

*Charakterisierung molekularer Determinanten zur spezifischen Sekretion  
von RNAs in extrazelluläre Vesikel*

*Dissertation*

*Zur Erlangung des akademischen Grades Doctor rerum naturalium (Dr. rer.nat.)*

*Vorgelegt von Marie-Luise Mosbach (M.Sc. Biologie)*

*Eingereicht im Fachbereich Biologie und Chemie der Justus-Liebig-Universität Gießen*

*Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biochemie der Justus-Liebig-Universität Gießen im Fachbereich 08 in der Zeit von August 2018 bis März 2022 unter der Leitung von Prof. Dr. Albrecht Bindereif angefertigt.*

*Dekan: Prof. Dr. Thomas Wilke  
Institut für Tierökologie und Spezielle Zoologie (FB 08)  
Justus-Liebig-Universität Gießen*

*1. Gutachter: Prof. Dr. Albrecht Bindereif  
Institut für Biochemie (FB 08)  
Justus-Liebig-Universität Gießen*

*2. Gutachterin: Prof. Dr. Elke Pogge von Strandmann  
Zentrum für Tumor- und Immunbiologie  
Philipps-Universität Marburg*

*Für meine Großeltern*

~Der Irrtum ist ein ganz zentraler Bestandteil von Wissenschaft - man irrt sich vorwärts~

Mai Thi Nguyen-Kim

<b>1</b>	<b>Abstract</b> .....	<b>IV</b>
<b>2</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>V</b>
<b>3</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
3.1	Extrazelluläre Vesikel (EVs).....	1
3.2	Molekulare Zusammensetzung von EVs.....	2
3.3	Biogenese von Exosomen und Mikrovesikeln .....	4
3.4	EV-Aufnahme an der Empfängerzelle.....	6
3.5	Spezifisches Beladen von RNAs in EVs .....	8
3.6	EV-RNA und ihre möglichen Funktionen.....	10
3.7	Methoden zur Aufreinigung von EVs .....	12
3.8	Methoden zur Charakterisierung von EVs .....	15
3.9	EVs in der therapeutischen Anwendung.....	17
3.10	Zielsetzung der Arbeit .....	20
<b>4</b>	<b>Material &amp; Methoden</b> .....	<b>22</b>
4.1	Materialien.....	22
4.1.1	Chemikalien.....	22
4.1.2	Kommerzielle Kits .....	23
4.1.3	Enzyme und Puffer .....	24
4.1.4	Plasmide.....	24
4.1.5	Größenmarker.....	24
4.1.6	Antikörper .....	25
4.1.7	Zelllinien .....	25
4.1.8	Zellkulturmedien .....	26
4.1.9	Verbrauchsmaterialien.....	27
4.1.10	Puffer, Gele und Lösungen .....	27
4.1.11	Laborgeräte.....	30
4.1.12	DNA-Oligonukleotide.....	31
4.2	Biochemische Methoden .....	40
4.2.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot.....	40
4.2.2	RNA-Isolierung und cDNA-Synthese .....	40
4.2.3	PCR und Agarose-Gelelektrophorese .....	40
4.2.4	Quantitative real-time PCR (qPCR).....	41
4.2.5	Northern Blot .....	42
4.3	Molekularbiologische Methoden.....	43
4.3.1	Restriktionsverdau und Ligation von DNA-Fragmenten .....	43

4.3.2	<i>Transformation in Bakterien</i> .....	43
4.3.3	<i>Isolierung von Plasmid-DNA</i> .....	43
4.3.4	<i>DNA-Sequenzierung</i> .....	44
4.3.5	<i>Annealing von DNA-Oligonukleotiden</i> .....	44
4.3.6	<i>Klonierung von RNA-Expressionskonstrukten</i> .....	44
4.4	<i>Arbeiten mit Zelllinien</i> .....	46
4.4.1	<i>Kultivierung von Trypanosoma brucei</i> .....	46
4.4.2	<i>Kultivierung eukaryotischer Zellen</i> .....	46
4.4.3	<i>Subkultivierung eukaryotischer Zellen</i> .....	46
4.4.4	<i>Transfektion eukaryotischer Zellen</i> .....	46
4.5	<i>Arbeiten mit extrazellulären Vesikeln</i> .....	47
4.5.1	<i>EV-Isolierung aus eukaryotischen Zellen</i> .....	47
4.5.2	<i>EV-Isolierung aus Trypanosoma brucei</i> .....	47
4.5.3	<i>Nanopartikel-Tracking-Analyse (NTA)</i> .....	48
4.5.4	<i>Nano-Durchflusszytometrie (NanoFCM)</i> .....	48
4.5.5	<i>Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)</i> .....	49
4.5.6	<i>RNase A-, Proteinase K- und Triton X-100-Behandlung von EVs</i> .....	50
4.6	<i>RNA-Sequenzierungs-Daten</i> .....	50
4.6.1	<i>Herstellung einer RNA-Seq-Library</i> .....	50
4.6.2	<i>Bioinformatische RNA-Motivanalyse</i> .....	50
<b>5</b>	<b><i>Ergebnisse</i></b> .....	<b>51</b>
5.1	<i>Isolierung und Charakterisierung von EVs</i> .....	51
5.2	<i>Transmissionselektronenmikroskopie zur Detektion von EVs</i> .....	54
5.3	<i>Größenbestimmung von EVs</i> .....	55
5.4	<i>Charakterisierung von EV-RNA</i> .....	56
5.4.1	<i>Detektion von RNA-Kontaminationen in Zellkulturmedium</i> .....	56
5.4.2	<i>EV-assoziierte RNAs sind vor dem Abbau durch RNasen geschützt</i> .....	57
5.5	<i>In vivo SELEX zur Detektion von RNA-Sequenzmotiven</i> .....	59
5.6	<i>RNA-Polymerase III-Transkripte werden bevorzugt in EVs geladen</i> .....	64
5.7	<i>Kleinere Transkripte werden bevorzugt in EVs geladen</i> .....	66
5.8	<i>Absolute Quantifizierung von endogenen RNAs in EVs</i> .....	68
5.8.1	<i>Charakterisierung von EVs aus fünf verschiedenen Zelllinien</i> .....	68
5.8.2	<i>Absolute Quantifizierung der snRNAs U6 &amp; U1, Y1 RNA und GAPDH mRNA</i> .....	70
5.9	<i>Potentielle Modifizierung der GAPDH mRNA in EVs</i> .....	72
5.10	<i>Spezifisches Beladen von EVs mit RNAs</i> .....	73

5.10.1	<i>Passives Beladen von RNA-Aptameren.....</i>	73
5.10.2	<i>RNA-sequenzunabhängiges passives Beladen von RNAs.....</i>	75
<b>6</b>	<b><i>Diskussion.....</i></b>	<b>77</b>
6.1	<i>Isolation und Charakterisierung von EVs.....</i>	77
6.2	<i>Molekulare Determinanten, die das Beladen von RNAs in EVs begünstigen .....</i>	78
6.3	<i>Nur geringe RNA-Mengen sind mit EVs assoziiert .....</i>	82
6.4	<i>Integrität von EV-RNA .....</i>	84
6.5	<i>EV-Beladungsstrategien .....</i>	84
6.6	<i>Fazit/Ausblick.....</i>	85
<b>7</b>	<b><i>Literaturverzeichnis.....</i></b>	<b>88</b>
<b>8</b>	<b><i>Tabellenverzeichnis .....</i></b>	<b>VI</b>
<b>9</b>	<b><i>Abbildungsverzeichnis .....</i></b>	<b>VII</b>
<b>10</b>	<b><i>Abkürzungsverzeichnis.....</i></b>	<b>VIII</b>
<b>11</b>	<b><i>Selbstständigkeitserklärung .....</i></b>	<b>XI</b>

## 1 ABSTRACT

Extracellular vesicles (EVs) are secreted into the extracellular space by almost every cell in the human body. EVs can transport functionally active biomolecules between cells, so they play an important role in cell-cell communication. In addition to proteins, lipids and DNA, they also transport RNAs, including several classes of coding and noncoding RNAs, some of which have been shown to be selectively packaged into vesicles. However, the mechanism of packaging, protein factors and sequence elements that determine this specificity remains largely unknown.

The aim of the presented work is to contribute to the understanding of RNA loading into EVs as well as to identify characteristic features of EV RNA. For this purpose, reporter systems were designed resulting in different types of modified transcripts. These include RNAs with different lengths on the one hand as well as RNAs with different cap structures and with/without poly(A) tail on the other hand. These reporter constructs were then transfected into cells and the expressed EV RNAs were quantified. Furthermore, the amounts of RNA present in EVs were quantified in absolute terms. Both endogenous RNAs (U6 snRNA, U1 snRNA, Y1 RNA, and GAPDH mRNA) and RNAs expressed by reporter constructs were quantified.

Small RNAs were found to be more efficiently packaged into EVs than large ones. In addition, RNA polymerase III-generated transcripts were shown to be secreted more efficiently into EVs compared to polymerase II transcripts. Surprisingly, quantitative analysis revealed no RNA accumulation in vesicles compared to total cellular levels, for both overexpressed reporter transcripts and endogenous RNAs. RNA appears to be associated with EVs only at low copy numbers, between 0.02 and 1 molecule per EV.

Since investigations from previous studies showed protein-RNA interactions favoring specific loading of (mi)RNAs into EVs, an *in vivo* SELEX was performed to identify RNA motifs, followed by bioinformatic evaluation. Here, reporter constructs expressing a random pool of RNAs (N40) in the cells were used; subsequent EV RNA isolation and library preparation were intended to identify enriched sequences. However, no specific enrichment of a sequence motif could be identified.

## 2 ZUSAMMENFASSUNG

Extrazelluläre Vesikel (EVs) werden von fast jeder Zelle des menschlichen Körpers in den extrazellulären Raum sezerniert. Dort können EVs funktionell aktive Biomoleküle zwischen Zellen transportieren und sind somit Bestandteil der Zell-Zellkommunikation. Neben Proteinen, Lipiden und DNA transportieren sie RNAs, darunter verschiedene Klassen von kodierenden und nicht-kodierenden RNAs, von denen einige selektiv in Vesikel verpackt werden. Die Proteinfaktoren, Mechanismen und Sequenzelemente, die diese Spezifität bedingen, sind jedoch noch weitestgehend unbekannt.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, einen Beitrag zum Verständnis über das Beladen von RNAs in EVs zu leisten sowie Charakteristika von EV-RNA zu identifizieren. Dazu wurden Reporterkonstrukte entworfen, die zu verschiedenen modifizierten Transkripten führten. Zum einen wurden RNAs mit verschiedenen Längen exprimiert und zum anderen RNAs mit verschiedenen Cap-Strukturen sowie mit/ohne Poly(A)-Schwanz. Diese Reporterkonstrukte wurden anschließend in Zellen transfiziert und die exprimierten EV-RNAs quantifiziert. Des Weiteren wurden die in EVs vorhandenen RNA-Mengen absolut quantifiziert. Hierbei wurden sowohl endogene RNAs (U6 snRNA, U1 snRNA, Y1 RNA und GAPDH mRNA) als auch durch Reporterkonstrukte exprimierte RNAs verwendet.

Es konnte festgestellt werden, dass kleine RNAs effizienter in EVs verpackt werden als große. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass RNA-Polymerase III-Transkripte im Vergleich zu Polymerase II-Transkripten effizienter in EVs sezerniert werden. Überraschenderweise ergab die quantitative Analyse keine RNA-Akkumulation in den Vesikeln im Vergleich zu dem gesamtzellulären Level, und dies sowohl bei überexprimierten Reporter-Transkripten als auch bei endogenen RNAs. RNA ist nur in einer niedrigen Kopienzahl (0,02 - 1 Molekül pro EV) mit EVs assoziiert.

Da Untersuchungen von vorangegangenen Studien Protein-RNA-Interaktionen zeigten, die das spezifische Beladen von (mi)RNAs in EVs begünstigten, wurde ein *in vivo* SELEX zur Identifizierung von RNA-Motiven mit anschließender bioinformatischer Auswertung durchgeführt. Hierbei wurden Reporterkonstrukte verwendet, welche einen zufallsgenerierten Pool an RNAs (N40) in den Zellen exprimierten, welche anschließend in EVs verpackt wurden. Durch anschließende EV-RNA-Isolation und Library-Präparation sollten angereicherte Sequenzen identifiziert werden. Es konnte jedoch keine spezifische Anreicherung eines Sequenzmotivs detektiert werden.

### 3 EINLEITUNG

#### 3.1 Extrazelluläre Vesikel (EVs)

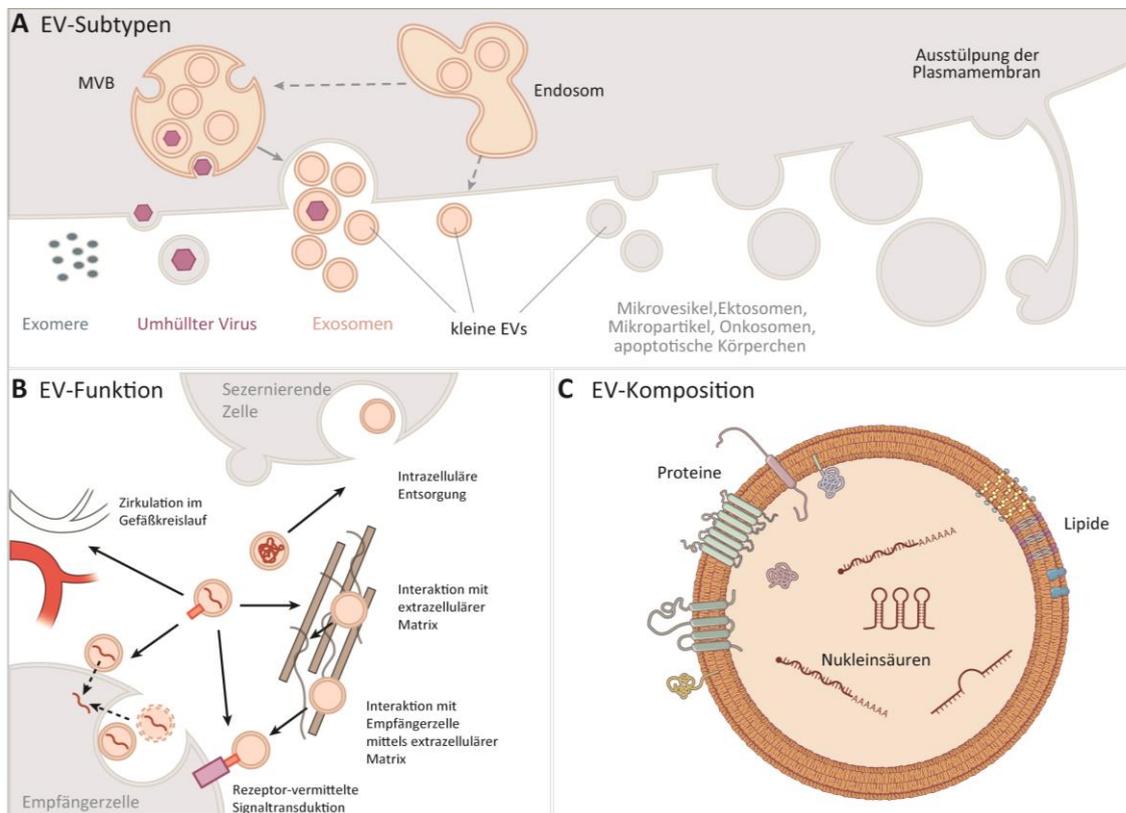
Extrazelluläre Vesikel (EVs) sind Membranpartikel, die von einer Vielzahl von Zellen und Organismen, darunter Säugetierzellen, grampositive und -negative Bakterien, Pilze, Pflanzen, Hefen, Nematoden und einzelligen Organismen, in den extrazellulären Raum sezerniert werden (György *et al.* 2015). Dort transportieren sie funktionell aktive Biomoleküle (Nukleinsäuren, Proteine und Lipide) zwischen Zellen und sind somit Bestandteil der Zell-Zellkommunikation (van Niel *et al.* 2018, Simons & Raposo 2009, Théry *et al.* 2009, Lötvall *et al.* 2014).

Der Begriff EV beschreibt eine große heterogene Population von Vesikeln, welche stark in ihrer Größe, chemischen Zusammensetzung und Funktion variieren, abhängig davon, wie und von welchem Zelltyp sie gebildet wurden (Lötvall *et al.* 2014, van Niel *et al.* 2018). Die EV-Klassifikation stellt eine große Herausforderung dar, aufgrund von fehlenden, einheitlichen oder spezifischen Markern für die einzelnen Populationen sowie einer einheitlich standardisierten Aufreinigungsmethode (Witwer *et al.* 2017). Die derzeitig geläufige Unterteilung geschieht anhand der Größe und des Biogenesewegs.

Hierbei unterscheidet man drei Hauptpopulationen: Exosomen, Mikrovesikel und apoptotische Körperchen (engl. *apoptotic bodies*) (Yáñez-Mó *et al.* 2015). Exosomen weisen eine Größe von 30 - 100 nm im Durchmesser auf und haben ihren Ursprung intraluminal im multivesikulären Endosom (MVE). Durch multivesikuläre Endosomfusion mit der Plasmamembran kommt es zur Freisetzung der Exosomen in den extrazellulären Raum (Théry *et al.* 2009, van Niel *et al.* 2018, Mathivanan & Simpson 2010). Mikrovesikel haben eine Größe von 50 nm - 1 µm im Durchmesser und entstehen durch direkte Ausstülpung und Abschnürung von der Plasmamembran (Théry *et al.* 2009, van Niel *et al.* 2018, Yáñez-Mó *et al.* 2015, Ratajczak *et al.* 2006). Apoptotische Körperchen haben eine Größe von 500 nm - 5 µm im Durchmesser, sind somit die größten Vertreter, und werden während der Apoptose von Zellen freigesetzt (Li *et al.* 2020, Théry *et al.* 2009, Caruso & Poon 2018). Neben den drei erwähnten Hauptgruppen gibt es noch viele weitere Subpopulationen, wie z.B. Ektosomen, Exomere, Mikropartikel, Onkosomen etc. (siehe **Abbildung 1A** und Théry *et al.* 2009, Coccozza *et al.* 2020).

Lange wurde angenommen, dass die Funktion von extrazellulären Vesikeln die Entsorgung von „Müll“ aus der Zelle ist (Johnstone *et al.* 1987). Jedoch rückt, wie schon oben erwähnt, zunehmend ihre Bedeutung für die interzelluläre Kommunikation als wichtiger Vermittler vieler (patho)physiologischer Prozesse mehr und mehr in den Fokus (Herrmann *et al.* 2021). Durch den Transport verschiedener funktioneller Biomoleküle können EVs physiologische Veränderungen in der Empfängerzelle induzieren (siehe **Abbildung 1B**). Sie können Signalkaskaden in der

Empfängerzelle vermitteln oder sie werden abgebaut und dienen als Nährstoffquelle für die Empfängerzelle. Außerdem können sie ins Blut- oder Lymphgefäßsystem freigesetzt werden und so aktive Biomoleküle an weit entfernte Zielzellen abgeben (Cocozza *et al.* 2020).



**Abbildung 1. Übersicht über die Subtypen, Funktionen und die Zusammensetzung von extrazellulären Vesikeln**

**A)** Dargestellt sind die häufigsten Subpopulationen von extrazellulären Vesikeln, darunter Exosomen, die durch multivesikuläre Endosomfusion mit der Plasmamembran und anschließender Freisetzung der intraluminalen Vesikel (Exosomen) in den extrazellulären Raum entstehen. Mikrovesikel, die durch direkte Ausstülpung und Abschnürung von der Plasmamembran entstehen sowie apoptotische Körperchen, Exomere, Onkosomen, Ektosomen und Mikropartikel.

**B)** EVs können Empfängerzellen über verschiedene Wege beeinflussen: Durch Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion, durch den Transfer von aktiven Biomolekülen oder durch die Interaktion mit der extrazellulären Matrix. Außerdem können sie als „Abfallentsorgungssystem“ von der Zelle genutzt werden.

**C)** Klassischer Aufbau eines EVs (Cocozza *et al.* 2020, Abbildung modifiziert).

### 3.2 Molekulare Zusammensetzung von EVs

Die genaue molekulare Zusammensetzung von EVs ist noch nicht abschließend geklärt. Bisher wurde eine große Anzahl verschiedener Biomoleküle identifiziert (siehe **Abbildung 1C**), darunter Proteine (z.B. Rezeptoren, Transkriptionsfaktoren, Enzyme und extrazelluläre Matrixproteine), Lipide und Nukleinsäuren (DNA und RNA), welche sich innerhalb oder auf der Oberfläche der EVs befinden können (Mathivanan & Simpson 2010, Kowal *et al.* 2016, Jeppesen *et al.* 2019).

Die EV-Membran besteht, im Gegensatz zu den einschichtigen Membranen der Lipoproteine (HDL und LDL), aus einer Lipid-Doppelschicht, die der Plasmamembran einer Zelle ähnelt

(Zaborowski *et al.* 2015, Laulagnier *et al.* 2004). EVs sind mit Cholesterol, Phosphatidylserin, Sphingomyelin, Glycosphingolipiden und ungesättigten Fettsäuren angereichert, dies kann jedoch abhängig von der Ursprungszelle variieren (Elsharkasy *et al.* 2020). Proteomische Studien legen nahe, dass es eine EV-Kernproteinsignatur aus hochexprimierten vesikulären Proteinen gibt (Herrmann *et al.* 2021).

Prinzipiell kann auf Proteinebene zwischen zwei „Typen“ von Proteinen unterschieden werden. Den hochexprimierten, stark angereicherten und unabhängig von der Ursprungszelle exprimierten Proteinen, den „typischen“ EV-Proteinen und den Proteinkomponenten, welche die spezifische Herkunft aus der Ursprungszelle widerspiegeln (Doyle & Wang 2019, Mashouri *et al.* 2019, Mathivanan & Simpson 2010). Beispiele hierfür sind MHC-Klasse-I- und Klasse-II-Moleküle für antigenpräsentierende Zellen, Transferrinrezeptoren bei Retikulozyten, CD3 bei T-Zellen und die GluR2/3-Untereinheiten von Glutamat-Rezeptoren bei Neuronen. Auch Adhäsionsmoleküle wie CAMs, Integrine und Tetraspanine können zelltypspezifisch an der exosomalen Oberfläche exprimiert werden (van Niel *et al.* 2006). Zu den „klassischen“ EV-Markerproteinen zählen vor allem die Tetraspanine CD63, CD81 und CD9; Fusions- und Transferproteine wie Rab2, Rab7, Flotillin und Annexin; Hitzeschockproteine wie Hsc70 und Hsc90; Zytoskelettproteine wie Aktin, Myosin und Tubulin sowie Proteine wie Alix, die an der Biogenese beteiligt sind (Mashouri *et al.* 2019, van Niel *et al.* 2006). Die meisten EVs werden biochemisch durch das Vorhandensein dieser „klassischen“ EV-Markerproteine identifiziert. Insbesondere CD9, CD63 und CD81 sind die am häufigsten verwendeten Markerproteine (Théry *et al.* 2018). Doch selbst bezüglich dieser Marker gibt es bekannte Kontroversen. In einer Studie waren CD9 und CD81 konsistente EV-Marker, während die Expression von CD63 je nach Zelllinie variierte (Yoshioka *et al.* 2013).

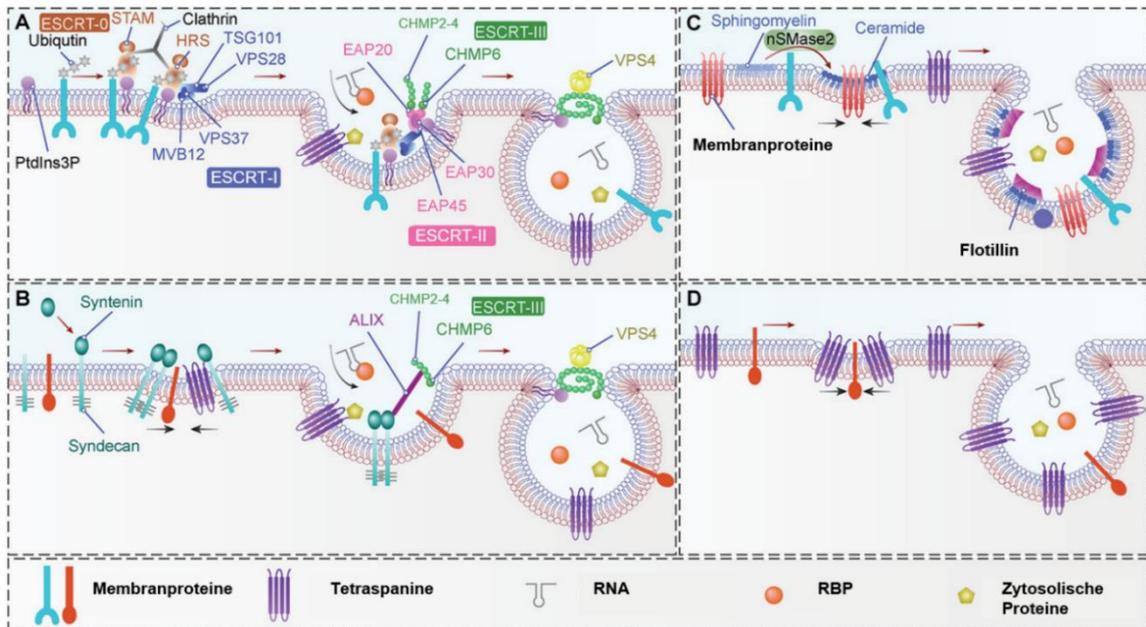
Des Weiteren können EVs DNA beinhalten, was in einigen Studien gezeigt werden konnte (Guescini *et al.* 2010, Balaj *et al.* 2011, Kahlert *et al.* 2014, Thakur *et al.* 2014). Die Größe der DNA scheint jedoch auf 0,1 bis 2,5 Kilobasenpaare beschränkt zu sein (Thakur *et al.* 2014). Außerdem bleibt die funktionelle Bedeutung nach wie vor unbekannt (Zaborowski *et al.* 2015). Durch die vermehrte Nutzung von RNA-Seq-Daten konnten verschiedene RNA-Populationen in EVs detektiert werden, darunter mRNAs, noncoding RNAs einschließlich miRNAs, lncRNAs, snoRNAs, tRNAs, rRNAs, piRNAs und circRNAs (Preußner *et al.* 2018, Nolte-'t Hoen *et al.* 2012, Turchinovich *et al.* 2019, O'Brien *et al.* 2020). RNAs können nach dem EV-vermittelten Transport entweder translatiert werden oder regulatorische Funktionen ausüben (Zomer *et al.* 2015, Vojtech *et al.* 2014, Valadi *et al.* 2007).

