Nachdem die Proben 30- bis 40-mal invertiert wurden, erfolgte eine erneute Zentrifugation ($10.000 \times g$, 4° C, 10 min). Während das Isopropanol vorsichtig weggeschüttet wurde, verblieb im Reaktionsgefäß ein Pellet, in dem sich die zu quantifizierende RNA befand. Es schlossen sich zwei Waschschrte mit 500 μ l Ethanol an. Nach der vorsichtigen

Material und Methoden

Entfernung des Ethanols musste das Pellet, bevor es in 30 µl destillierten RNase-freien Wasser aufgenommen wurde, trocknen. Vor der Messung mittels Fluorometer standen die Proben 20 min auf Eis.

Für die photometrische Messung der RNA wurde nach dem *Qubit® RNA HS Assay Kit* der Firma Thermo Fisher Scientific vorgegangen. Hierfür wurden die Proben in speziell für die Messung vorgesehene Gefäße überführt. Außerdem wurden zwei weitere Gefäße für die RNA-freie Negativ- und die RNA-enthaltende Postivkontrolle (je 10 µl), die der Kalibrierung des Qubit® Fluorometers dienen, benötigt. Als nächstes wurde das Qubit® RNA HS Reagenz 1:200 in Qubit® RNA HS Puffer gelöst. Das Reagenz fluoresziert erst nach Bindung an RNA und ist damit sensitiver als die Messung mittels UV-Spektralphotometer. Daher war es auch nicht notwendig, die in der Probe enthaltene DNA vor der Messung zu degradieren. Nach einer zweiminütigen Inkubationszeit konnte die Fluoreszenz der Probe gemessen werden.

Formel zur Berechnung der RNA-Konzentration:

$$\text{RNA-Konzentration [ng/ml]} = \frac{\text{Messwert [ng]} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Eingesetztes Volumen [ml]}}$$

2.2.5 Immunfluoreszenzfärbung

Ziel der Immunfluoreszenzfärbungen ist die Lokalisation eines Proteins innerhalb einer Zelle bzw. eines Gewebes. Zur Färbung der Mastzellen wurde sowohl die Methode der direkten als auch indirekten Immunfluoreszenz angewandt.

Während bei der direkten Methode bereits der Erstantikörper an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, dienen bei der indirekten Methode Fluoreszenzmarkierte Zweitantikörper der Markierung eines an ein spezifisches Antigen gebundenen Erstantikörpers. Des Weiteren wurde die Vybrant Cell-Labeling Lösung CM-DiI, die durch eine sehr starke lipophile Eigenschaft Phospholipid-Doppelschichten durch Einlagerung sichtbar machen kann, verwendet.

2.2.5.1 Färbung von Mastzellen

2.2.5.1.1 Direkte und indirekte Immunfluoreszenz

Nachdem die Mastzellen mit PBS gewaschen wurden, erfolgte eine Verdünnung der Zellen mit indikatorfreiem RPMI-Medium auf 2×10^6 Zellen/ml. Nach einer einstündigen Ruhephase wurden jeweils 40 µl der Zellsuspension in die Kammern eines 8-Well Chamber Slides gegeben. Dann wurden jeweils 100 µl einer 4%igen Paraformaldehyd (PFA)-Lösung auf die Zellen getropft und 10 min inkubiert. Es folgte ein Waschschriff mit PBS, an den sich eine Permeabilisierung der nun fixierten Zellen mit je 100 µl einer 0,1 %igen Triton-Lösung anschloss. Nachdem die Kammern erneut mit PBS gewaschen wurden, erfolgte der einstündige Blockierungsvorgang mit 200 µl einer 3%igen Lösung aus bovinem Serumalbumin (BSA), um unspezifische Bindungsstellen zu sättigen. An einen weiteren Waschschriff schloss sich die Inkubation mit dem ersten spezifisch gegen ein Antigen gerichteten Antikörper. Dieser wurde zuvor in 1%iger BSA-Lösung verdünnt. Nach ca. einer Stunde wurden die Kammern gründlich mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die 60-minütige Inkubation mit dem spezifisch gegen den Primärantikörper gerichteten Zweitantikörper. Hierbei haben Alexa-488 Farbstoffe ein Absorptionsmaximum von 495 nm und ein Emissionsmaximum von 519 nm (grün). Alexa-568 weist ein Absorptionsmaximum von 578 nm und ein Emissionsmaximum von 603 nm (rot). Als Kontrolle dienten unspezifische Immunglobuline G (IgG), die aus der gleichen Spezies isoliert wurden wie der Primär-Antikörper, um unspezifische Wechselwirkungen zu detektieren.

4%ige Paraformaldehyd-Lösung

pH = 7,4

40g Paraformaldehyd

1000ml PBS

10 x PBS (Phosphat-gepufferte

Kochsalzlösung), pH= 7,4

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

8,2 mM di-Natriumhydrogenphosphat –
Dihydrat

1,8 mM Kaliumdihydrogenphosphat

Material und Methoden

Eine direkte Färbung der Membran der Mastzelle erfolgte mit der Vybrant® *CM-DiI Cell-Labeling* (CM-DiI) Lösung von Thermo Fisher Scientific. Der lipophile Farbstoff CM-DiI lagert sich in Membranen ein und macht sie so sichtbar. 2 µl des Farbstoffs werden zu einem ml Zellsuspension (10^6 Zellen/ml) gegeben und für 10 min bei 37° C inkubiert. Es schließen sich drei Waschvorgänge mit PBS an, um den überflüssigen Farbstoff zu entfernen.

Indirekte Immunfluoreszenz

Erstantikörper	Verdünnung	Zweitantikörper	Verdünnung
rRNA (Y10b) Novus Biologicals NB100-662 Lot C-2	2 µg/ml	Alexa Fluor 568 Esel- Anti-Maus-IgG (H+L) Life Technologies REF A21202 LOT 1423052	10 µg/ml
Ribosomales Protein L11 (N-17) Santa Cruz SC-25931 , Lot #B0614 Goat polyclonal IgG	2 µg/ml	Alexa Fluor 488 Esel- Anti-Ziege-IgG (H+L) Life Technologies REF A11055 LOT 1369678	10 µg/ml
Histamin Novusbio Lot 024M4857V Hasenantikörper	1:100	Alexa Fluor 488 Esel- Anti-Kaninchen-IgG (H+L) Life Technologies REF A21206 LOT 913921	10 µg/ml
Maus IgG Sigma I5381-1MG	2 µg/ml	Alexa Fluor 568 Esel- Anti-Maus-IgG (H+L) Life Technologies REF A21202 LOT 1423052	10 µg/ml

Material und Methoden

Ziege-IgG Sigma I5256	2 µg/ml	Alexa Fluor 488 Esel- Anti-Ziege IgG (H+L) Life Technologies REF A11055 LOT 1369678	10 µg/ml
Kaninchen IgG Sigma I5006	2 µg/ml	Alexa Fluor 488 Esel- Anti-Kaninche-IgG (H+L) Life Technologies REF A21206 LOT 913921	10 µg/ml

Direkte Immunfluoreszenz

Antikörper	Verdünnung
Vybrant® CM-DiI Cell-Labeling Solution Invitrogen	2 µl/ml Zellsuspension mit 1×10^6 Zellen (enthält 2 nM CM-DiI)

Das Einbetten der Proben erfolgte im Eindickmedium *Vectashield* + DAPI (4',6-Diamidin-2-Phenylindol), es wurde ein Deckglas aufgelegt und die Ränder mit Nagellack versiegelt. Das Eindickmedium verhinderte das vorzeitige Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe und ermöglichte die langfristige Lagerung bei 4° C. DAPI dient der Darstellung der DNA und damit des Zellkerns. Nach Bindung fluoresziert es blau mit einem Absorptionsmaximum von 358 nm und einem Emmisionsmaximum von 461 nm.

2.2.5.1.2 Fluoreszenzmikroskopische Bildgebung

Die gefärbten Zellen bzw. MV wurden mit dem Leica DMR Fluoreszenzmikroskop betrachtet und mit der Metamorph Imaging Software (Version 7.0) analysiert. Um die Fluoreszenzsignale der verschiedenen Färbungen miteinander vergleichen zu können,

Material und Methoden

wurden die gleichen Belichtungszeiten sowie Kontrast- und Helligkeitseinstellungen verwendet und die Bilder mit Größenmarkern versehen.

2.2.5.2 Färbung von Mikrovesikeln mit anschließender Stimulation

Zunächst erfolgte die Inkubation der MV mit dem Farbstoff *CM-DiI Vybrant®* von Thermo Fisher Scientific (10 min, 37°C). Es schlossen sich drei Waschvorgänge mit PBS an, um die überflüssige Menge an Farbstoff zu entfernen. Die gefärbten MV konnten danach zur Stimulation von Zellen genutzt werden. Nachdem die Zellen stimuliert wurden, wurden sie dreimal mit PBS gewaschen um die gefärbten MV zu entfernen, die nicht mit den stimulierten Zellen interagierten. In der Immunfluoreszenzmikroskopie erschienen MV und die Abbauprodukte ihrer Membran rot.

2.2.6 Elektronenmikroskopie

2.2.6.1 Einbettung der Proben

Die Zellen bzw. MV wurden nach Zentrifugation (200 x g bzw. 21.000 x g) in 4 % PFA aufgenommen. Um Schnitte der Proben erstellen zu können, mussten diese eingebettet werden. Dafür wurden die Zellen bzw. MV in Phosphatpuffer gewaschen und anschließend in einer Alkoholreihe (30 %, 50 %, 70 %, 90 %, 96 %, jeweils 30 min) dehydriert. Danach wurde das Pellet für eine Stunde in einer 1:2 Mischung aus 96 % Ethanol und LR-White inkubiert. Bei LR-White handelt es sich um ein hydrophiles Acrylharz niedriger Viskosität. Dann wurde die Mischung für zweimal 60 min durch reines LR-White ersetzt. Eine weitere Inkubation mit LR-White erfolgte über Nacht. Am nächsten Morgen wurden drei weitere Wechsel des LR-Whites durchgeführt, wobei die Lösung beim letzten Vorgang bis zum Rand des 500 µl-Eppendorf-Reaktionsgefäßes gefüllt wurde. Die Härtung des Harzes wurde durch eine Polymerisierung des Harzes erreicht und erfolgte mit UV-Licht (Wellenlänge 365 nm, 2 x 8 W Lampen, 15 cm Abstand zur Probe) bei 10° C für 4 Stunden. Der nächste Schritt bestand in der Anfertigung ultradünner Schnitte (70-80 nm) mit dem Ultramikrotom (Reichert Ultracut E). Die Schnitte wurden auf ein Nickelnetz (200 Mesh, Plano GmbH) gelegt und konnten anschließend immunhistochemisch gefärbt werden.

2.2.6.2 Immunhistochemische Färbung

Alle Untersuchungen mittels Elektronenmikroskopie erfolgten in der Zusammenarbeit mit Ulrich Gärtner im Anatomischen Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Für immunhistochemische Färbung der Mastzellen und ihrer MV wurden die verwendeten Antikörper in 0,1 % acetyliertem BSA in TBS (Inkubationspuffer) verdünnt. Zunächst wurden die sich auf Nickelnetz befindenden Proben für zweimal drei Minuten auf einen Tropfen aus Inkubationspuffer gelegt, um angefeuchtet zu werden. Danach erfolgte die 40-minütige Inkubation mit dem Erstantikörper (rRNA-AK: 10 µg/ml). Es folgten vier Waschschrte mit Inkubationspuffer für je 5 min. Zwischen jedem Schritt wurde die restliche dem Netz aufliegende Lösung mit einem Filterpapier aufgesogen.

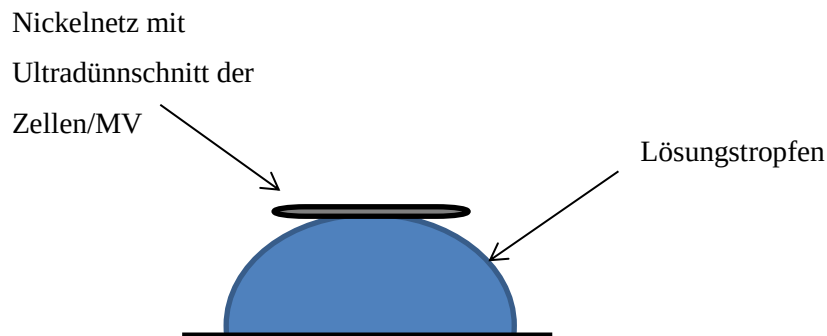


Abb. 8: Immunhistochemische Färbung für die Elektronenmikroskopie. Die Schnittfläche des eingebetteten Materials liegt den Lösungen an, ohne dass das ganze Nickelnetz untertaucht. Nach definierten Inkubationszeiten wird das Netz mit einer Pinzette vom Tropfen abgehoben und die übriggebliebene Lösung vorsichtig mittels Filterpapier entfernt.

Als nächstes wurden die Netze für 40 min auf die Tropfen mit dem Zweitantikörper platziert (6 nm Gold-AK: 1:75). Es schlossen sich vier Waschschrte à 5 min in Inkubationspuffer und zwei Waschungen in Tris-gepufferter Kochsalzlösung (TBS, s.S. 40) an. Das Netz wurde getrocknet und konnte dann mit dem Transmissionselektronenmikroskop untersucht werden. Die digitalen Bilder wurden mit einer Slow-Scan 2K CCD Kamera aufgenommen.

Material und Methoden

Erstantikörper	Verdünnung	Zweitantikörper	Verdünnung
rRNA Antikörper (Y10b) Novus Biologicals NB100-662 Lot C-2	10 mg/ml	Ziege-Anti-Maus- IgG, 6 nm Gold Aurion Lot: 806.022	1:75
Histamin pAb Lot 024M4857V Novusbio	1:100	Ziege-Anti- Kaninchen-IgG, 6 nm Gold Aurion Lot: 806.011	1:75

2.2.6.3 Größenbestimmung der Mikrovesikel

Mit Hilfe des ImageSP-Programms der Firma Unitary Enterprise "SYSPROG" (Weißrussland, Minsk) wurde der Durchmesser durch Ausmessen einzelner Vesikel bestimmt. Dieses Programm ermöglichte die Bestimmung der Durchmesser ausgewählter MV.

2.2.7 Proteinnachweis mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot

Bei einem Western Blot werden die zuvor in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Das gesuchte Protein kann dann mit Hilfe von spezifischen Antikörpern visualisiert werden.

2.2.7.1 Kolorimetrische Proteinbestimmung

Das *Pierce BCA Protein Assay Kit* von Thermo Scientific dient dem kolorimetrischen Nachweis und der Quantifizierung der gesamten Proteinmenge einer Probe. Durch die Chelatbildung aus zwei Molekülen biochrominischer Säure (BCA) und einem Cu^{1+} -Ion entsteht ein lila wasserlösliches Reaktionsprodukt, das ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 562 nm aufweist (entspricht der Biuret-Reaktion). Die Proteinkonzentrationen der zu untersuchenden Proben wurden immer im Vergleich zu Standardproteinproben (BSA) bestimmt und dargestellt.

Material und Methoden

Es wurden 5 µl der jeweiligen Probe als Doppelbestimmung in die Wells einer 96-Well-Platte pipettiert. Hierzu wurden 100 µl des Reagenz aus dem Kit hinzugefügt. Die Absorption konnte photometrisch detektiert werden und ist nahezu linear zur steigenden Proteinkonzentration. Anhand der aus der BSA-Standardgeraden (Eichkurve: 0, 125, 250, 500, 750, 1.000, 1.500, 2.000 µg/ml) abgeleiteten Geradengleichung wird der Proteingehalt der Proben berechnet.

2.2.7.2 Probenverarbeitung

Zur Gewinnung der Proteinprobe wurden sowohl MV als auch Zellen in Radioimmunopräzipitation (RIPA)-Lysepuffer aufgenommen. Dem RIPA-Lysepuffer wurde zusätzlich Natriumvanadat (1 mM) und Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, 0,5 mM) zugeführt. Das Natriumvanadat hemmte dabei die Protein-Tyrosin-Phosphatasen. Die Lyse der Zellen wurde zusätzlich durch eine Ultraschallbestrahlung (Branson Sonifier 250, Microtip, 15% Output, dreimal 3 s) unterstützt.

RIPA-Puffer (Radioimmunopräzipitation)		5x SDS Probenpuffer, pH = 6,8
Tris/HCl (pH 7,4)	50 mM	7,56 g TRIS
NaCl	150 mM	50 ml β - Mercaptoethanol
EDTA	1 mM	100 ml Glycerin
Triton-X-100	1%	20 g SDS
Natriumdesoxycholat	1%	0,02 g Bromphenolblau
SDS (10%)	0,1%	
Protease-Inhibitor	1 Tablette pro 10 ml Puffer	

Definierte Mengen Protein jeder Probe wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 5x SDS Probenpuffer versetzt und 10 min lang bei 95° C erwärmt. Dabei reduzierte das im Probenpuffer enthaltene β -Mercaptoethanol die Disulfidbrücken des Proteins und es resultierte der Verlust der Tertiär- bzw. Quartärstruktur der Proteine. Es folgte eine Anlagerung des negativ-geladenen Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) an hydrophobe Bereiche der Proteine.

Material und Methoden

Die nun gleichmäßig negativ geladenen Proteine wanderten im elektrischen Feld gemäß ihres relativen Molekulargewichts im Gel von Kathode zu Anode.

2.2.7.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Je höher der Anteil an Polyacrylamid, desto kleiner sind die Poren im Gel und desto besser lassen sich kleine Proteine detektieren. Da es sich bei allen untersuchten Proteinen um kleine Proteine handelte, wurde ein 15% SDS-Polyacrylamidgel zur Trennung des Proteingemisches hergestellt.

	15 % Trenngel	5% Sammelgel
Trenn- bzw. Sammelgelpuffer	2,5 ml	2,5 ml
Acrylamid (30 %)	5 ml	1,65 ml
Wasser	2,4 ml	5,7 ml
Ammoniumpersulfat	100 ul	100 ul
TEMED	10 ul	10 ul
Endvolumen	10 ml	10 ml

Trenngelpuffer, pH = 6,8

1,5 M TRIS

0,4% SDS

Sammelgelpuffer, pH = 8,8

1,5 M TRIS

0,4% SDS

SDS-Laufpuffer

25 mM TRIS

250 mM Glycin

0,1% SDS

Material und Methoden

Das Trenngel wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen. Es wurde mit Isopropanol überschichtet, welches nach Aushärten des Trenngels abgegossen wird. Danach wurde das Sammelgel, das der Bündelung der Proteinproben dient, auf das Trenngel gegossen. Ein Profilformer im Sammelgel sorgte für die Entstehung von Taschen, in die später die Proteinproben pipettiert wurden. Nach dem Aushärten des Gels wurde der Profilformer entfernt und das Gel in Laufpuffer gegeben. Anschließend wurden die Proben sowie ein Molekulargewichtsmarker aufgetragen. Bei der Gelelektrophorese wurde eine konstante Stromstärke von 25 mA angelegt.

2.2.7.4 Western Blot

Durch das Anlegen einer konstanten elektrischen Spannung von 100 V senkrecht zur Laufrichtung konnten die im Gel getrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen werden. Gel und Transfermembran befanden sich dabei im Transferpuffer.

Transferpuffer

0,02 M TRIS
0,15 M Glycin
20% Methanol

TBS (Tris-gepufferte Kochsalzlösung), pH 7,4

Tris	25 mM
NaCl	150 mM
KCl	3 mM
für TBS-T	0,1% Tween-20

Danach wurde die Membran eine Stunde lang in Roti-Block[®], einem Blockierungsreagenz auf Polymerbasis, geblockt. Hierdurch werden unspezifische Bindungsstellen gesättigt. Nun kann die Inkubation der Membran mit dem Erstantikörper erfolgen (über Nacht, 4° C).

Material und Methoden

Erstantikörper	Verdünnung	Zweitantikörper	Verdünnung
RNase Inhibitor, RNH1 (C-14) Santa Cruz sc-49697 Lot# G2809 Goat polyclonal IgG 200 µg/ml	400 ng/ml in 1% BSA in TBS-T	HRP-gekoppelter polyklonaler Kaninchen-Anti- Ziege-Antikörper Dako REF P0449 LOT #20011796	200 ng/ml in 5% Milchpulver in TBS-T
Angiogenin, ANG I (M- 20) Santa Cruz sc-1408 Lot # J1810 Goat polyclonal IgG 200 µg/ml	400 ng/ml in 1% BSA in TBS-T	HRP-gekoppelter polyklonaler Kaninchen-Anti- Ziege-Antikörper Dako REF P0449 LOT #20011796	200 ng/ml in 5% Milchpulver in TBS-T

Nach viermaligem Waschen mit TBS-T erfolgte eine 60-minütige Inkubation mit einem mit Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelten Sekundär-Antikörper. Dieser soll den ersten Antikörper binden, um ihn in nachfolgenden Schritten sichtbar zu machen. Dafür wurde der Antikörper im Verhältnis 1:3.000-5.000 in 5% Milchpulverlösung verdünnt. An eine Inkubationszeit von einer Stunde schlossen sich erneut sechs Waschvorgänge je 5 min mit TBS-T an.

2.2.7.5 Immunologischer Proteinnachweis

Zur Detektion des zweiten Antikörpers wurde das *Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* von GE Healthcare nach Herstelleranweisung benutzt. Durch die Chemolumineszenz des Reagenzes kann ein Röntgenfilm für eine bestimmte Zeit belichtet und danach ein Bild, auf dem sich die gesuchte Proteinbande befindet, entwickelt werden. Das in der Lösung enthaltene Luminol wurde von der an den

Material und Methoden

Sekundär-Antikörper gekoppelten HRP oxidiert und gab dabei ein Chemolumineszenzsignal in Höhe des gesuchten Proteins ab. Dieses Signal wurde mit Röntgenfilmen detektiert, wobei die Entwicklung der Röntgenfilme in einem Entwicklerbad mit anschließender Fixierung erfolgte.

2.2.8 Stimulation von THP-1 mit Mikrovesikeln

Nach der Differenzierung der THP-1-Monozyten zu Makrophagen wurde der Überstand abgesaugt und die nun adhärenen Zellen mit PBS gewaschen. Das Medium wurde durch 1 ml indikatorfreies RPMI-Medium ausgetauscht und nach zwei Stunden Ruhezeit mit der Stimulation begonnen. Hierbei wurden CM-DiI-gefärbte MV (15-20 MV: 1 Makrophagen) in das sich bereits auf den Zellen befindende Medium pipettiert. Es folgte eine Inkubation bei 37° C, 5% CO₂ und 95%iger Luftfeuchtigkeit. Nach einer definierten Zeit (2, 8, 24 Stunden) wurde der Überstand entnommen und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Dann wurden die Makrophagen mit 4% PFA fixiert, gefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

2.2.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software Microsoft Excel 2013 und SPSS Statistics 22. Bei normalverteilten paarigen Stichproben wurde die statistische Signifikanz mittels Einstichproben-t-Test geprüft. Für nicht paarige Proben wurde die Signifikanz mit einfaktorieller Varianzanalyse (Analysis of variance, ANOVA) und anschließend Bonferoni-Test berechnet. Für nicht normalverteilte Daten wurde bei paarigen Stichproben der Man-Whitney-U-Test verwendet. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Isolierung, Nachweis und Quantifizierung von Mikrovesikeln aus den Überständen stimulierter Mastzellen

3.1.1 Schema der Isolierung von Mikrovesikeln mittels Zentrifugation

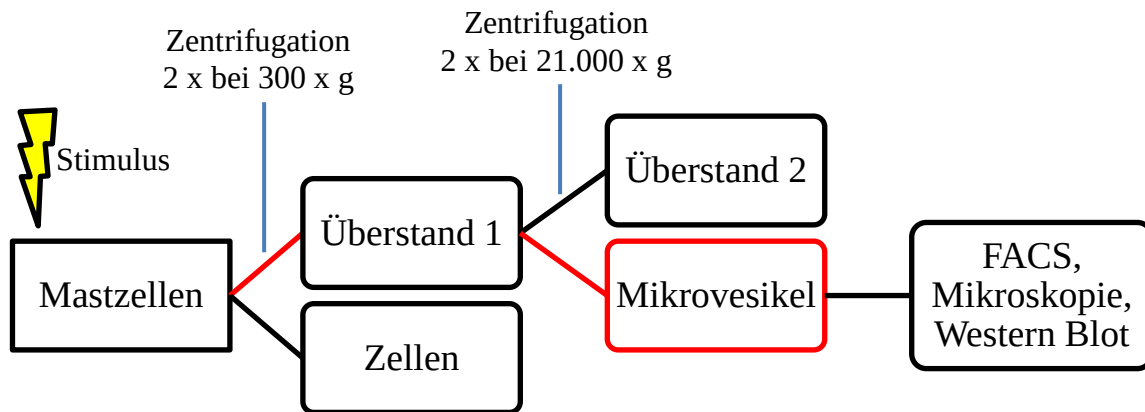


Abb. 9: Schematische Darstellung der Isolierung von MV. Nachdem die Mastzellen einem Stimulus ausgesetzt wurden, erfolgte eine zweifache Zentrifugation der Mastzell-Suspension bei 300 x g. In Überstand 1 befanden sich danach MV und Exosomen. Überstand 1 wurde zweimal bei 21.000 x g zentrifugiert, um MV zu isolieren. Im Anschluss wurde die Qualität und Quantität der Isolierung mittels verschiedener Methoden (FACS, Licht- und Elektronenmikroskopie, West Blot Analyse) bestimmt.

3.1.2 Durchflussszytometrie

Die Analyse des nach der Zentrifugation von Überständen stimulierter Mastzellen gewonnenen Vesikel-Pellets mittels FACS ermöglichte eine Aussage über die Anzahl der darin enthaltenen MV sowie die Reinheit der Probe. Abb. 10 zeigt eine repräsentative Auswertung einer solchen Messung.

Während die Abszisse (FSC-A) in Graph Nr. 1 die Größe der gemessenen Teilchen als Dot-Plot wiedergab, diente die Ordinate (SSC-A) der Darstellung der Granularität der Vesikel. Somit konnten z.B. große, optisch dichte Teilchen im Graphen rechts oben wiedergefunden werden. P1 stellte den Bereich dar, in dem sich MV aufgrund ihrer morphologischen Charakteristik befanden. All diesen Kriterien entsprechende Partikel wurden durch rote Punkte dargestellt, die anderen detektierten Vesikel wurden durch schwarze Punkte repräsentiert. In Feld P2 wurden die Referenzpartikel gezeigt.

Ergebnisse

Terminiert wurden die Messungen immer dann, wenn 200 dieser Partikel detektiert wurden.

Graph Nr. 2 gab Auskunft über spezifische Eigenschaften der in Feld P1 detektierten Partikel. Die Abszisse (Annexin PE-A) lieferte hierbei Informationen über Fluoreszenzsignale des an Annexin V gekoppelten Phycoerythrin (PE), während die Ordinate (7AAD-PerCP-A) die Signale von an 7AAD-gebundenem Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP) skalierte. Durch Setzen von Grenzen entstanden unterschiedlich große Quadranten, in denen die Anzahl der Partikel mit der jeweiligen Eigenschaft dargestellt wurde.

Die Tabelle (Abb. 11) gibt alle Daten in Zahlen wieder. Mit diesen Informationen konnte die Anzahl der MV in einem Mikroliter mithilfe folgender Formel berechnet werden:

$$\frac{\text{Anzahl der Referenzpartikel in } 10\mu\text{l}}{\text{Testvolumen}} \times \frac{P1 (\text{Annexin+}/7\text{AAD-})}{P2 (\text{Referenzpartikel})} \times \text{Verdünnungsfaktor (110/90)}$$

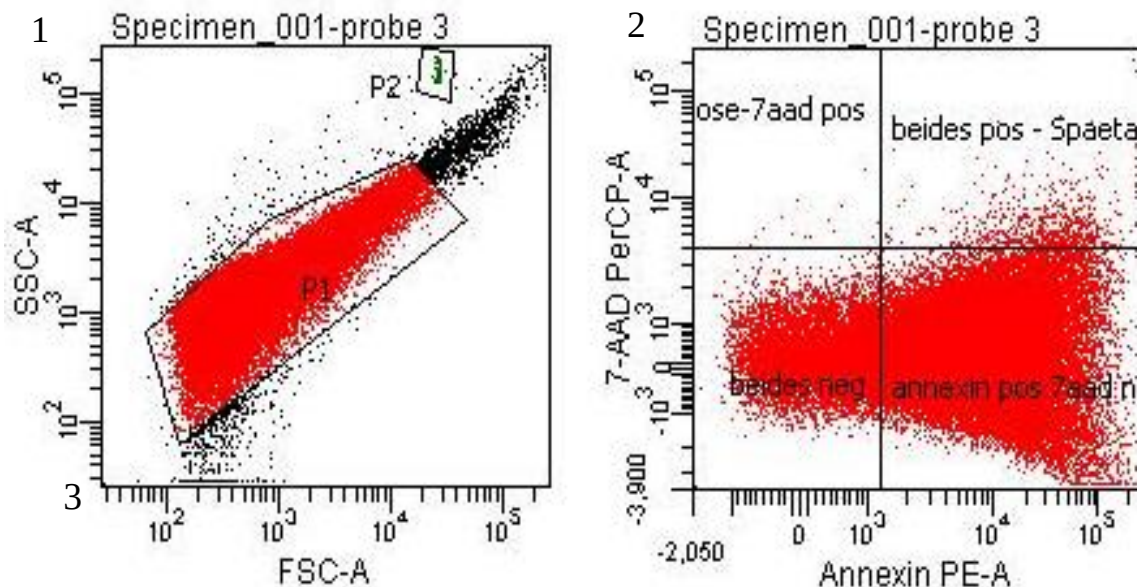


Abb. 10: Graphische Darstellung der Analyse einer MV-Probe mittels FACS: Beispiel der Rohdaten der FACSDiva Software Version 6.1.

Ergebnisse

Tube: probe 3

Population	#Events	%Parent	%Total
■ All Events	59,792	####	100.0
■ P1	57,650	96.4	96.4
☒ nekrose-7aad pos	14	0.0	0.0
☒ beides pos - Spaetapoptosi	615	1.1	1.0
☒ beides neg	8,100	14.1	13.5
☒ annexin pos 7aad neg	48,921	84.9	81.8
■ P2	200	0.3	0.3

Abb. 11: Tabellarische Darstellung der Analyse einer MV-Probe mittels FACS: Die rot-umrandete Zeile der Tabelle gibt die MV-Fraktion wieder. MV sind Annexin-positiv und 7-AAD-negativ. In diesem Beispiel sind 84,9% aller sich in P1 (siehe Abb. 10) befindenden Vesikel Annexin V positiv.

3.1.2.1 Anteil der Annexin-positiven und 7AAD-negativen Vesikel nach Isolierung

Um die Reinheit der MV-Isolierung zu prüfen, wurden die einzelnen Fraktionen anteilig an der Gesamtmenge bestimmt. Den mit Abstand größten Anteil stellten MV (nur Annexin-positiv (A+) Vesikel) dar. Annexin V bindet an PS, das sich an der Außenseite von MV befindet. Bei 7AAD-positiven (7AAD+) Vesikeln, die DNA enthielten und nicht A+ waren, handelte es sich um Vesikel der späten Phase der Apoptose. Vesikel, die sowohl A+- als auch 7AAD+-positiv sind, entsprechen apoptotischen Körpern, denn diese präsentieren PS auf ihrer Oberfläche und enthalten fragmentierte DNA. Die letzte Gruppe repräsentierten die A-/7AAD- Vesikel.

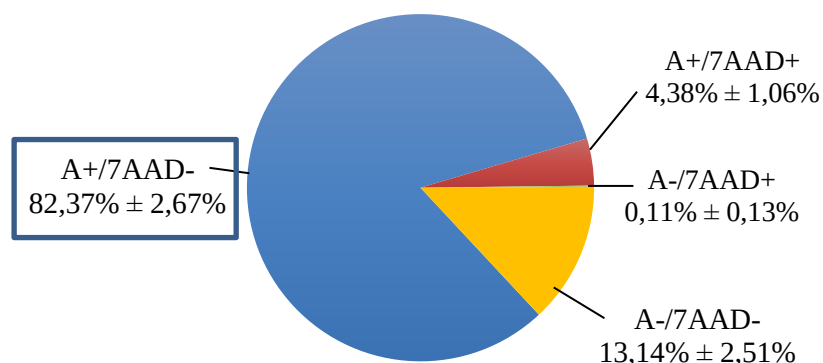


Abb. 12: Anteil der Annexin positiven und 7AAD negativen Vesikeln nach Isolierung. Das Kreisdiagramm zeigt die Verteilung der unterschiedlichen Vesikel nach der Isolierung: A+ = Annexin positiv, A- = Annexin negativ, 7AAD+ = 7-Aminoactinomycin D positiv, 7AAD- = 7-Aminoactinomycin D negativ. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung, n = 15.

Ergebnisse

3.1.2.2 Nachweis eines Mastzell-spezifischen Oberflächenmarkers auf Mastzellen und ihren Mikrovesikeln

MV tragen auf ihrer Oberfläche Mutterzellen-spezifische Proteine. Bei Mastzellen handelt es sich bei diesem Marker um c-Kit (CD117). Daher wurde zunächst überprüft, ob die verwendete humane Mastzelllinie (HMC-1.2.) diesen Oberflächenmarker exprimiert.

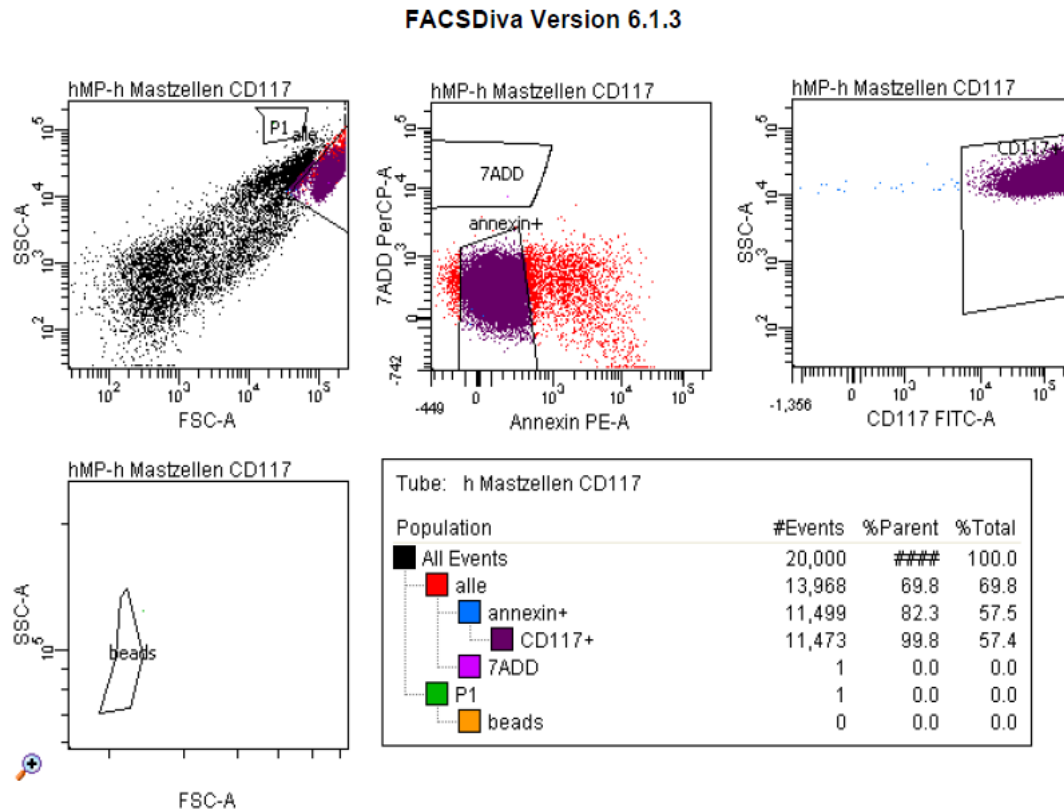


Abb. 13: Nachweis von CD117 auf HMC-1.2. mittels FACS-Analyse. Es zeigt sich, dass die humane Mastzelllinie HMC-1.2. den spezifischen Marker CD117 an ihrer Oberfläche exprimiert.

Nachdem mittels Durchflusszytometrie CD117 nachgewiesen werden konnte, sollte anschließend ermittelt werden, ob die von HMC-1.2. abstammenden MV ebenfalls c-KIT positiv waren. Die Ergebnisse zeigen, dass viele der Annexin V-positiven Vesikel auch CD117-positiv waren (Abb. 14). Der Anteil der CD117-positiven Vesikel war unabhängig vom Stimulus. So betrug der Anteil $67,83 \% \pm 1,13 \%$ nach 3 h Hypoxie ($2 \% \text{ O}_2$, $n = 3$) und $67,2 \% \pm 0,96 \%$ nach Stimulation mit Ionomycin ($1,5 \mu\text{M}$, $n = 3$).

Ergebnisse

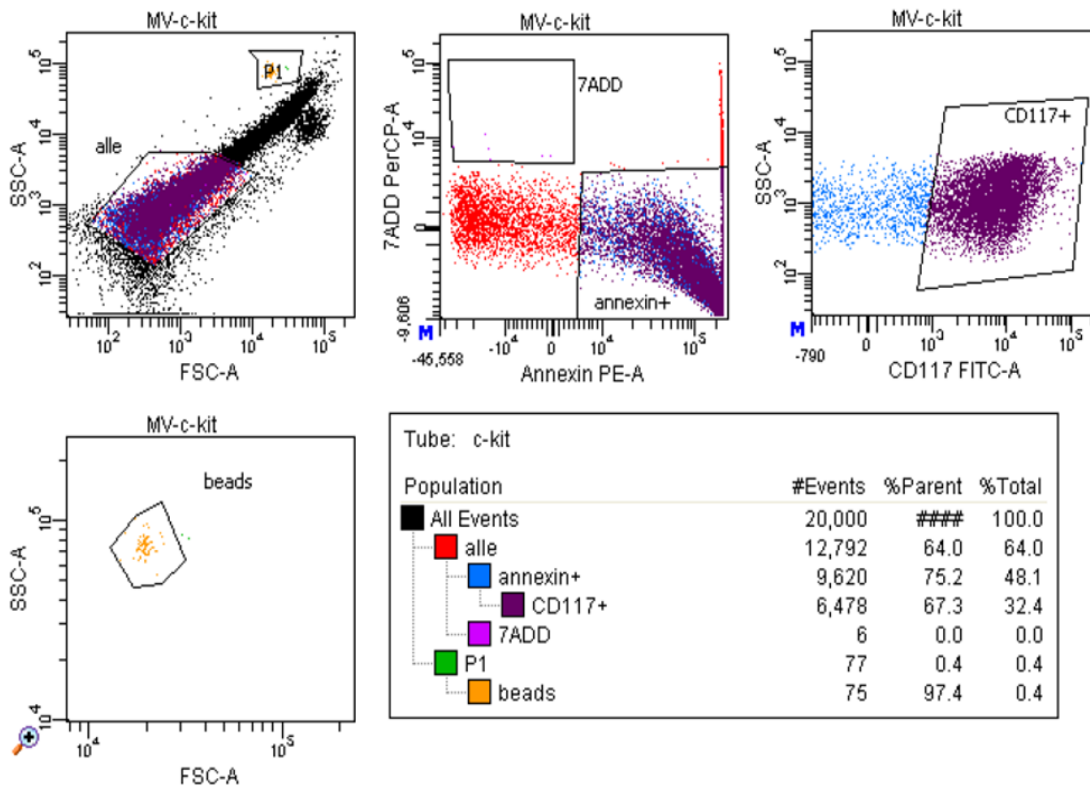


Abb. 14: Nachweis von CD117 auf MV aus stimulierten Mastzellen. Die untersuchten Vesikel waren zu $74,23\% \pm 0,69\%$ (3 h Hypoxie, n = 3) bzw. $73,8\% \pm 0,98\%$ (1,5 μM Ionomycin) 7ADD-negativ und Annexin positiv. Bei diesen gemessenen Vesikeln handelte es sich um MV. Diese trugen zu $67,83\% \pm 1,13\%$ (3 h Hypoxie, n = 3) bzw. $67,2\% \pm 0,96\%$ (1,5 μM Ionomycin, n=3) den Mastzellmarker CD117 an ihrer Außenseite.

3.1.3 Elektronenmikroskopie

Um die Charakterisierung der MV mittels Durchflusszytometer und den damit einhergehenden Nachweis der erfolgreichen Isolierung zu unterstützen, wurden elektronenmikroskopische Bilder angefertigt. Zunächst wurden hierbei Bilder der humanen Mastzellen (HMC-1.2.) aufgenommen (Abb. 15). Es zeigte sich die typische Morphologie der Mastzelle mit Granula und Plasmamembranfortsätzen. Anschließend wurden Schnitte der aus dem Überstand stimulierter Mastzellen isolierten MV angefertigt. Unter dem Elektronenmikroskop konnte anhand der typischen Morphologie zwischen MV und anderen Vesikeln unterschieden werden. Die isolierten MV waren rundlich und ihre Größe rangierte zwischen 100 und 1000 nm (Abb. 16 a+ b).

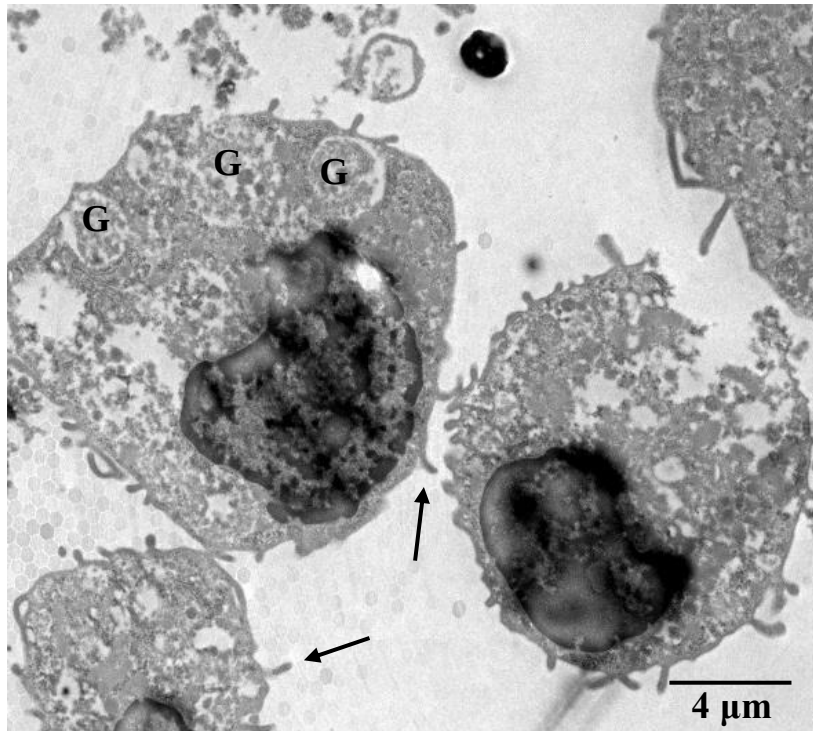


Abb. 15 : Bild einer HMC-1.2. mit Mastzell-typischer Morphologie mittels EM. Das Bild zeigt eine 7.000-fache Vergrößerung einer elektronenmikroskopischen Aufnahme von ungefärbten HMC-1.2.-Zellen. Es stellt die typische Morphologie einer Mastzelle mit Granula (G) und Plasmamembranfortsätzen (Pfeil) dar.

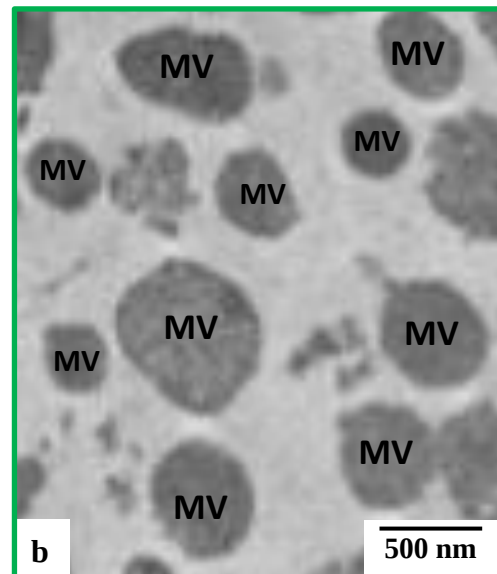
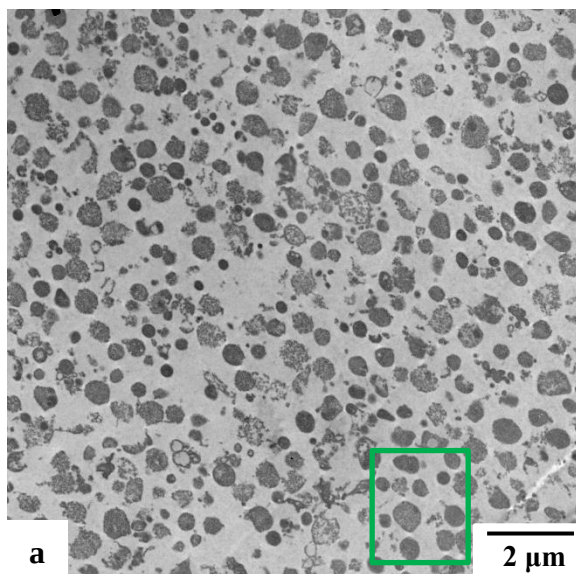


Abb. 16 a + b: Nachweis der MV im EM. Bild 16 a zeigt einen Ausschnitt aus einem isolierten MV-Pellet. Die 4.400-fach vergrößerte elektronen-mikroskopische Aufnahme ist eine ungefärbte Kontrolle der MV. Abb. 16 b ist eine Vergrößerung des grün umrandeten Bereichs aus Abb. 16 a.

Ergebnisse

3.1.3.1 Größenbestimmung der Mikrovesikel

Zur Bestimmung der durchschnittlichen Größe der MV wurde der Durchmesser von insgesamt 692 MV aus vier unterschiedlichen Präparationen in elektronenmikroskopischen Bildern ermittelt. Die Messungen ergeben eine mittlere Größe von 492 nm.

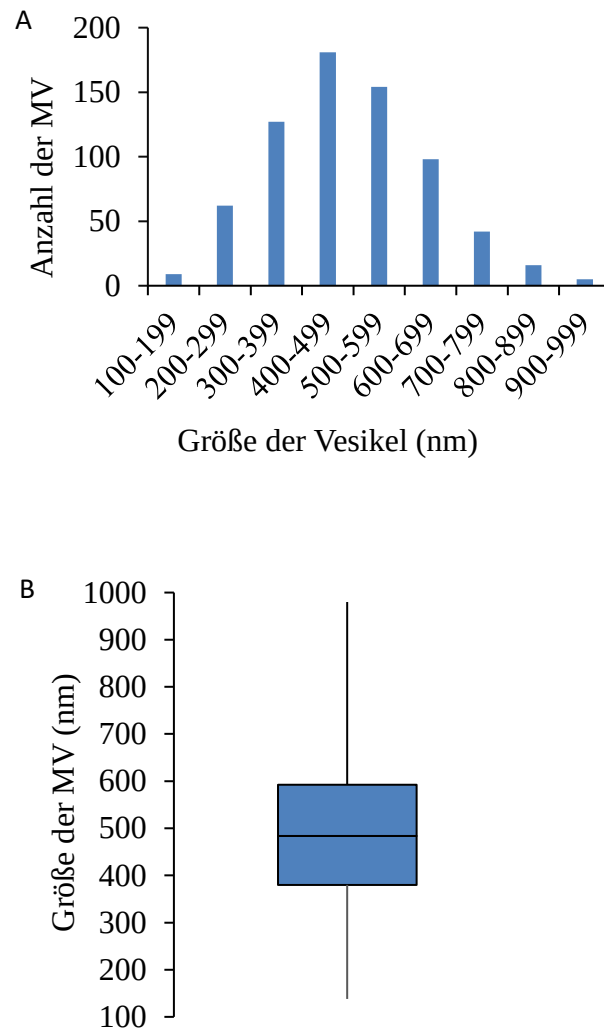


Abb. 17: Durchschnittliche Größe eines MV aus humanen Mastzellen (HMC-1.2.): Zur Darstellung der Größenverteilung von MV wurde die Einteilung in 100 nm große Gruppen gewählt. Es zeigte sich eine annähernd glockenförmige Größenverteilung der MV, wobei der Mittelwert bei $491,87 \text{ nm} \pm 151,94 \text{ nm}$ lag. $n = 692$.

B: Mittels eines Box-Plots kann der Median von 484 nm dargestellt werden. Der Anfang und das Ende der Box stehen für die 25. und 75. Perzentile. Dementsprechend befinden sich 50 % aller gemessenen Werte zwischen 380 nm und 592,5 nm. Des Weiteren kann der Minimalwert von 138 nm und der maximale Durchmesser von 980 nm abgelesen werden. $n = 692$.

3.2 Stimuli der Mikrovesikelbildung

3.2.1 Zytotoxizität der Stimuli

Um zu überprüfen, ob die verwendeten Stimuli zytotoxisch waren bzw. zur Induktion der Apoptose in Mastzellen führten, wurden zum einen Zellzählungen und zum anderen ein Apoptosetest durchgeführt. Es zeigte sich, dass nach 8- und 24-stündiger Hypoxie eine Abnahme der Zellzahl sowie eine Zunahme der Apoptose zu verzeichnen war. Alle anderen verwendeten Substanzen wirkten nicht zytotoxisch.

Stimulanz	Lebendzellzahl (% der Kontrolle $\pm \sigma$)	Apoptose (prozentualer Anstieg im Vergleich zur Kontrolle $\pm \sigma$)
3 h Hypoxie	99,2 $\pm$ 3,3	2,0 $\pm$ 0,6
8 h Hypoxie	85,7 $\pm$ 2,2	8,2 $\pm$ 1,2
24 h Hypoxie	73,6 $\pm$ 2,3	15,7 $\pm$ 1,8
Ionomycin (1,5 μ M)	94,9 $\pm$ 1,7	3,0 $\pm$ 0,2
C3a (250 ng/ml)	95,8 $\pm$ 2,7	1,3 $\pm$ 0,4
C5a (100 ng/ml)	96,9 $\pm$ 3,0	1,6 $\pm$ 0,7
Poly IC (5 μ g/ml)	97,1 $\pm$ 1,1	1,5 $\pm$ 0,9
LPS (1 μ g/ml)	93,6 $\pm$ 0,4	1,4 $\pm$ 0,5
Cromolyn (10 μ g/ml)	98,26 $\pm$ 0,60	1,3 $\pm$ 1,0
Wortmanin (10 μ M)	92,64 $\pm$ 1,11	0,8 $\pm$ 0,2
BAPTA (20 μ M)	94,96 $\pm$ 0,41	0,7 $\pm$ 0,2

Tab. 2: Anteil der Lebendzellzahl und Apoptoserate nach Hypoxie. Zur Bestimmung der Zytotoxizität wurden die Lebendzellzahl sowie die Rate der Apoptose nach Stimulation und unter Kontrollbedingungen verglichen. Dabei wurden die Mastzellen für 3, 8 und 24 h entweder hypoxischen (2,0% O₂) oder normoxischen Bedingungen ausgesetzt. Alternativ wurde die einstündige Stimulation mittels Erhöhung der Calciumkonzentration durch Ionomycin (1,5 μ M), Aktivierung des Komplementsystems durch C3a (250 ng/ml) und C5a (100 ng/ml), des Agonisten des TLR 4 durch LPS (1 μ g/ml) und des Agonisten des TLR 3 durch Poly IC (5 μ g/ml) durchgeführt. Des Weiteren erfolgte eine einstündige Inkubation mit Cromolyn (10 μ g/ml), das als Mastzellstabilisator fungiert, Wortmannin (10 μ M), einem Phosphatidylinositol 3 Kinase-Hemmer und dem Calciumchelator BAPTA (10 mM). Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Lebendzellen unter Stimulation von der Anzahl der Lebendzellen unter Kontrollbedingung $\pm$ Standardabweichung (σ) bzw. der prozentuale Anstieg der Apoptoserate im Vergleich zur Kontrolle, n = 3.