### 3.3 Biogenese von Exosomen und Mikrovesikeln

Bei der Entstehung von Exosomen kann zwischen ESCRT-abhängigen und ESCRT-unabhängigen Mechanismen unterschieden werden. Bei den ESCRT-Komplexen (*endosomal sorting complexes required for transport*) (Fernandez-Trillo *et al.* 2016) handelt es sich um vier Komplexe (ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II und ESCRT-III), die jeweils aus verschiedenen Untereinheiten bestehen (Qui *et al.* 2021). Mit Hilfe weiterer akzessorischer Proteine sind sie an der Membranformung und Invagination und somit der Bildung des multivesikulären Endosoms (MVE) beteiligt (van Niel *et al.* 2018).

Die ESCRT-Maschinerie agiert dabei schrittweise (siehe **Abbildung 2A**), durch die Aktivierung des *hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate* (HRS), durch Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PtdIns3P), kommt es zur Anlagerung von ESCRT-0 an die endosomale Membran. Anschließend rekrutiert HRS Clathrin, was zum Clustering der Membran in Mikrodomänen führt. Des Weiteren bindet HRS ubiquitinierte Proteine, was essentiell für die Sortierung der Proteine in die Mikrodomänen ist (Teng & Fussenegger 2020, Qui *et al.* 2021, van Niel *et al.* 2018, Zhang *et al.* 2019, Reiners *et al.* 2017). Durch direkte Interaktion von HRS (ESCRT-0) und TSG101 (ESCRT-I) kommt es zur Rekrutierung des ESCRT-I-Komplexes an die endosomale Membran. Die weitere Interaktion zwischen dem ESCRT-I- und ESCRT-II-Komplex ist für die Sortierung der Proteine in den MVE und die Invagination der endosomalen Membran wichtig, sie wird durch VPS28 (ESCRT-I) und EAP45 (ESCRT-II) angeregt (Qui *et al.* 2021). Der ESCRT-III-Komplex wird durch den ESCRT-II-Komplex rekrutiert, durch direkte Bindung von CHMP6 (ESCRT-III) an EAP20 (ESCRT-II). Für die Abschnürung der intraluminalen Vesikel (ILVs) in das Lumen des MVEs wird ESCRT-III benötigt (Reiners *et al.* 2017, Teng & Fussenegger 2020). Anschließend wird der ESCRT-III-Komplex, unterstützt durch die ATPase VPS4, recycelt (Teng & Fussenegger 2020). Durch die Interaktion mit dem Zytoskelett und kleinen GTPasen (Rab-Proteine) wird der MVE zur Plasmamembran transportiert (Teng & Fussenegger 2020). Die anschließende Fusion des MVEs mit der Plasmamembran wird durch SNARE-Proteine (*soluble NSF attachment receptor*) initiiert, wodurch die ILVs als Exosomen in den extrazellulären Raum freigesetzt werden (Teng & Fussenegger 2020, Qui *et al.* 2021).

Neuere Erkenntnisse haben gezeigt, dass es neben dem klassischen ESCRT-abhängigen auch ESCRT-unabhängige Mechanismen geben muss, die an der MVE-Bildung beteiligt sind, da die gleichzeitige Hemmung von ESCRT-Komplexen die MVE-Bildung nicht aufhebt (Teng & Fussenegger 2020). Ein Beispiel dafür ist der Syndecan-Synthenin-Alix *pathway* (siehe **Abbildung 2B**), welcher unabhängig von ESCRT-0, ESCRT-I und ESCRT-II ist, jedoch ESCRT-III benötigt. Hierbei rekrutiert das Transmembranprotein Syndecan Synthenin, welches mit Alix interagiert, was die Bildung von ILVs und das Sortieren von Proteinen in die ILVs unterstützt. Zur



**Abbildung 2. Mechanismen der Biogenese von Exosomen**

**A)** Beim „klassischen“ ESCRT-abhängigen Mechanismus werden ubiquitinierte Proteine in der endosomalen Membran von ESCRT-0 erkannt, das durch die Bindung von PtdIns3P an die endosomale Membran rekrutiert wird, die durch anschließende Clathrin-Bindung in Mikrodomänen geclustert wird. Anschließend werden ESCRT-0, ESCRT-I und ESCRT-II kaskadenartig rekrutiert, wodurch die koordinierte Invagination der endosomalen Membran eingeleitet und die Proteine innerhalb der Einstülpung fixiert werden. ESCRT-III wird für die Abschnürung der ILVs rekrutiert und anschließend durch VPS4 abgebaut.

**B)** Bei dem Syndecan-Syntenin-Alix-Mechanismus findet die ILV-Bildung unabhängig von Ubiquitin, ESCRT-0, ESCRT-I und ESCRT-II statt. ESCRT-III und VPS4 sind jedoch für den Abspaltungsschritt erforderlich.

**C)** Bei dem Ceramid-abhängigen Mechanismus wird durch nSMase2 aus Sphingomyelin Ceramid gebildet. Dadurch können sich Lipid Raft-Mikrodomänen bilden, die die Entstehung von ILVs begünstigen.

**D)** CD63 spielt eine entscheidende Rolle im ESCRT-unabhängigen Weg der ILV-Biogenese. CD63 kann mit Tetraspaninen angereicherte Mikrodomänen bilden, die die Entstehung von ILVs in MVEs begünstigen. Abkürzungen: MVE = multivesikuläres Endosom, ILV = intraluminaler Vesikel, ESCRT = endosomal sorting complexes required for transport, PtdIns3P = Phosphatidylinositol-3-Phosphat, STAM = signal transducing adapter molecule, HRS = hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate, TSG101 = tumor susceptibility gene 101 protein, VPS (EAP) = vacuolar protein sorting, MVB12 = multivesicular body subunit 12, CHMP = charged multivesicular body protein, Alix = ALG-2 interacting protein X, nSMase2 = neutrale Sphingomyelinase 2 (Teng & Fassneger 2020, Abbildung modifiziert).

Abschnürung der ILVs in das endosomale Lumen werden der ESCRT-III-Komplex sowie VPS4 benötigt (Teng & Fassneger 2020). Des Weiteren können Ceramide, die durch die neutrale Sphingomyelinase 2 (nSMase2) aus Sphingomyelin gebildet werden, Mikrodomänen (Lipid Rafts) bilden, die die Entstehung von ILVs in MVEs auslösen können (siehe **Abbildung 2C** und Trajkovic *et al.* 2008, Teng & Fassneger 2020). Ein weiterer ESCRT-unabhängiger Weg kann durch Tetraspanine initiiert werden (siehe **Abbildung 2D**), ohne dass eine Ubiquitinierung, ESCRT-Komplexe oder Ceramide erforderlich sind. CD63 kann Mikrodomänen bilden, die mit

Tetraspaninen angereichert sind, welche die Entstehung von ILVs sowie die endosomale Sortierung von Proteinen in MVEs begünstigen (van Niel *et al.* 2011, Teng & Fussenegger 2020).

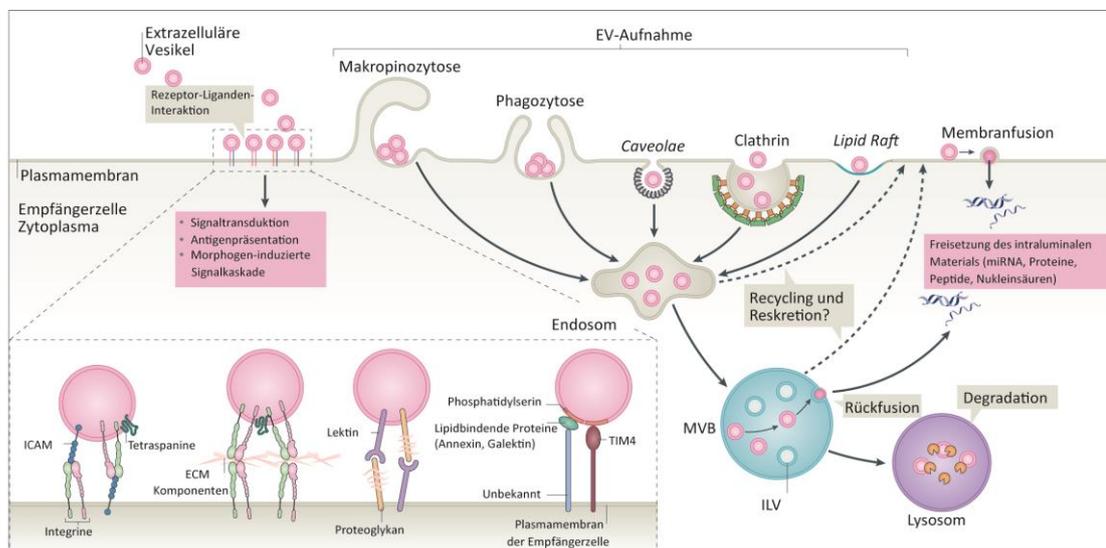
Im Gegensatz zu Exosomen werden Mikrovesikel direkt von der Plasmamembran durch Ausstülpung und Abschnürung in den extrazellulären Raum freigesetzt (Mentkowski *et al.* 2018). Bei der Biogenese kommt es zu molekularen Umstrukturierungen innerhalb der Plasmamembran, einschließlich Veränderungen der Lipidkomponenten und der Proteinzusammensetzung sowie einer Veränderung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels. Reguliert wird die Umstrukturierung durch  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige enzymatische Mechanismen, einschließlich Aminophospholipid-Translokasen (Flippasen und Floppasen), Scramblasen und Calpain. Die Umstrukturierung der Membranphospholipide (Translokation von Phosphatidylserin an die Oberfläche der Plasmamembran) führt zur Biegung der Membran und zur Neustrukturierung des Aktin-Zytoskeletts, das die Abschnürung der Membran und somit die Bildung von Mikrovesikeln begünstigt (van Niel *et al.* 2018, Mentkowski *et al.* 2018).

### 3.4 EV-Aufnahme an der Empfängerzelle

Nach der Freisetzung von EVs in den extrazellulären Raum können sie mit Empfängerzellen interagieren, in dem sie an Oberflächenrezeptoren binden oder indem sie ihre „Fracht“ (Proteine, Nukleinsäuren etc.) ins Zytoplasma freisetzen. Dies kann nachgeschaltete Signalkaskaden auslösen, die die Zielzelle aktivieren oder zu Veränderungen in molekularen Prozessen führen, die den physiologischen oder pathophysiologischen Zustand der Zelle verändern können (Kwok *et al.* 2021, Gurung *et al.* 2021). Die zellulären und molekularen Mechanismen der Aufnahme von EVs in ihre Zielzellen sind noch nicht vollständig verstanden. Es wird angenommen, dass die EV-Aufnahme entweder durch Clathrin-vermittelte Endozytose (Tian *et al.* 2014), Makropinozytose (Tian *et al.* 2014), Phagozytose (Feng *et al.* 2010), Caveolae-vermittelte Endozytose (Nanbo *et al.* 2013), *Lipid Rafts* (Svensson *et al.* 2013) oder direkte Membranfusion (Jiang *et al.* 2017) geschieht.

Darüber hinaus wurden Rezeptor-vermittelte Mechanismen beschrieben, die Membranaußenkomponenten wie Tetraspanine (Rana *et al.* 2012), Lektine und Proteoglykane (Shimoda *et al.* 2017) sowie Integrine (Fuentes *et al.* 2020) für die EV-Internalisierung oder das Andocken an die Zelloberfläche benötigen (siehe **Abbildung 3** und Kwok *et al.* 2021). Des Weiteren wird vermutet, dass auch zellspezifische Rezeptoren wie zum Beispiel TIM4 (T-Zell-Immunglobulin-Mucin-Rezeptoren) an der Bindung von Phosphatidylserin beteiligt sind, die an der EV-Oberfläche exprimiert werden (Miyanishi *et al.* 2007, van Niel *et al.* 2018). Das weitere Schicksal des aufgenommenen Vesikels kann durch die Zusammensetzung seiner „Fracht“

bestimmt werden. Die meisten EVs werden nach ihrer Aufnahme dem endozytären Weg zugeführt und größtenteils durch das Lysosom abgebaut. Es ist aber auch möglich, dass EVs dem Abbau entgehen und ihren Inhalt in das Zytoplasma der Empfängerzelle entlassen (van Niel *et al.* 2018).



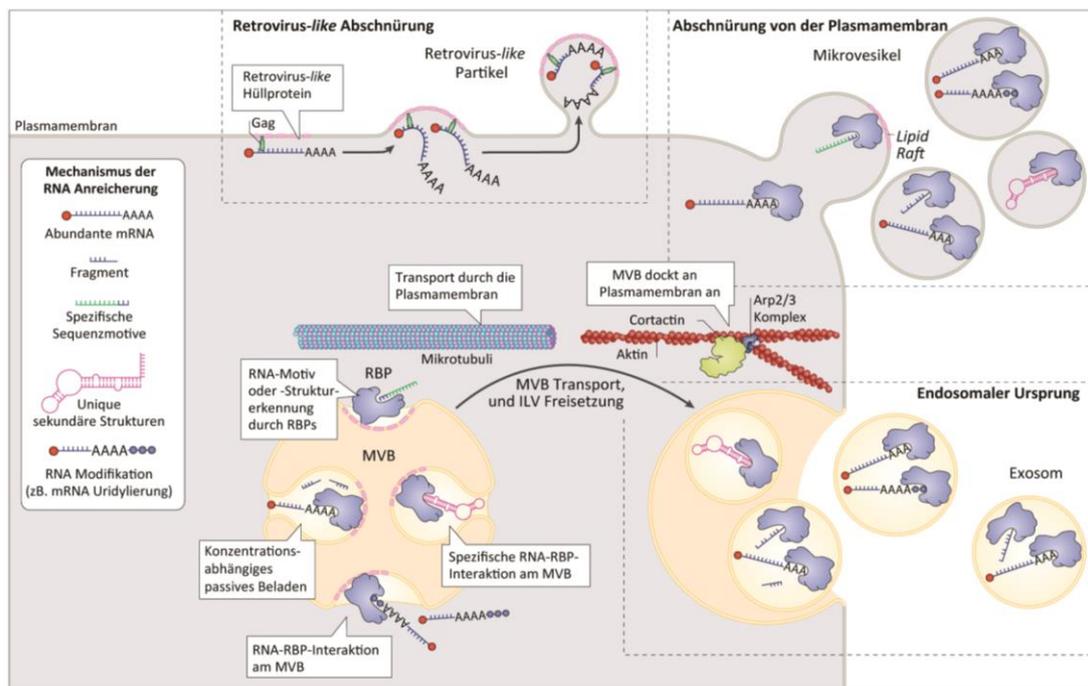
**Abbildung 3. Aufnahme von extrazellulären Vesikeln an der Zielzelle**

EVs können, je nach Zelltyp, durch verschiedene Mechanismen die Empfängerzelle beeinflussen. Dies kann indirekt durch Bindung an Oberflächenproteine (z.B. Integrine, Tetraspanine, Lektine oder Proteoglykane) durch Initiation verschiedener Signalkaskaden geschehen oder durch die direkte Aufnahme von EVs durch verschiedene Mechanismen wie Makropinozytose, Phagozytose, Caveolae-vermittelte Endozytose, Clathrin-vermittelte Endozytose, Lipid Rafts oder durch direkte Membranfusion an der Plasmamembran. Nach der Fusion können die EVs entweder in das multivesikuläre Endosom (MVEs) gelangen, wodurch sich die EVs mit endogenen intraluminalen Vesikeln (ILVs) vermischen und durch anschließende Fusion des MVEs mit dem Lysosom abgebaut werden oder EVs können ihre „Fracht“ ins Zytoplasma freisetzen und somit funktionelle Prozesse in der Zielzelle induzieren (van Niel *et al.* 2018, Abbildung modifiziert).

Neben dem genauen Mechanismus der EV-Aufnahme ist auch der Mechanismus des spezifischen, gezielten Ansteuerns der EVs an ihre Empfängerzellen noch weitestgehend unklar. Einige Daten weisen darauf hin, dass Integrine, die sich auf der EV-Oberfläche befinden mit Adhäsionsmolekülen (z.B. ICAM), die sich auf der Plasmamembran der Empfängerzelle befinden, interagieren können (Morelli *et al.* 2004). Darüber hinaus scheint die Interaktion von Integrinen mit extrazellulären Matrixproteinen (z.B. Fibronektin) eine wichtige Rolle in der Bindung von EVs an die Empfängerzelle zu spielen (Purushothaman *et al.* 2016). Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung an Heparansulfat-Proteoglykanen die Aufnahme von EVs aus Tumoren erhöht (Christianson *et al.* 2013). Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass spezifische Integrinrezeptoren die selektive Aufnahme von EVs in bestimmte Primärtumore steuern können (Hurwitz *et al.* 2019).

### 3.5 Spezifisches Beladen von RNAs in EVs

Die molekularen Mechanismen, die zur selektiven Beladung von EVs mit RNAs führen, sind nach wie vor noch nicht vollständig verstanden. Die vermehrte Anreicherung von kleinen nicht-kodierenden RNAs sowie die asymmetrische quantitative Verteilung der RNAs zwischen den Ursprungszellen und ihren freigesetzten EVs deuteten darauf hin, dass die Sortierung von RNAs in EVs ein aktiver, selektiver Prozess ist (Baglio *et al.* 2015, O'Brien *et al.* 2020, Chiou *et al.* 2018, Ragusa *et al.* 2017, Qui *et al.* 2021).



**Abbildung 4. Mechanismen des selektiven Verpackens von RNAs in EVs**

Dargestellt sind Mechanismen, die das spezifische Verpacken von RNAs in EVs regulieren. Zum einen können RNAs gezielt an die Plasmamembran gebracht werden, wo sie durch Ausstülpung der Plasmamembran innerhalb eines Mikrovesikels freigesetzt werden. Zum anderen können sich RNAs aufgrund von erhöhten RNA-Konzentrationen im Zytosol oder durch Erkennung von RNA-bindenden Proteinen (durch Sequenzmotive, sekundäre RNA-Strukturen oder spezifische Modifikationen) innerhalb des endosomalen Kompartiments befinden und so in intraluminalen Vesikeln (ILVs) des multivesikulären Körpers (MVB) eingebaut werden. Der MVB kann durch Komponenten des Zytoskeletts (Mikrotubuli) zur Plasmamembran gelenkt werden und an der Plasmamembran durch Arp2/3-generierte Aktinfilamente, die durch Cortactin stabilisiert werden, andocken. Die ILVs werden durch Fusion mit der Plasmamembran als Exosomen freigesetzt. Durch Membranmikrodomänen (Lipid Rafts) kann es zu einer Anreicherung von RNAs an der Membran kommen und somit zu einer anschließenden Verpackung in extrazelluläre Vesikel. Des Weiteren kann RNA von retroviralen Hüllproteinen wie Gag erkannt und gebunden werden, was zu einer virusähnlichen Partikelfreisetzung führt (O'Brien *et al.* 2020, Abbildung modifiziert).

Es ist inzwischen erwiesen, dass sich der Aktivierungs- und Differenzierungsstatus einer Zelle in den von ihr freigesetzten EV-assoziierten RNAs widerspiegelt und somit eine partielle transkriptomische Momentaufnahme des physiologischen oder pathologischen Status der sezernierenden Zellen darstellt (Mateescu *et al.* 2017). Eine Veränderung der miRNA-Profile von

EVs konnte bei Krebserkrankungen, Autoimmunerkrankungen, Asthma und Herz-Kreislauf-Erkrankungen beobachtet werden (Mateescu *et al.* 2017).

Der Prozess der RNA-Sortierung in EVs kann durch zwei molekulare Komponenten gesteuert werden: Zum einen den RNA-bindenden Proteinen (RBPs) und zum anderen den Membranproteinen, die an der EV-Biogenese beteiligt sind (siehe **Abbildung 4** und Wang *et al.* 2021, O'Brien *et al.* 2020).

Durch bioinformatische Analysen konnten angereicherte Motivsequenzen von miRNAs in EVs identifiziert werden. Diese Sequenzmotive (EXOMotifs) scheinen bei der Beladung von RNA in EVs eine regulierende Funktion auszuüben. Das heterogene Ribonukleoprotein A2B1 (hnRNPA2B1) bindet miRNAs spezifisch durch die Erkennung dieser Motive und steuert ihre Aufnahme in EVs. HnRNPA2B1 liegt in EVs sumoyliert vor, wodurch die Bindung von hnRNPA2B1 an die miRNAs kontrolliert wird (Villarroya-Beltri *et al.* 2013). Das heterogene nukleare Ribonukleoprotein U (hnRNPU) ist ein weiteres RNA-bindendes Protein, das durch die Bindung eines spezifischen Sequenzmotivs (AAMRUGCU) das Verpacken von miRNAs beeinflusst (im Besonderen miRNA 30c-5p) (Zietzer *et al.* 2020). Ein weiteres RNA-bindendes Protein, von dem angenommen wird, dass es die Sortierung von miRNAs in EVs vermittelt, ist SYNCRIP (hnRNPPQ). Durch die Erkennung des RNA-Motivs hEXO (GGCU/A) können miRNAs spezifisch in EVs verpackt werden (Santangelo *et al.* 2016). Des Weiteren konnte eine N-terminale RNA-Domäne (NURR) in SYNCRIP identifiziert werden, die das GG-Motiv innerhalb der hEXO-Sequenz erkennt (Hobor *et al.* 2018). Das RNA-bindende Protein Y-Box-1 (YBX1), ist ein weiteres gut beschriebenes RNA-Bindeprotein, das an der Sortierung von miR-223 und miR-133 in EVs beteiligt ist (Shurtleff *et al.* 2016, Shurtleff *et al.* 2017, Lin *et al.* 2019). Argonaute 2 (Ago2) ist ein RNA-bindendes Protein, das Teil des RNA-induzierten Silencing-Komplex (RISC) ist, der miRNAs und ihre Ziel-mRNA bindet und somit den Abbau der mRNA induziert oder die Translation hemmt. Die Anwesenheit von Ago2 in EVs ist umstritten und somit auch seine Rolle beim Verpacken von RNAs in EVs (Arroyo *et al.* 2011). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Sortierung von Ago2 in EVs durch MEK-ERK-Signale reguliert wird, die der Aktivierung von KRAS nachgeschaltet sind. Die Phosphorylierung von Ago2 an Serin387 hemmt spezifisch die Assoziation von Ago2 mit MVEs und vermindert so die Sekretion in EVs. Sowohl die Ago2-Konzentration als auch die Ago2-Phosphorylierung scheinen die Sekretion spezifischer miRNAs in EVs zu kontrollieren (McKenzie *et al.* 2016). Das Major Vault Protein (MVP) soll am Export des Tumorsuppressors (miR-193) in EVs aus Dickdarmkrebszellen beteiligt sein (Teng *et al.* 2017). Das Lupus La Protein ist für die Sortierung von miR-122 in EVs aus Brustkrebszelllinien verantwortlich, in dem es an ein UUUG-Motiv in der miR-122 bindet (Temoche-Diaz *et al.* 2019). Das ELAV-Protein HuR beschleunigt den EV-vermittelten Export von miRNAs (Mukherjee *et al.* 2016). Außerdem soll der Serin- und

Arginin-reiche Spleißfaktor 1 (SRSF1) an der Verpackung von RNA in EVs beteiligt sein (Xu *et al.* 2020).

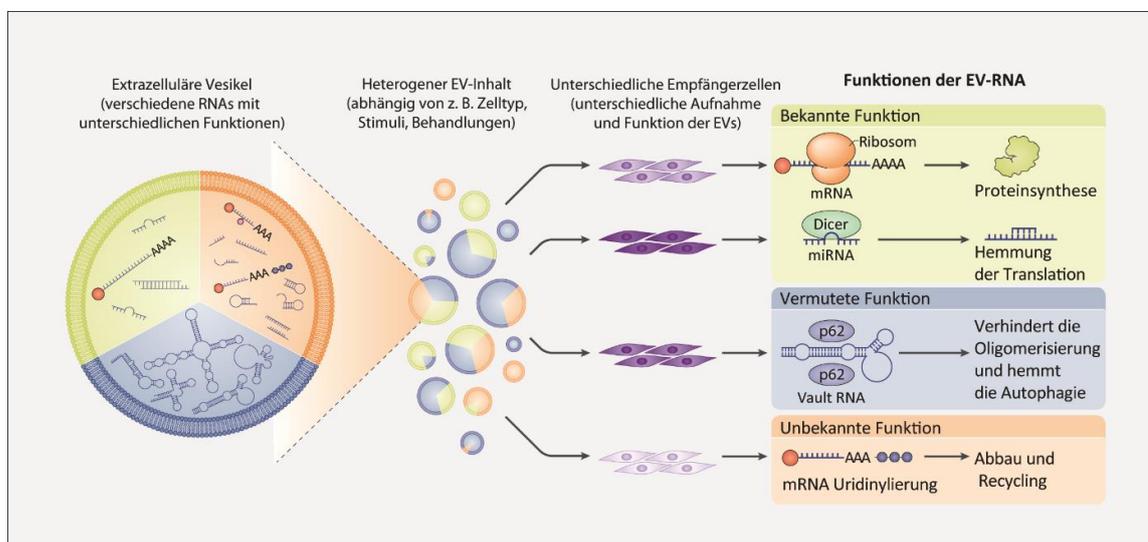
Des Weiteren scheinen posttranslationale Modifikationen von RBPs (Sumoylierung, Phosphorylierung sowie Ubiquitylierung) eine wichtige Rolle bei der EV-Beladung zu spielen (Fabbiano *et al.* 2020). Membranproteine, die mit der EV-Biogenese in Verbindung stehen, scheinen auch an der RNA-Sortierung in EVs beteiligt zu sein; darunter nSMase2 (neutrale Sphingomyelinase 2), VPS4a (*vacuolar protein sorting-associated protein 4A*), Alix (Iavello *et al.* 2016), Annexin A2 (ANXA2) (Hagiwara *et al.* 2015) und Caveolin-1 (Lee *et al.* 2019, Wang *et al.* 2021, Groot & Lee 2020). Außerdem scheint es, als könnten *Lipid Rafts*, Bereiche, die mit Cholesterin und Sphingolipiden angereichert sind, Nukleinsäuren spezifisch binden und somit das Verpacken in EVs begünstigen (Wang *et al.* 2021). Eine konzentrationsabhängige Verpackung konnte durch Squadrito *et al.* (2014) gezeigt werden. In der Studie hing die Verteilung von miRNAs in Makrophagen und deren freigesetzten Exosomen von den zellulären Ebenen ihrer Zieltranskripte ab.