3.2.2 Hypoxie

3.2.2.1 Zeitabhängigkeit der Mikrovesikel-Bildung unter Hypoxie

Hypoxie ist ein potenter Stimulus der Degranulation von Mastzellen. Um zu überprüfen, ob Hypoxie auch zur vermehrten Bildung von MV führt, wurde die Anzahl der MV nach unterschiedlich andauernder Hypoxie auf die zeitgleich durchgeführte normoxische Kontrolle normiert. Es zeigt sich eine zeitabhängige Zunahme der Mikrovesikelbildung unter hypoxischen Bedingungen (2% O₂).

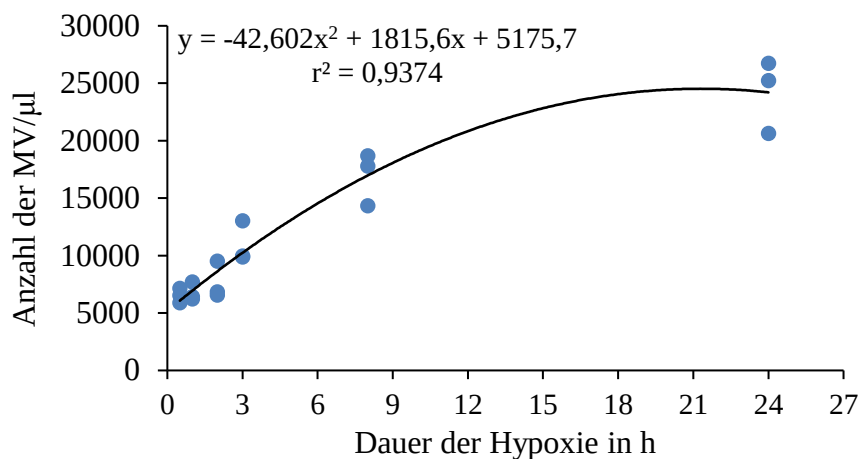


Abb. 18: Zeitabhängigkeit der MV-Bildung unter Hypoxie. Der Graph zeigt die Anzahl unter Hypoxie (2% O₂) gebildeter MV im zeitlichen Verlauf. Dabei wurde die Anzahl der MV nach 0,5, 1, 2, 3, 8 und 24 h Hypoxie mittels FACS-Messungen ermittelt. Es zeigte sich ein Zusammenhang ($r^2 = 0,9374$) zwischen Anzahl der MV und Dauer der Hypoxie.

3.2.2.2 Vergleich zwischen 3 und 24 Stunden Hypoxie

Obwohl die Ergebnisse aus 3.2.2.1 zeigten, dass die meisten MV nach 24-stündiger Hypoxie entstanden, wurde für weiterführende Versuche unter Hypoxie eine Dauer von 3 h gewählt. Bereits nach 8 Stunden Hypoxie war eine Abnahme der Lebenszellzahl und eine Induktion der Apoptose zu verzeichnen. Nach 3 h Hypoxie zeigte sich ein relativer Anstieg der MV-Anzahl um Faktor 2,6 im Vergleich zur normoxischen Kontrolle. Ein weiterer Grund sich gegen Versuche mit MV aus dem Überstand der Mastzellen nach 24-stündiger Hypoxie zu entscheiden, war die Reinheit der MV-Isolierung. Während der Anteil der MV (A+/ 7AAD-) an allen Vesikeln nach 3 h Hypoxie bei ca. 83 % lag, sank der Anteil nach 24 h Hypoxie auf ca. 71%.

Ergebnisse

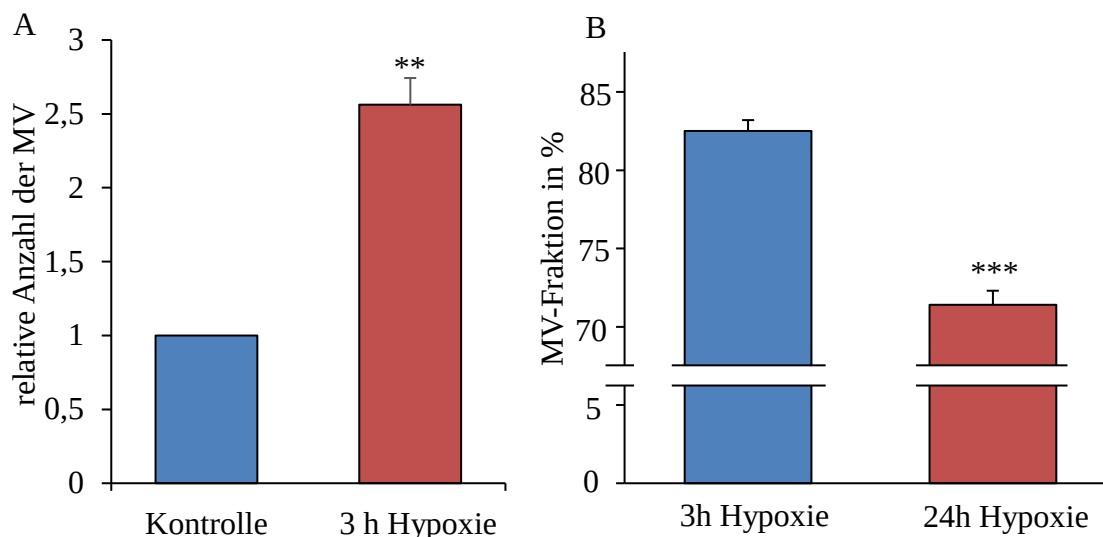


Abb. 19: Relativer Anteil der MV unter Hypoxie im Vergleich zur Kontrolle. A: Relativer Anteil der MV nach 3 h Hypoxie im Vergleich zur normoxischen Kontrolle. Nach 3-stündiger Inkubation in der Hypoxiekammer (2 % O₂, 5 % CO₂, 37 °C, 100 % Luftfeuchtigkeit) zeigte sich ein relativer Anstieg der MV-Anzahl um den Faktor 2,6 im Vergleich zur normoxischen Kontrolle. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung. * = signifikant gegen Kontrolle *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; n = 3.

B: Anteil der MV-Fraktion an der Gesamtzahl der isolierten Vesikeln nach 3 h und 24 h Hypoxie. Nach der Stimulation (3 h bzw. 24 h, 2 % O₂, 5 % CO₂, 37 °C, 100 % Luftfeuchtigkeit) wurden aus dem Überstand MV isoliert. Das in Annexin-bindendem Puffer (ABB) aufgenommene MV-Pellet wurde anschließend im Durchflusszytometer analysiert. Dabei konnte neben Größe und Granularität mithilfe von fluoreszierenden Antikörpern auch der Anteil Annexin-positiver und zugleich 7AAD-negativer Vesikel (= MV) bestimmt werden. Dabei zeigte sich ein Anteil der MV unter allen isolierten Vesikeln von 82,5 % $\pm$ 0,7 % nach 3-stündiger Stimulation und ein Anteil von 71,4 % $\pm$ 0,9 % nach 24 h Hypoxie. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung. * = signifikant gegen Kontrolle. *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; n = 3.

3.2.2.3 Kalziumabhängigkeit der Mikrovesikel-Freisetzung unter Hypoxie

Da Ca²⁺ sowohl bei der Degranulation als auch bei der Abknospen der MV von der Membran eine wichtige Rolle spielt, sollte überprüft werden, ob der Mechanismus der erhöhten MV-Freisetzung unter Hypoxie ebenfalls von Ca²⁺ abhängt. Dafür wurden die Mastzellen eine Stunde vor Hypoxie-Stimulation mit dem Ca²⁺-Chelator BAPTA inkubiert. Es zeigte sich, dass freies extrazelluläres Ca²⁺ für die gesteigerte MV-Freisetzung unter hypoxischen Bedingungen eine essentielle Rolle spielt, da sie mit BAPTA auf ein Fünftel des Ausgangswertes unter Hypoxie reduziert werden konnte. Auch die basale MV-Freisetzung unter normoxischen Bedingungen war Ca²⁺-abhängig.

Ergebnisse

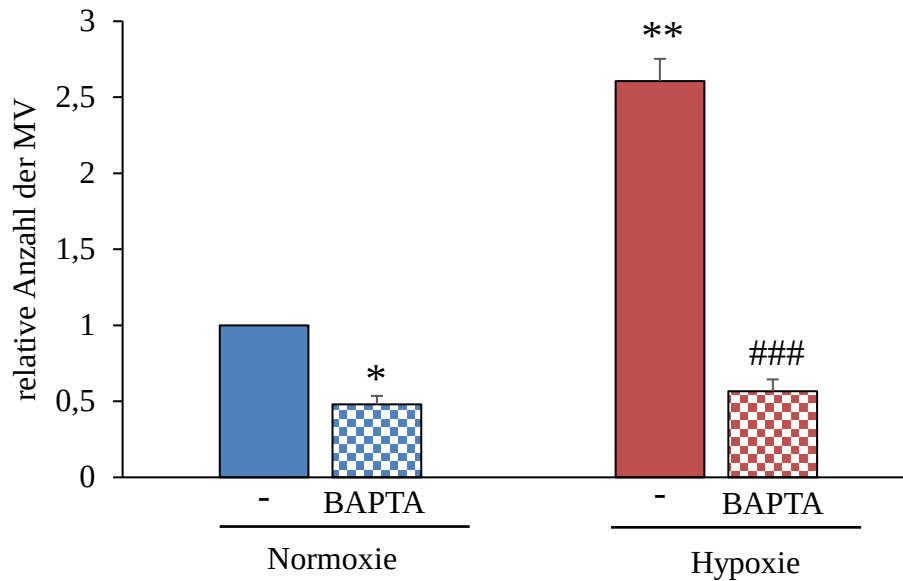


Abb. 20: Ca^{2+} -Abhängigkeit der MV-Freisetzung unter Hypoxie. Der Graph zeigt die relative Anzahl der MV nach dreistündiger Normoxie, 3 h Hypoxie (2% O_2), Hypoxie + BAPTA (20 μM), und Normoxie + BAPTA im Vergleich zur Normoxie. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. * Signifikant gegen Normoxie; # Signifikant gegen Hypoxie; $n=3$.

3.2.3 Induktoren der Degranulation

Neben der Hypoxie gibt es zahlreiche weitere potente Stimulatoren der Mastzell-Degranulation, die auch die MV-Bildung stimulieren. Hierfür wurden Mastzellen einer einstündigen Inkubation mit Ionomycin, den aktivierten Komplementfaktoren C3a und C5a, Poly I:C oder LPS ausgesetzt. Abb. 21 zeigt, dass auch hier - bis auf die Stimulation mit LPS - im Vergleich zur Kontrolle signifikant steigende MV-Anzahlen nachgewiesen werden konnten.

3.2.3.1 Hemmung der Mikrovesikel-Bildung durch Degranulationshemmer

Cromolyn, Wortmannin und BAPTA werden häufig zur Inhibition der Mastzell-Degranulation eingesetzt. Daher war es wichtig zu überprüfen, ob sie auch die MV-Bildung hemmen. Abb. 22 zeigt, dass es sich bei allen drei Substanzen um potente Hemmer der MV-Bildung handelt.

Ergebnisse

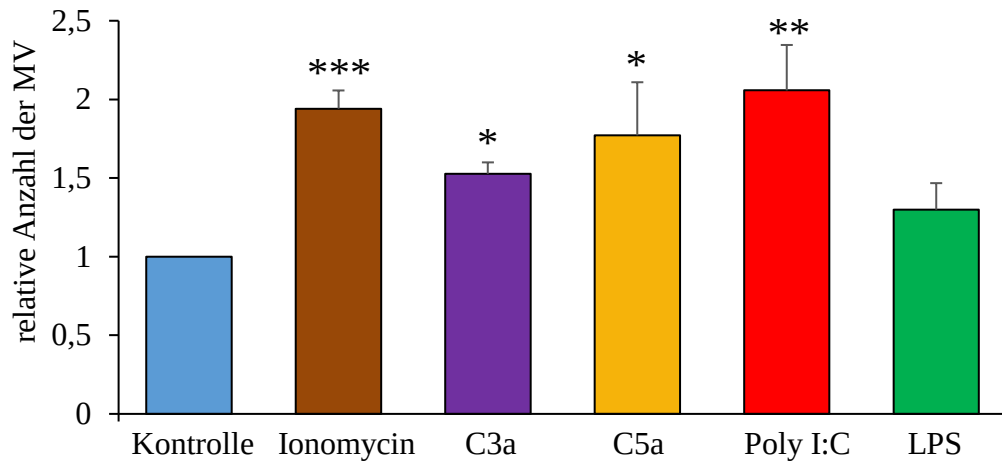


Abb. 21: Anzahl der MV nach Stimulation mit Induktoren der Degranulation. Die Abbildung zeigt die relative Anzahl der MV nach einstündiger Stimulation mit dem Kalzium-Ionophor Ionomycin (1,5 μ M), den Komplementfaktoren C3a (250 ng/ml) und C5a (100 ng/ml), dem Toll-like-Rezeptor (TLR) 3 Agonist Poly I:C (5 μ g/ml) und dem TLR4-Agonisten LPS (1 μ g/ml). Die Ergebnisse zeigen, dass besonders Ionomycin einen potenten und verlässlichen Stimulus der MV-Bildung darstellte. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung. * = signifikant gegen Kontrolle * P <0,05; ** P <0,01; *** P <0,001; n =3.

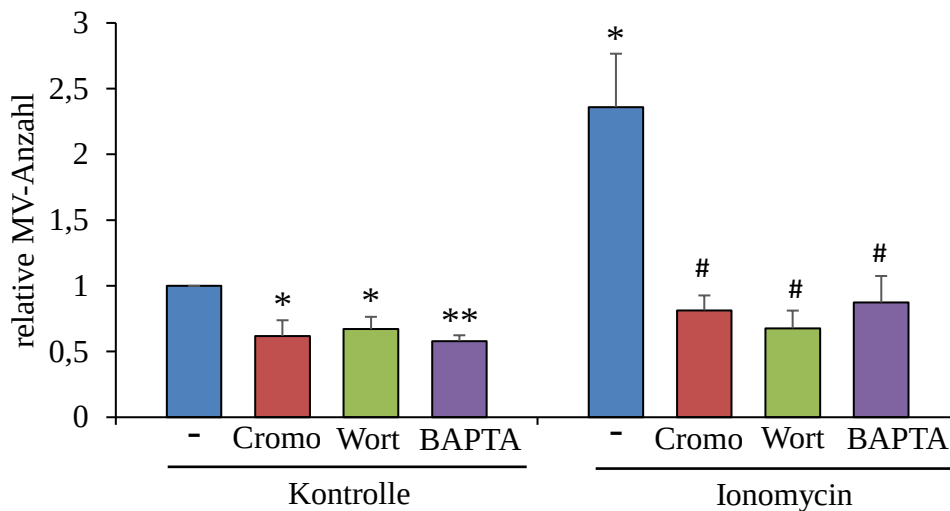


Abb. 22: Hemmung der MV-Bildung durch Degranulationshemmer. Die Abbildung zeigt die relative Anzahl der MV nach einstündiger Inkubation mit Cromolyn (10 μ g/ml), Wortmanin (10 μ M) bzw. BAPTA (20 μ M) gefolgt von einer einstündigen Stimulation mit 1,5 μ M Ionomycin. Es zeigte sich, dass Cromolyn und Wortmanin nicht nur die durch Stimulation gebildete MV-Anzahl sank, sondern auch die Basis-MV-Bildung gedrosselt wurde. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung. * P <0,05; ** P <0,01; *** P <0,001; *Signifikant gegen Kontrolle; # Signifikant gegen Ionomycin.

Ergebnisse

3.2.4 Bestimmung der Mikrovesikel-Fraktion ohne Zentrifugation

Um zu überprüfen, ob ein Stimulus die MV-Bildung fördert, wurden aus dem Überstand stimulierter Zellen mit Hilfe von mehreren Zentrifugationsschritten MV isoliert. Anschließend erfolgten eine Kontrolle der Reinheit und eine Messung der Anzahl der MV mit dem Durchflusszytometer. Möchte man mit den isolierten MV weiterarbeiten, sind diese Schritte unerlässlich. Möchte man allerdings lediglich eine Substanz auf ihre Fähigkeit zur Stimulation der MV-Bildung untersuchen, stellte sich die Frage, ob auf die zeitaufwendigen Schritte der Zentrifugation verzichtet werden kann. Es zeigte sich, dass auch ohne Zentrifugation ein Anstieg der MV-Bildung im Vergleich zur Kontrolle zu erkennen ist. Möchte man diverse Stimuli auf ihre Fähigkeit zur Stimulation der MV-Bildung „screenen“, genügt es, den relativen Anteil der MV in der jeweiligen Rohfraktion zu bestimmen.

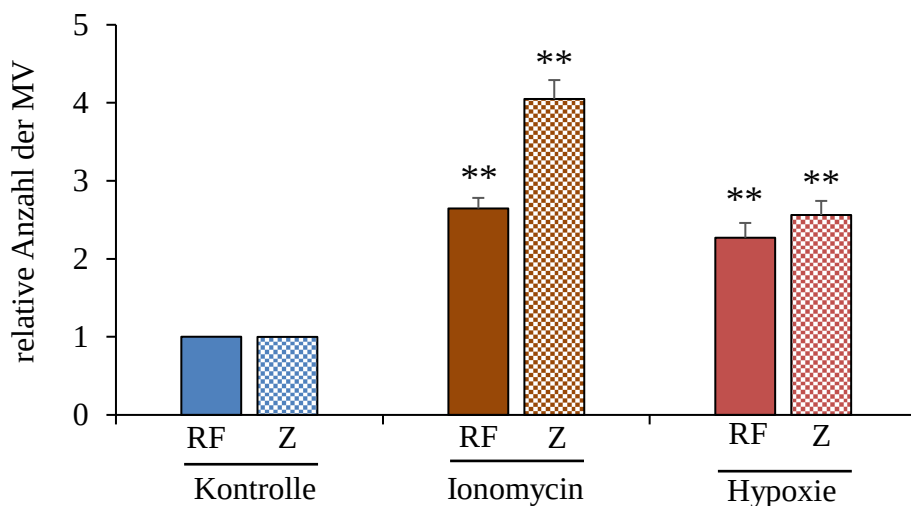


Abb. 23: Bestimmung der MV-Fraktion mittel FACS ohne Zentrifugationsschritt. Die Abbildung zeigt die relative Anzahl der MV (A+/7AAD-) im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle einmal ohne (Rohfraktion = RF) und einmal mit Zentrifugation = Z (2x, 40 min, 21.000 x g). Die Mastzellen wurden zuvor entweder mit Ionomycin (1,5 µM, 1 h, 37° C, 5% CO₂, 100% Luftfeuchtigkeit) oder durch Hypoxie (2% O₂, 3 h, 37° C, 5% CO₂, 100% Luftfeuchtigkeit) zur MV-Bildung angeregt. Es zeigt sich, dass auch ohne Zentrifugation ein deutlicher Anstieg der MV-Bildung zu verzeichnen ist. Im Vergleich zur zentrifugierten Probe, kann jedoch insbesondere bei der Stimulation mit Ionomycin ein Unterschied in der absoluten Anzahl der MV verzeichnet werden. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung. n = 3. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; *Signifikant gegen jeweilige Kontrolle.

3.3 Charakterisierung der Mikrovesikel

Um die biologische Aktivität von Hypoxie-induzierten MV aus Mastzellen zu untersuchen, müssen ihre Zusammensetzung und ihr Inhalt teilweise bekannt sein. Von besonderem Interesse sind hierbei die Mikrovesikel-assoziierten Ribonukleinsäuren und Proteine.

3.3.1 Mikrovesikel-assoziierte Ribonukleinsäuren

An der Mikrovesikel-assoziierten RNA bestand zweierlei Interesse. Einerseits könnte sie in Form von eRNA als proinflammatorischer Mediator wirken, andererseits durch Aufnahme der in MV enthaltenen RNA das Transkriptom der Rezeptorzelle verändern.

3.3.1.1 RNA-Quantifizierung der Mikrovesikel-assoziierten rRNA

Um zu überprüfen, ob der RNA-Gehalt in der MV-Suspension von der Anzahl der MV abhängt, wurde die RNA-Menge gegen die MV-Zahl aufgetragen. Dabei wurden MV aus unterschiedlichen Stimulationen verwendet. Es ergibt sich eine positive lineare Korrelation der beiden Faktoren (Abb. 24).

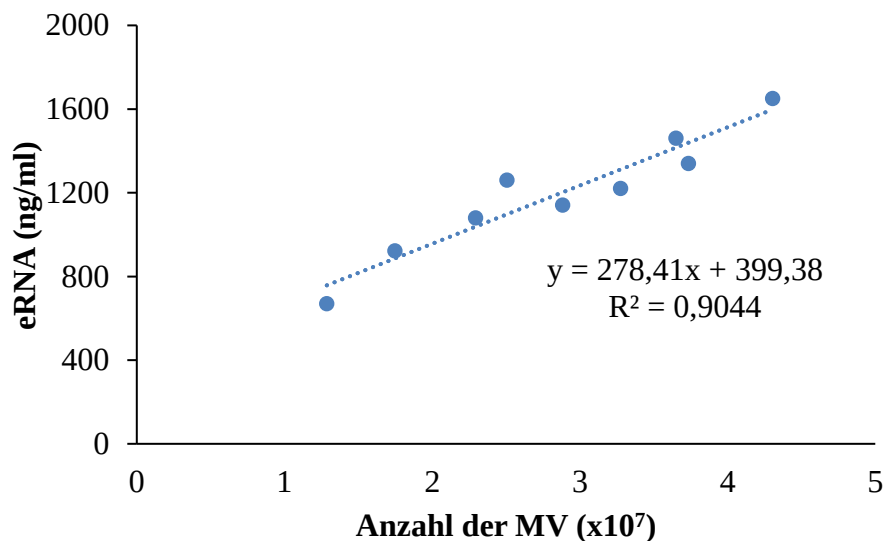


Abb. 24: Zusammenhang zwischen MV-Anzahl und eRNA-Gehalt. Der Graph zeigt die Korrelation zwischen der eRNA-Menge in ng/ml und der Anzahl der MV. Ein Korrelationskoeffizient von 0,9044 spricht für einen starken Zusammenhang zwischen der Anzahl der MV und dem Gesamt-RNA-Gehalt.

Ergebnisse

3.3.1.2. Lokalisation der Mikrovesikel-assoziierten RNA

3.3.1.2.1 Immunfluoreszenzfärbungen der ribosomalen RNA

Die bisherigen Ergebnisse konnten zeigen, dass das nach der Zentrifugation des Überstandes von stimulierten Mastzellen entstandene Pellet viel RNA enthält. Ob sich die RNA innerhalb der Vesikel oder membranassoziiert außerhalb der Vesikel befindet, blieb jedoch offen. Zur Untersuchung dieser Fragestellung, wurden zunächst Immunfluoreszenzfärbungen der ribosomalen RNA in Mastzellen angefertigt. Abb. 25 b-d zeigen hierbei die punktförmige Anordnung des Antikörpers gegen ribosomale RNA.

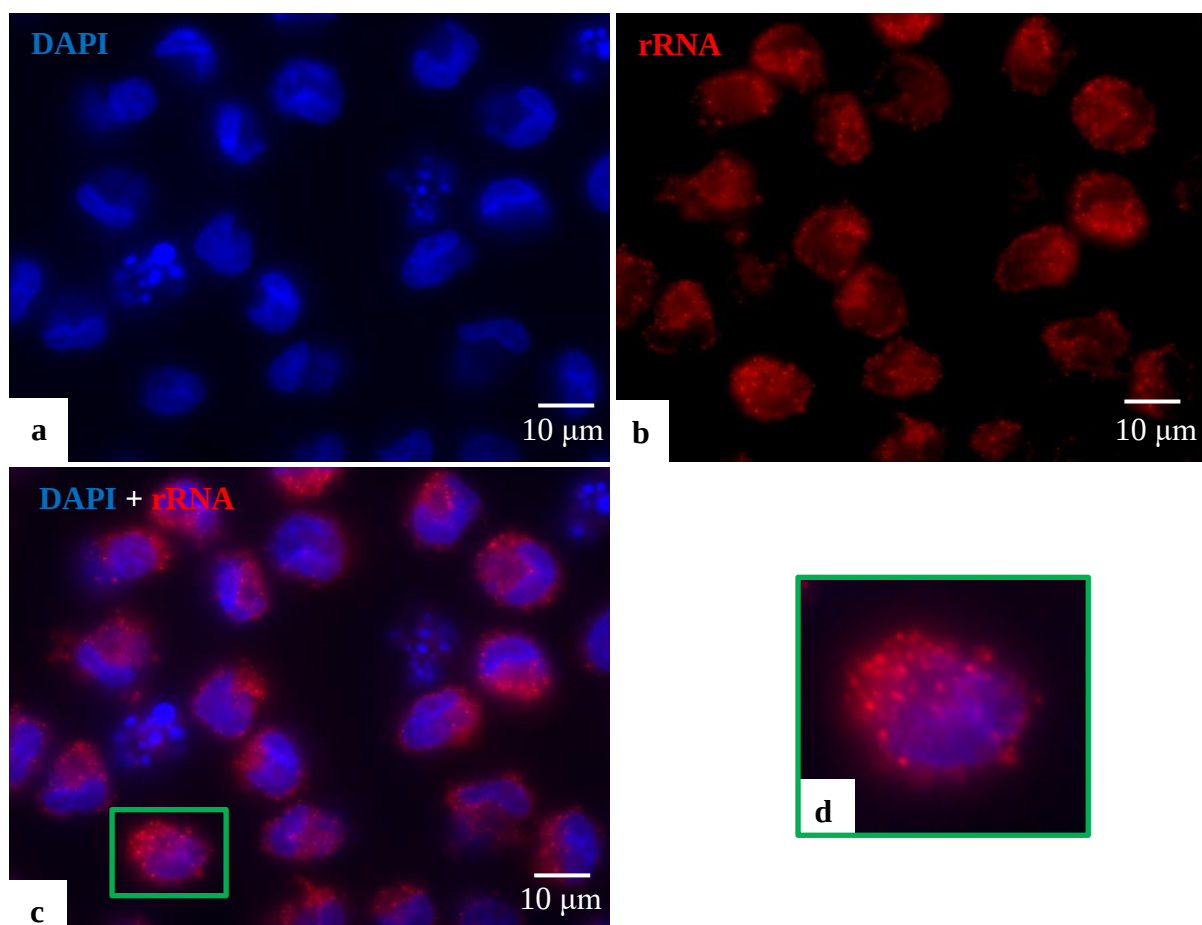


Abb. 25 a-d: Verteilungsmuster der rRNA in HMC-1.2-Zellen. Die Bilder stellen immunhistochemische Färbungen der humanen Mastzelle und ihrer MV mit einem spezifischen Antikörper gegen ribosomale RNA. Bild 25 a zeigt die Kernfärbung der Mastzelle mit DAPI (blau); b die rRNA-Färbung (rot), wobei besonders im vergrößerten Ausschnitt (Bild d) die punktförmige Anordnung der Antikörper zu erkennen ist. Bild 25 c ist das Overlay der Bilder a und b.