Insgesamt deuten die Beobachtungen darauf hin, dass die RNA-Sortierung in EVs ein sehr komplexer Mechanismus ist, in dem RNA-bindende Proteine eine primäre Rolle einnehmen. Neben den aktiven Mechanismen, bei denen die Beladung auf der Erkennung von spezifischen Sequenzen von RNA-Molekülen beruht, gibt es scheinbar auch passive Prozesse, bei denen die Konzentration der RNA-Moleküle eine entscheidende Rolle spielt (Ragusa *et al.* 2017, Gámbaro *et al.* 2020).

### 3.6 EV-RNA und ihre möglichen Funktionen

Die Erkenntnis, dass EVs funktionelle RNA-Moleküle transportieren können, hat in den letzten Jahren dazu geführt, dass sich die Forschung mehr mit EV-RNA beschäftigt. Ausschlaggebend hierfür ist ihr potenzieller Einsatz in der Medizin. Die meisten Studien konzentrierten sich auf miRNAs, da sie als potenzielle Biomarker betrachtet werden (He *et al.* 2021, Yan *et al.* 2019, Mu *et al.* 2021, Go *et al.* 2020, Ozawa *et al.* 2020, Mizohata *et al.* 2021, Li *et al.* 2015). Jedoch ermöglichte das Aufkommen der RNA-Seq-Technologien die Analyse geringer RNA-Mengen, was dazu führte, dass in den letzten Jahren viele verschiedene RNA-Typen in EVs identifiziert wurden; darunter mRNAs, noncoding RNAs einschließlich miRNAs, lncRNAs, snoRNAs, snRNAs, tRNAs, rRNAs, piRNAs, vt RNAs und circRNAs (zusammengefasst in Turchinovich *et al.* 2019, O'Brien *et al.* 2020). Neben der Identifizierung der verschiedenen RNAs ist die Quantifizierung der mit EVs assoziierten RNAs entscheidend. Obwohl ein großes Interesse an EV-assoziierten miRNAs herrscht, konnten interessanterweise neue quantitative Studien zeigen, dass miRNAs in EVs relativ selten sind (im Bereich zwischen 0,0001 und 0,1 RNA-Molekülen pro EV) (Chevillet *et*

al. 2014, Wei *et al.* 2017, Albanese *et al.* 2021). Dass miRNAs in EVs angereichert sind, wurde lange angenommen, da zirkulierende miRNAs extrem stabil und resistent gegenüber RNasen sind und sie in EV-Präparaten häufig nachgewiesen wurden (Wang *et al.* 2010). Mittlerweile konnte festgestellt werden, dass sie überwiegend mit RNA-bindenden Proteinen wie Ago2 assoziiert sind, was die miRNAs vor dem Abbau durch RNasen schützt (Arroyo *et al.* 2011, Turchinovich *et al.* 2011, Chevillet *et al.* 2014). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass auch mRNAs nur in geringem Maße mit EVs assoziiert sind. Im Gegensatz dazu sind andere RNAs, insbesondere solche, die von der RNA-Polymerase III transkribiert werden, wie z.B. Y-RNAs und tRNA(-Fragmente) anscheinend reichlicher in EVs vorhanden. Gleiches gilt für snRNAs und rRNA-Fragmente (Wei *et al.* 2017).



**Abbildung 5. Mögliche Funktionen von EV-RNA**

Die Funktionen von EV-RNA lassen sich in drei Gruppen einteilen: Bekannte Funktionen wie z.B. bei mRNAs, miRNAs (gelb), vermutete Funktionen z.B. für vt RNAs (blau) und unbekannte Funktionen wie z.B. für fragmentierte/ abgebaute (methylierte und uridylierte) mRNA-Moleküle (orange). Welche Funktion die verschiedenen EV-RNA-Typen in ihrer Empfängerzellen ausüben können, hängt von der Zusammensetzung der EVs ab sowie der Fähigkeit des Erkennens und der Aufnahme in die Empfängerzelle (O'Brien *et al.* 2020, Abbildung modifiziert).

Da die Aufnahme von EVs über endosomale Mechanismen geschieht, stellt dies in Bezug auf den funktionellen Transfer von RNAs ein Problem dar, da eine wichtige Aufgabe dieses Weges darin besteht, die aufgenommenen EVs zum Lysosom zu transportieren und somit abzubauen. Die RNA muss diesem Mechanismus entfliehen, um ihre potentielle Funktion in der Zielzelle zu erfüllen (O'Brien *et al.* 2020). Die möglichen Funktionen von RNAs, die durch EVs transferiert wurden, lassen sich in drei Kategorien einteilen: Den bekannten Funktionen, den vermuteten Funktionen und den völlig unbekanntem Funktionen (O'Brien *et al.* 2020). Zu den bekannten Funktionen, gehören der Transfer von mRNAs, die für Proteine kodieren und die anschließend in der Empfängerzelle translatiert werden (Valadi *et al.* 2007, Skog *et al.* 2008) sowie die

regulatorischen Funktionen von miRNAs. Zum Beispiel können EVs aus Hirntumoren, die miR-19ab transportieren, die einen wichtigen Tumorsuppressor in Krebszellen hemmt und dadurch das Wachstum von Hirnmetastasen begünstigt (Zhang *et al.* 2015, zusammengefasst in O'Brien *et al.* 2020). Zu den vermuteten Funktionen gehört die Funktion der vt RNAs. Sie könnten wichtige Regulatoren der Autophagie sein, indem sie direkt an den intrazellulären Autophagie-Rezeptor Sequestosom 1 (p62) binden und somit die Oligomerisierung des Rezeptors und die Autophagie hemmen (Horos *et al.* 2019, zusammengefasst in O'Brien *et al.* 2020). Eine weitere vermutete Funktion ist die der EV-assoziierten Y RNAs, die über Toll-like-Rezeptor-Signale in die Regulation des Immunsystems involviert sind (Driedonks & Nolte-t' Hoen 2019). Zu den unbekanntenen Funktionen gehört die Funktion der mRNAs, die uridinyliert vorliegen. Es ist vorstellbar, dass sie abgebaut und recycelt werden (O'Brien *et al.* 2020).

### 3.7 Methoden zur Aufreinigung von EVs

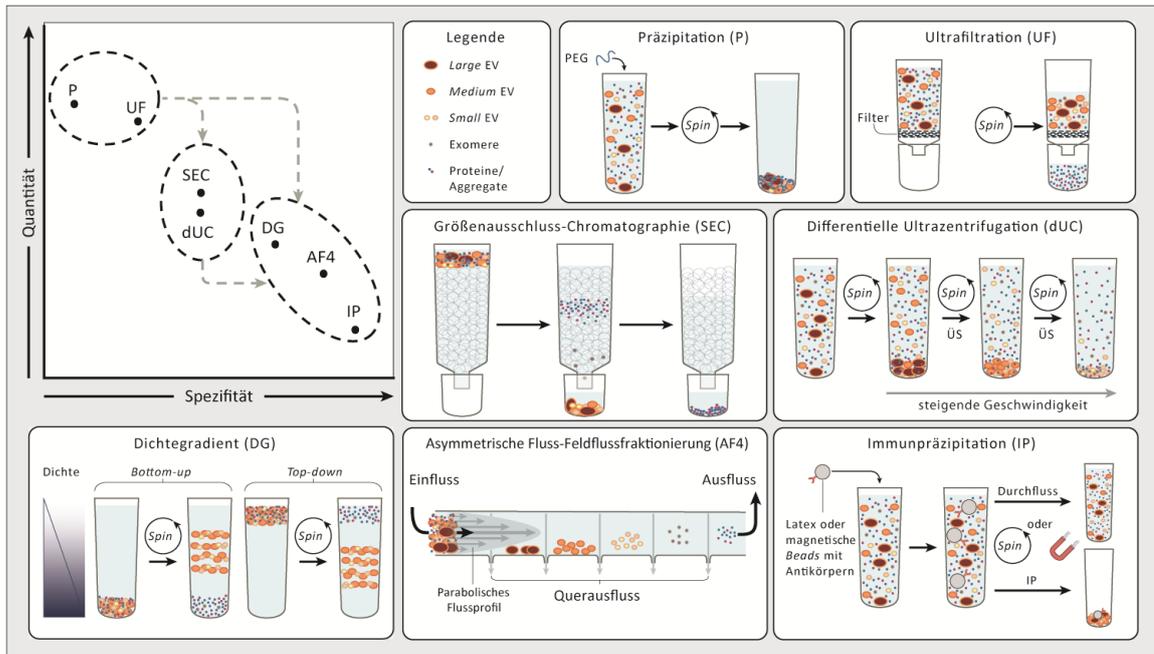
EVs können in verschiedenen Körperflüssigkeiten detektiert werden, darunter Blut (Blutserum & Blutplasma), Urin, Speichel, Muttermilch, Fruchtwasser, Aszites, Liquor, Sperma uvm. (Brennan *et al.* 2020, Konoshenko *et al.* 2018). Die verschiedenen Ausgangsflüssigkeiten als auch die sehr heterogene Beschaffenheit der EV-Subpopulationen, hinsichtlich Überschneidungen in Größe, Dichte und Markerproteinen, stellen eine große Herausforderung im Isolationsprozess dar (Brennan *et al.* 2020, Konoshenko *et al.* 2018, Mateescu *et al.* 2017). Neben den schon genannten Faktoren spielen auch Kontaminationen durch Lipoproteine (*High Density Lipoprotein*, *Low Density Lipoprotein*, *Intermediate Density Lipoprotein*, *Very Low Density Lipoprotein* und Chylomikronen) und Viren eine erhebliche Rolle im Isolationsprozess (Liangsupree *et al.* 2021). Eine Standardisierung in der Aufreinigung von EVs muss angestrebt werden, damit eine Vergleichbarkeit und zugleich eine robuste Reproduzierbarkeit der gewonnenen Daten möglich wird (Guerreiro *et al.* 2018, Konoshenko *et al.* 2018). Die derzeit gängigen Techniken zur Aufreinigung von EVs sind die differentielle Ultrazentrifugation (dUZ), die Größenausschluss-Chromatographie (SEC), die (Ultra)Filtration (UF), die polymerbasierte Präzipitation (P), die Immunpräzipitation (IP), der Dichtegradient (DG) sowie die asymmetrische Fluss-Feldflussfraktionierung (AF4) (Mateescu *et al.* 2017, Cocozza *et al.* 2020, Liangsupree *et al.* 2021).

Die differentielle Ultrazentrifugation (dUZ) ist eine der am häufigsten verwendeten Methoden. Nach einer Befragung der ISEV benutzen 81% der Mitglieder Ultrazentrifugation zur Aufreinigung von EVs (Gardiner *et al.* 2016). EVs, die eine Dichte von 1,13 - 1,19 g/ml aufweisen, werden durch die dUZ von anderen Probenbestandteilen getrennt. Begonnen wird mit einer

Zentrifugation im niedrigen Bereich zur Sedimentation von Zellen, gefolgt von Zentrifugationschritten zur Entfernung von Zelltrümmern, Aggregaten und apoptotischen Körperchen (engl. *apoptotic bodies*). Die im Überstand verbliebenen EVs werden anschließend durch Ultrazentrifugation bei  $>100.000 \times g$  sedimentiert (Konoshenko *et al.* 2018). Protein-Kontaminationen werden zum Teil durch Resuspendieren des entstandenen Pellets und anschließender wiederholter Ultrazentrifugation entfernt. Das wiederholte Zentrifugieren führt jedoch zu einer geringeren EV-Ausbeute, da EVs verloren gehen oder beschädigt werden (Brennan *et al.* 2020). Bei dieser Aufreinigungsmethode werden neben EVs auch Mikropartikel unterschiedlicher Größe und Zusammensetzung isoliert, darunter Viren, Lipoproteine und Proteinkomplexe (Gandham *et al.* 2020).

Die Größenausschluss-Chromatographie (SEC) trennt Makromoleküle auf der Grundlage ihrer Molekülgröße und ihres hydrodynamischen Volumens (Gandham *et al.* 2020, Liangsupree *et al.* 2021). Die chromatographische Trennung der Moleküle geschieht anhand einer porösen stationären Phase (z.B. Sephadex oder Sepharose), die die Moleküle, gelöst in einem geeigneten Lösungsmittel (mobile Phase), durchlaufen. Dadurch dass kleinere Moleküle häufiger in die Poren der Gelmatrix (stationären Phase) eindringen, während größere Moleküle in nur wenige Poren eindringen, werden die Moleküle entsprechend ihrer Größe geordnet und eluiert (Liangsupree *et al.* 2021). Die SEC ist eine einfache, robuste und skalierbare Methode zur Aufreinigung von EVs (Gandham *et al.* 2020). Das Vorhandensein von EVs in mehreren Fraktionen führt jedoch zu einer Verdünnung der Proben, die anschließend wieder aufkonzentriert werden müssen (Brennan *et al.* 2020). Des Weiteren ist die Co-Isolierung von anderen Lipoproteinen, die im selben Größenbereich wie EVs liegen, nicht vermeidbar (Liangsupree *et al.* 2021).

Die Filtration bzw. Ultrafiltration beruht auf der Verwendung von Membranen mit bestimmten Porendurchmessern bzw. Molekulargewichtsgrenzen zur Isolierung von Partikeln eines bestimmten Größenbereichs (Sidhom *et al.* 2020). Bei der Ultrafiltration werden poröse Membranen mit Molekulargewichtsgrenzen (MWCOs) von 3 bis 100 kDa verwendet, die Auftrennung geschieht durch einen Zentrifugationsschritt (Guerreiro *et al.* 2018, Konoshenko *et al.* 2018, Liangsupree *et al.* 2021). Sie ist eine schnelle EV-Isolationsmethode, hat jedoch den Nachteil von Proteinverunreinigungen und EV-Verlusten an der Membran sowie morphologischen Veränderungen der EVs (Liangsupree *et al.* 2021). Bei der Verwendung von Mikrofiltern zur EV-Isolation werden Filter mit absteigendem Porendurchmesser (0,8; 0,45; 0,22 und 0,1  $\mu\text{m}$ ) verwendet, wodurch einerseits eine hohe Reinheit erlangt wird, andererseits jedoch die EV-Ausbeute verringert wird (Konoshenko *et al.* 2018, Liangsupree *et al.* 2021).



**Abbildung 6. Darstellung der konventionellen Methoden zur Aufreinigung von extrazellulären Vesikeln**

Die polymerbasierte Präzipitation (P) basiert auf der Ausfällung von EVs durch Polyethylenglycol (PEG). Bei der Größenausschluss-Chromatographie (SEC) werden Moleküle anhand einer stationären Phase proportional ihrer Größe nach aufgetrennt. Die differenzielle Ultrazentrifugation (dUC) beruht auf der Trennung von Biomolekülen durch schrittweise Erhöhung der Beschleunigung. Beim Dichtegradienten werden EVs ihrer Dichte nach aufgetrennt. Die Immunpräzipitation (IP) beruht auf der Antikörperkopplung von exosomalen Oberflächenproteinen an Kügelchen (engl. Beads) und anschließender Bindung der EVs an die Beads. Bei der asymmetrischen Fluss-Feldflussfraktionierung (AF4) erfolgt die Auftrennung anhand von gegenläufigen Strömungen, die die Partikel in der Mitte des Kanals fokussieren. Anschließend wird die entgegengesetzte Strömung entfernt und die Partikel werden durch eine senkrechte Querströmung ihrer Größe nach aufgetrennt (Veziroglu & Mias 2020). Bei der Ultrafiltration (UF) wird ein Filter mit spezifischer Porengröße verwendet. Des Weiteren ist die Höhe der Spezifität/Quantität für die verschiedenen Isolationsmethoden in einem schematischen Diagramm dargestellt (Cocozza et al. 2020, Abbildung modifiziert).

Viele der kommerziell erhältlichen Kits zur Aufreinigung von EVs basieren auf der polymerbasierten Präzipitation (P). Bei der polymerbasierten Fällung werden Polymere verwendet, um die Löslichkeit von EVs, Proteinen sowie anderen Partikeln zu verringern, durch anschließende Zentrifugation mit niedriger Geschwindigkeit werden die EVs, Proteine und Partikel pelletiert. Generell führt die Methode zu einer hohen Ausbeute von EVs jedoch mit minderwertiger Qualität. Um dies zu vermeiden, ist die Kombination der PEG-basierten Isolierung mit anderen Techniken zu empfehlen (Brennan et al. 2020, Sidhom et al. 2020, Salmond et al. 2021).

Die immunaffinitätsbasierte Präzipitation (IP) beruht auf der Isolierung spezifischer Subpopulationen mittels Protein-Protein-Interaktion (Sidhom et al. 2020). Dabei werden Antikörper an eine stationäre Phase (z.B. Beads) gekoppelt, die spezifisch gegen EV-

Oberflächenproteine (z.B. CD9, CD63 und CD81) gerichtet sind (Konoshenko *et al.* 2018, Gandham *et al.* 2020). Ein Vorteil ist die hohe Spezifität der Methode, jedoch kann es durch unspezifische Bindungen, kompetitive Hemmung und Kreuzreaktivität der Antikörper zu Verunreinigungen kommen (Gandham *et al.* 2020). Des Weiteren kann die Freisetzung der EVs von der stationären Phase problematisch sein (Gandham *et al.* 2020).

Die Dichtegradientenzentrifugation kann dazu verwendet werden, die Co-Isolation von Proteinaggregaten, apoptotischen Körperchen und anderen nicht-exosomalen Partikel zu vermeiden. Sie ist ein Verfahren zur Trennung von Makromolekülen unterschiedlicher Dichten. Für die Herstellung des Dichtegradienten werden Lösungen mit steigenden Konzentrationen aus Saccharose oder Iodixanol übereinander geschichtet. Durch anschließende Ultrazentrifugation werden die auf den Gradienten geladenen Moleküle entsprechend ihrer Dichte aufgetrennt, was die Trennung der EV-Populationen von kontaminierenden Proteinen ermöglicht (Salmond *et al.* 2021, Konoshenko *et al.* 2018). Da die Trennung anhand der Dichte geschieht, werden Nicht-EV-Partikel mit ähnlicher Dichte mitisoliert (Brennan *et al.* 2020). Die Dichtegradientenzentrifugation gilt jedoch derzeit als eine der besten Methoden zur Isolation von EVs (Konoshenko *et al.* 2018).

Die asymmetrische Fluss-Feldflussfraktionierung (AF4) ist eine neue, schonende, größenbasierte Fraktionierungstechnik für die Auftrennung von EVs, bei der keine stationäre Phase benötigt wird (Gandham *et al.* 2020, Liangsupree *et al.* 2021). Das Funktionsprinzip basiert auf der Fokussierung von Partikeln durch zwei Ströme, die in entgegengesetzter Richtung, von der Einlass- und Auslassöffnung, in den Kanal gepumpt werden. Die größenbasierte Fraktionierung erfolgt durch eine senkrechte Querströmung zum parabolischen Strömungsprofil, das die EVs auf Grundlage ihrer hydrodynamischen Größe und Diffusionskoeffizienten an der Akkumulationswand auftrennt (Liangsupree *et al.* 2021, Gandham *et al.* 2020, Zhang & Lyden 2019).

Abschließend ist anzumerken, dass für die Isolierung von EVs zahlreiche Methoden verwendet werden können. Hierbei ist jedoch wichtig, dass die Methode abhängig des Ausgangsmaterials und des nachfolgenden Experiments sorgfältig ausgewählt wurde (Gardiner *et al.* 2016).

### **3.8 Methoden zur Charakterisierung von EVs**

Es ist von großer Bedeutung die isolierten EVs zu charakterisieren, da es während des Aufreinigungsprozesses, aufgrund von Überschneidungen in Dichte und Größe, zu Kontaminationen durch Lipoproteine kommen kann. Auch kleine Zellbestandteile und andere Mikropartikel können zu Verunreinigungen führen (Gandham *et al.* 2020). Neben der

Abschätzung der Reinheit kann auch durch die Detektion von Markerproteinen, in geringem Ausmaß, zwischen einzelnen Subpopulationen unterschieden werden (z.B. Exosomen, Mikrovesikeln, apoptotische Körperchen) (Carnino *et al.* 2019). Dabei gelten Western Blot, Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und Nanopartikel-Tracking-Analyse (NTA) als die am häufigsten verwendeten Methoden (Gardiner *et al.* 2016, Royo *et al.* 2020). Dabei wird Western Blot zur Detektion typischer EV-Markerproteine und zelltypspezifischen Markern verwendet. Die TEM wird zur Analyse der EV-Struktur, Integrität sowie Morphologie verwendet, während die NTA zur Quantifizierung und zur Bestimmung der Größenverteilung verwendet wird (Hartjes *et al.* 2019). Des Weiteren kann die Nano-Durchflusszytometrie (NanoFCM) zur Größenbestimmung und Detektion von EV-Markerproteinen eingesetzt werden.

Der Western Blot ist eine Methode zum Nachweis von Proteinen und wird meist verwendet, um das Vorhandensein von EV-assoziierten Proteinen (z.B. CD9, CD63, Alix, Tsg101) nachzuweisen. Gemäß den MISEV2018-Richtlinien sollten dabei mindestens ein mit der Plasmamembran assoziiertes Transmembranprotein (z.B. CD9, CD63, CD81), ein zytosolisches Protein (z.B. TSG101, Alix) sowie gegebenenfalls zelltypspezifische Marker detektiert werden. Des Weiteren empfiehlt die ISEV die zusätzliche Quantifizierung gängiger Proteinkontaminationen, abhängig vom Ausgangsmaterial, die häufig zusammen mit EVs isoliert werden (Théry *et al.* 2018).

Die Nanopartikel-Tracking-Analyse kann zur Bestimmung der Konzentration sowie der Größenverteilung verwendet werden. Die Methode beruht auf der Laserlichtstreuung oder emittierten Fluoreszenz sowie der Brown'schen Molekularbewegung von Partikel in einer flüssigen Suspension. Durch Detektion eines Mikroskops und der Aufzeichnung einer Videokamera wird die Bewegung der einzelnen Partikel verfolgt, was die Berechnung des theoretischen hydrodynamischen Durchmessers, durch Verwendung der Stokes-Einstein-Gleichung, erlaubt (Carnino *et al.* 2019, Gandham *et al.* 2020, Hartjes *et al.* 2019, Szatanek *et al.* 2017). Dabei kann jedoch nicht zwischen EVs und anderen Partikeln unterschieden werden (Carnino *et al.* 2019).

Die Transmissionselektronenmikroskopie ist ein bildgebendes Verfahren zur Identifizierung von Partikeln in einem Größenbereich von 0,2 nm - 1 µm (Mulisch & Welsch 2015, Gandham *et al.* 2020). Beim TEM wird anders als bei der Lichtmikroskopie ein Bild durch Elektroneninterferenz erzeugt, wobei ein Elektronenstrahl die Probe mit einer Wellenlänge durchquert, die drei Größenordnungen kleiner ist als die des sichtbaren Lichts (Szatanek *et al.* 2017). Die Messung geschieht im Vakuum, damit keine Luftmoleküle die Elektronen ablenken. Hierbei werden Beschleunigungsspannungen für biologische Materialien zwischen 80 kV und 120 kV verwendet. Damit die EV-Proben mikroskopiert werden können, müssen sie auf ein auf Formvar-/Kohle-

beschichtetes TEM-Grid gegeben, fixiert und mit Reagenzien wie z.B. Uranylacetat angefärbt werden (Gandham *et al.* 2020, Jung & Mun 2018). Zur Sichtbarmachung von EVs wird eine Negativkontrastierung, eines schweren Atoms wie Uran, welches Elektronen stärker streut als leichte Atome und somit den Kontrast erhöht, verwendet. Mit Hilfe der TEM kann die Morphologie, Größe und der Phänotyp von EVs bestimmt werden sowie die Bestimmung der Reinheit und die Differenzierung zu ähnlich großen Nicht-EV-Partikeln erfolgen (Carnino *et al.* 2019). Die Probenvorbereitung erschwert die Übertragung der beobachteten Strukturen auf die native Morphologie von EVs. Dennoch können Größe und Morphologie von EVs, trotz dieser Einschränkungen, erfolgreich zur Charakterisierung (*cup-shape* Form) verwendet werden (Hartjes *et al.* 2019). Zusätzlich kann eine Immungoldmarkierung verwendet werden, um EV-Markerproteine auf EVs sichtbar zu machen (Salmond *et al.* 2021). Es kann neben der TEM auch die Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie oder die Rasterelektronenmikroskopie zur bildlichen Darstellung von EVs verwendet werden (Jung & Mun 2018).