Ergebnisse

Des Weiteren konnte bisher noch nicht die Qualität der RNA bestimmt werden. Sollte es sich vornehmlich um ribosomale RNA handeln, bestünde die Möglichkeit, dass es sich bei der gemessenen RNA ebenfalls um isolierte Ribosomen/Polysomen handelt. Um diesen Fragen nachzugehen, wurden der Antikörper gegen ribosomale RNA sowie ein Fluoreszenz-markierter Sekundärantikörper verwendet und die Vesikel unter dem Mikroskop betrachtet.

Dadurch konnte überprüft werden, ob MV ribosomale RNA enthalten. Hiernach konnte jedoch noch nicht bestimmt werden, ob es sich um rRNA enthaltende MV oder freie Ribosomen handelt. Um dies zu erforschen, wurden neben weiteren fluoreszenz- auch elektronenmikroskopische Bilder angefertigt.

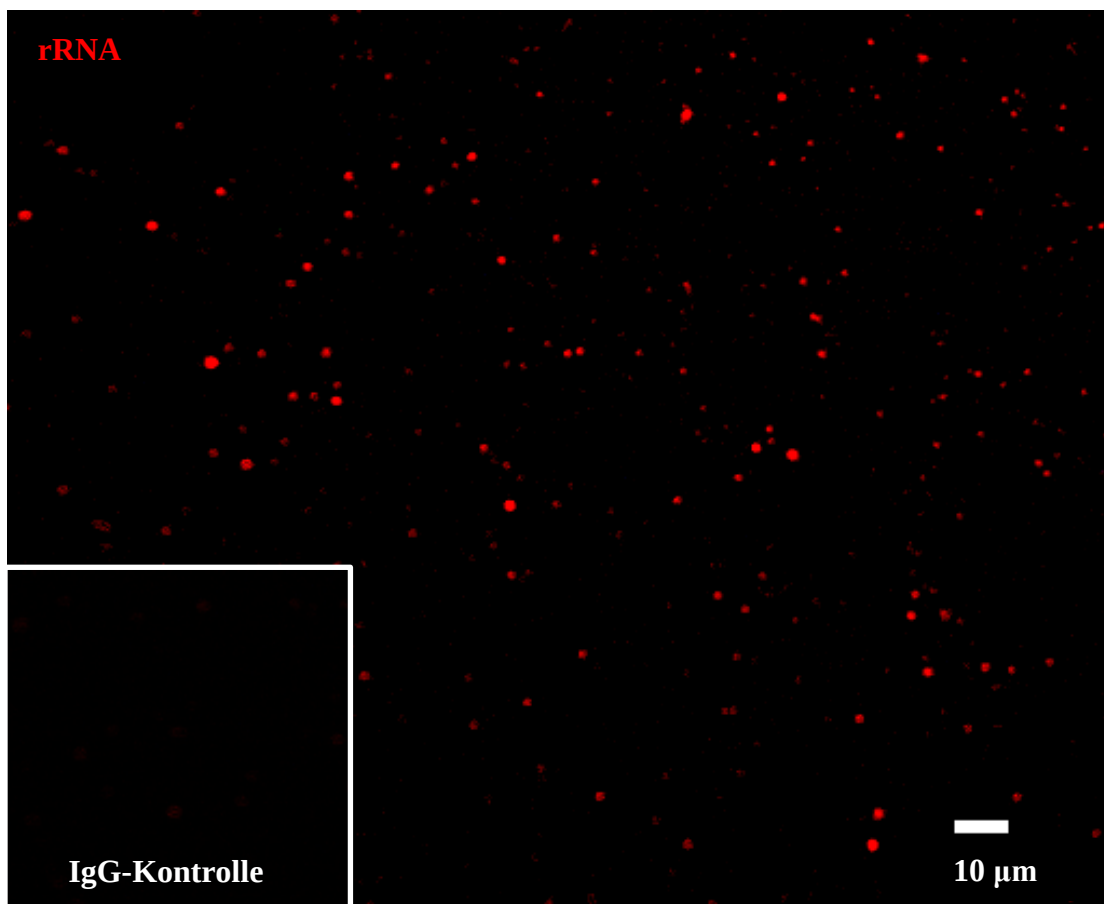


Abb. 26: rRNA ist MV-assoziiert. Die Bilder zeigen immunhistochemische Färbung der MV aus Hypoxie-stimulierten Mastzellen mit einem spezifischen Antikörper gegen ribosomale RNA. Das Bild zeigt in 63-facher Vergrößerung des gefärbten Pellets aus dem Überstand Hypoxie-stimulierter Mastzellen. Dabei lässt sich die Anwesenheit von rRNA nachweisen. Weiß umrandet ist die Aufnahme der Kontrollfärbung. Es zeigt sich, dass der Sekundärantikörper keine unspezifischen Bedingungen eingeht.

Ergebnisse

3.3.1.2.2 Immunfluoreszenzfärbungen der ribosomalen RNA und des ribosomalen Proteins L11

Zusammen mit ribosomalen Proteinen bildet die rRNA den Ort der Proteinbiosynthese: Ribosomen. Daher wurde als nächstes - neben der Färbung der rRNA - auch das ribosomale Protein L11 immunhistochemisch gefärbt. Hierbei deutet eine Überlagerung der Fluoreszenzsignale (gelb) auf eine räumliche Nähe der rRNA und des Proteins L11 hin. Zunächst wurden dieselben Antikörper zur Färbung von Mastzellen verwendet (Abb. 27 a). Danach wurden MV aus dem Überstand Hypoxie-stimulierter HMC-1.2. auf dieselbe Art und Weise angefärbt wie zuvor die Mastzellen (Abb. 27 b-e). Es zeigte sich, dass auch MV das ribosomale Protein L11 enthalten.

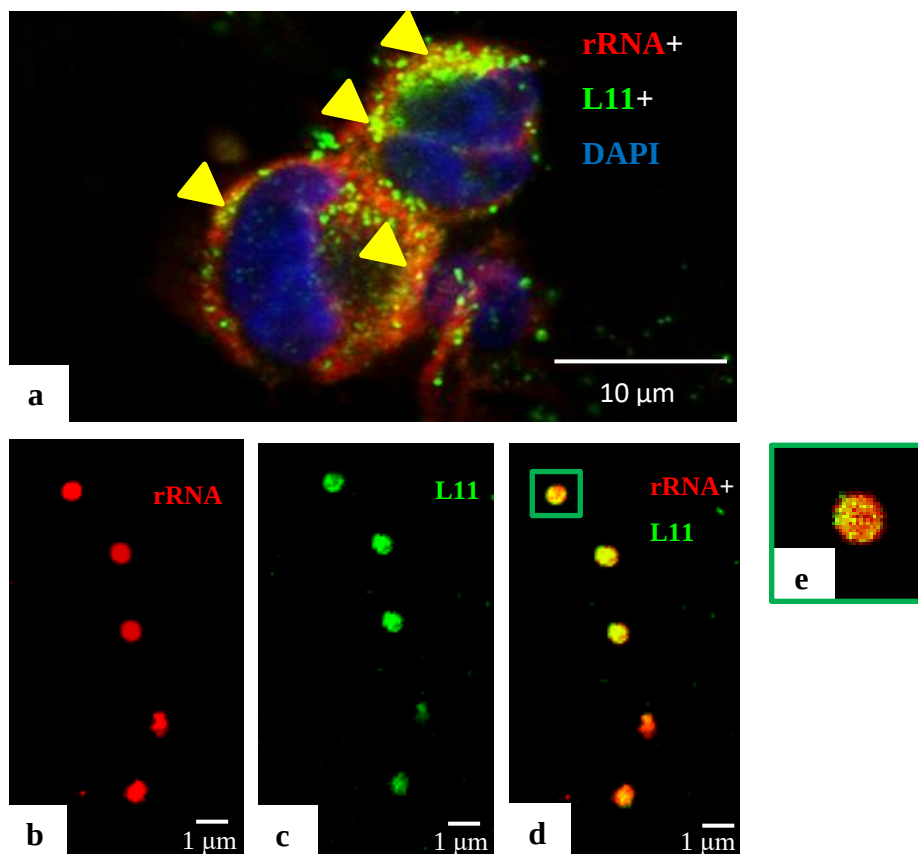


Abb. 27 a-e: MV-assoziierte rRNA und zytoplasmatische rRNA sind mit dem ribosomalen Protein L11 co-lokalisiert. Die Bilder zeigen immunhistochemische Färbungen der Mastzelle und ihrer MV mit Antikörpern gegen rRNA und L11. Die Bilder wurden mit dem konfokalen Mikroskop aufgenommen. Bild a zeigt ein Überlagerungsbild der Färbung der rRNA (rot), des ribosomalen Proteins L11 (grün) und des Kerns (blau) der Mastzelle. Während Bild b die Färbung der rRNA isolierter MV darstellt, zeigt Bild c die Färbung des ribosomalen Proteins L11 und d eine Überlagerung der beiden Bilder b und c. Bild e stellt einen vergrößerten Vesikel aus Bild d dar.

Ergebnisse

3.3.1.2.3 Elektronenmikroskopische Aufnahme der ribosomalen RNA

Aufgrund der erfolgten Versuche konnte angenommen werden, dass die isolierten Vesikel rRNA enthalten. Ob sich die RNA innerhalb der Vesikel oder membranassoziiert außerhalb der Vesikel befindet, blieb jedoch offen. Um dieser Frage nachzugehen, wurden der Antikörper gegen ribosomale RNA sowie ein an Gold-gekoppelter Sekundärantikörper verwendet und anschließend die Mastzellen (Abb. 28) und die Vesikel (Abb. 29) unter dem Raster-Elektronenmikroskop. Da sich rRNA nicht nur im Zytoplasma sondern auch im Nukleolus befand, galt es auch diesen anzufärben. Es zeigte sich, dass neben der Färbung von Ribosomen auch der Nukleolus gefärbt werden konnte.

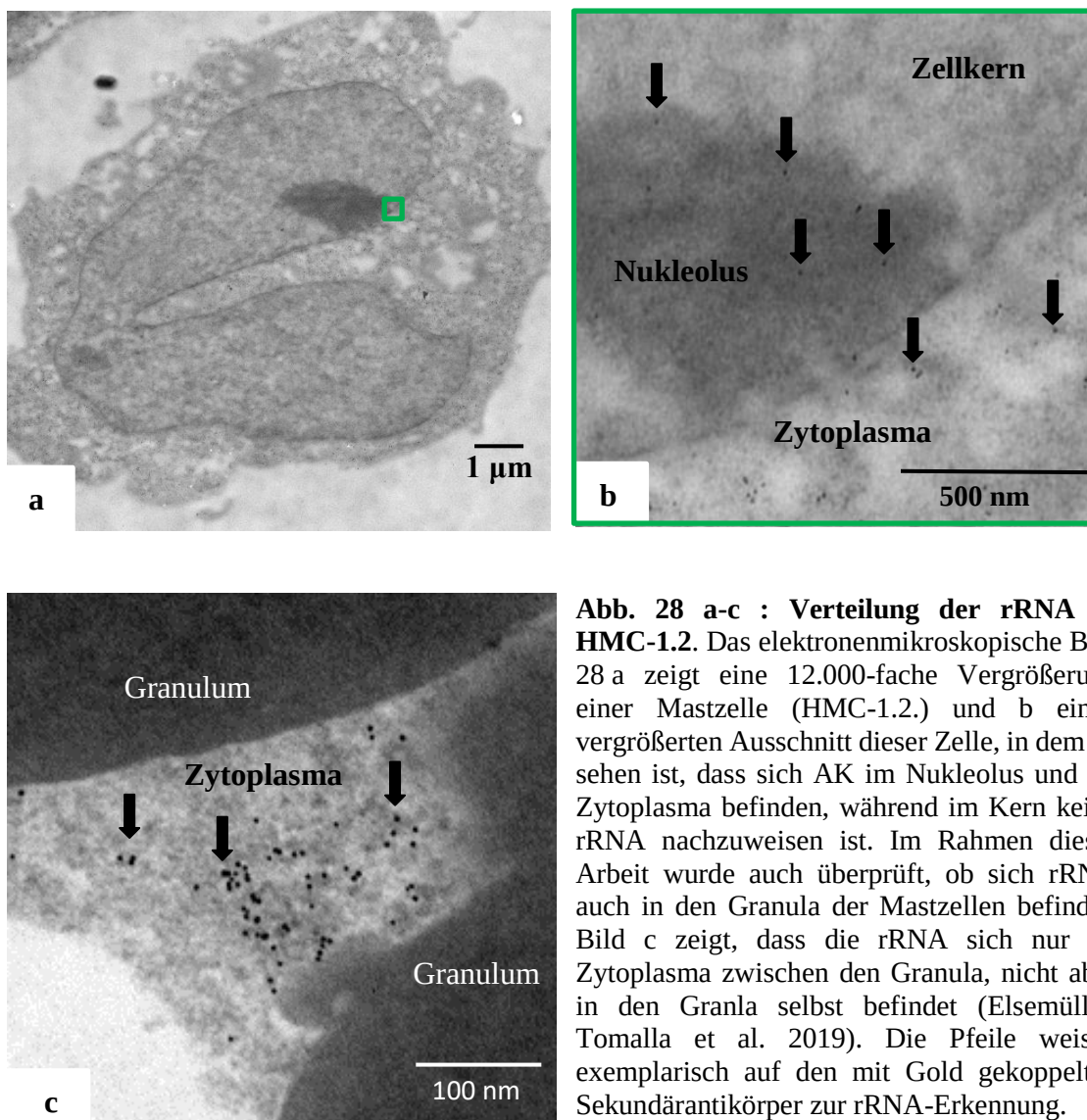


Abb. 28 a-c : Verteilung der rRNA in HMC-1.2. Das elektronenmikroskopische Bild 28 a zeigt eine 12.000-fache Vergrößerung einer Mastzelle (HMC-1.2.) und b einen vergrößerten Ausschnitt dieser Zelle, in dem zu sehen ist, dass sich AK im Nukleolus und im Zytoplasma befinden, während im Kern keine rRNA nachzuweisen ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch überprüft, ob sich rRNA auch in den Granula der Mastzellen befindet. Bild c zeigt, dass die rRNA sich nur im Zytoplasma zwischen den Granula, nicht aber in den Granula selbst befindet (Else Müller, Tomalla et al. 2019). Die Pfeile weisen exemplarisch auf den mit Gold gekoppelten Sekundärantikörper zur rRNA-Erkennung.

Ergebnisse

Die EM-Bilder von MV (Abb. 29 a-c) lieferten den Hinweis, dass sich MV-assoziierte rRNA intravesikulär befindet. Neben MV konnten gelegentlich auch Exosomen gefunden werden (Abb. 29 c-d). Hier konnte membranassoziierte rRNA (Abb. 29 d) detektiert werden. Es bleibt offen, ob es sich um Exosomen-assoziierte rRNA oder Vesikel-unabhängige freie Ribosomen/Polysomen handelt.

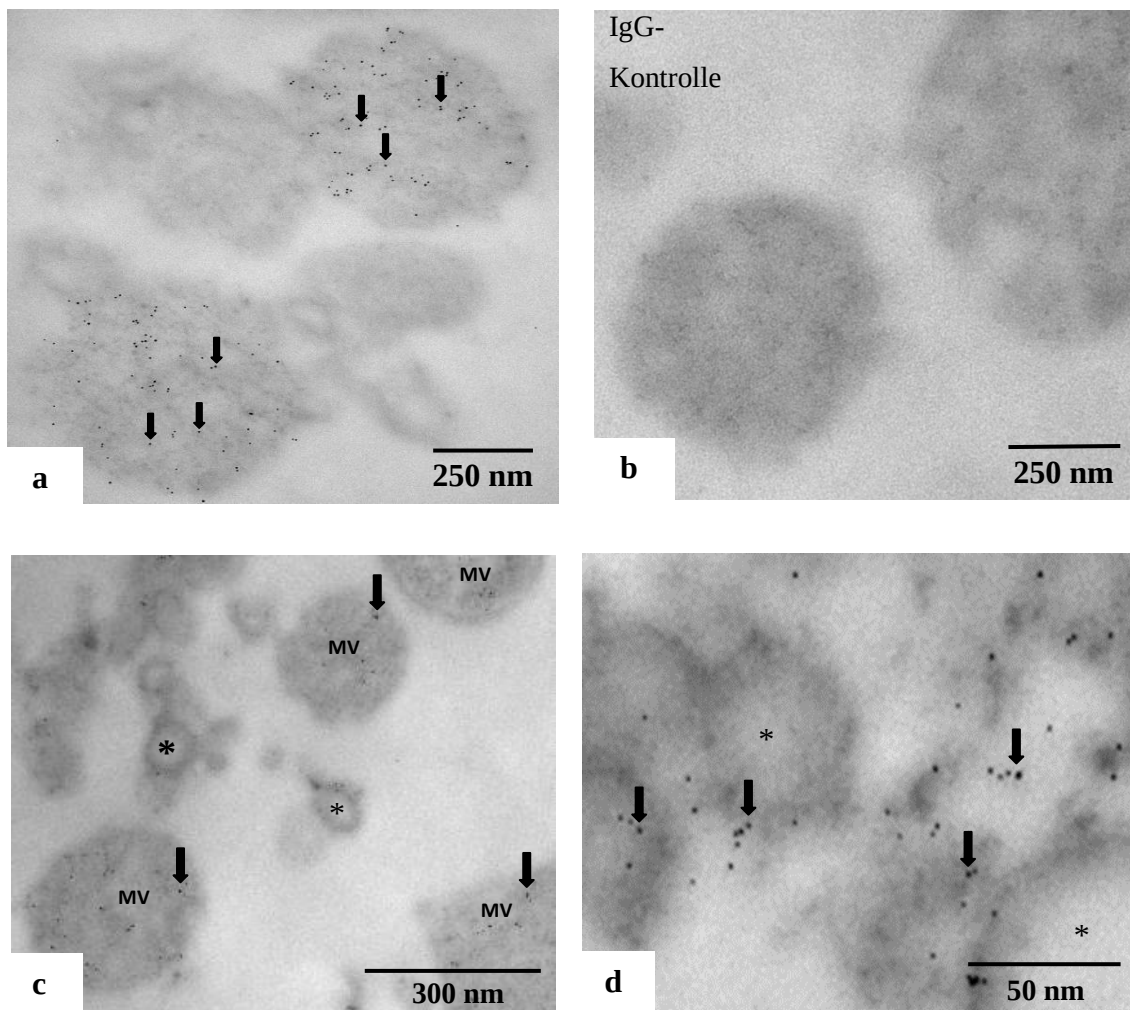


Abb. 29 a-d: Nachweis von rRNA innerhalb von MV mittels EM. Die Bilder sind elektronenmikroskopische Aufnahmen der rRNA-Färbung von MV aus Hypoxie-stimulierten Mastzellen. Bild **a** zeigt MV, die im Inneren rRNA enthalten. Die Pfeile markieren dabei beispielhaft den an den rRNA-AK gebundenen mit Gold gekoppelten Sekundärantikörper. Bild **b** repräsentiert die IgG-Kontrolle und bestätigt, dass der Sekundärantikörper keine unspezifische Bindung eingeht. Bild **c** zeigt einen Ausschnitt, in dem neben MV auch Exosomen (*) zu sehen sind. Auf Bild **d** sind Exosomen vergrößert dargestellt. Hierbei ist zu sehen, dass sich rRNA in der Nähe von Exosomen befindet.

3.3.2 Mikrovesikel-assoziiertes Histamin in Mastzellen und ihren MV

Histamin ist als Mediator der Mastzellen präformiert in ihren Granula zu finden. Es sollte untersucht werden, ob MV aus Hypoxie-stimulierten Mastzellen auch Histamin enthalten. Zunächst wurde der Histamin-AK zur immunhistochemischen Färbung ganzer Mastzellen verwendet (30 a + b). Als nächstes wurden MV aus Hypoxie-stimulierten Mastzellen gefärbt (30 c+d). Hierbei zeigte sich, dass manche MV Histamin enthielten, während andere Vesikel sich Histamin-leer präsentierten.

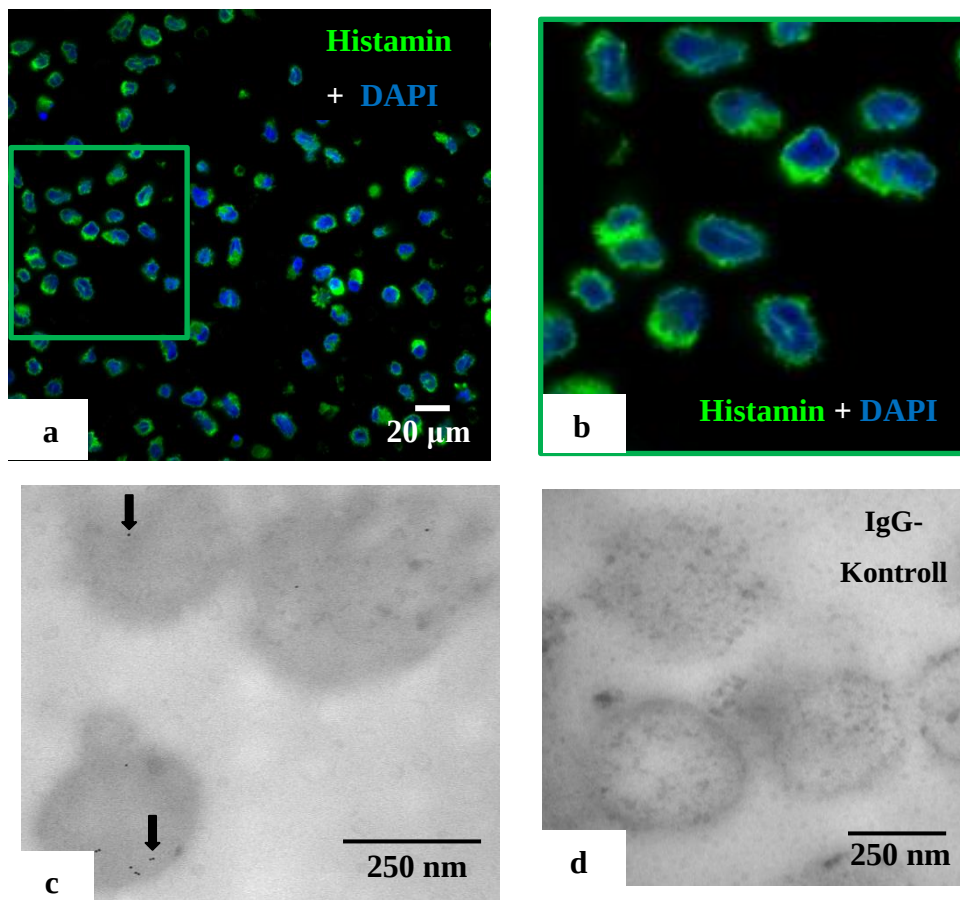


Abb. 30 a-d: Nachweis von Histamin in HMC-1.2. und ihren MV mittels Fluoreszenz-Mikroskopie und EM. Bilder a + b wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Während Bild a eine 40-fache Vergrößerung der Mastzellen zeigt, stellt Bild b einen vergrößerten Ausschnitt aus a dar. Die MV (c+d) wurden aus dem Überstand Hypoxie-stimulierter Mastzellen gewonnen. Bild c zeigt MV, die Histamin enthalten (Gold-markierter AK durch Pfeile markiert). Hierbei ist zu erwähnen, dass nur ca. jeder vierte Vesikel Histamin enthält. Bild d zeigt die IgG-Kontrolle. Es haben keine Gold-AK gebunden. Demnach kommt es bei der Färbung der MV mit dem verwendeten Antikörper nicht zur unspezifischen Bindung der Immunglobuline.

3.4 Hydrolyse der intravesikulären rRNA ohne Lyse der Mikrovesikel

3.4.1 Veränderung der Mikrovesikel-Anzahl durch Proteinase, DNase, RNase, Triton

Zur Bestätigung der durch die elektronenmikroskopischen Bilder gewonnen Erkenntnisse, dass sich die rRNA intravesikulär befindet, wurde ein weiterer Versuch angeschlossen. Inkubierte man Mikrovesikel mit RNase, dürfte die von einer Doppellipidschicht umhüllte RNA nicht enzymatisch abgebaut werden. Erst durch Zugabe von Triton X-100, einem nichtionischen Tensid, könnte die RNase ins Innere des MV eindringen und RNA abbauen. Es stellte sich jedoch zunächst die Frage, ob Enzyme wie RNase, DNase und Proteinase K sowie auch Triton X-100 MV lysieren. Um dies zu überprüfen, wurden MV mit den entsprechenden Substanzen eine Stunde lang bei 37° C inkubiert. Danach wurde eine quantitative FACS-Analyse durchgeführt. Es zeigte sich, dass weder die verwendeten Enzyme noch die Inkubation der MV mit 0,01% Triton zur signifikanten Reduktion der MV-Anzahl führte.

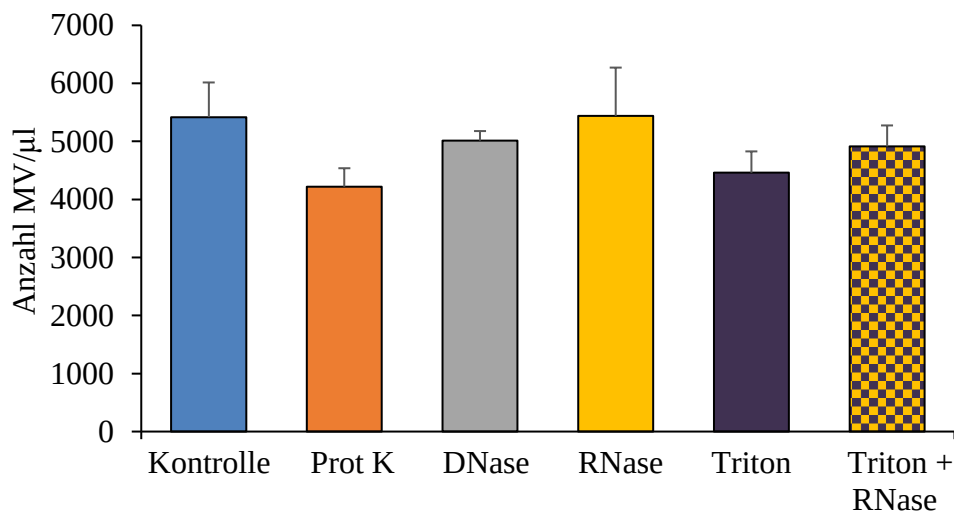


Abb. 31: Veränderung der MV-Anzahl durch diverse Substanzen. Der Graph zeigt die Anzahl der MV nach einstündiger Inkubation mit Proteinase K (4 µg/ml), DNase (1 µg/ml), RNase (1 µg/ml), 0,01 % Triton X-100 und 0,01 % Triton X-100 + RNase (1 µg/ml). Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied der MV-Anzahl. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung. *Signifikant gegen Kontrolle. *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; n = 3.

Ergebnisse

3.4.2 Veränderung der RNA-Menge durch Proteinase, DNase, RNase und Triton

Nachdem gezeigt werden konnte, dass sich die MV-Anzahl durch Zugabe von Proteinase, DNase, RNase und 0,01% Triton nicht verändert, wurde eine RNA-Quantifizierung durchgeführt. Hierbei zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Proben. Lediglich die Kombination aus 0,01% Triton X-100 und RNase konnte die MV-assoziierte RNA quantitativ vermindern.

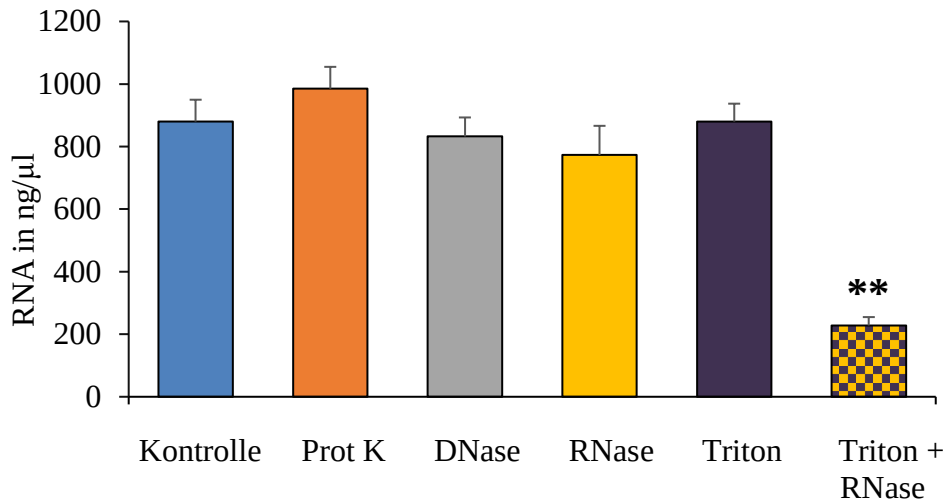


Abb. 32: Quantifizierung der eRNA nach Zugabe diverser Substanzen. Die Abbildung zeigt die Menge MV-assoziiierter RNA in ng/μl nach einstündiger Inkubation mit 0,01 % Triton X-100, 0,01 % Triton X-100 + RNase, RNase, DNase und Proteinase K. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied der RNA-Konzentration nach Inkubation mit Triton X-100 und RNase im Vergleich zur Kontrolle. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung. *Signifikant gegen Kontrolle. *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; n = 3.

3.4.3 Elektronenmikroskopische Kontrolle der Hydrolyse der eRNA durch Triton und RNase

Die Ergebnisse aus 3.4.1 und 3.4.2 gaben einen starken Hinweis darauf, dass sich MV-assoziierte RNA hauptsächlich intravesikulär befand und nur durch RNase degradiert werden konnte, wenn Triton X-100 als Detergens den Weg ins Innere der MV ermöglicht. Dies konnte elektronenmikroskopisch bestätigt werden. Wurden die MV lediglich mit 0,01% Triton oder RNase inkubiert, konnte weiterhin rRNA nachgewiesen werden. Erst die Inkubation mit Triton und RNase führte zur Hydrolyse der rRNA.

Ergebnisse

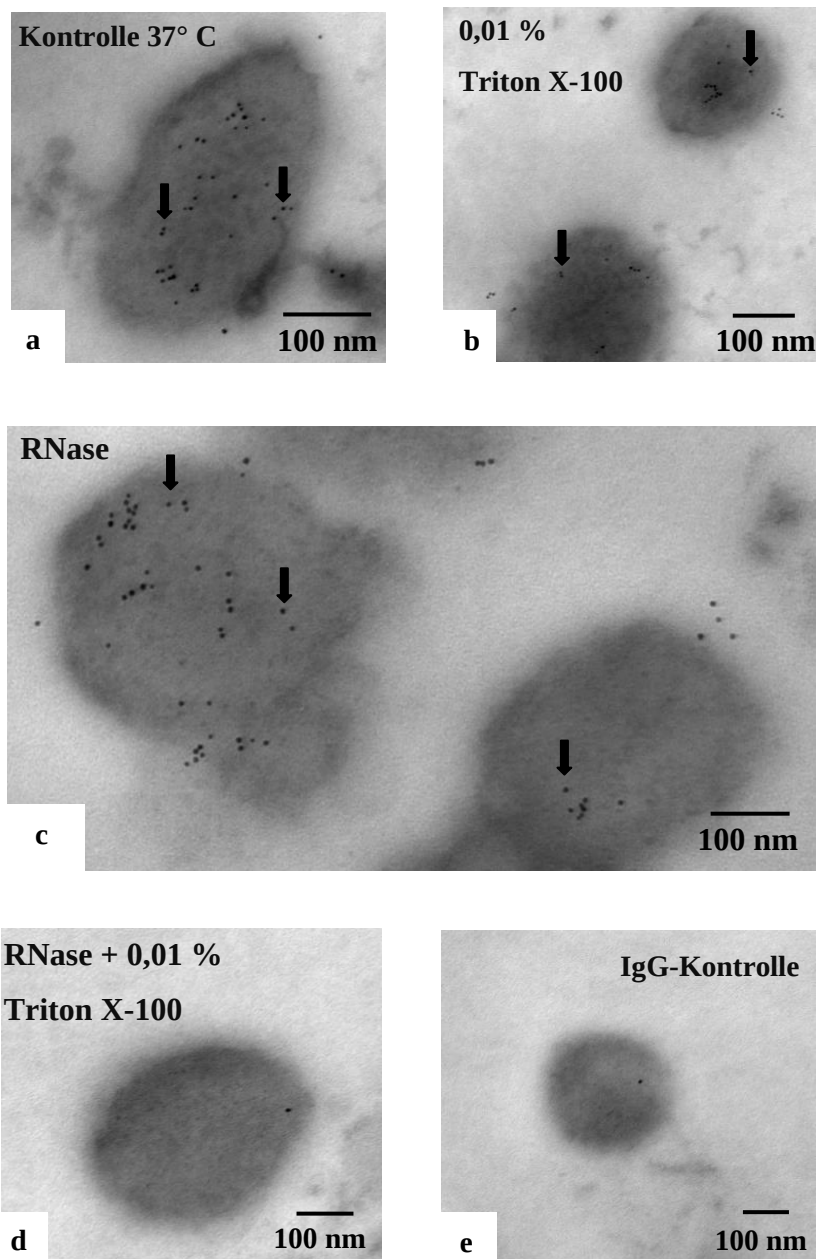


Abb. 33 a-e Nachweis des erfolgreichen enzymatischen Abbaus der MV-assoziierten eRNA mittels RNase und Triton. Die EM-Bilder zeigen die MV nach Stimulation mit Triton X-100, RNase, Triton X-100 + RNase. Alle Schnitte wurden mit einem rRNA-AK und anschließend mit einem Gold-markierten Zweitantikörper (die schwarzen Pfeile zeigen beispielhaft auf ein 6 nm Goldpartikel) inkubiert. Bilder **a-c** zeigen eine deutliche Goldanhäufung. Wurden die MV jedoch vor der Färbung mit RNase + Triton X-100 (Bild **d**) vorbehandelt, ließ sich kaum noch RNA nachweisen. Bild **e** zeigt die IgG-Kontrolle.

3.5 Analyse Mikrovesikel-assoziiierter Proteine

3.5.1 Proteinnachweis rRNA-assoziiierter Proteine mittels Western Blot

Da gezeigt werden konnte, dass sich innerhalb der membranumgrenzten Vesikel rRNA befand, bestand die Möglichkeit, dass sich auch RNasen und RNase-Inhibitoren in den Mikrovesikeln befinden. Zum einen wurde die RNase 5 (auch Angiogenin genannt), zum anderen der RNase-Inhibitor (RI) untersucht. Dafür wurden Western Blots mit Angiogenin und RI aus Zelllysaten, MV und MV-freien Überständen nach 3h Normoxie und 3h Hypoxie durchgeführt und miteinander verglichen. Um sicherzustellen, dass die gleichen Proteinmengen aufgetragen wurden, wurde eine Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung der Membran angefertigt.

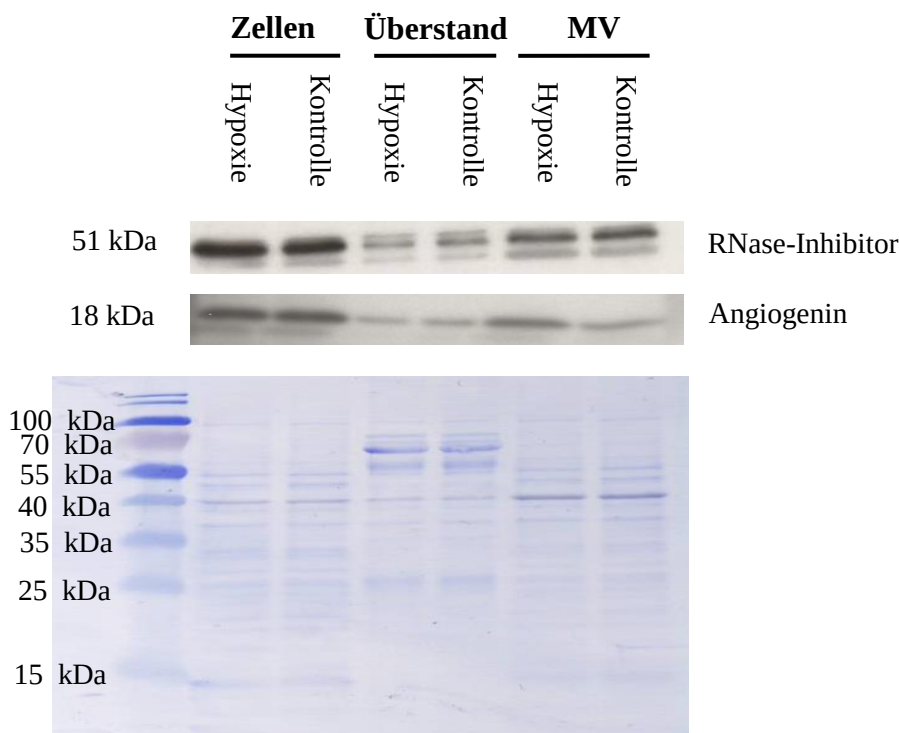


Abb. 34: Nachweis eines erhöhten Angiogeningehalts in MV aus Hypoxie-stimulierten Mastzellen mittels Western Blot Analyse. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot der Zelllysate, des MV-freien Überstands und MV von HMC-1.2. für den RNase Inhibitor und Angiogenin nach 3 h Normoxie im Vergleich zur Hypoxie. Es wurden überall 15 µg Protein aufgetragen. Des Weiteren ist die Färbung des Blots mit Coomassie-Brilliant-Blau zu sehen. Der blaue Säure-Farbstoff dient der quantitativen unspezifischen Darstellung von Proteinen. Da alle Banden des Blots gleichmäßig blau gefärbt sind, kann davon ausgegangen werden, dass überall die gleiche Proteinmenge aufgetragen wurde.

Ergebnisse

In den Zelllysaten zeigte sich sowohl beim RI als auch bei Angiogenin keine Veränderung der relativen Proteinmenge nach 3h Hypoxie im Vergleich zur normoxen Kontrolle (Abb. 35 a+b). In den MV ließen sich jedoch signifikante Unterschiede zwischen Hypoxie und Normoxie nachweisen. So ist der relative Angiogeningehalt fast doppelt so hoch wie in der normoxischen Kontrolle. Auch in MV wurde die Menge an RI nicht beeinflusst. In den Überständen zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei den MV. Der Gehalt an RI blieb unbeeinflusst, während ein - wenn auch nicht signifikanter- Anstieg Angiogenins zu verzeichnen ist.

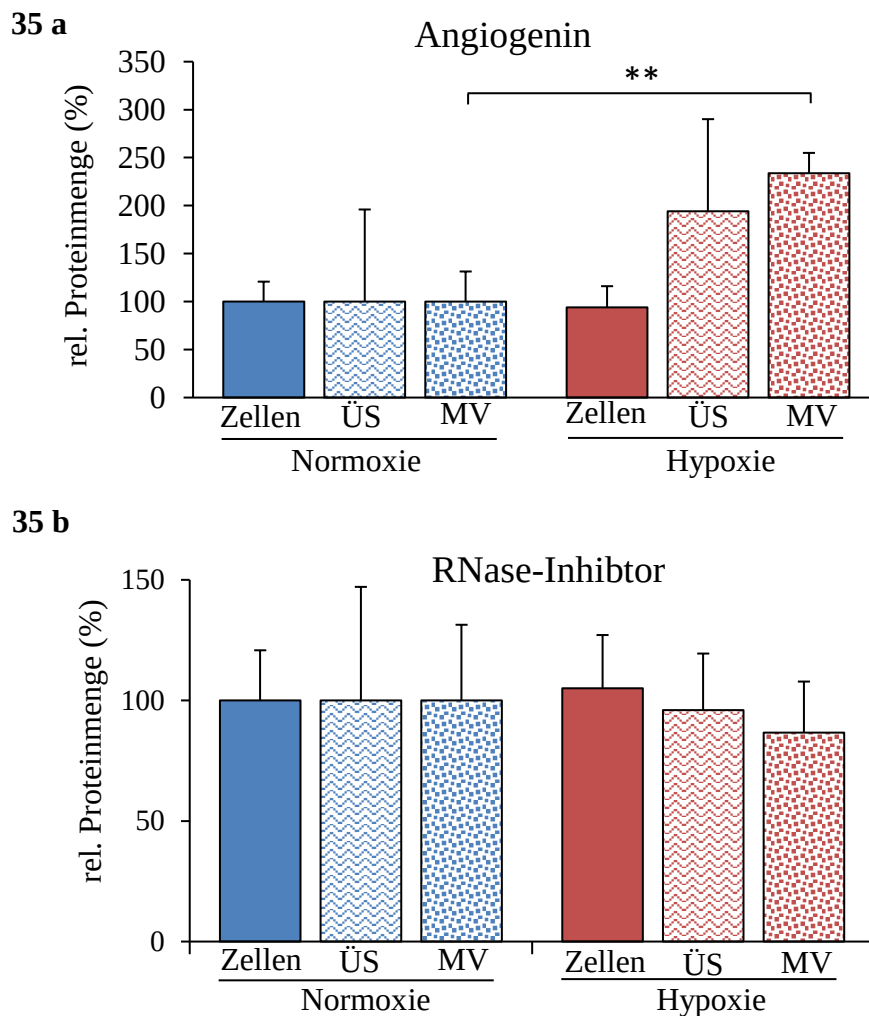


Abb. 35 a+b: Western Blot-Analyse: Erhöhter relativer Angiogeningehalt in MV aus Mastzellen nach Hypoxie-Stimulation. Abb. 35 a zeigt den relativen Proteingehalt in % aus Zelllysaten, zell- und MV-freien Überstand und MV der HMC-1.2.-Zellen nach 3 h Hypoxie verglichen mit der normoxischen Kontrolle für den RNase-Inhibitor. Es lässt sich kein signifikanter Unterschied nachweisen. **Abb. 35 b** zeigt den relativen Proteingehalt in % für Angiogenin. MV = Mikrovessikel, ÜS = Überstand. Die Daten sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung. *P < 0,05; n = 3.

3.6 Stimulation von Makrophagen mit gefärbten Mikrovesikeln

3.6.1 Färbung der Mastzellen und der Mikrovesikel mit CM-DiI

Um die Interaktion zwischen MV und anderen Zellen zu untersuchen sollten MV mit Fluorochromen gefärbt werden. Hierfür wurde ein Farbstoff (CM-DiI) gewählt, der sich in Doppellipidschichten einlagert und somit Membranen markiert. Zunächst sollte die Qualität des Farbstoffes CM-DiI überprüft werden, indem die Membran von Mastzellen gefärbt wurde (Abb. 36 a). Es zeigte sich eine Einlagerung des Farbstoffs in alle Doppellipidschichten der Zelle. Im nächsten Schritt wurden isolierte MV mit CM-DiI gefärbt. Da MV Membran-umgrenzt sind, konnte die Methode der Membranfärbung von Zellen auf die Färbung von MV übertragen werden (Abb. 37).

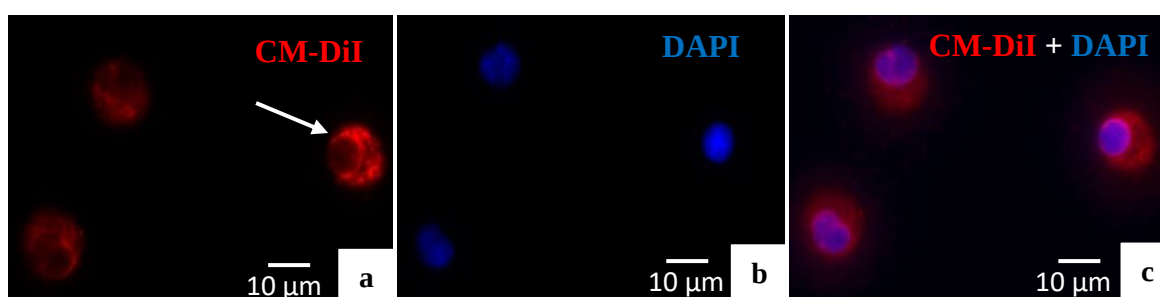


Abb. 36 a-c: Kern- und Membranfärbung der HMC-1.2.-Zellen mit CM-DiI. Bild a zeigt eine Färbung der Membran der Mastzellen mit dem Farbstoff CM-DiI (rot), Bild b die Kernfärbung der HMC-1.2. mit DAPI (blau) und Bild c das Overlay der beiden Bilder. Der weiße Pfeil weist auf die doppelschichtige Lipidmembran des Zellkerns, die durch eine Anreicherung des Farbstoffs sichtbar wird. Die Bilder zeigen, dass sich CM-DiI in Phospholipidmembranen einlagert.

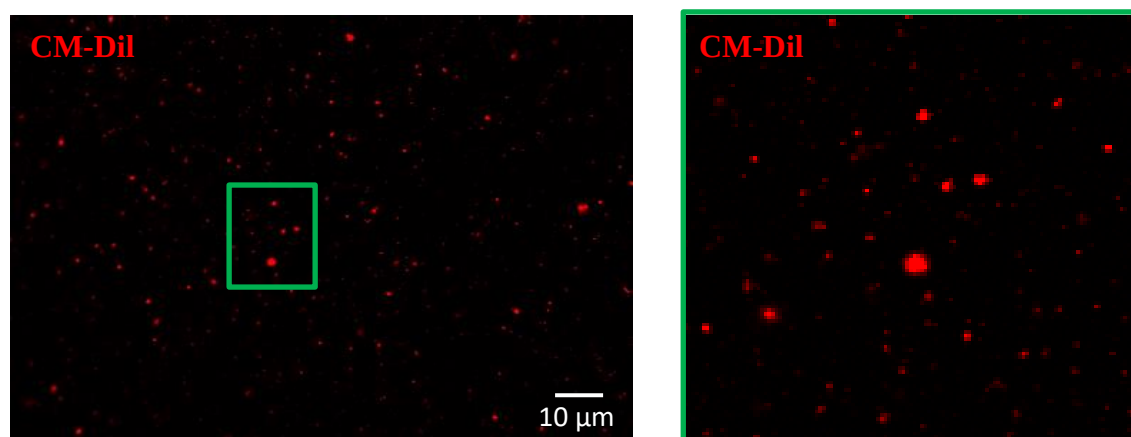


Abb. 37 a+b: Färbung der Membran von MV mit CM-DiI. Die Bilder zeigen die erfolgreiche Färbung der MV aus Hypoxie-stimulierten HMC-1.2.-Zellen mit dem lipophilen Farbstoff CM-DiI. Während Bild a eine Aufnahme mit dem konfokalen Mikroskop (63-fache Vergrößerung) ist, zeigt Bild b einen vergrößerten Ausschnitt dieser Aufnahme.

3.6.2 Wechselwirkung zwischen Mikrovesikeln und Makrophagen

Zunächst sollte die Interaktion zwischen MV und Makrophagen untersucht werden. Hierfür wurden Makrophagen 2, 8 und 24 h mit CM-Dil-gefärbten MV inkubiert. Es zeigt sich, dass die MV von den Makrophagen aufgenommen werden (Abb. 38). Bereits nach zwei Stunden ist unter dem Fluoreszenzmikroskop eine deutlich Aufnahme zu erkennen, die auch nach 8 oder 24 Stunden kaum gesteigert wurde. Wird die zweistündige Inkubation der Makrophagen mit MV auf Eis durchgeführt, wurden keine MV aufgenommen. Dies spricht für eine aktive Aufnahme der MV durch Makrophagen.

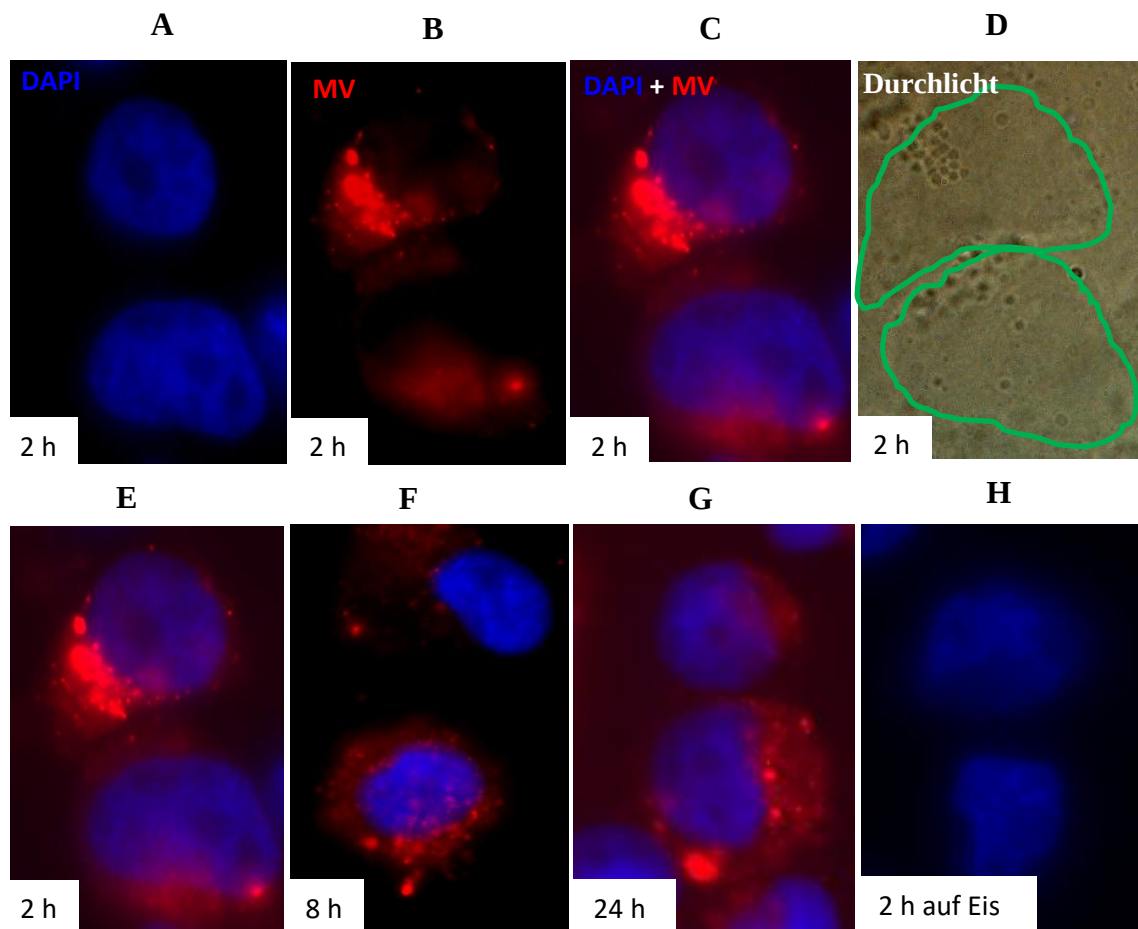


Abb. 38: Immunhistochemische Färbung: Aufnahme gefärbter MV aus Hypoxie-stimulierten Mastzellen durch Makrophagen. MV wurden aus dem Überstand Hypoxie-stimulierter Mastzellen gewonnen, mit CM-Dil (rot) gefärbt und anschließend zu ausgereiften Makrophagen gegeben. Nach einer definierten Zeit wurde der Überstand entnommen, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 4%iger PFA-Lösung fixiert. Der Kern der Makrophagen wurde mittels DAPI-Färbung (blau) sichtbar gemacht. Bilder A-D zeigen die Aufnahme der MV nach 2 Stunden. Bild D ist eine Aufnahme der Makrophagen im Durchlicht. Die grüne Umrandung markiert die Zellmembran. Bilder E-H zeigen die Aufnahmen der MV im zeitlichen Verlauf nach 2 h, 8 h und 24 h sowie die Aufnahme auf Eis. Bereits nach 2 h ist die MV-Aufnahme deutlich zu sehen, während auf Eis keine Aufnahme stattfand.