Die Nano-Durchflusszytometrie ist in der Lage, Partikel mit einer Größe > 40 nm zu detektieren (Vogel *et al.* 2021). Die Technik basiert im Gegensatz zu der konventionellen Durchflusszytometrie auf einem reduzierten Probenvolumen, welches in eine sich verjüngende Kapillare injiziert und hydrodynamisch durch einen niedrigen Druck mittels der so genannten Mantelflüssigkeit fokussiert wird. Anschließend durchläuft die Probe einen fokussierten Laser (Arab *et al.* 2021, Zhu *et al.* 2014, NanoFCM 2021). Die nanoFCM kann zur Bestimmung der Größe oder zur Detektion von Oberflächenproteinen auf EVs verwendet werden, indem entweder die Lichtstreuung (SSC) oder die Fluoreszenz der Probenpartikel gemessen wird. Die Proben können hierfür unter anderem mit fluoreszierenden Antikörpern gegen Oberflächenmarker wie z.B. die für EVs typischen Tetraspanine CD63, CD81 oder CD9 markiert werden (Gandham *et al.* 2020).

Neben den oben beschriebenen Methoden zur „äußerlichen“ Charakterisierung kann auch die detaillierte Zusammensetzung der transportierten Moleküle (Proteine, Lipide und Nukleinsäuren) zur Charakterisierung verwendet werden (z.B. mittels RNA-Sequenzierung, Massenspektrometrie etc.) (Gandham *et al.* 2020).

### 3.9 EVs in der therapeutischen Anwendung

Aufgrund ihrer Funktion in der Zell-Zellkommunikation bieten EVs vielversprechende Möglichkeiten in der medizinischen Anwendung. Die derzeit diskutierten Anwendungsbereiche sind: Die regenerative Medizin, in der EVs gezielt eingesetzt werden, um die Geweberegeneration zu verbessern sowie die Immunantwort zu modellieren; die Diagnostik,

bei der EVs als Biomarker fungieren können, um Krankheiten frühzeitig zu diagnostizieren; ihr Einsatz als neuartiges Transportsystem von Medikamenten sowie ihr Einsatz im Bereich der Immunisierung gegen verschiedene Krankheiten u.a. COVID-19.

EVs bzw. Exosomen, gewonnen aus mesenchymalen Stammzellen (engl. *mesenchymal stem cells*; MSC), scheinen in der therapeutischen Anwendung einen ähnlich starken positiven Effekt wie die klassische Behandlung mit MSC zu erzielen (Doeppner *et al.* 2015). Es wird vermutet, dass der positive Effekt der Stammzelltherapie nicht über die Einwanderung der Zellen in das Gewebe erfolgt, sondern auf parakrine Weise geschieht (Börger *et al.* 2015). Dies konnte dadurch untermauert werden, dass auch MSC-konditionierte Medien einen positiven Effekt vermitteln (Ionescu *et al.* 2012). Nach genaueren Analysen konnte dieser positive Effekt kleinen Vesikeln (EVs) mit einer Größe von 50 - 100 nm zugeschrieben werden (Lai *et al.* 2010). MSC-EVs haben gegenüber MSC einige Vorteile. Sie können sich nicht teilen, deshalb besteht kein erhöhtes Risiko einer unkontrollierten Zellteilung. Aufgrund ihrer Größe von < 200 nm können sie steril gefiltert werden, die Lagerung gegenüber Zellen ist einfacher sowie die Etablierung einer hochskalierten EV-Produktion könnte in Zukunft realisierbar werden (Bauer & Giebel 2015, Börger *et al.* 2015). Der Einsatz von EVs in präklinischen Studien konnte zeigen, dass sie einen pro-regenerativen Effekt erzielen, in dem sie durch Modulation des Immunsystems bei verschiedenen Krankheiten wirken. Unter anderem konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit MSC-EVs nach einem Schlaganfall bei Nagetieren eine langfristige Neuroprotektion bewirkt, sie förderten die Neuroregeneration und modulierten die periphere Immunreaktion (Doeppner *et al.* 2015). In einer weiteren Studie wurden neun Tage alten Mäusen MSC-EVs verabreicht, die durch Hypoxie-Ischämie verursacht, eine neonatale Enzephalopathie entwickelten. Es konnte gezeigt werden, dass die MSC-EVs entzündungshemmend wirkten, regenerative Reaktionen förderten und wichtige Entwicklungsprozesse im verletzten neonatalen Gehirn verbesserten (Kaminski *et al.* 2020). Des Weiteren konnten signifikante Verbesserungen in feinmotorischen Funktionen bei Primaten mit einer kortikalen Verletzung erzielt werden, wahrscheinlich durch Verringerung der Entzündung und Förderung der kortikalen Plastizität (Moore *et al.* 2019, Go *et al.* 2020). Eine Verringerung der Neuroinflammation konnte auch bei Ratten gezeigt werden, die an einer Kontusions-Rückenmarksverletzung litten, und zwar über einen Zeitraum von bis zu zwei Wochen nach Verabreichung (Romanelli *et al.* 2019). In einer Studie von Ma *et al.* (2019) konnte die Regeneration und die funktionelle Erholung von Nerven bei Ratten gezeigt werden, die mit EVs aus humanen mesenchymalen Stammzellen aus der Nabelschnur (engl. *human umbilical cord mesenchymal stem cells*; hUCMSC) nach einer Nervendurchtrennung behandelt wurden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass durch die Verabreichung von hUCMSC-EVs bei Mäusen

die Heilung von Rückenmarksverletzungen durch die Herunterregulierung von Entzündungszytokinen wie TNF- $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$ , IL-6 und IFN- $\gamma$  begünstigt wurde (Sun *et al.* 2018). Sogar der potentielle Einsatz von EVs aus MSC oder Thrombozyten zur Behandlung von COVID-19 Patienten wird diskutiert und in einzelnen Studien getestet (Börger *et al.* 2020, Leng *et al.* 2020, Karn *et al.* 2021).

Auch der Einsatz von EVs in der Diagnostik als potentielle Biomarker ist ein vielversprechender Bereich, da die von EVs transportierten Proteine, Lipide und Nukleinsäuren zum Teil den physiologischen Zustand ihrer Ursprungszelle widerspiegeln, können sie dafür genutzt werden, Krankheiten frühzeitig zu entdecken oder einen Krankheitsverlaufs zu bewerten (Kodam & Ullah 2021, Pang *et al.* 2020, Ciferri *et al.* 2021).

EVs als Transportsysteme für Medikamente einzusetzen, hat besondere Vorteile wie zum Beispiel Spezifität, Sicherheit und Stabilität. Des Weiteren können sie ihre Fracht über weite Strecken transportieren (Pedrioli *et al.* 2021). Da EVs der körpereigenen Produktion entspringen, führen sie zu geringen Immunreaktionen (Bunggulawa *et al.* 2018, Pedrioli *et al.* 2021). Ein weiterer Vorteil ist, dass sie die Blut-Hirn-Schranke überwinden können (Rufino-Ramos *et al.* 2017). Zurzeit verhindert die Blut-Hirn-Schranke das Eindringen ca. 100 % der großmolekularen Neurotherapeutika und mehr als 98 % aller kleinmolekularen Arzneimittel (Pardridge 2012, Pardridge 2005). Da viele neue Therapieansätze auf der Gabe von Proteinen und Nukleinsäuren basieren, die nach Verabreichung in den Körper jedoch sehr instabil sind, stellen EVs aufgrund ihrer natürlichen protektiven Eigenschaften ein potentielles Vehikel dar. Dennoch bleiben einige Wissenslücken, die vorher geschlossen werden müssen. Die genaue spezifische Zusammensetzung von EVs muss geklärt werden, das spezifische Beladen von den zu transportierenden Molekülen muss verbessert werden und die genaue Funktion sowie ihr Einfluss auf die Zielzellen muss abschließend geklärt werden, bevor sie standardmäßig als Transportsystem für Medikamente genutzt werden können (Ha *et al.* 2016, Rufino-Ramos *et al.* 2017).

Es ist bekannt, dass EVs eine starke Immunreaktion auslösen können, in dem sie Antigene auf ihrer Oberfläche präsentieren. Durch *EV-engineering* können EVs so manipuliert werden, dass sie virale Antigene präsentieren und so hohe, spezifische CD8(+)-T-Zell- und B-Zell-Reaktionen auslösen. Dabei können EVs durch zwei Strategien modifiziert werden. Zum einen können EVs direkt nach der Isolierung durch Elektroporation, Biokonjugation oder Click-Chemie modifiziert werden (*post-isolation engineering*) zum anderen durch die EV-produzierende Zelle (*parental cell-based engineering*) (Sabanovic *et al.* 2021, Jafari *et al.* 2020). Da EVs, wie oben erwähnt, eine hohe Biokompatibilität aufweisen, stellen sie eine sichere, flexible und effiziente Strategie

für die Entwicklung eines virusfreien Impfstoffs dar. Für potentielle Impfstoffe gegen COVID-19 werden z.B. SARS-CoV-2 Spike-Proteine auf der EV-Oberfläche exprimiert oder mRNAs, die virale Proteine kodieren, in EVs eingebracht (Sabanovic *et al.* 2021). Neben dem Einsatz für virale Infektionskrankheiten wird auch ihr Einsatz als Impfstoff in der Krebstherapie diskutiert (Santos *et al.* 2021).

Man kann davon ausgehen, dass EVs in Zukunft mehr und mehr in die Anwendung geraten, da präklinische Studien, einige wenige an Menschen (Kordelas *et al.* 2014), ein enormes therapeutisches Potenzial erahnen lassen (Bauer *et al.* 2015).

### 3.10 Zielsetzung der Arbeit

In den letzten Jahrzehnten wurde eine Vielzahl synthetischer Arzneimittelabgabesysteme entwickelt, insbesondere Lipid-Nanopartikel rückten durch die mRNA-Impfstoffentwicklung stark in den Fokus. Da die Anwendungen solcher synthetischer Systeme aufgrund von Ineffizienz, Zytotoxizität oder Immunogenität begrenzt sind (Hou *et al.* 2021), hat das Interesse an EVs als natürliche Wirkstoffträgersysteme stark zugenommen. Aufgrund ihrer Funktion in der Interzellulären Kommunikation und ihrer endogenen Herkunft besitzen EVs eine Reihe von Eigenschaften, die sie als vielversprechende Transportsysteme für die Verabreichung von Medikamenten qualifizieren könnten.

Ziel dieser Arbeit ist es, einen Beitrag zum Verständnis über das Beladen von RNA in EVs zu leisten sowie Charakteristika von EV-RNA zu identifizieren, um dem Ziel, EVs als Transportvehikel für RNA-basierte Arzneimittel und deren gezielten Verabreichung, näher zu kommen.

Das primäre Anfangsziel dieser Arbeit ist die Etablierung eines Isolationsprotokolls für EVs aus Zellkulturüberstand, welches EVs in ausreichender Menge und Qualität hervorbringt, um genug RNA im Anschluss aufzureinigen zu können. Deshalb werden zu Anfang verschiedene Isolationsmethoden, unter anderem Ultrazentrifugation, PEG-Präzipitation sowie Größenausschluss-Chromatographie getestet. Des Weiteren steht die Optimierung der Zellkulturbedingungen für die Isolation von EVs aus humanen Krebszelllinien im Vordergrund.

Anschließend folgt die Etablierung von Charakterisierungsmethoden gemäß *The first Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles* (MISEV), der Internationalen Gesellschaft für extrazelluläre Vesikel (ISEV), mittels Western Blots, Transmissionselektronenmikroskopie, Nano-Durchflusszytometrie (NanoFCM) und Nanopartikel-Tracking-Analyse (NTA).

Des Weiteren sollen EV-RNAs hinsichtlich spezifischer Eigenschaften, wie Sequenzmotiven, Größe, 5'-Modifikationen und Polyadenylierungsstatus charakterisiert werden. Da Untersuchungen von vorangegangenen Studien Protein-RNA-Interaktionen zeigten, die das spezifische Beladen von (mi)RNAs in EVs begünstigten (Villarroya-Beltri *et al.* 2013, Santangelo *et al.* 2016, Mukherjee *et al.* 2016, Shurtleff *et al.* 2017), soll ein *in vivo* SELEX zur Identifizierung von RNA-Motiven mit anschließender bioinformatischer Auswertung durchgeführt werden.

Um die in EVs enthaltenen RNAs näher zu charakterisieren, sollen Reporterkonstrukte entworfen werden, die zum einen RNAs mit verschiedenen Längen exprimieren und zum anderen RNAs mit verschiedenen Cap-Strukturen sowie mit/ohne Poly(A)-Schwanz. Diese Reporterkonstrukte sollen in Zellen transfiziert und anschließend die exprimierten RNAs in den isolierten EVs detektiert und quantifiziert werden, um eine Präferenz hinsichtlich der Größe, der 5'-Modifikation und des Polyadenylierungsstatus zu identifizieren. Des Weiteren sollen die in EVs vorhandenen RNA-Mengen absolut quantifiziert werden.

## 4 MATERIAL & METHODEN

### 4.1 Materialien

#### 4.1.1 Chemikalien

<i>Substanz</i>	<i>Hersteller</i>
Agarose	Carl Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	BioRad
Blocking Reagent	Roche
Borsäure	Carl Roth
Bromphenolblau	Merck
CDP-Star Chemilumineszenz Substrat	Sigma-Aldrich
Desoxynukleosidtriphosphat	Peqlab
DFHBI 1T	Sigma-Aldrich
Dimethylpyrocarbonat (DMPC)	Sigma-Aldrich
Ethanol	Carl Roth
Ethidiumbromid	Carl Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth
Glucosamin	Sigma-Aldrich
Glucose	Roche
Glycerol	Carl Roth
Glycin	Carl Roth
Hefeextrakt	Carl Roth
Isopropanol	Carl Roth
L-GLutamin	Sigma-Aldrich
L-Glutaminsäure	Sigma-Aldrich
L-Prolin	Sigma-Aldrich
L-Threonin	Sigma-Aldrich
Magnesiumchlorid	Merck
Maleinsäure	Carl Roth
Milchpulver	Carl Roth
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth
Natriumacetat anhydriert	Roche
Natriumchlorid	Carl Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth
Natriumhydroxid	Carl Roth

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:42:1)	Carl Roth
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Carl Roth
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung 10x (PBS)	Gibco, Thermo Fisher Scientific
Polyethylenglycol 6000 (PEG)	Merck
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth
SOC-Medium	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Biorad
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Carl Roth
Triton X-100	Carl Roth
TRIzol Reagent	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific
Trypton	Carl Roth
Tween® 20	Sigma-Aldrich
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich

#### 4.1.2 Kommerzielle Kits

<b>Produktname</b>	<b>Hersteller</b>
AMPure XP für die PCR-Aufreinigung	Beckmann Coulter
Bioanalyzer DNA High Sensitivity Kit	Agilent
Bioanalyzer Nano RNA Chip Kit	Agilent
Bioanalyzer Pico RNA Chip Kit	Agilent
DIG RNA labeling Mix	Roche
HiScribe T7 High Yield RNA Synthesis Kit	New England Biolabs
Luna® Universal qPCR Mastermix	New England Biolabs
Monarch DNA clean up Kit	New England Biolabs
Monarch RNA clean up Kit (50 µg und 500 µg)	New England Biolabs
Norgen total RNA purification Kit	Norgen Biotek Corp.
Plasmid Plus Maxi Kit	Qiagen
qEVoriginal / 70 nm SEC Columns	Izon Science
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
qScript cDNA Synthesis Kit	Quantabio
qScript Flex cDNA Synthesis Kit	Quantabio

<b>Produktname</b>	<b>Hersteller</b>
TurboFect™ Transfection Reagent	Thermo Fisher Scientific

#### 4.1.3 Enzyme und Puffer

<b>Produktname</b>	<b>Hersteller</b>
<i>Apal</i>	New England Biolabs
CutSmart® Buffer	New England Biolabs
NorthernMax™-Gly Sample Loading Dye	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific
<i>HindIII-HF</i>	New England Biolabs
<i>MluI</i>	New England Biolabs
RNase A	Qiagen
RNaseOUT	Thermo Fisher Scientific
T4 DNA Ligase	New England Biolabs
T4 DNA Ligase 10x Reaction Buffer	New England Biolabs
T7 RNA Polymerase (20 U/μL)	Thermo Fisher Scientific
T7 RNA Polymerase Buffer	Thermo Fisher Scientific
Taq-Polymerase	Laboreigene Herstellung
TURBO™ DNase	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific
TURBO™ DNase 10x Reaction Buffer	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific
<i>XbaI-HF</i>	New England Biolabs

#### 4.1.4 Plasmide

<b>Produktname</b>	<b>Hersteller</b>
pcDNA3 Vektor	Thermo Fisher Scientific

#### 4.1.5 Größenmarker

<b>Produktname</b>	<b>Hersteller</b>
GeneRuler DNA Ladder Mix	Thermo Fisher Scientific
PeqGOLD Protein-Marker IV	Peqlab

## 4.1.6 Antikörper

<b>Protein</b>	<b>Hersteller</b>
Alix, (EPR15314)	Abcam
Calnexin, (AF18)	Santa Cruz Biotechnology
CD63, (TS63)	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific
FITC-konjugierter anti-Human CD81, (TAPA-1)	Biolegend
FITC-konjugierter anti-Human CD9, (HI9a)	Biolegend
FITC-konjugierter Maus-IgG1, $\kappa$ (MOCP-21)	Biolegend
Flotillin-1 (Flot-1), (W16108A)	Biolegend
PE-konjugierter anti-Human CD63, (H5C6)	Biolegend
PE-konjugierter Maus-IgG2a, $\kappa$ (MOPC-173)	Biolegend

## 4.1.7 Zelllinien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
A549-Zellen	Zur Verfügung gestellt von Prof Dr. Hüttelmaier (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)
ES-2-Zellen	Zur Verfügung gestellt von Prof Dr. Hüttelmaier (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)
HEK293-Zellen	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Weber (Justus-Liebig-Universität Gießen)
HeLa-Zellen	Leibniz-Institut DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
HepG2-Zellen	Leibniz-Institut DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
U373-Zellen	Leibniz-Institut DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
<i>Trypanosoma brucei</i>	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Göringer (Technische Universität Darmstadt)

## 4.1.8 Zellkulturmedien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Konzentration</b>
CD 293 Medium	Gibco, Thermo Fisher Scientific	
DMEM	Gibco, Thermo Fisher Scientific	
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco, Thermo Fisher Scientific	
GlutaMAX™ 10x	Gibco, Thermo Fisher Scientific	
Trypsin-EDTA (0,05 %)	Gibco, Thermo Fisher Scientific	
SDM79-CGGGPPTA Powder	HyClone, Cytiva	
Hämin	Sigma-Aldrich	
SDM79-Medium (pH 7,3)	SDM79 Pulver	1 Box/5l
Sterilfiltration (0,22 µm)	Natriumhydrogencarbonat	10 g/5l
	Glucose	9,3 g/5l
	L-Glutamin	2,6 g/5l
	L-Prolin	3,1 g/5l
	Natriumpyruvat	0,5 g/5l
	L-Threonin	2,0 g/5l
	Natriumacetat anhydriert	52,5 mg/5l
	L-Glutaminsäure	112,1 mg/5l
	Glucosamin	0,25 mg/5l

#### 4.1.9 Verbrauchsmaterialien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller; Produktbezeichnung</b>
Detektionsfilm	GE Healthcare; Amersham Hyperfilm™ ECL
Filterpapier	Sigma-Aldrich; Whatman® filter paper
Kompetente Zellen	Thermo Fisher Scientific; One Shot TOP 10™ <i>E. coli</i>
Laborhandschuhe	Sarstedt
PCR-Streifen und -Deckel	Sarstedt
Pipettenspitzen	Sarstedt; Pipettenspitzen 10, 20, 200, 1250 µl
qPCR Abdeckfolie	VWR; Seal Optical Clear Films
qPCR Platten	VWR; 96-Well, Semi-Skirtes Plates
Reaktionsgefäß	Eppendorf; Safe Lock Tubes 1,5 ml, 2 ml
Spritzenfilter	ROTILABO® CME; sterile Spitzenfilter 0,22 und 0,45 µm
Sterile Pipetten	Greiner Bio-One; Pipetten 5, 10, 25, 50 ml
Transfektions-Reaktionsgefäß	Greiner Bio-One; Röhrchen, PP, 14 ml, 18 x 95 mm
Ultrafiltrationsfilter	Amicon; Ultra-15, PLGC Ultracel-PL Membran, 10 kDa
Ultra-Zentrifugationsröhrchen	Beckmann Coulter; Polycarbonate Thick Wall (13 x 56 mm; 3,2 ml)
Zellkulturflasche	Greiner Bio-One; CELLSTAR® Zellkulturflasche T175
Zellkulturschalen	Sarstedt; (100 x 20 mm/ 145 x 20 mm)
Zentrifugenröhrchen	Sarstedt; Falcon Tubes 15 ml, 50 ml

#### 4.1.10 Puffer, Gele und Lösungen

<b>Puffer, Gele, Lösungen</b>	<b>Komponenten</b>	<b>Konzentration</b>
Agarosegel	Agarose	2% (w/v)
	TBE 0,5x /MOPS 1x	200 ml
	Ethidiumbromid	1:20.000
Annealing-Puffer 2x	Tris (pH 7,5)	20 mM
	NaCl	100 mM
	EDTA	2 mM
DIG-Blocklösung	Blocking Reagent (Roche)	10 g
	Maleinsäure-Puffer	100 ml
DIG-Detektionspuffer (pH 9,5)	Tris/HCl	100 mM
	NaCl	100 mM
DIG-Waschpuffer	Tween® 20	0,3% (v/v)
	Maleinsäure-Puffer (pH 7,5)	siehe unten

<b>Puffer, Gele, Lösungen</b>	<b>Komponenten</b>	<b>Konzentration</b>
DMPC-H <sub>2</sub> O	Dimethylpyrocarbonat (DMPC) (2x autoklavieren)	1%
DNA-Ladepuffer 6x	TBE Glycerol Bromphenolblau	6x 30% (v/v) 0,25% (w/v)
LB-Medium	Hefeextrakt NaCl Trypton	5 g/l 10 g/l 10 g/l
Maleinsäure-Puffer (pH 7,5)	Maleinsäure NaCl	100 mM 150 mM
Milch-Blocklösung (Western Blot)	PBS-T (1x PBS mit 1% Tween® 20) Milchpulver	1x 5% (w/v)
MOPS-Puffer 10x	MOPS EDTA (pH 8,0) Natriumacetat	200 mM 10 mM 50 mM
PCR-Puffer 10x (pH 8,3)	Tris/HCl (pH 9,0) NaCl MgCl <sub>2</sub> Triton X-100	100 mM 500 mM 15 mM 1% (v/v)
SDS-Ladepuffer 2x	Tris/HCl (pH 6,8) SDS Bromphenolblau Glycerin 2-Mercaptoethanol	100 mM 4% (w/v) 0,2 mg/ml 20% (v/v) 5% (v/v)
SDS-Laufpuffer 10x	Glycin Tris SDS	192 mM 25 mM 0,1% (w/v)
SDS-Sammelgelpuffer 4x	Tris/HCl (pH 6,8) SDS	0,5 M 0,4% (w/v)
SDS-Trenngelpuffer 4x	Tris/HCl (pH 8,8) SDS	1,5 M 0,4% (w/v)
SSC-Waschpuffer 20x (pH 7,0)	NaCl Natriumcitrat	3 M 300 mM

<b>Puffer, Gele, Lösungen</b>	<b>Komponenten</b>	<b>Konzentration</b>
TBE-Puffer 1x	Tris	89 mM
	Borsäure	89 mM
	EDTA (pH 8,0)	2 mM

Tabelle 1. Pipettierschema für SDS-PAGE

	<b>Trenngel 10%</b>	<b>Sammelgel 6%</b>
Acrylamid (Rotiphorese®Gel 30)	2,6 ml	0,6 ml
Trenngelpuffer	2 ml	/
Sammelgelpuffer	/	1 ml
H <sub>2</sub> O	3,4 ml	2,4 ml
APS	1%	1%
TEMED	0,1%	0,1%
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>8 ml</b>	<b>4 ml</b>

## 4.1.11 Laborgeräte

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller; Produktbezeichnung</b>
Autoklav	Systemec; DB-23 Autoclave
Bioanalyser	Agilent; Bioanalyser 2100
Blotting-System	BioRad; Trans-Blot Turbo Transfer System
CO <sub>2</sub> -Inkubator	New Brunswick Scientific; Excella Eco-170 CO <sub>2</sub> Incubator
Entwicklermaschine	Agfa; Agfa Curix 60 Processing Machine
Fluorometer	Invitrogen; Qubit 2.0 Fluorometer
Fraktionierer	Izon Science; qEV Automatic Fraction Collector (AFC)
Geldokumentationssystem	Syngene; G:Box gel documentation
Gelkammer	BioRad; Subcell GT Agarose Gel System
Heizblock	Liebisch; Blockthermostat Liebisch 209
Inkubator	Binder GmbH; E. Classic Line
Mikroskop	Nikon; TMS Inverted Phase Contrast Microscope
NanoFCM	NanoFCM Co., Ltd; NanoAnalyzer
NanoSight	Malvern Instruments; NanoSight NS300
pH-Meter	Mettler Toledo; InLab Expert Pro-ISM pH meter
Pipetten	Eppendorf; Research Plus 10 µl
Pipetten	Gilson; Pipetman L P20L , P200L , P1000L
Pipettierhilfe	Hirschmann; Pipetus Pipet Filler
Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific; NanoDrop 1000 spectrophotometer
Sterilbank	Thermo Fisher Scientific; Sterilbank Safe 2020
Thermocycler	Applied Biosystems; Veriti Thermal Cycler
Thermocycler <i>real-time</i> PCR	Eppendorf; Realplex Mastercycler (Thermocycler)
Tischzentrifuge	Eppendorf; Centrifuge 5424
Tischzentrifuge mit Kühlung	Thermo Fisher Scientific; Heraeus Multifuge X1R Centrifuge
Ultrazentrifuge	Beckmann Coulter; Optima™ Max-XP Ultracentrifuge
Ultrazentrifugenrotor	Beckmann Coulter; TLA 100.4
Vortex	Scientific Industries; Vortex-Genie2
Zellzähler	ORFLO Technologies; Moxi Z Mini Automated Cell Counter