4 Diskussion

4.1 Stimulierte Mastzellen setzen Mikrovesikel frei

Die Untersuchungen im Rahmen dieser Dissertation konzentrierten sich auf größere Vesikel (MV) und konnten zeigen, dass insbesondere Hypoxie, Ionomycin und die Komplementfaktoren C3a und C5a die Bildung von MV durch Mastzellen anregen. Als besonders potente Stimuli erwiesen sich hierbei Hypoxie und Ionomycin, die eine relative Erhöhung der MV-Anzahl um den Faktor 2,5-3 im Vergleich zur Kontrolle herbeiführen. Die bisherige Forschung fokussierte sich nur auf die Untersuchung von Exosomen aus Mastzellen (Sokos et al. 2001/ Ekström et al. 2012/ Lotvall et al. 2007).

Bei den verwendeten Stimuli dieser Arbeit handelt es sich um bekannte Agonisten der Degranulation der Mastzelle (Dawn et al. 2003/ Puri et al. 2003/ Nilsson et al. 1996). Daraus lässt sich schließen, dass die Degranulation und die MV-Bildung parallel ablaufende Prozesse sind. Damit stellt die Bildung von MV eine weitere interzelluläre Kommunikationsmöglichkeit der Mastzelle dar. Während Moleküle, die durch Degranulation abgegeben werden, frei vorliegen und eine kurze Halbwertszeit aufweisen, können Botenstoffe, die in MV verpackt und vor Proteasen und Nukleasen geschützt sind, über verschiedene Wege andere Zellen erreichen (Lawerence et al. 1990/ Mause et al. 2010). Anders als bei löslichen Agonisten, wie z.B. Histamin, die ihre Wirkung über extrazelluläre membranständige Rezeptoren entfalten, gibt es für MV mehrere Möglichkeiten der interzellulären Interaktion. Zum einen können MV endozytiert werden, sodass der komplette Vesikelinhalt in die Zielzelle übertragen wird (Faille et al. 2011), zum anderen können sie mit der Membran der Zielzelle fusionieren und die Plasmamembran ergänzen (Mause et al. 2010). Einen weiteren Kommunikationsmechanismus stellt das *outside-in-signaling* dar, bei dem an die MV-Membran gebundene Liganden an Rezeptoren der Zielzelle binden (MacKenzie et al. 2001). Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass MV nach einer gewissen Zeit ihre Membranintegrität verlieren und ihr Inhalt zu einem späteren Zeitpunkt an einem von der Mutterzelle weiter entfernten Ort frei wird und ebenfalls eine Interaktion mit membranständigen Rezeptoren von Zielzellen eingeht.

4.2 Kalzium-Abhängigkeit der Mikrovesikel-Bildung

4.2.1 Mikrovesikel-Bildung und Mastzell-Degranulation als Kalzium-abhängige Prozesse

Ein Versuch dieser Arbeit konnte zeigen, dass das Kalziumionophor Ionomycin auch in humanen Mastzellen durch den Influx extrazellulären Kalziums in die Zelle die MV-Bildung initiieren kann. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass auch typische Degranulationshemmer die MV-Bildung inhibieren. Wortmannin greift als PI3K/AKT-Inhibitor und BAPTA als Ca^{2+} -Chelator in den Ca^{2+} -Haushalt der Zelle ein. Cromolyn ist als Membranstabilisator bekannt (Abliz et al. 2015/ Bernstein 1985). Damit geben diese Ergebnisse einen weiteren Hinweis auf die mechanistischen Überschneidungen der Degranulation und der MV-Abschnürung. Somit stellen die Degranulation als auch die MV-Bildung Kalzium-abhängige Prozesse dar.

Der Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration ist für die Degranulation der Mastzelle essentiell. Dabei sind sowohl das endoplasmatische Retikulum als auch extrazelluläres Kalzium als Quelle notwendig (Beaven et al. 1984/ Hong-Tao et al. 2010). Die Signaltransduktion startet mit der Aktivierung der Phospholipase C, was zur enzymatischen Bildung von Inositol-1,4,5-trisphosphat und letztendlich zur Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern führt. Die erhöhte Kalziumkonzentration sorgt nicht nur für die Freisetzung der Granula mithilfe des *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor-attachment* Proteins und Rezeptors (SNAP und SNARE), sondern führt durch die Aktivierung der Floppase und der Scramblase bei gleichzeitiger Inhibition der Flippase auch zur Phospholipid-Asymmetrie der Zellmembran. Dies bewirkt eine Externalisierung von negativ geladenem Phosphatidylserin und stimuliert die Bildung von MV (Beyer et al. 2010).

4.2.2. Hypoxie als potenter Stimulus der MV-Bildung

Die Ergebnisse, die in Kapitel Nr. 3.2.2. dargestellt sind, beweisen, dass auch die MV-Bildung durch Hypoxie getriggert wird. Es stellt sich die Frage, warum gerade Hypoxie einen für diesen Vorgang potenten Stimulus darstellt. Dass Hypoxie die Degranulation der Mastzelle initiiert, ist schon länger bekannt (Dawn et al. 2003).

Diskussion

Der Pathomechanismus des intrazellulären Ca^{2+} -Anstiegs in Mastzellen könnte dem in ischämischen Herzmuskelzellen ähneln. Hier bedingt der Sauerstoffmangel eine verminderte Aktivität der Atmungskette und damit einen ATP-Mangel. Die Zelle reagiert darauf mit anaerober Glykolyse und es entsteht Laktat. Die anfallenden Protonen werden durch den Na^+ - H^+ -Austauscher (NHX) eliminiert. Zusätzlich schleust die Na^+ - K^+ -ATPase aufgrund des Energiemangels Na^+ nicht mehr adäquat aus der Zelle. Diese beiden Mechanismen führen zu einem intrazellulären Na^+ -Anstieg und einer Membrandepolarisation (Hausenloy und Yellon 2013).

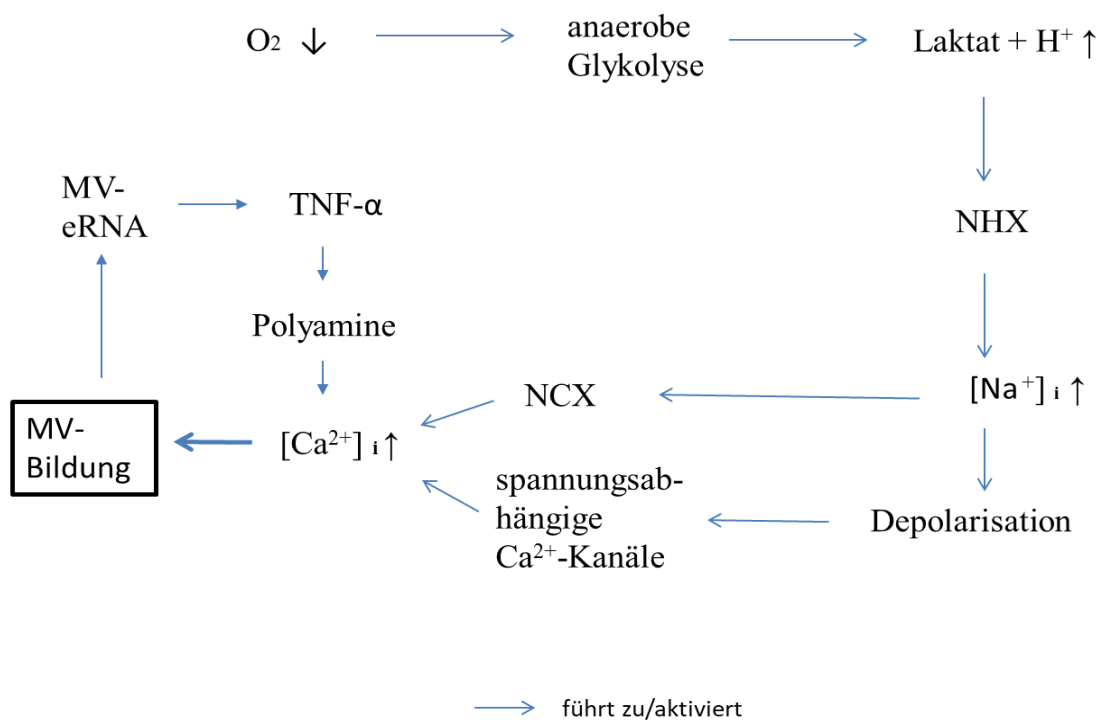


Abb. 39: Möglicher Mechanismus der MV-Bildung unter Hypoxie. Die Hypothese ist angelehnt an den Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} unter Ischämie. Die Initiierung der MV-Bildung könnte durch eine positive Feedbackschleife zu einem weiteren Ca^{2+} -Anstieg führen. Dabei spielt MV-assoziierte eRNA eine Rolle. Diese könnte durch Aktivierung von TACE zur Bildung von $\text{TNF-}\alpha$ führen, was über mehrere Schritte zur Aktivierung des Polyaminstoffwechsels und zum weiteren Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} führt.

Die Depolarisation aktiviert spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle und es kommt zum Ca^{2+} -Influx (Mozaffari et al. 2013). Außerdem führt eine hohe intrazelluläre Na^+ -Konzentration zur Umkehr des Na^+ - Ca^{2+} -Austauschers (NCX), sodass Na^+ aus- und Ca^{2+} einströmt (Khandoudi et al. 1990). Der Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} kann nun zur

Degranulation und MV-Bildung führen. Dabei wird MV-assoziierte eRNA frei und kann über Stimulation des Polyaminstoffwechsels im Rahmen eines positiven Feedbacks die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration weiter ansteigen lassen (Cabrera-Fuentes et al. 2014/ Schlüter et al. 2015). Diese könnte erneut die MV-Abschnürung fördern. Abb. 39 gibt einen Überblick über einen hypothetischen Mechanismus.

Ob dieser Mechanismus zutrifft und auf Mastzellen und die MV-Bildung übertragbar ist, müsste in weiterführenden Experimenten untersucht werden. Zunächst sollte mittels Polymerase-Kettenreaktion und Western Blot die Expression der verschiedenen Transporter und der am Mechanismus beteiligten Proteine analysiert werden. Auch eine immunhistochemische Färbung dieser Moleküle könnte einen Hinweis auf die Verteilung dieser Enzyme und Transporter in Mastzellen geben. Danach sollten die einzelnen Transporter und Enzyme selektiv gehemmt werden und die jeweilige Auswirkung auf die MV-Bildung untersucht werden.

4.3 Mikrovesikel-assoziierte eRNA

4.3.1 Mikrovesikel-assoziierte eRNA ist intravesikuläre ribosomale RNA

Diese Arbeit konzentriert sich auf ribosomale RNA in MV als eRNA stimulierter Mastzellen. Ein Ziel dieser Dissertation bestand in der Analyse dieser MV-eRNA. So konnte gezeigt werden, dass eine positive Korrelation zwischen der Anzahl von MV und der freigesetzten Menge an eRNA bestand. Demnach bewirkten jene Stimuli, die generell die Bildung von MV fördern, eine besonders hohe eRNA-Freisetzung. Bei den hier getesteten Stimuli waren Hypoxie und Ionomycin am wirksamsten.

Die meisten Forschungsergebnisse zur Untersuchung von Nukleinsäuren in EV aus Mastzellen fokussierten sich auf mRNA und miRNA. Sie sind u.a. beteiligt am Reifungsprozess dendritischer Zellen und an der Aktivierung von B- und T-Lymphozyten (Vukman et al. 2017/ Benito-Martin et al. 2015/ Sokos et al. 2001/ Ekström et al. 2012). Eine Kapillar-Elektrophorese und eine Untersuchung von eRNA-assoziierten Proteinen mittels Proteomanalyse konnten zeigen, dass es sich bei eRNA um ribosomale RNA handelt und dass MV ribosomale Proteine, u.a. L11, enthalten (Elsemüller und Tomalla et al. 2019). Eine Bestätigung dieser Ergebnisse ließ sich durch Immunfluoreszenzfärbungen der MV mit spezifischen Antikörpern gegen rRNA und L11 erreichen. Es

Diskussion

zeigte sich eine Co-Lokalisation beider Antikörper. Offen blieb jedoch weiterhin, ob die eRNA den MV außen angelagert ist oder sich intravesikulär befindet. Um dieser Frage nachzugehen, wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen immunhistochemisch gefärbter MV durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich MV-eRNA innerhalb der Vesikel befindet. Dies lässt sich mit der Tatsache, dass es sich bei MV um Membranabschnürungen mit Zytoplasmaeinschlüssen handelt, vereinen (Mause et al. 2010). Dieses Ergebnis macht folgende Interaktionen von MV-eRNA mit anderen Zellen möglich:

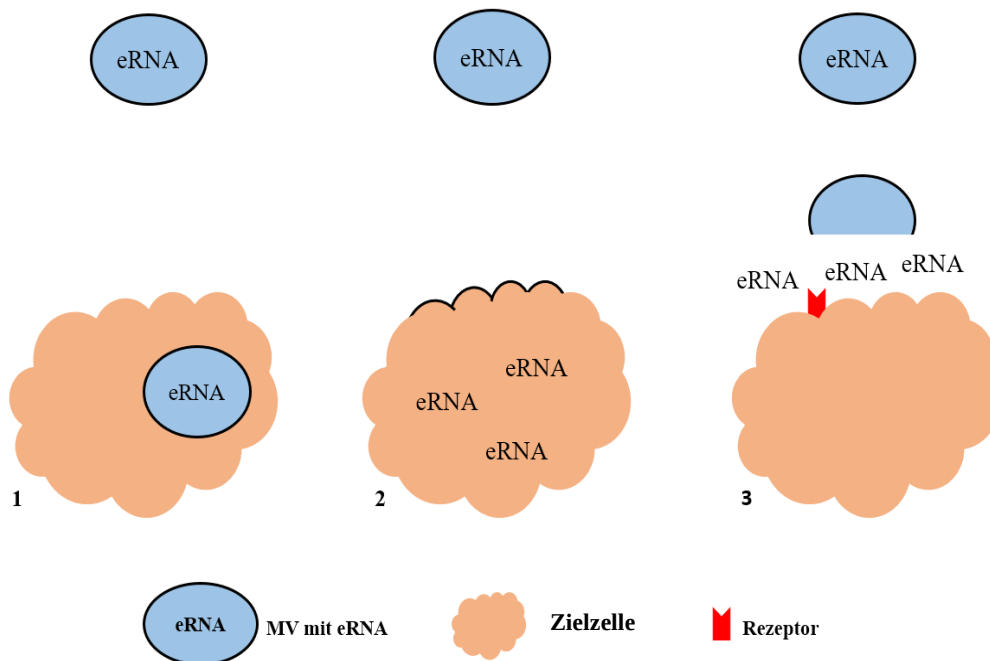


Abb. 40: Interaktion zwischen MV-eRNA aus stimulierten Mastzellen und anderen Zellen.

1. Endozytose: Ganze MV werden von Zellen aufgenommen (Faille et al. 2011). MV-eRNA befindet sich nun intrazellulär. Dies könnte die Kapazität der Translation in dieser Zelle steigern. MV können auch Messenger-RNA (mRNA) enthalten (McVey et al. 2011). Mithilfe von rRNA könnte in MV enthaltene mRNA in Proteine translatiert und in andere Zellen übertragen werden. Damit könnten MV Veränderungen des Proteoms herbeiführen. **2. Fusion:** Die Membran der MV fusioniert mit der Plasmamembran einer Zelle. Der Inhalt der MV wird in die neue Zelle abgegeben (Mause et al. 2010). **3. Lyse:** MV können ihre Membranstabilität verlieren und ihr Inhalt würde frei. eRNA kann nun über extrazelluläre Rezeptoren, wie z.B. TACE, wirken (Cabrera-Fuentes et al. 2014).

Obwohl die angewandte Methode der MV-Isolation eine Trennung von Exosomen herbeiführen soll, besteht die Möglichkeit, dass auch Verbände aus Exosomen isoliert werden. Bei einigen elektronenmikroskopischen Untersuchungen ist es gelungen, Exosomen darzustellen. Exosomen sind bekannt dafür, dass sie nicht-kodierende RNA,

v.a. miRNA, enthalten (Guduric-Fuchs et al. 2012). In den elektronenmikroskopischen Bildern dieser Arbeit sind Exosomen zu sehen, die an ihre Außenseite rRNA tragen. Hierbei könnte es sich sogar um Polyribosomen handeln. Exosomen-assoziierte eRNA ist - anders als MV-eRNA- nicht von einer Membran umgeben und könnte daher andere Eigenschaften haben. Unverpackte Exosomen-assoziierte eRNA bzw. freie Ribosomen könnte über extrazelluläre Rezeptoren, z.B. TACE, wirken (Cabrera-Fuentes et al. 2014).

4.3.2 Enzymatischer Abbau von MV-assoziiierter eRNA ohne Integritätsverlust der Mikrovesikel

Um die Wirkung von MV-assoziiierter eRNA bestimmen zu können, galt es, die in MV enthaltene eRNA degradieren zu können, ohne die Integrität der Vesikel zu zerstören, die zur Auflösung der Membran und zur Freisetzung des Vesikelinhalts führen würde. Mit einer Lyse der Vesikel-Membran ginge die ursprüngliche Funktion verloren. Die selektive Wirkung von MV-eRNA lässt sich nur dann nachweisen, wenn die Grundstruktur der MV nach der Behandlung weiterhin bestehen bleibt. Mithilfe von 0,01% Triton-X-100 und RNase A konnte dieses Ziel erreicht werden.

Triton-X-100 ist ein bekanntes nicht-ionisches Tensid, das der Extraktion von Membranproteinen und der Permeabilisierung von Membranen, z.B. für Transfektionen, dient (Gennuso et al. 2004/ Rajagopal et al. 2002/ Hipfner et al. 1994). Dass zu hohe Konzentrationen (> 0,025% Triton-X-100) zur Lyse der Vesikel führen würden, zeigte auch die Arbeitsgruppe um Osteikoetxea (Osteikoetxea et al. 2015). Daher musste eine Triton-Konzentration gefunden werden, bei der RNase ins Innere der MV eindringen kann, ohne eine Lyse der Vesikel herbeizuführen. Im Rahmen dieser Versuche konnte gezeigt werden, dass die Inkubation der Vesikel mit 0,01% Triton-X-100 die Anzahl der MV nicht verändert, die simultane Inkubation mit RNase A aber zu einer signifikanten Senkung des eRNA-Gehalts führt.

Da RNase die MV-Membran nach Behandlung mit 0,01% Triton-X-100 passieren kann, müssen auch andere Moleküle bis mindestens 13,7 kDA (entspricht der Größe von RNase A) ins Innere der MV gelangen können (Produktinformation RNase A, Thermo Scientific). Damit könnte sich diese Methode auf andere Untersuchungen des Inhalts von

MV übertragen lassen. Es könnten z.B. spezifische Inhibitoren verschiedener Proteine zu MV gegeben und damit die biologische Aktivität von MV genauer untersucht werden. Sollte dieser Versuchsaufbau auf MV anderer Zellen übertragen werden, sollte beachtet werden, dass kleinere Proteine MV nach der Behandlung mit Triton-X-100 verlassen könnten. Möchte man jedoch nur den Einfluss der MV-assoziierten rRNA untersuchen, sollten nach Behandlung der MV mit Triton-X-100 zunächst elektronenmikroskopische Untersuchungen auf den intravesikulären Verbleib kleiner Proteine unternommen werden. Sollten neben der rRNA auch andere Proteine die MV verlassen, könnte die Wirkung der MV-eRNA nicht isoliert untersucht werden.

4.4 Erhöhte Expression von Angiogenin in Mikrovesikeln unter Hypoxie

Untersuchungen über MV-assoziierte eRNA schließen die Analyse von RNasen und RNase-Inhibitor ein. Hierbei wurde Angiogenin - auch RNase 5 genannt - untersucht. Dabei handelt es sich um ein Protein, das in Mastzellen präformiert vorliegt (Kulka et al. 2009). Neben seiner namensgebenden angiogenen Wirkungen, wird Angiogenin durch Veränderung der rRNA-Transkription auch eine Rolle bei der Pathogenese der chronischen Herzinsuffizienz, Proliferation von Tumorzellen und Asthma bronchiale zugesprochen (Tsuji et al. 2005/ Patel et al. 2008/ Simcock et al. 2008/ Hoshino et al. 2001). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Angiogenin sich auch in den MV stimulierter Mastzellen befindet. Unter Hypoxie lässt sich mehr Angiogenin in MV nachweisen.

Dass unter hypoxischen Bedingungen mehr Angiogenin in MV zu finden ist, liegt vermutlich zum einen an der gesteigerten Expression von Angiogenin unter Hypoxie und zum anderen an der Bindung des Angiogenins an Aktin (Campo et al. 2005/ Hu et al. 1993). Dass MV Aktin enthalten und Aktin in einer höheren Dichte in Plasmamembrannähe vorliegt, erklärt wieso unter Hypoxie mehr Angiogenin in MV zu finden ist (Muralidharan-Chari et al. 2010/ Clark et al. 2013). Die Arbeitsgruppe um Chen hat ähnliche Versuche mit MV aus Hypoxie-stimulierten mesenchymalen Stammzellen durchgeführt. Auch hier zeigen die Ergebnisse, dass unter Hypoxie mehr Angiogenin in MV enthalten ist, während der Gehalt an Angiogenin in den Zellen nicht stieg. (Chen et al. 2014).

Diskussion

Welche Rolle Aktin beim Transport des Angiogenins in die MV hat, müsste in weiteren Versuchen untersucht werden. Abb. 41 stellt den Zusammenhang zwischen Hypoxie und Angiogenin in MV schematisch dar.

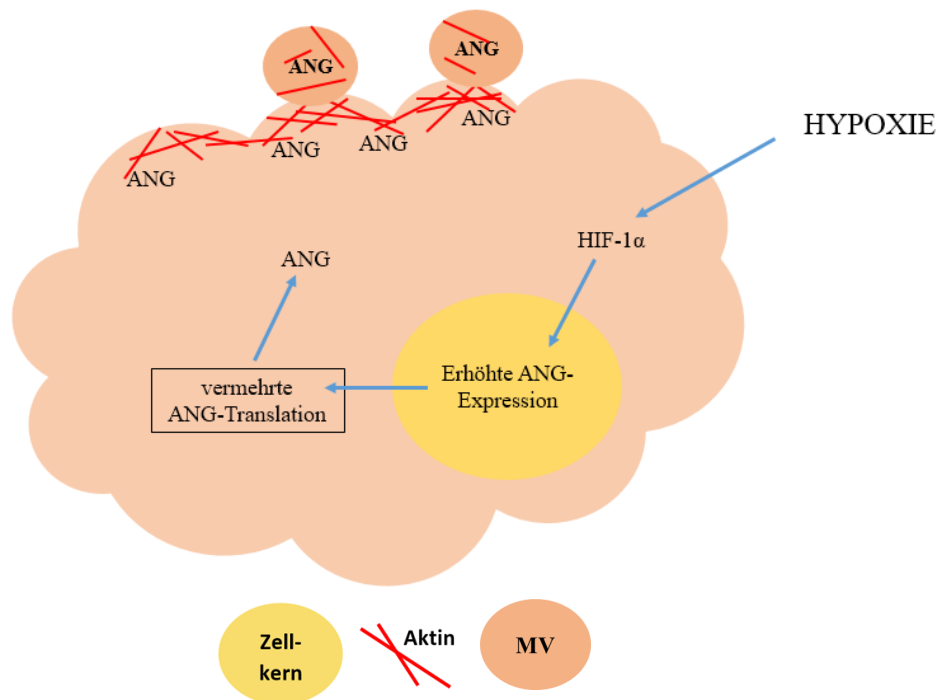


Abb. 41: Angiogenin (ANG) in MV aus Hypoxie-stimulierten Mastzellen. Unter Hypoxie entfällt die Sauerstoff-abhängige Hydroxylierung des Hypoxie-induzierbaren Faktors (HIF-1 α). HIF-1 α wird nun nicht mehr abgebaut und kann mit dem im Zellkern konsekutiv vorkommenden HIF-1 β dimerisieren. Als Transkriptionsfaktor aktiviert HIF-1 verschiedene Hypoxie-abhängige Gene, u.a. Angiogenin (Metzen et al. 2004/ Lai et al. 2016). ANG weist eine hohe Bindungsaffinität zu Aktin auf (Hu et al. 1993). Da Aktin ein Bestandteil der MV ist, wird bei der Abschnürung auch vermehrt ANG mitgenommen (Muralidharan-Chari et al. 2010).

MV können somit Angiogenin, das in hypoxischem Gewebe vermehrt über MV freigesetzt wird, an einen anderen Ort transportieren und damit peripher die Angiogenese anregen. Angiogenin spielt nicht nur bei der Pathogenese des Tumorwachstums eine Rolle, sondern z.B. auch bei Endometriose und rheumatoider Arthritis (Suzumori et al. 2004/ Hosaka et al. 1995). Sollte man als therapeutische Option die Inhibition von Angiogenin in Erwägung ziehen, könnte eine verminderte Wirkung auf die intravesikuläre Lage des Angiogenins zurückzuführen sein (Jorfi et al. 2013).

Des Weiteren wurde der RNase-Inhibitor (RI) in MV nachgewiesen. Er schützt die RNA vor ihrer Degradation durch RNasen. Das Gleichgewicht von RNase und RI ist für die Aktivität der RNasen bestimmend (Dickson et al. 2005).

Da die Menge von MV-RI unter Hypoxie nicht ansteigt, kann davon ausgegangen werden, dass MV aus Hypoxie-stimulierten Mastzellen die Angiogenese fördern und damit an der Pathogenese verschiedener Erkrankungen, wie z.B. der peripheren vasculären Verschlusskrankheit, beteiligt sind (Burgmann et al. 1996). Durch die die Vesikel umgebende Phospholipidschicht könnten intravesikulär lokalisierte RNasen vor extravesikulären RI geschützt sein (Lawerence et al. 1990/ Mause et al. 2010). Hierbei ist jedoch zu erwähnen, dass die ribonukleolytische Aktivität von Angiogenin gering ist und die eRNA durch den ebenfalls in den MV vorhandenen RNase-Inhibitors vor dem Abbau geschützt ist (Sheng und Xu 2016).

4.5. Mikrovesikel aus Mastzellen und ihre Interaktion mit anderen Zellen

4.5.1 Aufnahme der Mikrovesikel durch Makrophagen

Zur Untersuchung der Aufnahme von MV aus Mastzellen durch Makrophagen wurden mit dem lipophilen Farbstoff CM-DiI gefärbte MV zu Makrophagen gegeben. Hierbei zeigte sich, dass bereits nach zwei Stunden eine deutliche Aufnahme der MV erfolgte, sodass davon ausgegangen werden kann, dass es sich bei der Interaktion zwischen MV und Makrophagen um einen schnell ablaufenden Prozess handelt. Eine Inhibierung der MV-Aufnahme bei 4° C gibt einen Hinweis darauf, dass dieser Prozess metabolisch abläuft. Da es sich bei der Zielzelle um Makrophagen handelt, muss neben den üblichen Interaktionen zwischen MV und Zelle auch an die Phagozytose gedacht werden. Bei der Phagozytose handelt es sich um rezeptorvermittelte Endozytose von Bakterien, Zellfragmenten oder Fremdkörpern (Aderem et al. 1999/ Desjardins et al. 1994). Neben einer Opsonisierung durch Komplementfaktoren oder Immunglobuline ist auch Phosphatidylserin ein Signal zur Phagozytose (Hochreiter-Hufford et al. 2013). Da auch MV an ihrer Außenseite PS tragen, ist die Wahrscheinlichkeit der Phagozytose als eine Möglichkeit der Interaktion mit Makrophagen sehr groß (Beyer et al. 2010). Zu den Enzymen des Phagolysosoms gehören Proteasen, Oxidasen und Nukleasen. Diese können MV und ihren Inhalt degradieren und so ihre biologische Wirksamkeit herabsetzen (Lehrbuch Physiologie Thieme, 6. Auflage).

4.5.3. Mikrovesikel aus Hypoxie-stimulierten Mastzellen und ihre Wirkung auf Makrophagen

Makrophagen gehören zum mononukleären Phagozytensystem und stellen eine heterogene Zellgruppe dar, die je nach Stimulus und Umgebung sowohl Phänotyp als auch Funktion anpassen kann (Horwood 2015). Um pathomechanistische Prozesse zu erforschen, ist es wichtig, die verschiedenen Stimuli und ihre Auswirkungen auf Makrophagen, z.B. auf ihre Polarisierung, zu kennen.

Zurzeit werden Makrophagen in M1- (klassisch aktivierte) und M2- (alternativ aktivierte) Makrophagen unterteilt (= Polarisierung) (Hotamisligil 2006). Die klassische Aktivierung der Makrophagen erfolgt über Endotoxine (z.B. Lipopolysaccharide (LPS)) sowie Chemokine (z.B. Interferon γ) und führt zur Expression proinflammatorischer Gene. Die alternative Aktivierung wird vor allem durch IL-4 und IL-13 (Gordon et al. 2013) getriggert. Die Funktion der sogenannten M2-Makrophagen ist durch eine hohe Phagozytoseaktivität und Beteiligung an der Wundheilung gekennzeichnet. Der Phänotyp eines Makrophagen ist plastisch und eine Veränderung der Polarisierung ist Bestandteil des Pathomechanismus vieler Erkrankungen (z.B. chronisch entzündliche Darmerkrankungen oder Adipositas) (Dang et al. 2014/ Li et al. 2017).

Wechselwirkungen zwischen Mastzellen und Makrophagen sind ursächlich an kardiovaskulären Erkrankungen, Stoffwechselstörungen und Tumorprogression (Xu et al. 2012/ Ribatti 2013). Daher sollte die Expression verschiedener Gene nach der Stimulation der Makrophagen mit MV aus stimulierten Mastzellen erfolgen. Interessante proinflammatorische Gene wären hierbei $\text{TNF}\alpha$, IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18 und IL-23 (Martinez et al. 2006). Zu untersuchende antiinflammatorische Gene wären IL-10 und Arginase I (Pauleau et al. 2004).

4.5.4 Mikrovesikel und ihre Wirkung auf andere Zellen

Neben der Wirkung von MV und eRNA auf Makrophagen, hat unsere Arbeitsgruppe die Interaktion mit Endothelzellen untersucht. Hierbei zeigte sich anhand einer erhöhten Expression von IL-6 und MCP-1 eine proinflammatorische Wirkung der MV auf Endothelzellen, die vorrangig durch die in MV enthaltene eRNA induziert wird. Des Weiteren setzen MV-stimulierte Endothelzellen den prokoagulatorischen von-

Willebrand-Faktor (vWF) aus Weibel-Palade-Körperchen frei (Elsemlüller und Tomalla et al. 2019).

Neben Zellkulturen wurde in einem Ischämie-Reperfusionen-Modell isolierter Rattenherzen eine Interaktion der MV mit einem ganzen Organ untersucht. Die größtenteils in den MV enthaltenen eRNA trägt hier TNF- α -abhängig zum Reperfuison-Schaden bei. Der Schaden konnte durch Zugabe von RNase 1 begrenzt werden (Cabrera-Fuentes et al 2014). Diese Arbeiten zeigen, dass MV-eRNA an der Regulation immunologischer Vorgänge, die v.a. das kardiovaskuläre System betreffen, beteiligt ist. Zukünftige Forschungen sind nötig, um die genauen Wirkmechanismen von eRNA und in MV verpackter eRNA auf Endothelzellen und Kardiomyozyten zu klären.

4.6 Ausblick: Mikrovesikel aus Hypoxie-stimulierten Mastzellen und Tumorprogression

Da Mastzellen häufig in direkter Nähe von soliden Tumoren zu finden sind, kann von einer Modulation der Tumorbilogie entweder direkt durch Mastzellen oder durch Interaktionen der Mastzelle mit anderen Zellen ausgegangen werden (Marichal et al. 2013). Eine Akkumulierung von Mastzellen in Tumoren korreliert mit einer schlechten Prognose und einer erhöhten Metastasierungsrate bei Melanomen, Prostatakarzinomen, und Lymphomen (Ribatti et al. 2003/ Nonomura et al. 2007/ Strouch et al. 2010/ Glimelius 2005).

Eine Untersuchung der Interaktion von MV aus Mastzellen und Tumorzellen sollte daher angeschlossen werden. Einen Hinweis auf einen möglichen Einfluss der MV auf die Tumorbilogie gibt ein Ergebnis dieser Arbeit: MV aus Hypoxie-stimulierten Mastzellen enthalten viel Angiogenin. Da die Angiogenese für das Wachstum solider Tumoren essenziell ist, ist eine prokarzinogene Wirkung der MV aus Mastzellen nicht auszuschließen. Im Rahmen der gezielten Tumorthherapie (auch *targeted therapy* genannt) werden u.a. Antikörper zur gezielten Hemmung bestimmter Moleküle eingesetzt. Die Angiogenese stellt häufig einen Angriffspunkt in der Therapie von Tumoren dar (Carmeliet et al. 2000). Dabei handelt es sich um Moleküle, die Tumorwachstum und –metastasierung fördern (Ellis et al. 2008).

Diskussion

Spezifische Antikörper gegen Angiogenese-fördernde Moleküle könnten wirkungslos sein, wenn das Antigen sich innerhalb von MV befindet. Somit müssten neue Methoden, z.B. Immundepletion (Abb. 42). Zur Eliminierung von extrazellulären Vesikeln herangezogen werden (Moore et al. 2017).

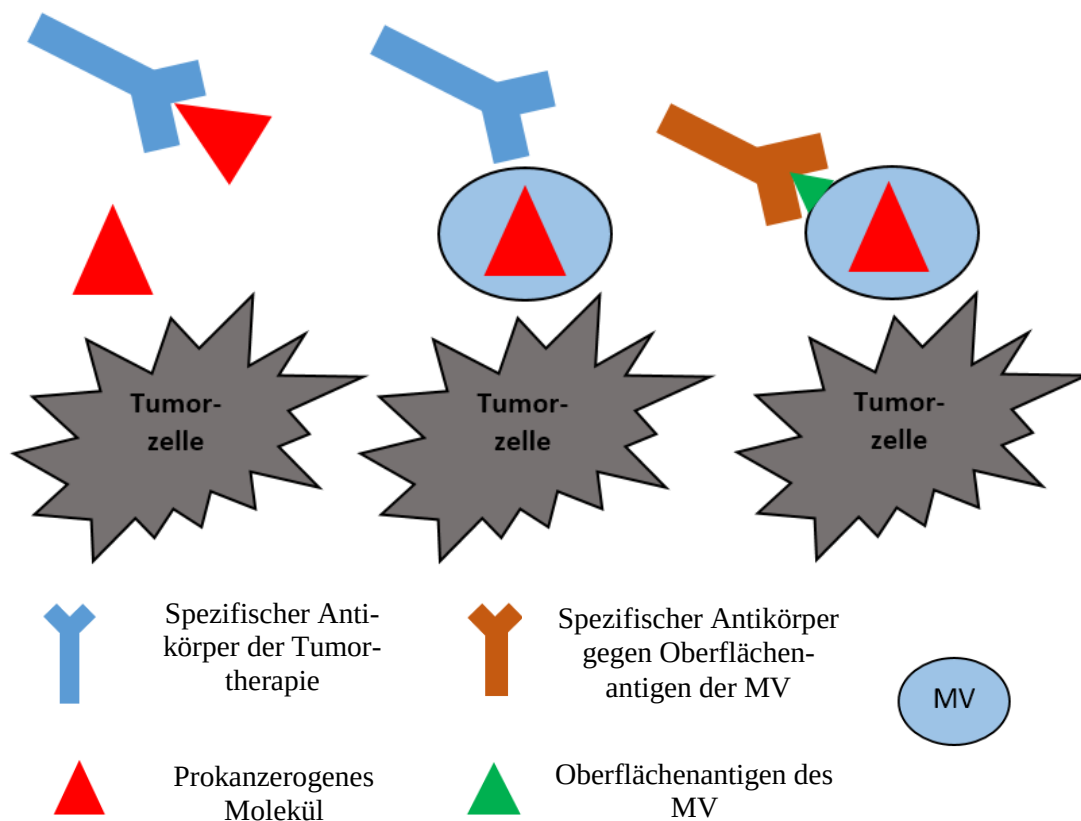


Abb. 42: Wie proangiogene Moleküle der Krebsimmuntherapie entkommen könnten.

Links: Der Antikörper der *targeted therapy* richtet sich gegen ein spezifisches prokarzinogenes Molekül. Es kann nun nicht mehr mit der Tumorzelle interagieren und verliert seine Wirkung.

Mitte: Das Antigen ist durch die Membran des MV vor einer Bindung durch den Antikörper geschützt. Die Immuntherapie wäre wirkungslos. **Rechts:** Um das spezifische Antigen und auch weitere sich im MV befindende tumorfördernde Moleküle trotzdem zu eliminieren, könnte ein Antikörper gegen spezifische Oberflächenantigene der MV genutzt werden. Diese würden dann zum Abbau der MV und ihrem Inhalt durch das Immunsystem initiieren.

ZUSAMMENFASSUNG

Mikrovesikel (MV) sind als Abschnürung von Zellen entstehende extrazelluläre, Granuläre ähnliche Membran-umhüllte Partikel, die zytoplasmatische und transmembrane Moleküle der Mutterzelle enthalten können. Sie dienen nicht nur als Biomarker bei kardiovaskulären und Entzündungserkrankungen, sondern tragen durch ihre Interaktionen mit Zielzellen über Ligand-Rezeptor Wechselwirkungen und nachfolgende Internalisierung zum Transfer von z.B. Oberflächenproteinen und genetischem Material als interzelluläres Kommunikationssystem bei. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass körpereigene extrazelluläre RNA (eRNA) nach Stimulierung von Mastzellen in MV-assoziiierter Form zu finden ist und proinflammatorische Eigenschaften besitzt. In dieser Arbeit wurden diese mit eRNA beladenen MV stimulierter Mastzellen charakterisiert.

Nach Stimulation von humanen Mastzell-Linien mit verschiedenen Stimulationen bzw. unter bestimmten Stressbedingungen (u.a. Ionomycin und Hypoxie) wurden MV aus den Kulturüberständen isoliert und mittels Fluoreszenz-aktivierter Durchflusszytometrie und anderer Methoden charakterisiert. Die beobachtete Freisetzung der MV verlief parallel zur Degranulierung der Mastzellen. Die in den Überständen der Mastzellen gefundene eRNA (überwiegend ribosomale RNA) war nicht in freier Form sondern zum größten Teil in den Calcium-abhängig gebildeten MV zu finden. Mittels lichtmikroskopischer (Immunfluoreszenz) und elektronenmikroskopischer (Immunogold-Markierung) Verfahren wurde die intravesikuläre Lokalisierung der eRNA zusammen mit dem ribosomalen Protein L11 nachgewiesen. Während die in MV eingeschlossene eRNA nicht ohne Weiteres durch RNase1 angreifbar war, führte eine Permeabilisierung der MV mit sehr gering konzentrierter Detergenzlösung (0,01% Triton) und RNase1 (ohne die Integrität der MV zu verletzen) zur Hydrolyse der eRNA. Neben der eRNA enthalten die beschriebenen MV die ribonukleolytisch kaum aktive RNase5 (Angiogenin), so dass die MV-assoziierte eRNA funktionell intakt bleibt und z.B. von Makrophagen (THP-1 Zellen) energieabhängig aufgenommen wurde.

Die experimentellen Daten dieser Arbeit (Else Müller AK, Tomalla V et al., FASEB J. 2019;33:5457-5467) zeigen, dass Stimuli der Mastzell-Degranulierung auch eine vermehrte Absonderung von eRNA tragenden MV bewirken, die z.B. eine funktionelle Aktivierung von Endothelzellen induzieren. Damit wurde die für ihre proinflammatorischen Eigenschaften bekannte, von Mastzellen freigesetzte, MV-assoziierte eRNA hinsichtlich ihrer Transportform im Entzündungsgeschehen charakterisiert.

SUMMARY

Microvesicles (MV) are released by budding off from the plasma membrane and represent extracellular vesicles that are similar to granules. They contain various cytoplasmatic and transmembrane proteins of their mother cell. On the one hand, MV can be used as biomarkers of cardiovascular and inflammatory diseases and on the other hand, they are part of the intercellular communication system by transferring surface molecules and genetic material to target cells as well as by promoting ligand-receptor interaction with consecutive internalization. Our group has shown, that after the stimulation of mast cells self-extracellular RNA (eRNA) can be found associated with MV and functions as a proinflammatory mediator. The focus of this work was to characterize these eRNA containing MV.

After the exposition of human mast cells to various stimuli (e.g. ionomycin) or hypoxia, MV were isolated from the supernatant. They were then characterized by FACS-analyses and other methods. The release of MV is a process, which happens in parallel with degranulation. The eRNA (predominantly ribosomal RNA) found in the supernatant was mainly enclosed by MV, that were released in a calcium-dependent manner. Electron microscopy (immunogold labelling) and light microscopy (immunofluorescence) showed an intravesicular localization of eRNA and its co-localization with the ribosomal protein L11. Whereas eRNA enclosed by MV was protected from RNase, the addition of a very low concentration of detergent (0.01% triton X-100) helped to hydrolyze the intravesicularly located eRNA without lysing the membrane of the vesicles. Moreover, MV contain an increased amount of angiogenin (RNase 5), which exhibits only little ribonucleolytic function. MV associated eRNA thus remains intact and is taken up by macrophages in an energy-dependent way.

The experimental data of this work (recently published: Elsemüller AK, Tomalla V et al., FASEB J. 2019; 33:5457-5467) demonstrate, that stimuli which induce the degranulation of mast cells are also able to promote the formation of eRNA carrying MV, that are functionally activating endothelial cells. These results characterize mast cell derived proinflammatory MV associated eRNA as a new transfer system in inflammation.

QUELLENVERZEICHNIS

Abels E et Breakefield X (2016): Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cell Mol Neurobiol*, 36(3): 301–312.

Akers JC, Gonda D, Kim R et al. (2013): Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J Neurooncol*. 113: 1–11.

Aliotta JM, Pereira M, Johnson KW et al. (2010): Microvesicle entry into marrow cells mediates tissue-specific changes in mRNA by direct delivery of mRNA and induction of transcription. *Exp Hematol* 38: 233–245.

Amabile N, Rautou PE, Tedgui A, Boulanger CM (2010): Microparticles: key protagonists in cardiovascular disorders. *Semin Thromb Hemost* 36: 907–916.

Andrade W, Seabrook TJ, Johnston MG, Hay JB (1996): The use of the lipophilic fluorochrome CM-DiI for tracking the migration of lymphocytes. *J Immunol Methods*. 194(2): 181-9.

Auwerx J (1991): The human leukemia cell line, THP-1: A multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia*. Volume 47, Issue 1: S. 22-31.

Barrett, K. E. (1992): Effect of Histamine and other mast cell mediators on T84 epithelial cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 664:222–231.

Beaven MA, Rogers J, Moore JP et al. (1984): The mechanism of the calcium signal and correlation with histamine release in 2H3 cells. *J Biol Chem*. 259:7129–36.

Benito-Martin A, Di Giannatale A, Ceder S et al. (2015): The new deal: a potential role for secreted vesicles in innate immunity and tumor progression. *Front Immunol*. 6: 66.

Bernstein I L (1985): Cromolyn sodium. *Chest*. 87 (1_Supplement): S. 68-73.

Berridge MV, Herst PM, Tan AS (2005): Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review* 11: 127-152.

Quellenverzeichnis

Beyer C, Pisetsky DS (2010): The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 6: 21–29.

Bosco MC, Pierobon D, Blengio F, et al. (2011): Hypoxia modulates the gene expression profile of immunoregulatory receptors in human mature dendritic cells: identification of TREM-1 as a novel hypoxic marker in vitro and in vivo. *Blood* 117: 2625–2639.

Burgmann H, Hollenstein U, Maca T et al. (1996): Increased serum laminin and angiogenin concentrations in patients with peripheral arterial occlusive disease, *J Clin Pathol* 49: 508-510.

Burnier L, Fontana P, Kwak BR et al. (2009): Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine. *Thromb Haemost.* 101: 439–45.

Butterfield JH, Weiler D, Dewald G et al. (1988): Establishment of an Immature Mast Cell Line From a Patient With Mast Cell Leukemia. *Leukemia Research* Vol. 12, Nr.4: 345-355.

Camaioni C, Gustapane M, Cialdella P et al. (2013): Microparticles and microRNAs: new players in the complex field of coagulation. *Intern Emerg Med.* 8 (4): 291-6.

Cabrera-Fuentes H. A., Ruiz-Meana M., Simsekyyilmaz S et al. (2014): RNase 1 prevents the damaging interplay between extracellular RNA and tumor necrosis factor- α in cardiac ischemia/reperfusion injury. *Thromb. Haemost.* 112: 1110-1119.

Campo L, Turley H, Han C et al. (2015): Angiogenin is up-regulated in the nucleus and cytoplasm in human primary breast carcinoma and is associated with markers of hypoxia but not survival, *J Pathol.* (5): 585-91.

Carmeliet P et Jain RK (2000): Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 2000 407(6801): 249-57.

Chanput W, Mes JJ, Wichers HJ. (2014): THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *Int Immunopharmacol.* 23: 37-45.

Chen J, Liu Z, Hong MM et al. (2014): Proangiogenic Compositions of Microvesicles Derived from Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells. PLoS ONE 9(12): e115316. doi:10.1371/journal.pone.0115316.

Chen Y, Li G, Liu ML (2018): Microvesicles as Emerging Biomarkers and Therapeutic Targets in Cardiometabolic Diseases. Genomics Proteomics Bioinformatics. 16 (1): 50-62.

Chironi GN, Boulanger CM, Simon A et al. (2009): Endothelial microparticles in diseases. Cell Tissue Res 335: 143–151, 2009.

Chung J, Suzuki H, Daleke DL (2003): Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid Asymmetry. J Lipid Res. 44: 233–242.

Tabuchi N, Blundell J, Etherton MR et al. (2007): Identification of tissue factor and platelet-derived particles on leukocytes during cardiopulmonary bypass by flow cytometry and immunoelectron microscopy. Thromb Haemost 98: 368–374.

Clark AG, Dierkes K, Paluch EK. (2013): Monitoring actin cortex thickness in live cells. Biophys J. 105(3): 570–580.

Cvjetkovic A, Lötval J, Lässer C. (2014): The influence of rotor type and centrifugation time on the yield and purity of extracellular vesicles. J Extracell Vesicles doi: 10.3402/jev.v3.23111. eCollection.

Dasgupta SK, Le A, Chavakis T et al. (2012): Developmental endothelial locus-1 (del-1) mediates clearance of platelet microparticles by the endothelium. Circulation 125: 1664–1672.

DeBruin EJ, Gold M, Lo BC et al. (2015): Mast cells in human health and disease. Methods Mol Biol. 1220: 93-119.

Dehai C, Bo P, Qiang T et al. (2014): Enhanced invasion of lung adenocarcinoma cells after co-culture with THP-1-derived macrophages via the induction of EMT by IL-6, Immunol Lett. 160(1): 1-10.

- Desjardins M, Huber LA, Parton RG et al.** (1994): Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus, *J. Cell Biol* 124: 677–88.
- Dickson KA, Haigis MC, Raines RT.** (2005): Ribonuclease Inhibitor: Structure and Function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 80: 349–374.
- Dignat-George F et Boulanger CM** (2011): The many faces of endothelial microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31: 27–33.
- Dang MA, Batra A, Freise I et al.** (2014): Polarisierte Makrophagen verändern ihren Phänotyp entsprechend des lokalen Zytokin-Milieus. *Gastroenterol* 52 - KG021
- Dranoff G** (2004): Cytokines in Cancer Pathogenesis and Cancer Therapy. *Nature Reviews Cancer* 4 (1): 11-22.
- Dvorak AM et Kissell S** (1991): Granule changes of human skin mast cells characteristic of piecemeal degranulation and associated with recovery during wound healing in situ. *J. Leukoc. Biol.* 49 (2): 197–210.
- Dvorak AM, Morgan ES, Lichtenstein LM et al.** (2000): RNA is closely associated with human mast cell secretory granules, suggesting a role(s) for granules in synthetic processes. *J Histochem Cytochem.* 48 (1): 1-12.
- Eckle T, Faigle M, Grenz A et al.** (2008): A2B adenosine receptor dampens hypoxia-induced vascular leak. *Blood.* 111: 2024–2035.
- Ekström K, Valadi H, Sjöstrand M et al.** (2012): Characterization of mRNA and microRNA in human mast cell-derived exosomes and their transfer to other mast cells and blood CD34 progenitor cells. *J Extracell Vesicles.* 1:10.3402/jev.v1i0.18389.
- Ellis LM, Hicklin DJ** (2008): VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat Rev Cancer.* 8(8): 579-91.
- Elmore S** (2007): Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35: 495–516.
- Eltzschig HK et Carmeliet P** (2011): Hypoxia and Inflammation. *Engl J Med* 364 (7): 656-665.

- Faille D, El-Assaad F, Mitchell AJ et al.** (2012): Endocytosis and intracellular processing of platelet microparticles by brain endothelial cells *J Cell Mol Med.* 16(8): 1731-1738.
- Fischer S, Cabrera-Fuentes HA, Noll T et al.** (2014): Impact of extracellular RNA on endothelial barrier function. *Cell and tissue research. Cell & Tissue Research* Vol. 355 Issue 3: 635-645.
- Fischer S, Gerriets T, Wessels C et al.** (2007): Extracellular RNA mediates endothelial-cell permeability via vascular endothelial growth factor. *Blood.* 110 (7): 2457-2465.
- Fischer S, Gesierich S, Griemert B et al.** (2013): Extracellular RNA liberates tumor necrosis factor alpha to promote tumor cell trafficking and progression. *Cancer Res.* 73 (16): 05080-5089.
- Galli S J** (1993): New concepts about the mast cell. *N. Engl. J. Med.* 328: 257–265.
- Garcia BA, Smalley DM, Cho H et al.** (2005): The platelet microparticle proteome. *J Proteome Res.* 4: 1516 –1521.
- Ghosh K et Shetty S** (2008): Blood coagulation in falciparum malaria—a review. *Parasitol Res* 102: 571–576.
- Gilfillan AM, Tkaczyk C** (2006): Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nat Rev Immunol.* 6(3): 218-30.
- Glimelius I, Edström A, Fischer M et al.** (2005): Angiogenesis and mast cells in Hodgkin lymphoma. *Leukemia* 19: 2360-2.
- Gordon S, Pluddemann A, Martinez Estrada F** (2014): Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions. *Immunol Rev* 262: 36-55.
- Grocott MP, Martin DS, Levett DZ et al.** (2009): Arterial blood gases and oxygen content in climbers on Mount Everest. *N Engl J Med* 360: 140-149.
- Guduric-Fuchs J, O'Connor A, Camp B et al.** (2012): Selective extracellular vesicle-mediated export of an overlapping set of microRNAs from multiple cell types. *BMC Genomics.* 13: 357.