## 4.1.12 DNA-Oligonukleotide

Tabelle 2. qPCR-Primer

<b>Gen</b>	<b>Sequenz (5'-&gt;3')</b>
<i>ACTB fwd.</i>	CTGGAACGGTGAAGGTGACA
<i>ACTB rev.</i>	AAGGGACTTCCTGTAACAACGCA
<i>GAPDH fwd.</i>	TGCACCACCAACTGCTTAGC
<i>GAPDH rev.</i>	GGCATGGACTGTGGTCATGAG
<i>snRNA U1 rev.</i>	GCAGTCCCCCACTACCACAA
<i>snRNA U1 fwd.</i>	GCGAGGCTTATCCATTGCAC
<i>snRNA U6 fwd.</i>	CTCGCTTCGGCAGCACATA
<i>snRNA U6 rev.</i>	GCTTCACGAATTTGCGTGTCA
<i>Y1 RNA rev.</i>	GCAGTAGTGAGAAGGGGGGA
<i>Y1 RNA fwd.</i>	GGCTGGTCCGAAGGTAGTGA

Tabelle 3. Primer zur Herstellung der Northern Blot-Sonden

<b>Gen</b>	<b>Sequenz (5'-&gt;3')</b>
<i>GAPDH (1) fwd.</i>	ACAGTCAGCCGCATCTTCTT
<i>GAPDH (1) rev.</i>	TAATACGACTCACTATAGGGTGTGGTCATGAGTCCTTCCA
<i>GAPDH (2) fwd.</i>	ACCCAGAAGACTGTGGATGG
<i>GAPDH (2) rev.</i>	TAATACGACTCACTATAGGGAGGGGTCTACATGGCAACTG

Tabelle 4. DNA-Oligonukleotide für die Klonierung der SELEX-Konstrukte

<b>Name</b>	<b>Sequenz (5'→3')</b>
<i>U6-Promoter fwd. (MluI/ApaI)</i>	<u>ACGCGT</u> GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCAT ATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTAGAATTAATTTG ACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGA AAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGT TTTTAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTAT TTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAAA GCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTG TGCTGGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCG AGCATGCATCTAGAGGGCCTTTTTTTTGGGCC
<i>U6-Promoter rev. (MluI/ApaI)</i>	<u>GGGCC</u> CAAAAAAAGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCC GCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATCCAGCACACTGGCGG CCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTTTCGTCC TTCCACAAGATATATAAAGCCAAGAAATCGAAATACTTTCA AGTTACGGTAAGCATATGATAGTCCATTTTAAAACATAATTT TAAACTGCAACTACCCAAGAAATTATTACTTTCTACGTCA CGTATTTTGTACTAATATCTTTGTGTTTACAGTCAAATTAAT TCTAATTATCTCTCTAACAGCCTTGTATCGTATATGCAAATA TGAAGGAATCATGGGAAATAGGCCCTCACGCGT
<i>SELEX Insert</i>	<u>CCAAGCTT</u> GCGTCTCGAGCGTAGTTANNNNNNNNNNNNNNNN
<i>Pol III/U6-term &amp; Pol II/poly(A)</i> <i>(HindIII/XbaI)</i>	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNAGTCGGCATCTTGGTACT <u>CTAGAGG</u>
<i>Doppelstrang-Synthese fwd.</i>	CCAAGCTTGCCTCTCGAGCGTAG
<i>Doppelstrang-Synthese rev.</i>	CCTCTAGAGTACCAAGATGCCGAC
<i>SELEX Insert</i>	<u>CCAAGCTT</u> GCGTCTCGAGCGTAGTTANNNNNNNNNNNNNNNN
<i>Pol II/U1-3'box</i> <i>(HindIII/ApaI)</i>	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNAGTCGGCATCTTACTTTC TGGAGTTTCAAAGTAGACGGGCCCTATT
<i>Doppelstrang-Synthese fwd.</i>	CCAAGCTTGCCTCTCGAGCCGTAG
<i>Doppelstrang-Synthese rev.</i>	AATAGGGCCCGTCTACTTTTGA

Tabelle 5. PCR-Primer zur Detektion der SELEX-Konstrukte

<b>Name</b>	<b>Sequenz (5'→3')</b>
<i>SELEX-Pol II/U1-3'box fwd.</i>	TGCGTCTCGAGCGTAGTTA
<i>SELEX-Pol II/U1-3'box rev.</i>	AGAAAGTAAGATGCCGACT
<i>SELEX-Pol III/U6-term &amp; Pol II/poly(A) fwd.</i>	TGCGTCTCGAGCGTAGTT
<i>SELEX-Pol III/U6-term &amp; Pol II/poly(A) rev.</i>	AGTACCAAGATGCCGACT

Tabelle 6. Barcodes und Primer für die Herstellung der RNA-Seq-Library

<b>Name</b>	<b>Sequenz (5'→3')</b>
<i>Barcode #1</i>	CGGTCTCGGCATTCCCTGNNGGCANNNAGGCCCTCTAGAGTACCAAG ATG
<i>Barcode #2</i>	CGGTCTCGGCATTCCCTGNNCGTNNNAGGCCCTCTAGAGTACCAAG ATG
<i>Barcode #3</i>	CGGTCTCGGCATTCCCTGNNCGACNNNAGGCCCTCTAGAGTACCAAG ATG
<i>Barcode #4</i>	CGGTCTCGGCATTCCCTGNNATGANNNAGGCCCTCTAGAGTACCAAG ATG
<i>Barcode #5</i>	CGGTCTCGGCATTCCCTGNNATATNNNAGGCCCTCTAGAGTACCAAG ATG
<i>Barcode #9</i>	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGGTCTCGGCATTCCCTGNNCTT GNNNGCGTCTCGAGCGTAGTTA
<i>Barcode #17</i>	CGGTCTCGGCATTCCCTGNNAGGGNNNAAAGTAAGATGCCGACT
<i>Barcode #18</i>	CGGTCTCGGCATTCCCTGNNGCCGNNNAAAGTAAGATGCCGACT
<i>Barcode #19</i>	CGGTCTCGGCATTCCCTGNNTCGCNNNAAAGTAAGATGCCGACT
<i>Barcode #33</i>	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGGTCTCGGCATTCCCTGNNAAC TNNNGCGTCTCGAGCGTAGTTA
<i>SLX Sol. fwd.</i>	AATGATACGGCGACGTCCGAGATCTACTCTTTCCCTACACGACG CTCTTCCGATCTNNNNNGCTTGCCCTCTCGAGCGTAG
<i>SLX Sol. rev.</i>	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGGTCTCGGCATTCCCTG

Tabelle 7. DNA-Oligonukleotide für die Klonierung der Quantifizierungs-Konstrukte

<b>Name</b>	<b>Sequenz (5'-&gt;3')</b>
<i>Insert Pol III/U6-term fwd.</i> <i>(HindIII/XbaI)</i>	<u>AAGCTTTGCAATCGGATCGCACTTTTCTCTCTAATGACGTG</u> TTCTTGCCTCAGCTCGATTTCGGTAGCACCCGAGAGATTGTC <u>CCTTTCTAGA</u>
<i>Insert Pol III/U6-term rev.</i> <i>(XbaI/HindIII)</i>	<u>TCTAGAAAGGGACAATCTCTGCGGTGCTACCGAATCGAGCT</u> GAGGCAAGAACACGTCATTAGAGAGAAAAGTGCATCCGAT <u>TGCAAAGCTT</u>
<i>Insert Pol II/poly(A) fwd.</i> <i>(HindIII/XbaI)</i>	<u>AAGCTTCGGCTTCAGTTACTTCGCTTCTCTCTAATGACGTG</u> TTCTTGCCTCAGCTCGATTTCGGTAGGCTTGTTACAATTGGG <u>CGGATCTAGA</u>
<i>Insert Pol II/poly(A) rev.</i> <i>(XbaI/HindIII)</i>	<u>TCTAGATCCGCCCAATTGTAACAAGCCTACCGAATCGAGCT</u> GAGGCAAGAACACGTCATTAGAGAGAAGCGAAGTAACTGAA <u>GCCGAAGCTT</u>
<i>Insert Pol II/U1-3'box fwd.</i> <i>(HindIII/XbaI)</i>	<u>AAGCTTGTAGGAGGATAGCGGTTCGACCTCTCTAATGACGTG</u> TTCTTGCCTCAGCTCGATTTCGGTAGTAAAGCCTCGCAGTTC <u>CGAACTTTCTGGAGTTTCAAAGTAGACTCTAGA</u>
<i>Insert Pol II/U1-3'box rev.</i> <i>(XbaI/HindIII)</i>	<u>TCTAGAGTCTACTTTTGAACTCCAGAAAGTTCGGAACTGC</u> GAGGCTTTACTACCGAATCGAGCTGAGGCAAGAACACGTC <u>TTAGAGAGGTCGACCGCTATCCTCCTACAAGCTT</u>

Tabelle 8. qPCR-Primer zur Detektion der Quantifizierungs-Konstrukte

<b>Name</b>	<b>Sequenz (5'-&gt;3')</b>
<i>Quant-Pol III/U6-term fwd.</i>	TGCAATCGGATCGCACTTTT
<i>Quant-Pol III/U6-term rev.</i>	AAGGGACAATCTCTGCGGTG
<i>Quant-Pol II/poly(A) fwd.</i>	CGGCTTCAGTTACTTCGCTT
<i>Quant-Pol II/poly(A) rev.</i>	TCCGCCCAATTGTAACAAGC
<i>Quant-Pol II/U1-3'box fwd.</i>	GTAGGAGGATAGCGGTTCGAC
<i>Quant-Pol II/U1-3'box rev.</i>	TCGGAAGTGCAGGCTTTA

Tabelle 9. DNA-Oligonukleotide für die Klonierung der Längen-Konstrukte (LC)

<b>Name</b>	<b>Sequenz (5'-&gt;3')</b>
<i>Insert LC<sub>80</sub> fwd.</i> <i>(HindIII/XbaI)</i>	<u>AAGCTT</u> TGCAATCGGATCGCACTTTTCTCTCTAATGACGTGTTCTT GCCTCAGCTCGATTTCGGTAGCACCGCAGAGATTGTCCCTTTCTAGA
<i>Insert LC<sub>80</sub> rev.</i> <i>(XbaI/HindIII)</i>	TCTAGAAAGGGACAATCTCTGCGGTGCTACCGAATCGAGCTGAGGC AAGAACACGTCATTAGAGAGAAAAGTGCGATCCGATTGCAAAGCTT T
<i>Insert LC<sub>120</sub> fwd.</i> <i>(HindIII/XbaI)</i>	<u>AAGCTT</u> CGGCTTCAGTTACTTCGCTTCTCTCTAATGACGTGTTCTT GCCTCAGCTCGATTTCGGTAGACTGCCATCACTAGCCACCGCTTCCA ATTCCCTACTCTGAGCTTGTTACAATTGGGCGGATCTAGA
<i>Insert LC<sub>120</sub> rev.</i> <i>(XbaI/HindIII)</i>	TCTAGATCCGCCAATTGTAACAAGCTCAGAGTAGGGAATTGGAAG CGGTGGCTAGTGATGGCAGTCTACCGAATCGAGCTGAGGCAAGAAC ACGTCATTAGAGAGAAGCGAAGTAACTGAAGCCGAAGCTT
<i>Insert LC<sub>200</sub> fwd.</i> <i>(HindIII/XbaI)</i>	<u>AAGCTT</u> GTAGGAGGATAGCGGTTCGACCTCTCTAATGACGTGTTCTT GCCTCAGCTCGATTTCGGTAGACTGCCATCACTAGCCACCGCTTCCA ATTCCCTACTCTGACTCTCTAATGACGTGTTCTTGCCTCAGCTCGA TTCGGTAGACTGCCATCACTAGCCACCGCTTCCAATTCCCTACTCT GATAAAGCCTCGCAGTTCGGATCTAGA
<i>Insert LC<sub>200</sub> rev.</i> <i>(XbaI/HindIII)</i>	TCTAGATCGGAACTGCGAGGCTTTATCAGAGTAGGGAATTGGAAGC GGTGGCTAGTGATGGCAGTCTACCGAATCGAGCTGAGGCAAGAACA CGTCATTAGAGAGTCAGAGTAGGGAATTGGAAGCGGTGGCTAGTGA TGGCAGTCTACCGAATCGAGCTGAGGCAAGAACACGTCATTAGAGA GGTCGACCGCTATCCTCCTACAAGCTT
<i>Insert LC<sub>360</sub> fwd.</i> <i>(HindIII/XbaI)</i>	<u>AAGCTT</u> GGATTAATGTCAGGCTCCGGCTCTCTAATGACGTGTTCTT GCCTCAGCTCGATTTCGGTAGACTGCCATCACTAGCCACCGCTTCCA ATTCCCTACTCTGACTCTCTAATGACGTGTTCTTGCCTCAGCTCGA TTCGGTAGACTGCCATCACTAGCCACCGCTTCCAATTCCCTACTCT GACTCTCTAATGACGTGTTCTTGCCTCAGCTCGATTTCGGTAGACTG CCATCACTAGCCACCGCTTCCAATTCCCTACTCTGACTCTCTAATG ACGTGTTCTTGCCTCAGCTCGATTTCGGTAGACTGCCATCACTAGCC ACCGCTTCCAATTCCCTACTCTGACTGCGCGGTAGGGTAACTTATC TAGA
<i>Insert LC<sub>360</sub> rev.</i> <i>(XbaI/HindIII)</i>	TCTAGATAAGTTACCCTACCGCGCAGTCAGAGTAGGGAATTGGAAG CGGTGGCTAGTGATGGCAGTCTACCGAATCGAGCTGAGGCAAGAAC ACGTCATTAGAGAGTCAGAGTAGGGAATTGGAAGCGGTGGCTAGTG ATGGCAGTCTACCGAATCGAGCTGAGGCAAGAACACGTCATTAGAG AGTCAGAGTAGGGAATTGGAAGCGGTGGCTAGTGATGGCAGTCTAC

CGAATCGAGCTGAGGCAAGAACACGTCATTAGAGAGTCAGAGTAGG  
 GAATTGGAAGCGGTGGCTAGTGATGGCAGTCTACCGAATCGAGCTG  
 AGGCAAGAACACGTCATTAGAGAGCCGGAGCCTGACATTAATCCAA  
GCTT

*Insert LC<sub>680</sub> fwd.*  
*(HindIII/XbaI)*

AAGCTTCAGCCCTGGACACCTGATTACTCTCTAATGACGTGTTCTT  
 GCCTCAGCTCGATTCCGGTAGACTGCCATCACTAGCCACCGCTTCCA  
 ATTCCCTACTCTGACTCTCTAATGACGTGTTCTTGCCTCAGCTCGA  
 TTCGGTAGACTGCCATCACTAGCCACCGCTTCCAATTCCCTACTCT  
 GACTCTCTAATGACGTGTTCTTGCCTCAGCTCGATTCCGGTAGACTG  
 CCATCACTAGCCACCGCTTCCAATTCCCTACTCTGACTCTCTAATG  
 ACGTGTTCTTGCCTCAGCTCGATTCCGGTAGACTGCCATCACTAGCC  
 ACCGCTTCCAATTCCCTACTCTGACTCTCTAATGACGTGTTCTTGC  
 CTCAGCTCGATTCCGGTAGACTGCCATCACTAGCCACCGCTTCCAAT  
 TCCCTACTCTGACTCTCTAATGACGTGTTCTTGCCTCAGCTCGATT  
 CGGTAGACTGCCATCACTAGCCACCGCTTCCAATTCCCTACTCTGA  
 CTCTCTAATGACGTGTTCTTGCCTCAGCTCGATTCCGGTAGACTGCC  
 ATCACTAGCCACCGCTTCCAATTCCCTACTCTGACTCTCTAATGAC  
 GTGTTCTTGCCTCAGCTCGATTCCGGTAGACTGCCATCACTAGCCAC  
 CGCTTCCAATTCCCTACTCTGAACTGGCCAGAGTCTTGAGTCTCTA  
GA

*Insert LC<sub>680</sub> rev.*  
*(XbaI/HindIII)*

TCTAGAGACTCAAGACTCTGGCCAGTTCAGAGTAGGGAATTGGAAG  
 CGGTGGCTAGTGATGGCAGTCTACCGAATCGAGCTGAGGCAAGAAC  
 ACGTCATTAGAGAGTCAGAGTAGGGAATTGGAAGCGGTGGCTAGTG  
 ATGGCAGTCTACCGAATCGAGCTGAGGCAAGAACACGTCATTAGAG  
 AGTCAGAGTAGGGAATTGGAAGCGGTGGCTAGTGATGGCAGTCTAC  
 CGAATCGAGCTGAGGCAAGAACACGTCATTAGAGAGTCAGAGTAGG  
 GAATTGGAAGCGGTGGCTAGTGATGGCAGTCTACCGAATCGAGCTG  
 AGGCAAGAACACGTCATTAGAGAGTCAGAGTAGGGAATTGGAAGCG  
 GTGGCTAGTGATGGCAGTCTACCGAATCGAGCTGAGGCAAGAACAC  
 GTCATTAGAGAGTCAGAGTAGGGAATTGGAAGCGGTGGCTAGTGAT  
 GGCAGTCTACCGAATCGAGCTGAGGCAAGAACACGTCATTAGAGAG  
 TCAGAGTAGGGAATTGGAAGCGGTGGCTAGTGATGGCAGTCTACCG  
 AATCGAGCTGAGGCAAGAACACGTCATTAGAGAGTCAGAGTAGGGA  
 ATTGGAAGCGGTGGCTAGTGATGGCAGTCTACCGAATCGAGCTGAG  
 GCAAGAACACGTCATTAGAGAGTAATCAGGTGTCCAGGGCTGAAGC  
TT

Tabelle 10. qPCR-Primer zur Detektion der Längen-Konstrukte (LC)

<b>Name</b>	<b>Sequenz (5'-&gt;3')</b>
<i>LC<sub>80</sub> fwd.</i>	TGCAATCGGATCGCACTTTT
<i>LC<sub>80</sub> rev.</i>	AAGGGACAATCTCTGCGGTG
<i>LC<sub>120</sub> fwd.</i>	CGGCTTCAGTTACTTCGCTT
<i>LC<sub>120</sub> rev.</i>	TCCGCCCAATTGTAACAAGC
<i>LC<sub>200</sub> fwd.</i>	GTAGGAGGATAGCGGTGAC
<i>LC<sub>200</sub> rev.</i>	TCGGAAGTGCAGGCTTTA
<i>LC<sub>360</sub> fwd.</i>	GGATTAATGTCAGGCTCCGG
<i>LC<sub>360</sub> rev.</i>	TAAGTTACCCTACCGCGCAG
<i>LC<sub>680</sub> fwd.</i>	CAGCCCTGGACACCTGATTA
<i>LC<sub>680</sub> rev.</i>	GACTCAAGACTCTGGCCAGT

Tabelle 11. DNA-Oligonukleotide für die Klonierung des Broccoli- und Spinach2-Konstrukts

<b>Name</b>	<b>Sequenz (5'-&gt;3')</b>
<i>Insert Broccoli fwd.</i> <i>(HindIII/XbaI)</i>	<u>AAGCTTT</u> TGCAATCGGATCGCACTTTT <u>GAGACGGTCGGGTCC</u> AGATATTCGTATCTGTGAGTAGAGTGTGGGCTCCACCGCA GAGATTGTCCCTT <u>TCTAGA</u>
<i>Insert Broccoli rev.</i> <i>(XbaI/HindIII)</i>	<u>TCTAGAA</u> AAGGGACAATCTCTGCGGTGGAGCCCACTCTAC TCGACAGATACGAATATCTGGACCCGACCGTCTCAAAGTG CGATCCGATTGCAA <u>AGCTT</u>
<i>Insert Spinach2 fwd.</i> <i>(HindIII/XbaI)</i>	<u>AAGCTT</u> GATGTAAGTGAATGAAATGGTGAAGGACGGGTCCA GTAGGCTGCTTCGGCAGCCTACTTGTGAGTAGAGTGTGAG CTCCGTAAGTACATCT <u>TCTAGA</u>
<i>Insert Spinach2 rev.</i> <i>(XbaI/HindIII)</i>	<u>TCTAGAG</u> ATGTAAGTGAATGAAATGGTGAAGGACGGGTCCA CAAGTAGGCTGCCGAAGCAGCCTACTGGACCCGTCCTTCAC CATTTCAATTCAGTTACATCA <u>AGCTT</u>

Tabelle 12. PCR-Primer zur Detektion des Broccoli- und Spinach2-Konstrukts

<b>Name</b>	<b>Sequenz (5'-&gt;3')</b>
<i>Broccoli fwd.</i>	TGCAATCGGATCGCACTTTT
<i>Broccoli rev.</i>	AAGGGACAATCTCTGCGGTG
<i>Spinach2 fwd.</i>	TGAAATGGTGAAGGACGGGT
<i>Spinach2 rev.</i>	ACTAGTTACGGAGCTCACACT

Tabelle 13. DNA-Oligonukleotide für die Klonierung der Expressionskonstrukte 1 - 4

<b>Name</b>	<b>Sequenz (5'-&gt;3')</b>
1. Insert fwd. ( <u>HindIII/XbaI</u> )	<u>AAGCTT</u> TGCAATCGGATCGCACTTTTCTCTCTAATGACGTGTT CTTGCCCTCAGCTCGATTTCGGTAGCACCCGAGAGATTGTCCCTT <u>TCTAGA</u>
1. Insert rev. ( <u>HindIII/XbaI</u> )	<u>TCTAGAA</u> AGGGACAATCTCTGCGGTGCTACCGAATCGAGCTGA GGCAAGAACACGTCATTAGAGAGAAAAGTGGGATCCGATTGCA <u>AAGCTT</u>
2. Insert fwd. ( <u>HindIII/XbaI</u> )	<u>AAGCTT</u> CGGCTTCAGTTACTTCGCTTCTCCCATTCAGTTGACC GAGCGAAAAGTTCAACCAGTTCGCTTGTACAAATTGGGCGGA <u>TCTAGA</u>
2. Insert rev. ( <u>HindIII/XbaI</u> )	<u>TCTAGAT</u> CCGCCCAATTGTAACAAGCGGAAGTGGTTGAACTTT TCGCTCGGTCAACTGAATGGGAGAAGCGAAGTAACTGAAGCCG <u>AAGCTT</u>
3. Insert fwd. ( <u>HindIII/XbaI</u> )	<u>AAGCTT</u> TGTAGGAGGATAGCGGTTCGACACCACATTATTCGCCTA TTGTTAACAGGTGTGAAGCACTTTAAAGCCTCGCAGTTCCGAT <u>CTAGA</u>
3. Insert rev. ( <u>HindIII/XbaI</u> )	<u>TCTAGAT</u> CGGAACTGCGAGGCTTTAAAGTGCTTCACACCTGTT AACAATAGGCGAATAATGTGGTGTGACCGCTATCCTCCTACA <u>AGCTT</u>
4. Insert fwd. ( <u>HindIII/XbaI</u> )	<u>AAGCTT</u> GGATTAATGTCAGGCTCCGGACTGCCATCACTAGCCA CCGCTTCCAATTCCTACTCTGACTGCGCGGTAGGGTAACTTA <u>TCTAGA</u>
4. Insert rev. ( <u>HindIII/XbaI</u> )	<u>TCTAGATA</u> AGTTACCCTACCGCGCAGTCAGAGTAGGGAATTGG AAGCGGTGGCTAGTGATGGCAGTCCGGAGCCTGACATTAATCC <u>AAGCTT</u>

Tabelle 14. qPCR-Primer zur Detektion der Expressionskonstrukte 1 - 4

<b>Name</b>	<b>Sequenz (5'-&gt;3')</b>
<i>Expressionskonstrukt 1 fwd.</i>	TGCAATCGGATCGCACTTTT
<i>Expressionskonstrukt 1 rev.</i>	AAGGGACAATCTCTGCGGTG
<i>Expressionskonstrukt 2 fwd.</i>	CGGCTTCAGTTACTTCGCTT
<i>Expressionskonstrukt 2 rev.</i>	TCCGCCCAATTGTAACAAGC
<i>Expressionskonstrukt 3 fwd.</i>	GTAGGAGGATAGCGGTCGAC
<i>Expressionskonstrukt 3 rev.</i>	TCGGAACTGCGAGGCTTTA
<i>Expressionskonstrukt 4 fwd.</i>	GGATTAATGTCAGGCTCCGG
<i>Expressionskonstrukt 4 rev.</i>	TAAGTTACCCTACCGCGCAG

## 4.2 Biochemische Methoden

### 4.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot

Zum Nachweis von EV-Markerproteinen wurden  $1 \times 10^9$  EVs oder  $1 \times 10^5$  Zellen mit 1x SDS-Probenpuffer (siehe Abschnitt 4.1.10) lysiert, für 10 Minuten aufgeköcht (für CD63-Proben wurden nicht-reduzierende Bedingungen verwendet) und auf einem 10%igen SDS-Proteingel aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine Nitrocellulosemembran (Bio-Rad) übertragen und die Membran in Milch-Blocklösung (siehe 4.1.10) für 1 Stunde geblockt. Anschließend wurde die Membran mit den Antikörpern: Maus-anti-Human CD63 (1:500, Invitrogen, Thermo Fischer Scientific), Kaninchen-anti-Human Alix (1:1.000, Abcam) und Ratte-anti-Human Flotillin-1 (1:1.000, Biolegend) über Nacht bei 4°C in Milch-Blocklösung (siehe Abschnitt 4.1.10) inkubiert. Der Blot wurde dreimal mit PBS-T gewaschen und anschließend mit HRP-konjugierten Anti-Maus-, Anti-Kaninchen- und Anti-Ratte-Sekundäantikörpern (Sigma-Aldrich) für jeweils 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreifachem Waschen mit PBS-T wurde der Blot für 1 Minute bei Raumtemperatur mit ECL Western Blotting-Substrat (Roche) inkubiert. Die Membran wurde in verschiedenen Zeitintervallen auf Amersham Hyperfilm™ ECL (GE Healthcare) Filmen exponiert. Die Filme wurden auf einer Agfa Curix 60 Processing Machine (Agfa) entwickelt.