György B, Szabó TG, Pásztói M et al. (2011): Membrane vesicles current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci* 68: 2667–2688.

Hausenloy D J et Yellon D M (2013): Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest.* 2013;123(1): 92-100.

Heijnen HF, Schiel AE, Fijnheer R et al. (1999): Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood.* 94: 3791–3799.

Hochreiter-Hufford A, Ravichandran KS (2013): Clearing the dead: apoptotic cell sensing, recognition, engulfment, and digestion, *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 5 (1): a008748

Hogan AD, Schwartz LB (1997): Markers of mast cell degranulation, *Methods* 13 (1): 43–52.

Hong-Tao M, Beaven MA (2011): Regulators of Ca^{2+} signaling in mast cells. Potential Targets for Treatment of Mast-Cell Related Diseases? *Advances in Experimental Medicine and Biology* 716: 62-90.

Horstman LL, Ahn YS (1999): Platelet microparticles: a wide-angle perspective. *Crit Rev Oncol Hematol.* 30 (2): 111–142.

Horwood, NJ (2016): Macrophage Polarization and Bone Formation: A review. *Clinic Rev Allerg Immunol* 51: 79-86.

Hosaka S, Shah MR, Barquin N et al. (1995): Expression of basic fibroblast growth factor and angiogenin in arthritis. *Pathobiology* 63: 249–256.

Hoshino M, Takahashi M, Aoike N (2001): Expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and angiogenin immunoreactivity in asthmatic airways and its relationship to angiogenesis. *J Allergy Clin Immunol.* 107: 295–301.

Hotamisligil GS (2006): Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* 444 (7121): 860-867.

Quellenverzeichnis

Hsu C, Morohashi Y, Yoshimura S, et al. (2010): Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C. *J Cell Biol.* 2010;189(2):223-232.

Hu GF, Strydom DJ, Fett JW et al. (1993): Actin is a binding protein for angiogenin. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 1217-1221.

Janeway CA Jr (2001): How the immune system works to protect the host from infection: a personal view. *Proc. Natl Acad. Sci.* 98: 7461–7468.

Johnstone RM, Adam M, Hammond JR et al. (1987): Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J. Biol. Chem.* 262: 9412–9420.

Jorfi S, Inal JM (2013): The role of microvesicles in cancer progression and drug resistance, *Biochem Soc Trans.* 41 (1): 293-8.

Jy W, Horstman LL, Jimenez JJ et al. (2004): Measuring circulating cell-derived microparticles, 2004; *J Thromb Haemost* 1: 1842–1851.

Jy W, Horstman LL, Ahn YS (2010): Microparticle size and its relation to composition, functional activity, and clinical significance. *Semin Thromb Hemost* 36: 876–880.

Kannemeier C, Shibamiya A, Nakazawa F et al. (2007): Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci* 104 (15): 6388–6393.

Khandoudi N, Bernard M, Cozzone P et al. (1990): Intracellular pH and role of Na⁺/Ca²⁺ exchange during ischaemia and reperfusion of normal and diabetic rat hearts. *Cardiovasc Res* 24: 873-878.

Kim KM, Abdelmohsen K, Mustapic M et al. (2017): RNA in extracellular vesicles. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 8(4): 10.1002/wrna.1413.

Klinke R, Pape HC, Kurtz A, Silbernagl S.: Physiologie 6., vollständig überarbeitete Auflage, Kapitel 7.4. S. 236.

Kopreski MS, Benko FA, Kwak LW et al. (1999): Detection of Tumor Messenger RNA in the Serum of Patients with Malignant Melanoma. *Clinical Cancer Research* Vol. 5: 1961–1965.

Kormelink T, Arkesteijn GJ, van de Lest CH et al. (2016): Mast Cell Degranulation Is Accompanied by the Release of a Selective Subset of Extracellular Vesicles That Contain Mast Cell–Specific Proteases. *J Immunol* 197 (8): 3382-3392.

Kowal J, Arras G, Colombo M et al. (2016): Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113 (8): 968–977.

Kumar H, Kawai T, Akira S. (2011): Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* 30: 16–34.

Lai K, Luo C, Zhang X et al. (2016): Regulation of angiogenin expression and epithelial-mesenchymal transition by HIF-1 α signaling in hypoxic retinal pigment epithelial cells. *Biochim Biophys Acta.* 862 (9):1594-1607.

Lawson C, Vicencio JM, Yellon DM et al. (2016): Microvesicles and exosomes: new players in metabolic and cardiovascular disease. *J Endocrinol.* 228(2): R57-71.

Lee TH, D'Asti E, Magnus N et al. (2011): Microvesicles as mediators of intercellular communication in cancer--the emerging science of cellular 'debris'. *Semin Immunopathol.* 33(5): 455-67.

Lee YXF, El Andaloussi S, Wood MJA (2012): Exosomes and microvesicles: extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy: *Human Molecular Genetics*, Volume 21: R125–R134.

Lhermusier T, Chap H, Payrastre B. (2011): Platelet membrane phospholipid asymmetry: from the characterization of a scramblase activity to the identification of an essential protein mutated in Scott syndrome. *J Thromb Haemost* 9: 1883-1891.

Lin R., Shi Ng L, Wang CH (2005): In vitro study of anticancer drug doxorubicin in PLGA-based microparticles. *Biomaterials* 26: 4476-4485

Quellenverzeichnis

- Li C, Xu MM, Wang K et al.** (2017): Macrophage polarization and meta-inflammation. *Transl Res.* 191: 29-44.
- Lo Cicero A, Stahl PD, Raposo G** (2015): Extracellular vesicles shuffling intercellular messages: for good or for bad. *Curr. Opin. Cell Biol.* 35: 69–77.
- Lotvall J, Valadi H.** (2007): Cell to cell signalling via exosomes through esRNA. *Cell Adh Migr.* 1(3): 156-8.
- Mause SF, C. Weber** (2010): Microparticles- Protagonists of a Novel Communication Network for Intercellular Information Exchange. *Circ Res.* 107: 1047-1057.
- MacKenzie A, Wilson HL, Kiss-Toth E et al.** (2001): Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *Immunity* 15: 825–835.
- Mack M, Kleinschmidt A, Bruhl H et al.** (2000): Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane-derived microparticles: a mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection. *Nat Med.* 6: 769 –775.
- Majno G, Joris I** (2004): *Cells, Tissues and Disease.* Oxford Univ. Press. SS. 1005.
- Marichal T, Tsai M, Galli SJ** (2013): Mast cells: potential positive and negative roles in tumor biology. *Cancer Immunol Res* 1: 269-279.
- Kulka M, Fukuishi N, Metcalfe DD** (2009): Human mast cells synthesize and release angiogenin, a member of the ribonuclease A (RNase A) superfamily. *J Leukoc Biol.* 86 (5): 1217-26.
- Martinez FO, Gordon S, Locati M et al.** (2006): Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol.* 177(10): 7303-11.
- McVey M, Tabuchi A, Kuebler WM et al.** (2012): Microparticles and acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 303: L364-L381.
- Metzen E, Ratcliffe PJ** (2004): HIF hydroxylation and cellular oxygen sensing. *Biol. Chem* 385: 223–230.

- Moore C, Kosgodage U, Lange S et al.** (2017): The emerging role of exosome and microvesicle- (EMV-) based cancer therapeutics and immunotherapy. *Int J Cancer*. 141 (3): 428-436.
- Morel O, Jesel L, Freyssinet JM et al.** (2011): Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31: 15–26.
- Mozaffari MS, Liu JY, Abebe W et al.** (2013): Mechanisms of load dependency of myocardial ischemia reperfusion injury. *Am J Cardiovasc Dis*. 3 (4): 180–196.
- Muralidharan-Chari V, Clancy JW, Sedgwick JW et al.** (2010): Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J Cell Sci* 123 (10): 1603–1611.
- Nilsson G, Blom T, Kusche-Gulberg M et al.** (1994): Phenotypic Characterization of the Human Mast-Cell Line HMC-1, *Scand. J. Immunol* 39: 489-498.
- Nilsson G, Johnell M, Hammer CH et al.** (1996): C3a and C5a are chemotaxins for human mast cells and act through distinct receptors via a pertussis toxin-sensitive signal transduction pathway. *J. Immunol*. 157: 1693–1698.
- Nizet V, Johnson RS** (2009): Interdependence of hypoxic and innate immune responses. *Nat. Rev. Immunol*. 9: 609–617.
- Nolte-'t Hoen EN, Buermans HP, Waasdorp M et al.** (2012). Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Res*. 40 (18): 9089-101.
- Nonomura N, Takayama H, Nishimura K et al.** (2007): Decreased number of mast cells infiltrating into needle biopsy specimens leads to a better prognosis of prostate cancer. *Br J Cancer* 97: 952-956.
- Osteikoetxea X, Sódar B, Németh A et al.** (2015): Differential detergent sensitivity of extracellular vesicle subpopulations. *Org Biomol Chem*. 13 (38): 9775-82.
- Owens AP, Mackman N** (2011): Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circ Res* 108: 1284–1297.

Özdamar SO, Seckin D, Kandemir B, Turanlı AY (1996): Mast cells in psoriasis. *Dermatology* 192: 190.

Pauleau AL, Rutschman R, Lang R et al. (2004): Enhancer-mediated control of macrophage-specific arginase I expression. *J Immunol* 172: 7565-7573.

Patel JV, Sosin M, Gunarathne A et al. (2008): Elevated angiogenin levels in chronic heart failure. *Ann Med.*: 1–6.

Pirro M, Schillaci G, Bagaglia F et al. (2008): Microparticles derived from endothelial progenitor cells in patients at different cardiovascular risk. *Atherosclerosis* 197: 757–767.

Pols MS, Klumperman J. (2009): Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Exp Cell Res.* 315(9):1584-92.

Puri N, Kruhlak MJ, Whiteheart SW et al. (2003): Mast Cell Degranulation Requires N-Ethylmaleimide-Sensitive Factor-Mediated SNARE Disassembly. *J Immunol.* 171: 5345-5352.

Tang Q, Jin MW, Xiang JZ et al. (2007): The membrane permeable calcium chelator BAPTA-AM directly blocks human ether a-go-go-related gene potassium channels stably expressed in HEK 293 cells. *Biochemical Pharmacology* 74: 1596-1607.

Ratajczak MZ, Ratajczak J (2016): Horizontal transfer of RNA and proteins between cells by extracellular microvesicles: 14 years later. *Clin Transl Med.* 5 (1):7.

Ribatti D, Crivellato E. (2011): Mast cells, angiogenesis and cancer. *Adv Exp Med Biol.* 716: 270-288.

Ribatti D, Ennas MG, Vacca A et al. (2003): Tumor vascularity and tryptase-positive mast cells correlate with a poor prognosis in melanoma. *Eur J Clin Invest.* 33: 420-425.

Ribatti D (2013): Mast cells and macrophages exert beneficial and detrimental effects on tumor progression and angiogenesis, *Immunol Lett.* 152 (2): 83-88.

Rivera J, Fierro NA, Olivera A et al. (2008): New insights on mast cell activation via the high affinity receptor for IgE. *Adv. Immunol.* 98: 85–120.

Rosenberger P, Schwab JM, Mirakaj V et al. (2009): Hypoxia-inducible factor-dependent induction of netrin-1 dampens inflammation caused by hypoxia. *Nat Immunol.*10: 195–202.

Salanova B, Choi M, Rolle S et al. (2007): Beta2-integrins and acquired glycoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) receptors cooperate in NF-kappaB activation of human neutrophils. *J Biol Chem* 282: 27960 –27969.

Schlüter KD, Schulz R, Schreckenber R (2015): Arginase induction and activation during ischemia and reperfusion and functional consequences for the heart. *Front. Physiol.* 6: 65. doi: 10.3389/fphys.2015.00065

Schwartz LB (1990): Tryptase, a mediator of human mast cells. *J Allergy Clin Immunol.* 86 (4 Pt 2): 594-598.

Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD et al. (1988): Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* 48: 4827-4833.

Sheng J und Xu Z. (2016): Three decades of research on angiogenin: a review and perspective. *Acta Biochim Biophys Sin* 48(5): 399-410.

Shet AS (2008): Characterizing blood microparticles: technical aspects and Challenges. *Vasc Health Risk Manag* 4: 769–774.

Simak J, Geldermann MP (2006): Cell membrane microparticles in blood and blood products: potentially pathogenic agents and diagnostic markers. *Transfus Med Rev* 20: S.1–26.

Simcock DE, Kanabar V, Clarke GW et al. (2008): Induction of angiogenesis by airway smooth muscle from patients with asthma. *Am J Respir Crit Care Med*178: 460–468.

Skog J, Wurdinger T, van Rijn S et al. (2008): Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol.* 10: 1470–1476.

Quellenverzeichnis

Skokos D, Botros HG, Demeure C et al. (2003): Mast cell-derived exosomes induce phenotypic and functional maturation of dendritic cells and elicit specific immune responses in vivo. *J Immunol.* 170 (6): 3037-45.

Skokos D, Le Panse S, Villa I et al. (2001): Nonspecific B and T cell-stimulatory activity mediated by mast cells is associated with exosomes. *Int. Arch Allergy Immunol.* 124 (1-3): 133-6.

Speckmann, Hescheler, Köhling: Physiologie 2008; Elsevier 5. Auflage: Kapitel 7.1.4. SS. 354-358.

Steiner DRS, Gonzalez N, Wood JG (2003): Mast cells mediate the microvascular inflammatory response to systemic hypoxia. *Journal of Applied Physiology* 94 (1): 325-334.

Strouch MJ, Cheon EC, Salabat MR et al. (2010): Crosstalk between mast cells and pancreatic cancer cells contributes to pancreatic tumor progression. *Clin Cancer Res* 16: 2257-65.

Sundström M, Vliagoftis H, Karlberg P et al. (2003): Functional and phenotypic studies of two variants of a human mast cell line with a distinct set of mutations in the c-kit proto-oncogene. *Immunology* 108: 89-97.

Suzumori N, Zhao X, Suzumori K (2004): Elevated angiogenin levels in the peritoneal fluid of women with endometriosis correlate with the extent of the disorder. *Fertil Steril* 82: 93-96.

Theoharides TC, Alysandratos KD, Angelidou A et al. (2012): Mast cells and inflammation. *Biochim Biophys Acta.* 1822 (1): 21-33.

T.C. Theoharides, D.E. Cochrane (2004): Critical role of mast cells in inflammatory diseases and the effect of acute stress. *J. Neuroimmunol.* 146: 1–12.

Thermo Scientific: RNase A, DNase and Protease-free. Produktinformation Pub. No. MAN0012003 2017 (Rev. C.00).

- Tsuji T, Sun Y, Kishimoto K et al.** (2005): Angiogenin is translocated to the nucleus of HeLa cells and is involved in ribosomal RNA transcription and cell proliferation. *Cancer Res.* 65: 1352–1360.
- Tual-Chalot S, Leonetti D, Andriantsitohaina R et al.** (2011): Microvesicles: intercellular vectors of biological messages. *Mol Interv.* 11(2): 88-94.
- Turturici G, Tinnirello R, Sconzo G et al.** (2014): Extracellular membrane vesicles as a mechanism of cell-to-cell communication: advantages and disadvantages. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 306: C621–33.
- Urb M, Sheppard DC et al.** (2012): The Role of Mast Cell in the Defence against Pathogens, *PLOS Pathogens* 8 (4): e1002619.
- Van der Pol E, Hoekstra AG, Sturk A et al.** (2010): Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. *J Thromb Haemost* 8 (12): 2596–2607.
- Vukman KV, Försonits A, Oszvald Á et al.** (2017): Mast cell secretome: Soluble and vesicular components. *Seminars in Cell & Developmental Biology* Volume 67: 65-73.
- Wernersson S, Pejler G** (2014): Mast cell secretory granules: armed for battle. *Nat.Rev. Immunol.* 14 (7): 478–494.
- Wolf P** (1967): The nature and significance of platelet products in human Plasma. *Br J Haematol* 13: 269–288.
- Wooley D E** (2003): The mast cell in inflammatory arthritis. *N. Engl. J. Med.* 348: 1709–1711.
- Wu ZH, Ji CL, Li H et al.** (2013): Membrane microparticles and diseases. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 17: 2420-2427.
- Xu JM, Shi GP** (2012): Emerging role of mast cells and macrophages in cardiovascular and metabolic diseases. *Endocr Rev.* 33(1): 71-108.

Quellenverzeichnis

Yáñez-Mó M, Siljander PR, Andreu Z et al. (2015): Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. J. Extracell. Vesicles 4:27066. doi: 10.3402/jev.v4.27066. eCollection.

Zernecke A, Preissner KT (2016): Extracellular Ribonucleic Acids (RNA) Enter the Stage in Cardiovascular Disease. Circ. 118(3): 469-479.

NUTZUNGSGENEHMIGUNGEN

Abb. 1.: Extrazelluläre Vesikel: Mikrovesikel, apoptotische Körper und Exosomen

Die Abbildung wurde aus dem Artikel von Turturici et al. 2014 entnommen und darf freundlicherweise mit der Genehmigung von F. Geraci in dieser Dissertation genutzt werden. Zur Vereinheitlichung der Sprache innerhalb dieser Dissertation erfolgte die Beschriftung mit äquivalenten deutschen Begriffen.

Quelle: Turturici G, Tinnirello R, Sconzo G, Geraci F. Extracellular membrane vesicles as a mechanism of cell-to-cell communication: advantages and disadvantages. Am J Physiol Cell Physiol. 2014;306(7):C621-C633. doi:10.1152/ajpcell.00228.2013

Abb. 2: Transmissionselektronenmikroskopie von EV

Das Bild wurde aus dem Artikel von Osteikoetxea et al. 2015 entnommen und darf freundlicherweise mit der Genehmigung von „The Royal Society of Chemistry“ in dieser Dissertation genutzt werden.

Quelle: Osteikoetxea X, Sódar B, Németh A, et al. Differential detergent sensitivity of extracellular vesicle subpopulations. Org Biomol Chem. 2015;13(38):9775-9782. doi:10.1039/c5ob01451d – **Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry**

Abb. 5: Einfluss extrazellulärer RNA (eRNA) auf vaskuläre Homöostase und kardiovaskuläre Pathologien

Das Bild wurde aus dem Artikel von Zerneck und Preissner 2016 entnommen und darf freundlicherweise mit der Genehmigung von K.T. Preissner in dieser Dissertation genutzt werden. Zur Vereinheitlichung der Sprache innerhalb dieser Dissertation erfolgte die Beschriftung mit äquivalenten deutschen Begriffen.

Quelle: Zerneck A, Preissner KT. Extracellular Ribonucleic Acids (RNA) Enter the Stage in Cardiovascular Disease. Circ Res. 2016;118(3):469-479. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.307961

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
%	Prozent
Abb.	Abbildung
BAPTA	1,2-Bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid
BSA	Rinderserumalbumin (engl. <i>bovin serum albumin</i>)
bzw.	Beziehungsweise
ca.	circa
Ca ²⁺	Kalzium
CD	Differenzierungscluster (engl. <i>cluster of differentiation</i>)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	engl. <i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>desoxyribonuclein acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eRNA	Extrazelluläre Ribonukleinsäure
et al.	<i>et alteri</i> , lateinisch für „und die jeweils anderen“
FACS	Durchflusszytometrie (engl. <i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FCS	fetales Kälberserum

FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm oder gravity force (<i>Erdbeschleunigung</i> $g = 9,80665 \text{ m/s}^2$)
h	hour, englische Abkürzung für Stunde
HMC	<i>Human mast cell</i> , englisch für humane Mastzelle
IgE	Immunglobulin E
kDa	Kilodalton
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
min	Minute
mRNA	<i>messenger</i> RNA
n	Anzahl der Versuche
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration einer Lösung
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
Poly I:C	Polyribocytidyl-Polyriboinosinsäure
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i> , englisch für Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
SCF	Stem cell factor, englisch für Stammzellfaktor

SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (engl. <i>Tris buffered saline</i>)
TBS-T	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween (engl. <i>Tris buffered saline with tween</i>)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF α	Tumornekrosefaktor α
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
z.B.	zum Beispiel

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung	Titel	Seite
1	Extrazellulären Vesikel: Mikrovesikel, apoptotische Körper und Exosomen	2
2	Transmissionselektronenmikroskopie von EV	4
3	Aufbau eines Mikrovesikel	5
4	Beispiele für die vielfältigen Wirkungen von Mikrovesikeln durch RNA-Transfer	8
5	Einfluss extrazellulärer RNA (eRNA) auf vaskuläre Homöostase und kardiovaskuläre Pathologien	11
6	Die Rolle der Mastzelle in entzündlichen Erkrankungen	14
7	Freisetzung ribosomaler RNA aus stimulierten Mastzellen	15
8	Immunhistochemische Färbung für die Elektronenmikroskopie	36
9	Schematische Darstellung der Isolierung von MV	43
10	Graphische Darstellung der Analyse einer MV-Probe mittels FACS	44

11	Tabellarische Darstellung der Analyse einer MV-Probe mittels FACS	45
12	Die meisten Vesikel sind Annexin positiv und 7AAD negativ	45
13	Nachweis von CD117 auf HMC-1.2. mittels FACS-Analyse	46
14	Nachweis von CD117 auf MV aus stimulierten Mastzellen	47
15	Bild einer HMC-1.2. mit Mastzell-typischer Morphologie mittels EM	48
16	Nachweis der MV im EM	49
17	Durchschnittliche Größe eines MV aus humanen Mastzellen	49
18	Zeitabhängigkeit der MV-Bildung unter Hypoxie	51
19	A) Relativer Anteil der MV unter Hypoxie im Vergleich zur Kontrolle. A: Relativer Anteil der MV nach 3 h Hypoxie im Vergleich zur normoxischen Kontrolle B) Anteil der MV-Fraktion an der Gesamtzahl der isolierten Vesikeln nach 3 h und 24 h Hypoxie	52
20	Ca ²⁺ -Abhängigkeit der MV-Freisetzung unter Hypoxie	53
21	Anzahl der Mikrovesikel nach Stimulation mit Induktoren der Degranulation	54
22	Hemmung der MV-Bildung durch Degranulationshemmer	54
23	Bestimmung der MV-Fraktion mittels FACS ohne Zentrifugationsschritt	55
24	Zusammenhang zwischen MV-Anzahl und rRNA-Gehalt	56
25	Verteilungsmuster der rRNA in HMC-1.2.	57
26	rRNA ist MV-assoziiert	58
27	MV- assoziierte rRNA und zytoplasmatische rRNA ist mit dem ribosomalen Protein L11 co-lokalisiert	59
28	Verteilung der rRNA in Mastzellen	60
29	Nachweis von rRNA innerhalb von MV mittels EM	61
30	Nachweis von Histamin in HMC-1.2. und ihren MV mittels Fluoreszenz-Mikroskopie und EM	62
31	Veränderung der MV-Anzahl durch diverse Substanzen	63
32	Quantifizierung der rRNA nach Zugabe diverser Substanzen	64

33	Nachweis des erfolgreichen enzymatischen Abbaus der MV-assozierten eRNA mittels RNase und Triton	65
34	Nachweis eines erhöhten Angiogeningehalts in MV aus Hypoxie-stimulierten Mastzellen mittels Western Blot Analyse	66
35	Graphische Darstellung der Western Blot-Analyse von Angiogenin und RNase Inhibitor	67
36	Kern- und Membranfärbung der HMC-1.2.-Zellen mit CM-DiI	68
37	Färbung der Membran von MV mit CM-DiI	68
38	Immunhistochemische Färbung: Aufnahme gefärbter MV aus Hypoxie-stimulierter Mastzellen durch Makrophagen	69
39	Möglicher Mechanismus der MV-Bildung unter Hypoxie	72
40	Interaktion zwischen MV-eRNA aus stimulierten Mastzellen und anderen Zellen	74
41	Angiogenin in MV aus Hypoxie-stimulierten Mastzellen	77
42	Wie proangiogene Moleküle der Krebsimmuntherapie entkommen könnten	81

PUBLIKATION

The FASEB Journal 2019

„Characterization of mast cell-derived rRNA-containing microvesicles and their inflammatory impact on endothelial cells. “

Ann-Kathrin Elsemüller, Vanessa Y. Tomalla, Ulrich Gärtner, Kerstin Troidl, Sylvia Jeratsch, Johannes Graumann, Nelli Baal, Holger Hackstein, Manuel Lasch, Elisabeth Deindl, Klaus T. Preissner, Silvia Fischer

FASEB J. 2019;33(4):5457-5467. doi:10.1096/fj.201801853RR

Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

DANKSAGUNG

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Herrn **Prof. Dr. Klaus T. Preissner** für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen und für die sehr gute Betreuung, die zum Gelingen der Doktorarbeit beigetragen hat. Im Laufe der letzten Jahre habe ich sehr viel über Forschung gelernt und bin nun motiviert, auch als Ärztin weiterhin wissenschaftlich zu arbeiten.

Ein großer Dank gebührt **Dr. Silvia Fischer**, die mir sowohl bei inhaltlichen als auch bei technischen Fragestellungen mit Rat und Tat zur Seite stand. Ihre hervorragende wissenschaftliche Betreuung und zeitnahe Antwort auf Fragen und Bitten sind nicht selbstverständlich.

Ich danke **Dr. Ulrich Gärtner** für die wundervollen elektronenmikroskopischen Bilder, ohne die eine Interpretation meiner Daten unvollständig wäre. Vielen Dank für die Unterstützung und die wichtigen Denkanstöße.

Sabrina Glasenhardt, Silke Leiting, Bärbel Fühler, Uwe Schubert und Julian Rodriguez danke ich für die wirkungsvolle Unterstützung beim Erlernen der wissenschaftlichen Methoden.

Auch bei meiner **Familie** möchte ich mich ganz herzlich bedanken. Vielen Dank für die geduldige Unterstützung, die Ratschläge und den Rückhalt. Ich danke euch für euren Beistand und eure Fürsprache während des gesamten Studiums.