### 4.2.2 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Für die Isolierung von Gesamt-RNA und EV-RNA wurde TRIzol (Thermo Fisher Scientific) oder das Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek Corp., nach Herstellerangaben) verwendet. Um verbliebene DNA zu eliminieren wurden die Proben anschließend mit 1 µl (2 Units) der TURBO™ DNase (Thermo Fisher Scientific, nach Herstellerangaben) behandelt. Die RNA-Konzentration und -Integrität wurde mit dem 2100 Bioanalyzer Instrument (Agilent) mittels Bioanalyzer Pico RNA Chip Kit oder dem Bioanalyzer Nano RNA Chip Kit (Agilent) analysiert. Für die cDNA-Synthese wurden zwischen 500 - 1000 ng für Gesamt-RNA und 0,5 - 50 ng für EV-RNA eingesetzt. Unter Verwendung des qScript™ cDNA Synthesis Kits oder des qScript™ Flex cDNA Synthesis Kits (Quantabio, nach Herstellerangaben) wurde die RNA in cDNA umgeschrieben.

### 4.2.3 PCR und Agarose-Gelelektrophorese

Für den Nachweis der verschiedenen Reporterkonstrukte wurden Primer mittels des Primer 3 Programms (<http://www.bioinfo.ut.ee/primer3/>) entworfen. Oligonukleotide mit einer Länge von bis zu 120 bp wurden bei Sigma-Aldrich Chemie GmbH bestellt, größere Fragmente wurden bei Thermo Fisher Scientific geordert. Alle Oligonukleotide/Primer sind in den ergänzenden Tabellen 2-14 zu finden. Die PCR-Reaktionen wurden ausschließlich nachdem Reaktionsschema in Tabelle 15 angesetzt. Für die PCR-Reaktion wurde eine Taq-Polymerase aus laboreigener Herstellung verwendet. Die anschließende Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte mittels

Agarose-Gelelektrophorese. Hierfür wurde Agarose (Carl Roth) in 0,5x TBE-Puffer (siehe Abschnitt 4.1.10) gelöst, mit Ethidiumbromid (1:20.000) versetzt und in eine Gelkammer gegossen, in der das Gel für 10 Minuten bei Raumtemperatur auspolymerisierte. Die PCR-Produkte wurden mit DNA-Ladepuffer (siehe Abschnitt 4.1.10) vermischt und aufgetragen. Zur Größenabschätzung der PCR-Produkte wurden zusätzlich 4 µl des GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific) geladen. Es wurde eine Spannung von 120 V für 30 - 60 Minuten angelegt, wodurch die DNA, aufgrund ihrer negativen Ladung, zur positiv geladenen Anode wanderte. Die Dokumentation erfolgte durch die G:Box gel documentation (Syngene) unter Verwendung der GeneTools Software (Syngene).

*Tabelle 15. PCR-Reaktionschema*

<b>Komponenten</b>	<b>Volumen</b>
PCR-Puffer (10x)	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
Primermix (10 µM)	1 µl
Template-DNA	variabel
DMPC-H <sub>2</sub> O	variabel
Taq-Polymerase (2000 U/ml)	1 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>25 µl</b>

<b>Zyklus</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>
1	95°C	2 Minuten
	95°C	15 Sekunden
25 - 30	58°C	20 Sekunden
	72°C	30 Sekunden
1	72°C	7 Minuten
<i>Hold</i>	4°C	∞

#### **4.2.4 Quantitative *real-time* PCR (qPCR)**

Für den Nachweis und die Quantifizierung von Nukleinsäuren (DNA und RNA) wurde eine qPCR auf dem realplex2 Thermocycler (Eppendorf) unter Verwendung des Luna® Universal qPCR Master Mix (New England Biolabs, nach Herstellerangaben) durchgeführt. Die relative Expression der Transkripte in Zellen und EVs wurde mit der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode berechnet. Zur Berechnung der Standardabweichung wurden drei Replikate verwendet. Für die absolute

Quantifizierung der endogenen RNAs sowie der durch Reporterkonstrukte exprimierten RNAs wurden DNA-Oligonukleotide entworfen, die eine T7-Promotorsequenz und die jeweilige Sequenz der zu quantifizierenden Gene enthielt. Doppelsträngige DNA-Oligonukleotide wurden als Templates für die *in vitro* Transkription mittels HiScribe™T7 High Yield RNA Synthesis Kit (New England Biolabs, nach Herstellerangaben) verwendet. Von jedem Standard wurden 50 ng mittels qScript cDNA Synthesis Kit (Quantabio, nach Herstellerangaben) in cDNA umgeschrieben und sechsmal 10-fach verdünnt (50 ng auf 5 fg). Daraus wurde eine Standardkurve mit drei Replikaten für die Standardabweichungen berechnet. Die absoluten Konzentrationen der Proben wurden mit folgender Gleichung bestimmt:

$$Y \text{ Moleküle}/\mu\text{l} = \frac{X \text{ RNA } g/\mu\text{l}}{(\text{Transkriptlänge [nts]} * 321.47 + 18.02) * 6.022 * 10^{23}}$$

#### 4.2.5 Northern Blot

Zum Nachweis von GAPDH mRNA mittels Northern Blots wurden 300 ng Gesamt-RNA und 300 ng EV-RNA mit NorthernMax™-Gly Sample Loading Dye (Thermo Fisher Scientific) versetzt und für 30 Minuten bei 50°C inkubiert. Für die Auftrennung der RNA wurde eine 1,2%ige Agarose-Gelelektrophorese in 1x MOPS-Puffer (siehe Abschnitt 4.1.10) durchgeführt. Der RNA-Transfer auf eine Nylonmembran (Hybond-N+, Amersham) erfolgte durch Semi-Dry-Blotting, woraufhin eine Fixierung (*cross-linking*) bei 254 nm für 120 J/cm<sup>2</sup> folgte. Zur Detektion der GAPDH mRNA wurde ein Mix aus zwei Northern Blot-Sonden mit einer Gesamtkonzentration von 50 µg/ml verwendet. Die Vorhybridisierung und die anschließende DIG-UTP-markierte Sondenhybridisierung erfolgten bei 64°C im NorthernMax™ Prehybridization/Hybridization Buffer (Thermo Fisher Scientific). Nach dem Waschen der Membran mit 0,2x/2x SSC-Waschpuffer (siehe Abschnitt 4.1.10) wurde die Membran mit DIG-Blocklösung (siehe Abschnitt 4.1.10) geblockt, gefolgt von weiteren Waschschrritten mit dem DIG-Waschpuffer (siehe Abschnitt 4.1.10). Alkalische Phosphatase-konjugierte Anti-DIG-Fab-Fragmente (Roche) wurden in der DIG-Blocklösung (siehe Abschnitt 4.1.10) gelöst und für 1 Stunde auf die Membran gegeben. Anschließend wurde die Membran mit CDP-Star Chemilumineszenz Substrat (Roche), verdünnt in DIG-Detektionspuffer (siehe Abschnitt 4.1.10), beträufelt und für 5 Minuten inkubiert. Die Membran wurde in verschiedenen Zeitintervallen auf Amersham Hyperfilm™ ECL (GE Healthcare) Filmen exponiert. Die Filme wurden auf einer Agfa Curix 60 Processing Machine (AGFA) entwickelt.

#### 4.2.5.1 Herstellung DIG-markierter RNA-Sonden

Die Herstellung der RNA-Sonden für den Northern Blot erfolgte durch PCR (siehe Tabelle 15). Die verwendeten Primer können Tabelle 3 entnommen werden, wobei der *reverse* Primer zusätzlich eine T7-Promotorsequenz (siehe Tabelle 3) für die anschließende T7-Transkription enthielt. Als Template diente Gesamt-RNA aus ES-2-Zellen, die zuvor in cDNA umgeschrieben und anschließend in einer PCR-Reaktion vervielfältigt wurde. Ausgehend von dem doppelsträngigen DNA-Template erfolgte, mittels DIG RNA labeling Mix (Roche), eine RNA-Markierung mit Digoxigenin-UTP durch *in vitro* Transkription mit der T7-RNA-Polymerase (Thermo Fisher Scientific, nach Herstellerangaben). Die anschließende Aufreinigung der RNA-Sonde erfolgte durch Quick Spin RNA Columns (Roche).

### 4.3 Molekularbiologische Methoden

#### 4.3.1 Restriktionsverdau und Ligation von DNA-Fragmenten

Für den Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten (Inserts) und Plasmiden wurden ausschließlich Restriktionsenzyme von New England Biolabs verwendet (siehe Abschnitt 4.1.3). Für den Restriktionsverdau wurde 1 Unit/1 µg DNA für eine Stunde verdaut. Nach dem Restriktionsverdau folgte eine Aufreinigung der geschnittenen DNA-Fragmente mit dem DNA clean up Kit (Monarch, nach Herstellerangaben) bzw. für linearisierte Plasmide durch das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, nach Herstellerangaben). Die aufgereinigten Inserts und Plasmide wurden durch Ligation, unter Verwendung der T4-DNA-Ligase und dazugehörigem Puffer (New England Biolabs, nach Herstellerangaben) in einem molaren Verhältnis von 1:3 zusammengeführt. Das Gesamtvolumen betrug 20 µl, die Inkubation erfolgte über Nacht bei 16°C.

#### 4.3.2 Transformation in Bakterien

Für die Transformation wurden 50 µl chemisch kompetenter *E. coli* (Thermo Fisher Scientific) mit 5 µl DNA-Ligationsansatz (siehe Abschnitt 4.3.1) für 30 Minuten auf Eis inkubiert, danach folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 30 Sekunden. Die Zellen wurden anschließend mit 200 µl SOC-Medium (Thermo Fischer Scientific) versetzt und für 1 Stunde bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Die Transformationsansätze wurden auf vorgewärmten LB-Platten, versetzt mit Ampicillin (100 µg/ml), ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### 4.3.3 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Gewinnung von kleinen Mengen (bis 20 µg) bzw. größeren Mengen (bis 1 mg) Plasmid-DNA wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit oder das Plasmid Plus Maxi Kit (Qiagen, nach Herstellerangaben) verwendet. Für die Präparation der Plasmid-DNA aus einer

Bakterienkolonie, die den gewünschten rekombinanten Vektor trug, wurde eine Übernachtskultur (50 - 100 ml) in LB-Medium (siehe Abschnitt 4.1.10), versetzt mit Ampicillin (100 µg/ml), angesetzt. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte nach 10-12 Stunden.

#### 4.3.4 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmiden und DNA-Fragmenten wurde von Microsynth SeqLab mittels Sanger-Sequenzierung durchgeführt. Für die anschließende Analyse wurde die SnapGene Viewer 5.07 Software verwendet.

#### 4.3.5 *Annealing* von DNA-Oligonukleotiden

Für das *Annealing* von DNA-Oligonukleotiden wurden jeweils 5 µg der DNA-Oligonukleotide (*forward* und *reverse*) zusammen mit 2x *Annealing*-Puffer (siehe Abschnitt 4.1.10) in einer 50 µl Reaktion angesetzt und mit nachfolgendem PCR-Programm annealt.

Tabelle 16. PCR-Programm für das *Annealing* von Oligonukleotiden

Zyklus	Temperatur	Zeit
1	95°C	3 Minuten
70	95 - 25°C	39 Sekunden
<i>Hold</i>	4°C	∞

#### 4.3.6 Klonierung von RNA-Expressionskonstrukten

Die für die Klonierung benötigten DNA-Oligonukleotide wurden synthetisch hergestellt. Oligonukleotide mit einer Länge bis zu 120 bp wurden bei Sigma-Aldrich Chemie GmbH bestellt, größere Fragmente wurden bei Thermo Fisher Scientific geordert. Alle Oligonukleotide sind in den ergänzenden Tabellen 2 - 14 zu finden.

##### 4.3.6.1 SELEX-Konstrukte

Für die SELEX-Konstrukte Pol II/poly(A), Pol II/U1-3'box wurde ein pcDNA3-Vektor verwendet. Die Inserts wurden als Genestrings (GeneArt, Thermo Fisher Scientific) entworfen und enthielten jeweils eine N40-Sequenz (40 bp) und flankierende konstante Regionen (20 bp). Das Insert für Pol II/U1-3'box enthielt zusätzlich das U1-Transkriptionsstoppsignal am 3'-Ende. Beide Inserts wurden von den Restriktionsstellen für *HindIII* am 5'-Ende und *XbaI* oder *ApaI* am 3'-Ende flankiert. Für das Pol III/U6-term-Konstrukt wurde der CMV-Promotor des pcDNA3-Vektors deletiert und durch ein synthetisches Insert (GeneArt, Thermo Fisher Scientific), bestehend aus dem U6-Promotor, einer multiplen Klonierungsstelle (MCS) und dem U6-Terminationssignal ersetzt (pcDNA3\_U6-Vektor). Danach wurde das Insert, bestehend aus einer N40-Sequenz und flankierenden konstanten Regionen sowie Restriktionsstellen für *HindIII* am 5'-Ende und *XbaI*

am 3'-Ende eingefügt (siehe Tabelle 4). Alle oben genannten Inserts wurden als einzelsträngige Oligonukleotide bestellt und mittels PCR-Reaktion zu einem doppelsträngigen Oligonukleotid aufgefüllt. Anschließend wurde der gesamte Ligationsansatz transformiert, es erfolgte keine Selektion von Einzelklonen.

#### **4.3.6.2 Quantifizierungs-Konstrukte**

Für die Quantifizierungs-Konstrukte Pol II/poly(A), Pol II/U1-3'box wurde ein pcDNA3-Vektor verwendet. Die Inserts wurden als Genestings (GeneArt, Thermo Fisher Scientific) entworfen und enthielten jeweils die gleiche zufallsgenerierte Sequenz (40 bp) und jeweils einzigartige flankierende konstante Regionen (20 bp). Das Insert für Pol II/U1-3'box enthielt zusätzlich die Sequenz des U1-Transkriptionsstoppsignals am 3'-Ende. Beide Inserts wurden von Restriktionsstellen für *HindIII* am 5'-Ende und *XbaI* am 3'-Ende flankiert (siehe Tabelle 7). Für das Pol III/U6-term-Konstrukt wurde der pcDNA3\_U6-Vektor (vgl. Abschnitt 4.3.6.1) und ein Insert, bestehend aus derselben zufallsgenerierten Sequenz (siehe oben) und individuellen flankierenden konstanten Regionen verwendet. Für alle Inserts wurden zwei komplementäre Einzelstrang-DNA-Oligonukleotide (*forward* und *reverse*) bestellt, die in einer *Annealing*-Reaktion zu einem Doppelstrang zusammengeführt wurden (siehe Abschnitt 4.3.5).

#### **4.3.6.3 Längen-Konstrukte**

Der neu generierte pcDNA3\_U6-Vektor (siehe Abschnitt 4.3.6.1) wurde für die Klonierung der verschiedenen Längen-Konstrukte verwendet. Die synthetisierten Inserts (GeneArt, Thermo Fisher Scientific), bestehend aus zwei Sequenzen (40 bp), die jeweils dupliziert wurden (LC<sub>80</sub>, LC<sub>120</sub>, LC<sub>200</sub>, LC<sub>360</sub> und LC<sub>680</sub>), wurden mit den Restriktionsschnittstellen *HindIII* am 5'-Ende und *XbaI* am 3'-Ende (siehe Tabelle 9) in den Vektor eingefügt. Für alle Inserts wurden zwei komplementäre Einzelstrang-DNA-Oligonukleotide (*forward* und *reverse*) bestellt, die in einer *Annealing*-Reaktion zu einem Doppelstrang zusammengeführt wurden (siehe Abschnitt 4.3.5).

#### **4.3.6.4 Aptamer-Konstrukte *Broccoli* und *Spinach2***

Der neu generierte pcDNA3\_U6-Vektor (siehe Abschnitt 4.3.6.1) wurde für die Klonierung der zwei Aptamer-Konstrukte verwendet. Die synthetisierten Inserts (GeneArt, Thermo Fisher Scientific), bestehend aus der Sequenz für *Spinach2* oder der Sequenz für *Broccoli* plus flankierenden konstanten Regionen (jeweils 20 bp), wurden mit *HindIII* am 5'-Ende und *XbaI* am 3'-Ende eingefügt (siehe Tabelle 11). Für alle Inserts wurden zwei komplementäre Einzelstrang-DNA-Oligonukleotide (*forward* und *reverse*) bestellt, die in einer *Annealing*-Reaktion zu einem Doppelstrang zusammengeführt wurden (siehe Abschnitt 4.3.5).

#### 4.3.6.5 Expressionskonstrukte 1 - 4

Der generierte pcDNA3\_U6-Vektor (siehe Abschnitt 4.3.6.1) wurde für die Klonierung der Expressionskonstrukte 1 - 4 verwendet. Die synthetisierten Inserts (GeneArt, Thermo Fisher Scientific) bestehend aus 79 bzw. 80 bp langen unterschiedlichen Sequenzen wurden mit *HindIII* am 5'-Ende und *XbaI* am 3'-Ende eingefügt (siehe Tabelle 13). Für alle Inserts wurden zwei komplementäre Einzelstrang-DNA-Oligonukleotide (*forward* und *reverse*) bestellt, die in einer *Annealing*-Reaktion zu einem Doppelstrang zusammengeführt wurden (siehe Abschnitt 4.3.5).

### 4.4 Arbeiten mit Zelllinien

#### 4.4.1 Kultivierung von *Trypanosoma brucei*

Die Arbeiten mit *T. brucei* (PCF) wurden unter sterilen Bedingungen in der Sterilbank Safe 2020 (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Inkubator (Binder GmbH) bei einer Temperatur von 28°C. Als Nährmedium diente SDM79-Medium (siehe Abschnitt 4.1.8), welches mit 10% (v/v) hitzeinaktiviertem FBS (Thermo Fisher Scientific) und Hämin (5 mg/l) versetzt wurde. Die Zellen wurden bis zu einer Dichte von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml kultiviert. Zur Erhaltung wurden die Zellen 1:10 verdünnt.

#### 4.4.2 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die Arbeiten an eukaryotischen Zellen wurden unter sterilen Bedingungen in der Sterilbank Safe 2020 (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator (New Brunswick Scientific) bei 5% CO<sub>2</sub>, einer Luftfeuchtigkeit von 95% und einer Temperatur von 37°C. Als Nährmedium diente DMEM, welches mit 10% (v/v) hitzeinaktiviertem FBS (Thermo Fisher Scientific) versetzt wurde.

#### 4.4.3 Subkultivierung eukaryotischer Zellen

Die Subkultivierung der Zellen erfolgte in 10 cm Zellkulturschalen (Sarstedt) bei einer Konfluenz von 80 - 100%. Hierfür wurde das vorhandene Zellmedium abgesaugt und die adhären Zellen mit 10 ml 1x PBS gewaschen. Anschließend wurde 1 ml Trypsin-EDTA (Gibco, Thermo Fisher Scientific) hinzugeben, vorsichtig geschwenkt und die Zellkulturschale für 1 - 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurden die abgelösten Zellen in Medium aufgenommen, resuspendiert und auf neue Zellkulturschalen verteilt.

#### 4.4.4 Transfektion eukaryotischer Zellen

Für die Transfektion wurden 5 -  $10 \times 10^6$  Zellen (abhängig von der Zelllinie) pro 15 cm Zellkulturschale (Sarstedt) einen Tag vor Transfektion in DMEM, versetzt mit 10% FBS, ausgesät. Die Transfektion wurde mit TurboFect Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific, nach Herstellerangaben) durchgeführt. Es wurden pro 15 cm Zellkulturschale 20 µg Plasmid-DNA und

40 µl Turbofect Transfection Reagent sowie 500 µl Opti-MEM™ (serumreduziertes Medium; Gibco, Thermo Fisher Scientific) verwendet. Nach 4 Stunden wurde das Medium gewechselt und die Zellen für 24-48 Stunden kultiviert.

## 4.5 Arbeiten mit extrazellulären Vesikeln

### 4.5.1 EV-Isolierung aus eukaryotischen Zellen

Für die EV-Produktion wurden je nach Zelllinie und Experiment zwischen  $8 \times 10^6$  -  $2 \times 10^7$  Zellen pro T175 Zellkulturflasche (Greiner Bio-One) ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen ausgiebig mit filtriertem (0,22 µm) 1x PBS gewaschen und das Medium gewechselt. Die Zellen wurden für 48 Stunden in CD 293 Medium (Gibco, Thermo Fisher Scientific), ergänzt mit 1% Penicillin-Streptomycin und 1x GlutaMAX™ (Gibco, Thermo Fisher Scientific) kultiviert. Die Isolation der EVs erfolgte durch eine Kombination von verschiedenen Aufreinigungsmethoden. Der zuvor gesammelte Zellkulturüberstand wurde durch differentielle Zentrifugation bei 2.000 x g für 10 Minuten und 5.000 x g für 5 Minuten bei 4°C von Zelltrümmern und Zellen befreit. Anschließend wurden größere Partikel/Vesikel durch Filtration mit einem 0,22 µm Porenfilter (ROTILABO® CME) entfernt. Um das Gesamtvolumen auf 500 µl zu verkleinern, wurde eine Ultrafiltration mittels Zentrifugalfilters (Amicon Ultra-15, 10 kDa, nach Herstellerangaben) durchgeführt. Anschließend wurden die konzentrierten EV-Proben einer Größenausschluss-Chromatographie mit qEVoriginal 70 nm Säulen (IZON Science, nach Herstellerangaben) unterzogen. Die EV-haltigen Fraktionen (7 - 10) wurden gepoolt und in einem abschließenden Ultrazentrifugationsschritt bei 110.000 x g bei 4°C für 2 Stunden pelletiert (Beckman Coulter MAX-XP Zentrifuge, TLA-100.4 Rotor). Das EV-Pellet wurde in gefiltertem (0,22 µm) 1x PBS in 100 - 500 µl resuspendiert.

### 4.5.2 EV-Isolierung aus *Trypanosoma brucei*

Für die EV-Produktion wurden  $1 \times 10^7$  Zellen pro T175 Zellkulturflasche (Greiner Bio-One) verwendet. Die Zellen wurden in SDM79-Medium (siehe Abschnitt 4.1.8), ergänzt mit 10% EV-depletiertem FBS, kultiviert. Um vorhandene EVs aus dem FBS zu entfernen, wurde das FBS unter sterilen Bedingungen für 18 Stunden bei 120.000 x g zentrifugiert, anschließend wurde der Überstand entnommen und dem SDM79-Medium hinzugefügt. Für die Isolierung von EVs wurden die Zellen bei 1.000 x g für 20 Minuten zentrifugiert, anschließend wurde der Überstand ein weiteres Mal bei 2.500 x g für 10 Minuten zentrifugiert, gefolgt von einer Filtration mit einem 0,22 µm Porenfilter (ROTILABO® CME). Die gefilterten Überstände wurden einer PEG-Präzipitation (vgl. Ludwig *et al.* 2018) unterzogen. Das entstandene Pellet wurde in 500 µl filtriertem (0,22 µm) 1x PBS resuspendiert. Anschließend wurden die konzentrierten EV-Proben einer Größenausschluss-Chromatographie mit qEVoriginal 70 nm Säulen (IZON Science, nach Herstellerangaben) unterzogen. Die EV-haltigen Fraktionen (7 - 10) wurden gepoolt und in

einem abschließenden Ultrazentrifugationsschritt bei 110.000 x g bei 4°C für 2 Stunden pelletiert (Beckman Coulter MAX-XP Zentrifuge, TLA-100.4 Rotor). Das EV-Pellet wurde in gefiltertem (0,22 µm) 1x PBS in 100 - 500 µl resuspendiert.

#### 4.5.3 Nanopartikel-Tracking-Analyse (NTA)

Zur Bestimmung der Größenverteilung und der Konzentration von EVs wurde das Nanosight NS300-Gerät (Malvern Instruments) verwendet. Mittels der aktuellen Nanosight Software 3.2 wurden folgende Parameter für die Dosierungspumpe eingestellt: *Repeatstart*, *Syringeload* (100), *Delay* (10), *Syringestop*, *Delay* (10), *Capture* (30), *Delay* (1), *Repeat* (4). Die Messung erfolgte konstant bei 25°C. Des Weiteren wurden folgende Einstellungen vorgenommen: Kamerasteuerung (Standard), Kameralevel (12 - 14), *Threshold* (8) und *Minimum Expected Particle Size* (Auto). Es wurden fünf Videos mit einer Länge von 30 Sekunden aufgenommen. Mit Hilfe der Brown'schen Molekularbewegung konnte die Konzentration sowie die durchschnittliche Größe der einzelnen Partikel berechnet werden. Die Proben wurden vor der Messung in gefiltertem (0,22 µm) 1x PBS 1:50 oder 1:100 verdünnt.

#### 4.5.4 Nano-Durchflusszytometrie (NanoFCM)

Für die Nano-Durchflusszytometrie von EVs wurde der NanoAnalyzer (NanoFCM Co., Ltd), ausgestattet mit einem 488-nm-Laser und drei Einzelphoton-Avalanche-Photodioden, verwendet. Für die Kalibrierung wurden 200-nm-Polystyrol-Beads (NanoFCM Co., Ltd) mit einer definierten Konzentration von  $2,08 \times 10^8$  Partikeln/ml genutzt, welche auch als Referenz für die Partikelkonzentration dienten. Zusätzlich wurden monodisperse Silica-Beads (NanoFCM Co., Ltd) mit vier verschiedenen Größen (68 nm, 91 nm, 113 nm, 155 nm) als Größenreferenzstandard verwendet, um die Größe der EVs zu bestimmen. Jede Messung wurde für 1 Minute bei einem Probendruck von 0,4 kPa durchgeführt. Die EV-Proben wurden mit gefiltertem (0,1 µm) 1x PBS verdünnt, um eine Partikelanzahl im optimalen Bereich von 2.500 - 12.000 Ereignissen (*Events*) zu erreichen. Die Partikelkonzentration und Größenverteilung wurden mit der NanoFCM-Software (NF Profession V 1.08) berechnet.

Für die Immunfluoreszenzfärbung von EVs wurden die Antikörper FITC-konjugierter Maus-anti-Human-CD9-Antikörper (Klon HI9a), FITC-konjugierter Maus-anti-Human-CD81-Antikörper (Klon TAPA-1) und PE-konjugierter Maus-anti-Human-CD63-Antikörper (Klon H5C6) von Biolegend verwendet. Als Isotyp-Kontrollen wurden FITC-konjugiertes Maus-IgG1, κ (Klon MOCP-21), und PE-konjugiertes Maus-IgG2a, κ (MOPC-173) von Biolegend verwendet. Von jedem Antikörper wurden 2 ng/µl in 100 µl 1x PBS verwendet. Die Antikörper wurden bei 12.000 x g für 10 Minuten zentrifugiert, um Antikörper-Aggregate zu entfernen. Der Überstand wurde zu ca.  $2 \times 10^8$  gereinigten EVs gegeben und über Nacht bei 4°C unter konstantem Schütteln inkubiert.

Anschließend wurde mit 1 ml 1x PBS durch Ultrazentrifugation bei  $110.000 \times g$  für 1 Stunde bei  $4^{\circ}\text{C}$  gewaschen (Beckman Coulter MAX-XP Zentrifuge, TLA-100.4 Rotor). Das Pellet wurde in  $50 \mu\text{l}$  1x PBS resuspendiert. Alle Messungen wurden in Kooperation mit der EV Core Facility, Zentrum für Tumor- und Immunbiologie, Philipps-Universität Marburg, von Dr. Christian Preußner durchgeführt.

#### **4.5.5 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)**

Zur Charakterisierung der EV-Morphologie der isolierten EVs wurden TEM-Aufnahmen angefertigt. Das Protokoll für die Präparation von EVs für die Transmissionselektronenmikroskopie wurde von Thery *et al.* (2006) größtenteils übernommen. Von isolierten EVs ( $1 \times 10^{10}/\text{ml}$ ) wurden  $5 \mu\text{l}$  1:2 mit 4% Formaldehyd verdünnt bzw. fixiert, anschließend wurden  $5 \mu\text{l}$  der fixierten EVs auf ein Formvar-/Kohle-beschichtetes TEM-Grid gegeben und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach folgte dreimaliges Waschen mit filtriertem ( $0,22 \mu\text{m}$ ) 1x PBS. Hierzu wurden 3 einzelne Tropfen ( $100 \mu\text{l}$ ) 1x PBS auf ein Stück Parafilm getropft und das Grid wurde mit Hilfe einer Pinzette in die Tropfen gehalten, zwischen jedem Tropfen wurde die Flüssigkeit mittels seitlichen Auflegens des Grids auf ein Whatman® filter paper (Sigma-Aldrich) entfernt. Die Kontrastierung erfolgte mittels einer Uranylacetat -Lösung (pH 7,0) für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend folgte, wie oben beschrieben, dreimaliges Waschen mit destilliertem Wasser. Die Einbettung der Proben erfolgte in 2%igem Methylcellulose-Uranylacetat. Hierfür wurde ein Tropfen ( $100 \mu\text{l}$ ) auf ein Stück Parafilm getropft und das Grid mit Hilfe einer Pinzette in den Tropfen gehalten, woraufhin eine Inkubation für 10 Minuten auf Eis folgte. Die überschüssige Flüssigkeit wurde mit Hilfe eines Loops entfernt. Für 10 Minuten erfolgte eine finale Trocknung des Grids bei Raumtemperatur, anschließend wurden die Proben mikroskopiert. Für die Aufnahmen in **Abbildungen 9A/B** wurde auf die Fixierung der EVs mit 4% Formaldehyd und die Einbettung in Methylcellulose-Uranylacetat verzichtet. Die EVs ( $5 \mu\text{l}$ ) wurden direkt auf ein Formvar-/Kohle-beschichtetes TEM-Grid gegeben, inkubiert, gewaschen mit Uranylacetat-Lösung kontrastiert, gewaschen, anschließend getrocknet und mikroskopiert. Die Messungen wurden entweder in Kooperation mit der Core Facility für Mikroskopie & Imaging, Justus-Liebig-Universität, von Anna Möbus und Prof Dr. Martin Hardt unter Verwendung eines EM912 AB Transmissionselektronenmikroskops (Zeiss) bei 120 kV, ausgestattet mit einer 2k x 2k Slow-Scan-CCD-Kamera (TRS-STAR GmbH) aufgenommen oder von der Core Facility Mauspathologie und Elektronenmikroskopie, Philipps-Universität Marburg, von Prof. Dr. Axel Pagenstecher und Dr. Frederik Helmprobst unter Verwendung eines Zeiss EMs 900 (Zeiss) bei 80 kV, ausgestattet mit einer 2k Slow-Scan-CCD-Kamera (TRS-STAR GmbH).

#### 4.5.6 RNase A-, Proteinase K- und Triton X-100-Behandlung von EVs

Um RNA-Kontaminationen durch frei zirkulierende RNAs oder durch RNA-Proteinkomplexe in den EV-Proben ausschließen zu können, wurden die Proben mit RNase A und Proteinase K behandelt. Um abschließend zu zeigen, dass die verbliebenen RNAs durch die Assoziation mit den EVs geschützt waren, wurde ein Teil der EV-Proben vor der Behandlung mit Proteinase K und RNase A mit 1% Triton X-100 behandelt und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Durch Triton X-100 wurden die EVs zerstört und die sich vorher innerhalb befindlichen RNAs für den Abbau durch die RNase A-Behandlung zugänglich. Um Proteinkontaminationen zu entfernen wurden die in PBS gelösten EVs (+/- Triton X-100) mit 50 ng/μl Proteinase K (Thermo Fischer Scientific) behandelt und für 40 Minuten bei 37°C inkubiert. Für die Inaktivierung der Proteinase K wurden 5 mM PMSF hinzugefügt und die Proben für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurden, um freizirkulierende RNAs abzubauen, 0,1 μg/μl RNase A (Qiagen) zu den EV-Proben (+/- Triton X-100) hinzugefügt und diese für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Als letztes wurde der RNase A-Verdau durch die Zugabe von RNaseOut (Thermo Fisher Scientific, nach Herstellerangaben) gestoppt und die Proben mit TRIzol (Thermo Fisher Scientific) oder dem Puffer RL des Total RNA Purification Kits (Norgen Biotek Corp.) versetzt.

### 4.6 RNA-Sequenzierungs-Daten

#### 4.6.1 Herstellung einer RNA-Seq-Library

Für die Generierung der RNA-Seq-Library konnte auf kein kommerziell vertriebenes Kit zurückgegriffen werden, da nur spezifische Sequenzen und nicht die Gesamt-RNA verwendet werden sollte. Aus diesem Grund wurde die Library mittels RT-PCR hergestellt. Durch eine reverse Transkription mit spezifischen *reverse* Primern (Tabelle 6) wurde ein individueller Barcode angefügt. Die Reaktion erfolgte durch das qScript™ Flex cDNA Synthesis Kit (Quantabio), wobei das *Reaction Protocol for Gene-Specific Priming* verwendet wurde und zwischen 0,5 und 10 ng RNA eingesetzt wurde. Anschließend wurden in einer PCR-Reaktion, durch einen Primer-Überhang (siehe Tabelle 6), die Adapter für das MiSeq™-System (Illumina) angefügt. Die Zyklenzahl wurde hierbei individuell auf die jeweilige Probe angepasst. Die fertigen Libraries wurden durch AMPure XP (Beckmann Coulter, nach Herstellerangaben) aufgereinigt. Die Analyse der fertigen RNA-Seq-Libraries erfolgte mittels Bioanalyzer (High Sensitivity DNA Kit, Agilent).

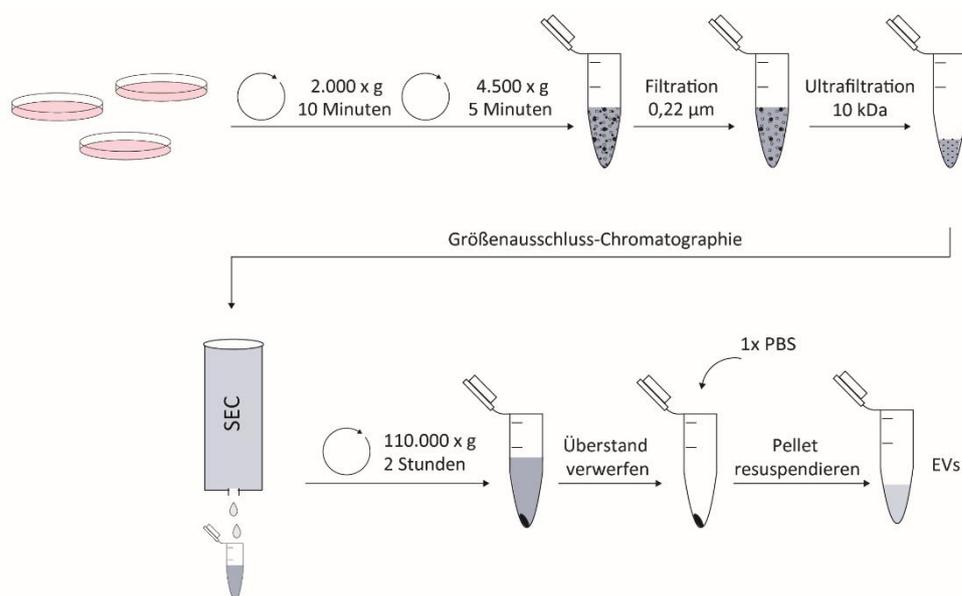
#### 4.6.2 Bioinformatische RNA-Motivanalyse

Die RNA-Seq-Datenanalyse wurde von Lee-Hsueh Hung, einem Mitglied der AG Bindereif (Institut für Biochemie der Justus-Liebig-Universität Gießen), durchgeführt. Die Methoden zur Analyse der Motivanreicherung (in 4-, 5- und 6-meren) sind in Schneider *et al.* (2019) ausführlich beschrieben.

## 5 ERGEBNISSE

### 5.1 Isolierung und Charakterisierung von EVs

Für die Isolation von extrazellulären Vesikeln aus Zellkulturüberstand wurde ein neues Aufreinigungsprotokoll etabliert, welches aus einer Kombination verschiedener Aufreinigungsmethoden bestand, darunter differentielle Zentrifugation, Filtration, Ultrafiltration, Größenausschluss-Chromatographie und Ultrazentrifugation (siehe **Abbildung 7**). Begonnen wurde mit zwei Zentrifugationsschritten mit niedrigen Geschwindigkeiten, um etwaige noch im Überstand verbliebene Zellen oder Zelltrümmer zu pelletieren. Anschließend wurde der Überstand filtriert, um große Vesikel (z.B. apoptotische Körperchen) zu entfernen. Um ein verringertes Probenvolumen zu erreichen, wurde der filtrierte Zellkulturüberstand einer Ultrafiltration unterzogen. Anschließend folgte eine Auftrennung der verschiedenen Bestandteile durch eine Größenausschluss-Chromatographie. Hierbei wurden EVs (in niedrigeren Fraktionen) und Proteine (in höheren Fraktionen) voneinander getrennt. Die EV-haltigen Fraktionen wurden durch einen Ultrazentrifugationsschritt aufkonzentriert, indem die vorhandenen EVs pelletiert und anschließend in einem geringeren Volumen PBS resuspendiert wurden.



**Abbildung 7. Isolation von extrazellulären Vesikeln (EVs)**

Schematischer Überblick der EV-Isolation aus Zellkulturüberstand. Die Isolation erfolgte durch eine Kombination aus differentiellen Zentrifugationsschritten, Filtration, Ultrafiltration und Größenausschluss-Chromatographie (SEC). Die EV-haltigen Fraktionen wurden anschließend gepoolt, durch Ultrazentrifugation pelletiert und in PBS resuspendiert.

Die isolierten EVs wurden gemäß den Richtlinien der *Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles* (MISEV) von 2018 charakterisiert. Gemäß dieser Richtlinien wurden drei Charakterisierungsmethoden etabliert. Dabei wurde Western Blot zur Detektion typischer EV-

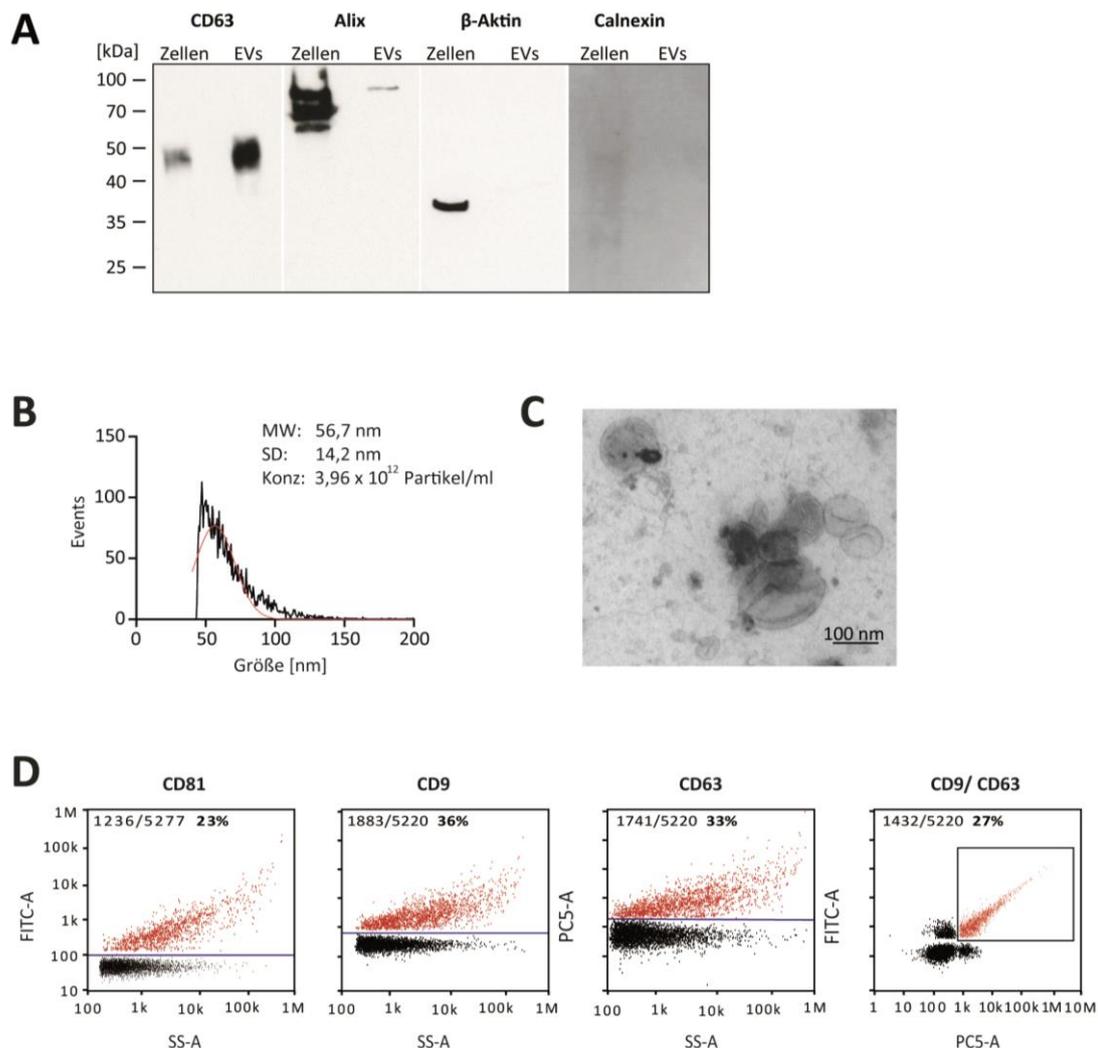
Markerproteinen verwendet, die TEM zur Analyse der EV-Struktur, -Integrität sowie -Morphologie, während die Nano-Durchflusszytometrie (NanoFCM) zur Größenbestimmung und Detektion von EV-Markerproteinen eingesetzt wurde.

Bei der Charakterisierung mittels Western Blots wurden Antikörper verwendet, die „klassische“ EV-Marker detektieren: Das Oberflächenprotein CD63 aus der Gruppe der Tetraspanine, den intravesikulären Marker Alix, der an der Biogenese beteiligt ist sowie das Housekeeping-Gen  $\beta$ -Aktin. Calnexin, ein integrales Protein des endoplasmatischen Retikulums, diente als Negativkontrolle (**Abbildung 8A**). Es wurden für jedes zu detektierende Protein in ausreichender Menge Zellen ( $1 \times 10^5$ ) und EVs ( $1 \times 10^9$ ) geladen. Für die Proteine CD63 und Alix können jeweils in den Zellen und den EVs Signale detektiert werden. Für  $\beta$ -Aktin kann nur ein Signal in den Zellen nachgewiesen werden. Gleiches gilt für Calnexin, wobei hier das Signal nur schwach und diffus sichtbar ist.

Die Bestimmung der Größenverteilung wurde mittels Nano-Durchflusszytometrie (NanoAnalyzer) durchgeführt. Der Hersteller gibt an, dass durch die Verwendung des S16M-Exos als Größenstandard eine Kalibrierungskurve zwischen der Partikelgröße und der Intensität des SSC (*side scatter*) erstellt werden kann, durch welche die Intensität jedes einzelnen EV-Partikels in eine genaue Größe umgerechnet werden kann. Die so ermittelten Größen scheinen mit gewonnenen Daten aus kryoelektronenmikroskopischen Aufnahmen übereinzustimmen (Nanofcm 2021). Für die in **Abbildung 8B** charakterisierten HEK293-EVs kann eine Größe von 56,7 nm mit einer Standardabweichung von 14,2 nm kalkuliert werden, was der herkömmlichen Größe von kleinen EVs entspricht.

Um die Struktur und Morphologie der isolierten EVs genauer beschreiben zu können, wurden transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt (**Abbildung 8C**). Auf den entstandenen Aufnahmen ist deutlich die markante, charakteristische *cup shape* Form sowie eine Größe von ca. 80 nm für die kleinen EVs und eine Größe von ca. 250 nm für die größeren EVs zu sehen. Des Weiteren konnten mittels NanoFCM-Messung (**Abbildung 8D**) EV-Oberflächenproteine direkt detektiert werden. Hierfür wurden die EVs mit FITC-konjugierten Antikörpern spezifisch für CD81 und CD9 sowie mit einem PE-konjugierten Antikörper spezifisch für CD63 fluoreszierend markiert. Zur visuellen Darstellung der Messung sind bivariate Dot-Plots der detektierten Fluoreszenz gegen den SSC sowie die positiven Ereignisse in % geplottet. Zusätzlich sind in der rechten Spalte doppelt positive Ereignisse für CD9/CD63 abgebildet. Für die Messung wurden EVs aus HEK293-Zellen, nach dem in **Abbildung 7** dargestellten Schema, aufgereinigt. Die Messungen zeigen, dass 23% der gemessenen Partikel positiv für CD81, 36%

für CD9 und 33% für CD63 sind. Außerdem zeigt die Co-Färbung von CD9 und dem exosomalalen Marker CD63 einen Wert von 27%.



**Abbildung 8. Charakterisierung von EVs aus HEK293-Zellen**

**A)** Western Blot-Analyse von HEK293-Zellen und EVs zum Nachweis der EV-Markerproteine CD63, Alix, β-Aktin und Calnexin als Negativkontrolle (Proteinmarker für das endoplasmatische Retikulum).

**B)** NanoFCM-Messung mit Darstellung der Größenverteilung und Konzentration. (Konz = Konzentration, MW = Mittelwert (rot), SD = Standardabweichung (schwarz))

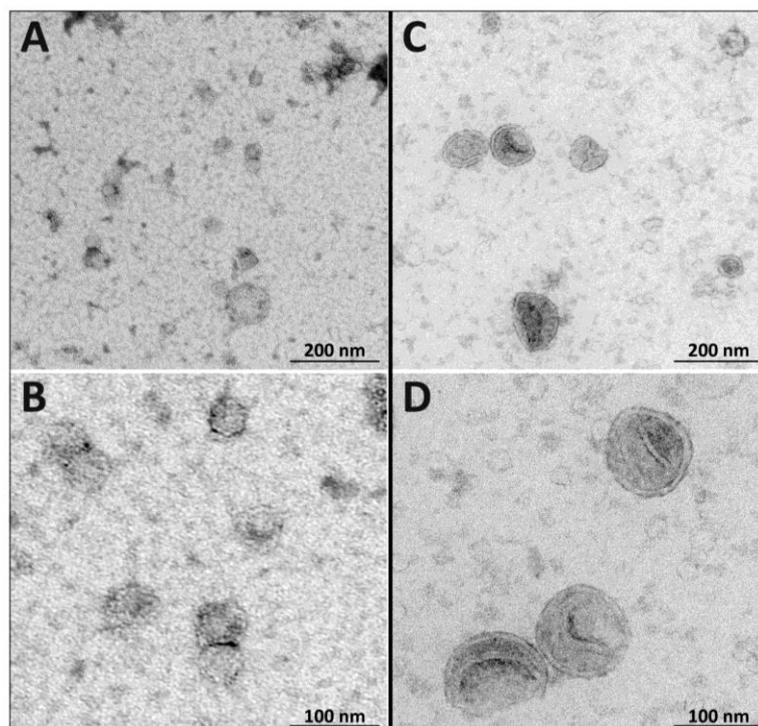
**C)** Elektronenmikroskopische Aufnahme der isolierten EVs, die fixiert, mit Uranylacetat kontrastiert und in Methylcellulose eingebettet wurden (Maßstabsbalken 100 nm). Die Aufnahme wurde in Kooperation mit der Core Facility Mauspathologie und Elektronenmikroskopie, Philipps-Universität Marburg, von Prof. Dr. Axel Pagenstecher und Dr. Frederik Helmprobst aufgenommen.

**D)** Einzelpartikelphänotypisierung zur Detektion von EV-Markerproteinen. Die EVs wurden mit FITC-konjugierten Antikörpern spezifisch für CD81 und CD9 sowie mit PE-konjugierten Antikörpern spezifisch für CD63 fluoreszierend markiert. (FITC-A = Fluorescein-5-isothiocyanate area, PC5-A = Phycoerythrin cyanine 5 area, SS-A = side scatter area) Alle NanoFCM-Messungen wurden in Kooperation mit der EV Core Facility, Zentrum für Tumor- und Immunbiologie, Philipps-Universität Marburg, von Dr. Christian Preußner durchgeführt.

## 5.2 Transmissionselektronenmikroskopie zur Detektion von EVs

Die hier verwendeten EVs stammen aus dem Parasiten *Trypanosoma brucei*, dem Erreger der Afrikanischen Schlafkrankheit, da die Aufnahmen für ein anderes Manuskript verwendet werden sollen. Die Isolation von EVs aus *T. brucei* unterscheidet sich geringfügig von der in **Abbildung 7** etablierten Methode. Da *T. brucei* nicht in serumfreien Medium kultiviert werden können, konnte kein chemisch definiertes Medium verwendet werden. Des Weiteren befand sich das in **Abbildung 7** beschriebene Protokoll noch in der Etablierungsphase, weswegen eine polymerbasierte Strategie verwendet wurde, um das Volumen zu verringern. Es wurden zwei Aufnahmen derselben Probe gemacht, jedoch wurden die Proben unterschiedlich vorbereitet.

Das Protokoll, welches für die **Abbildung 9A/B** verwendet wurde, bestand aus dem Laden der EVs auf ein Formvar-/Kohle-beschichtetes TEM-Grid, einer Inkubation, gefolgt von Waschschritten einer Kontrastierung mit Uranylacetat, weiteren Waschschritten und einer anschließenden Inkubation (Trocknung).



**Abbildung 9. Unterschiede in der Präparation beeinflussen Qualität und EV-Morphologie in der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)**

**A/B)** Isolierte EVs aus *T. brucei* (Prozyklische Form) wurden mit Uranylacetat gegengefärbt und gewaschen.

**C/D)** Basierend auf dem Protokoll von Thery et al. (2006) wurden EVs aus *T. brucei* (Prozyklische Form) mit Formaldehyd fixiert, mit Uranylacetat gegengefärbt und in Methylcellulose eingebettet. (Maßstabsbalken 200 nm und 100 nm) Die Aufnahmen wurden in Kooperation mit der Core Facility für Mikroskopie & Imaging, Justus-Liebig-Universität Gießen, von Anna Möbus und Prof Dr. Martin Hardt aufgenommen.

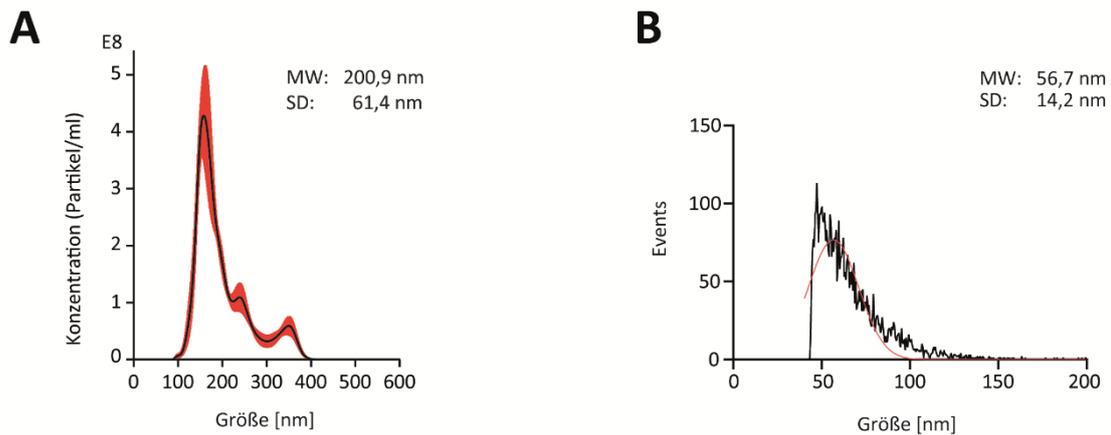
Das Protokoll, welches für die **Abbildung 9C/D** verwendet wurde, wurde im Wesentlichen von Thery *et al.* (2006) übernommen. Hierbei wurden die isolierten EVs mit Formaldehyd fixiert, auf ein Formvar-/Kohle-beschichtetes TEM-Grid gegeben, gewaschen und mit Uranylacetat kontrastiert. Anschließend erfolgten weitere Waschschriffe, eine Einbettung der Probe durch Methylcellulose-Uranylacetat sowie eine finale Trocknung des Grids.

Es ist deutlich zu erkennen, dass sich durch das in **Abbildung 9C/D** verwendete Protokoll viel klarere und schärfere Resultate erzielen lassen. Neben der verbesserten Schärfe der EVs kann auch eine verminderte Hintergrundverschmutzung erreicht werden. Des Weiteren ist die EV-typische *cup shape* Form deutlich zu erkennen, welche in **Abbildung 9A/B** nicht eindeutig zu erkennen ist. Des Weiteren scheint es, dass die in **Abbildung 9A/B** detektierten EVs kleiner sind als die in **Abbildung 9C/D**, obwohl es sich um dieselbe Probe handelt.

### 5.3 Größenbestimmung von EVs

Zur Bestimmung der EV-Größenverteilung können zum einen die Nanopartikel-Tracking-Analyse (NTA) oder die Nano-Durchflusszytometrie (NanoFCM) verwendet werden. Bei der NTA handelt es sich um eine optische Methode, die zur Bestimmung der Größe und Konzentration von Partikeln in Suspension verwendet wird (siehe Abschnitt 3.8 und Arab *et al.* 2021). Im Gegensatz dazu beruht die NanoFCM auf einem durchflussbasierten Verfahren, welches Partikel in Nanogröße durch Streuung und/oder Fluoreszenz detektiert (siehe Abschnitt 3.8 und Arab *et al.* 2021).

Da beide Geräte während der Anfertigung dieser Arbeit zur Verfügung standen, wurden die Methoden hinsichtlich ihrer Messergebnisse miteinander verglichen (**Abbildung 10**). Hierzu wurden EVs, aufgereinigt aus HEK293-Zellen, zum einen mittels NTA (NanoSight NS300) oder NanoFCM (NanoAnalyzer) gemessen. Die gemessenen Partikel weisen bei der NTA eine durchschnittliche Größe von 200,9 nm mit einer Standardabweichung von 61,4 nm und bei der NanoFCM eine Größe von 56,7 nm mit einer Standardabweichung von 14,2 nm auf.



**Abbildung 10. Vergleich der Größenbestimmungsmethoden für EVs: Nanopartikel-Tracking-Analyse (NTA) vs. Nano-Durchflusszytometrie (NanoFCM)**

EVs, isoliert aus HEK293-Zellen, zeigen unterschiedliche Größenverteilungen bei direktem Vergleich der NTA (A) und der NanoFCM (B). (MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung) Alle NanoFCM-Messungen wurden in Kooperation mit der EV Core Facility, Zentrum für Tumor- und Immunbiologie, Philipps-Universität Marburg, von Dr. Christian Preußner durchgeführt.

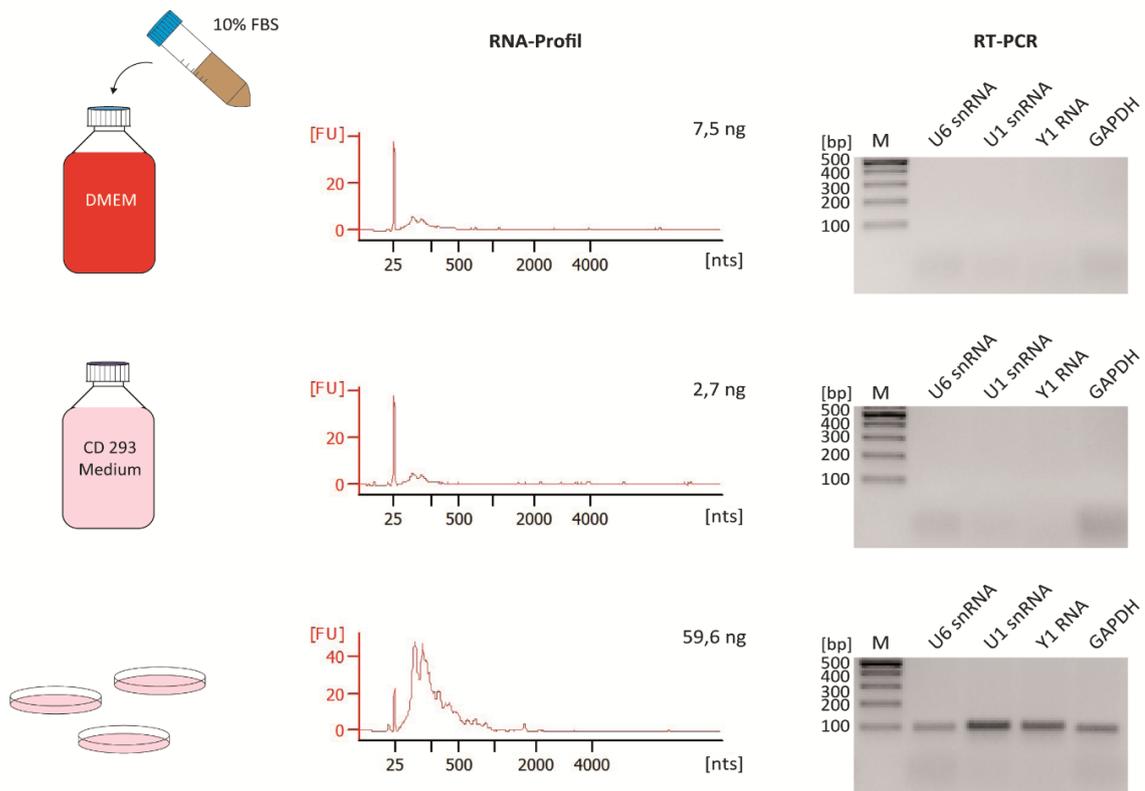
## 5.4 Charakterisierung von EV-RNA

### 5.4.1 Detektion von RNA-Kontaminationen in Zellkulturmedium

Um RNA-Kontaminationen durch die verwendeten Medien ausschließen zu können, wurde aus den verwendeten Medien, DMEM versetzt mit 10% FBS und CD 293 Medium, RNA isoliert. Dazu wurden 50 ml der Medien filtriert und durch Ultrafiltration auf 500  $\mu$ l verringert. Anschließend folgte eine Aufreinigung, bestehend aus einer Größenausschluss-Chromatographie und einem finalen Ultrazentrifugationsschritt (siehe **Abbildung 7**).

Die etwaigen RNA-Kontaminationen wurden mit dem Norgen total RNA purification Kit (Norgen Biotek) isoliert, in einem Probenvolumen von 35  $\mu$ l eluiert und auf dem Bioanalyzer analysiert (**Abbildung 10**). Als Positivkontrolle dienten EVs aus ES-2 Zellen. Zusätzlich wurde ein RT-PCR-Assay zur Detektion der U6 snRNA, U1 snRNA, Y1 RNA und GAPDH durchgeführt.

Das RNA-Profil des DMEMs zeigt eine RNA-Größenverteilung von 25 - 200 nts und eine Gesamt-RNA-Menge von 7,5 ng. Für das CD 293 Medium kann ein ähnliches RNA-Profil detektiert werden und eine Gesamt-RNA-Menge von 2,7 ng. Bei den anschließenden RT-PCRs kann keine der vier RNAs detektiert werden. Hingegen dazu kann bei der Positivkontrolle (ES-2-EV-RNA) eine Gesamt-RNA-Menge von 59,6 ng sowie eine RNA-Größenverteilung von 25 - 500 nts bestimmt werden. Des Weiteren können alle vier RNAs durch RT-PCR nachgewiesen werden (siehe **Abbildung 11**).

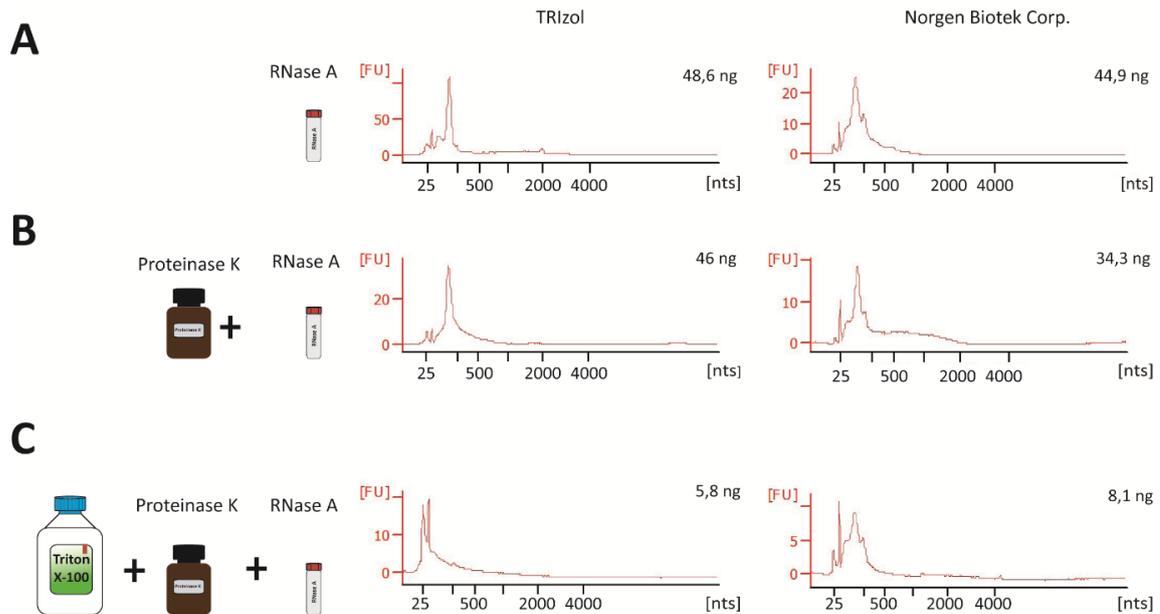


**Abbildung 11. Überprüfung der Zellkulturmedien auf RNA-Kontaminationen**

Die Medien, DMEM versetzt mit 10% FBS und CD 293 Medium, wurden dem Isolationsprozess von EVs (siehe **Abbildung 7**) unterzogen. Anschließend wurden vermeintliche RNA-Kontaminationen aus den Medien mittels Total RNA Purification Kit von Norgen Biotek Corp. isoliert sowie das RNA-Profil und die Gesamt-RNA-Menge mittels Bioanalyzer bestimmt. Zur Detektion von spezifischen RNAs wurde eine RT-PCR durchgeführt. Hierbei wurde jeweils 1 ng der Gesamt-RNA eingesetzt, als Positivkontrolle diente Zellkulturüberstand (EVs) von ES-2-Zellen. (bp = Basenpaare, M = Marker, nts = Nukleotide)

#### 5.4.2 EV-assoziierte RNAs sind vor dem Abbau durch RNasen geschützt

Um eine etwaige Kontamination von freien RNAs oder RNA-Proteinkomplexen während der EV-Aufreinigung auszuschließen, wurden aufgereinigte EVs mit Proteinase K und RNase A behandelt. Als Kontrolle diente ein Ansatz, bei dem EVs vorher mit einem Detergens (Triton X-100) inkubiert wurden. Durch den Proteinase K-Verdau sollten alle RNA-bindende Proteine verdaut werden und die RNA zugänglich für den nachfolgenden RNase A-Verdau sein, gleiches galt für freie RNA. Demnach sollten RNAs, welche sich in EVs befanden bzw. mit ihnen assoziiert waren, intakt bleiben.



**Abbildung 12. EV-assoziierte RNAs sind vor dem Abbau durch RNasen größtenteils geschützt**

Die aus ES-2-Zellen isolierten EVs wurden in drei Ansätzen mit **(A)** RNase A, **(B)** Proteinase K und RNase A, **(C)** Proteinase K, RNase A und Triton X-100 behandelt, anschließend folgte zum Vergleich eine RNA-Isolation mit TRIZOL oder dem Total RNA Purification Kit von Norgen Biotek Corp. sowie eine Analyse durch den Bioanalyzer. Die isolierte Gesamt-RNA-Menge ist in ng angegeben.

Nach der oben beschriebenen Methode wurden EVs, stammend aus ES-2-Zellen, behandelt. Die RNA wurde mit TRIZOL oder dem Norgen total RNA purification Kit (Norgen Biotek) isoliert und auf einem Bioanalyzer analysiert (**Abbildung 12**). Nach der Behandlung der EVs mit RNase A (**Abbildung 12A**) kann für die isolierten Proben mit TRIZOL eine Gesamt-RNA-Menge von 48,6 ng bestimmt werden, das RNA-Profil rangiert zwischen 25 - 200 nts. Bei den isolierten Proben, die mit dem Kit von Norgen Biotek isoliert wurden, kann eine Gesamt-RNA-Menge von 44,9 ng bestimmt werden, das RNA-Profil rangiert zwischen 25 - 500 nts. Nach dem zusätzlichen Proteinase K-Verdau sinkt die Gesamtmenge auf 46 ng (TRIZOL) bzw. 34,3 ng (Norgen Biotek), die RNA-Profile zeigen keine signifikante Veränderung (**Abbildung 12B**). Bei vorheriger Zugabe von Triton X-100 (**Abbildung 12C**) kann ein deutlicher Abfall in der Gesamt-RNA-Menge detektiert werden (5,8 ng TRIZOL; 8,1 ng Norgen Biotek). Das RNA-Profil zeigt bei den Proben, die mit TRIZOL isoliert wurden nur noch kleinere RNAs mit einer Größe von 25 -100 nts. Der direkte Vergleich der beiden RNA-Isolationsmethoden zeigt eine leichte Veränderung im RNA-Profil, wo hingegen die Gesamt-RNA-Menge sehr ähnlich bleibt.

## 5.5 *In vivo* SELEX zur Detektion von RNA-Sequenzmotiven

Vor der eigentlichen SELEX-Analyse wurden die aufgereinigten EVs nach den in **Abbildungen 7 & 8** etablierten Methoden entsprechend der MISEV-Guidelines isoliert und charakterisiert. Um den Mechanismus des spezifischen Beladens von EVs mit RNA intensiver zu untersuchen, wurde ein *in vivo* SELEX (Systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung) etabliert.

Beim SELEX handelt es sich um eine Methode zur spezifischen Selektion. Hierbei bindet beispielsweise DNA oder RNA als Ligand spezifisch an ein ausgewähltes Target. Bei dem klassischen SELEX-Experiment wird zu Anfang ein DNA-Pool mit zufälligen Sequenzen mit einer Länge zwischen 20 und 100 Nukleotiden synthetisiert. Diese zufälligen Sequenzen werden von konstanten Sequenzen flankiert (konstante Regionen), welche zur Detektion und PCR-Amplifikation erforderlich sind. Im Falle eines RNA-SELEXs muss der DNA-Pool zuerst durch eine T7-Transkription in RNA umgeschrieben werden. Danach erfolgt eine Selektionsrunde, bei der die RNA und z.B. ein Protein miteinander inkubiert werden. Durch anschließende Aufreinigung des Targets und den daran befindlichen RNAs kommt es zur Selektion der RNAs, die mit dem Target interagieren. Durch Freisetzung der gebunden RNAs vom Target, reverser Transkription in cDNA sowie anschließender PCR-Amplifikation, wird ein neuer Ausgangspool geschaffen. Durch Wiederholung dieser Schritte kommt es zur spezifischen Anreicherung der RNAs, die spezifisch mit dem Target interagieren. Anschließend kann eine Library-Präparation, Sequenzierung und bioinformatische Analyse folgen (Urak *et al.* 2016, Ellington & Szostak 1990, Klug & Famulok 1994, Tuerk & Gold 1990). Da der SELEX hier *in vivo* zur Detektion spezifischer RNA-Sequenzen in EVs genutzt werden sollte, wurden einige Schritte adaptiert.

Zu Beginn des Verfahrens wurde ein Molekülpool bestehend aus 40 Nukleotid langen DNA-Sequenzen generiert. Dabei wurde die DNA so synthetisiert, dass nicht ein Nukleotid an einer bestimmten Stelle eingebaut wird, sondern eine Mischung aus allen vier Nukleobasen, woraus eine sehr hohe Sequenzvariation hervorgeht. Die so entstandene randomisierte DNA-Sequenz (N40) wurde flankiert von zwei bekannten Sequenzen, die der Primererkennung dienen (konstante Regionen). Anschließend wurden die DNA-Oligonukleotide in drei verschiedene Expressionskonstrukte kloniert (Pol II/poly(A), Pol II/U1-3'box, Pol III/U6-term).

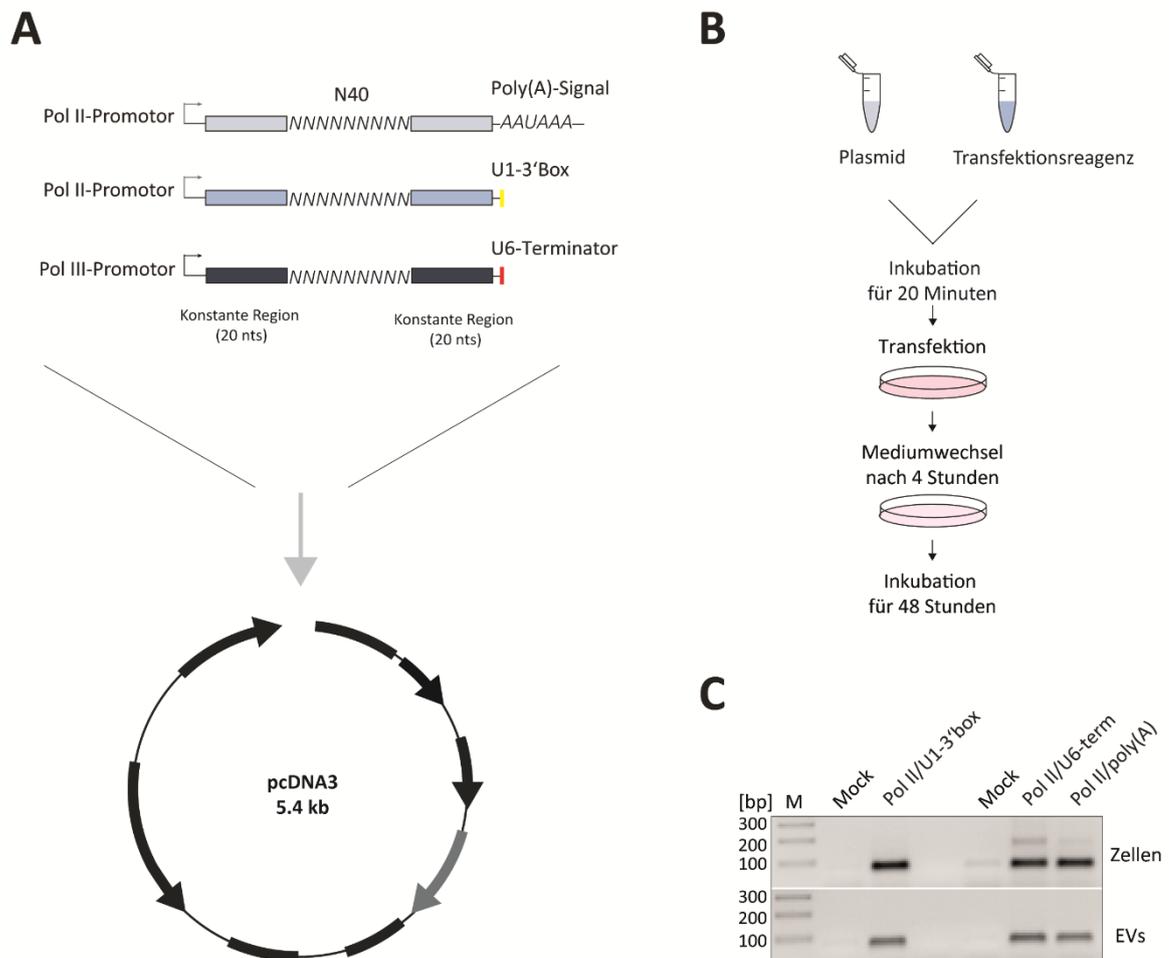
Die Expressionskonstrukte wurden in Bakterien (*E. coli*) transformiert und die gesamte Plasmid-DNA isoliert. Dieser Schritt wurde eingefügt, da für die RNA-Expression in EVs eine passive Beladungsstrategie gewählt wurde. Hierbei wurde RNA in der Zelle mittels Plasmid überexprimiert, was zu einer erhöhten RNA-Konzentration in der transfizierten Zelle und zur anschließenden Verpackung der RNAs in EVs führte. Damit unterschiedliche RNA-Transkripte entstehen, wurden drei verschiedene SELEX-Konstrukte entworfen. Zwei der Konstrukte

beginnen mit einem RNA Pol II-Promotor, gefolgt von einer zufälligen Sequenz (N40), die von zwei konstanten Regionen (20 nts) flankiert wird, wobei das erste Konstrukt mit einem Poly(A)-Signal (AAUAAA) endet und das zweite mit einem U1-Transkriptionsstoppsignal (gelb). Das dritte Konstrukt beginnt mit einem RNA Pol III-Promotor und endet mit einem U6-Transkriptionsstoppsignal (rot). Alle oben genannten Konstrukte sind in einen pcDNA3-Vektor eingefügt worden (**Abbildung 13A**). Anschließend wurden die SELEX-Expressionskonstrukte einzeln, mittels Lipofektion in HEK293-Zellen transfiziert und für zwei Tage kultiviert (**Abbildung 13B**). Nach Aufreinigung der EVs, RNA-Isolation und DNase-Verdau wurde zum Nachweis des erfolgreichen Beladens der EVs mit den drei verschiedenen RNAs eine RT-PCR durchgeführt. Hierbei wurden Primer verwendet, die spezifisch gegen die konstanten Regionen der einzelnen Konstrukte gerichtet waren (**Abbildung 13C**). Es kann deutlich gezeigt werden, dass die RNA-Expression aller drei SELEX-Konstrukte erfolgreich war; jeweils für die Zell- und die dazu gehörige EV-RNA können deutliche Signale mittels RT-PCR detektiert werden. Da die Menge der aus EV isolierten RNA sehr gering ist, wurde keine weitere SELEX-Runde angefertigt. Die isolierten EV-RNAs und die RNA der dazugehörigen Zellen wurden zur Anfertigung von Libraries verwendet, um die Proben anschließend mittels RNA-Seq zu sequenzieren. Dabei konnte für die Herstellung der Libraries nicht auf ein kommerziell erhältliches Kit zugegriffen werden, da nur die RNA-Sequenzen verwendet werden sollten, die dem Anfangspool entsprungen waren.

Stattdessen wurden die für die Sequenzierung benötigten Barcodes und Adapter über mehrere PCR-Schritte angefügt (**Abbildung 14A**). Dazu wurden 200 ng der Gesamt-RNA aus Zellen und 2 ng der Gesamt-RNA aus EVs, unter Verwendung eines spezifischen *reverse* Primers, welcher zusätzlich einen Barcodeüberhang enthielt, in cDNA umgeschrieben. Hierbei wurden sechs einzigartige Barcodes (Pol II/poly(A) Zellen bzw. EVs, Pol II/U1-3'box Zellen bzw. EVs und Pol III/U6-term Zellen bzw. EVs) verwendet.

Anschließend wurde der entstandenen cDNA mittels PCR ein spezifischer Adapter für die *flow cell* angefügt. Hierfür wurde ein *forward* Primer verwendet, der einen Überhang enthielt. Die Zyklen zur Vervielfältigung der Libraries wurden individuell angepasst. Anschließend wurden die Libraries aufgereinigt, um verbliebene Primer und PCR-Reagenzien zu entfernen. Die fertigen Libraries wurden anschließend sequenziert.

Die Libraries wurden mit dem Bioanalyzer analysiert (**Abbildung 14B**). Da es sich bei den Libraries um Sequenzen mit einer definierten Länge handelt, kann nur ein spitzer Peak detektiert werden. Alle Libraries stimmen mit den erwarteten Größen überein (Pol II/Poly(A), 211 bp; Pol II/U1-3' box, 198 bp; Pol III/U6-term, 211 bp). Die geringere Größe des Pol II/U1-3'box-Konstrukts lässt sich auf eine Verkürzung der konstanten Region um 13 Nukleotide im Vergleich zu den anderen Konstrukten zurückführen.



**Abbildung 13. Identifizierung von RNA-Motiven für das selektive Beladen von RNAs in EVs**

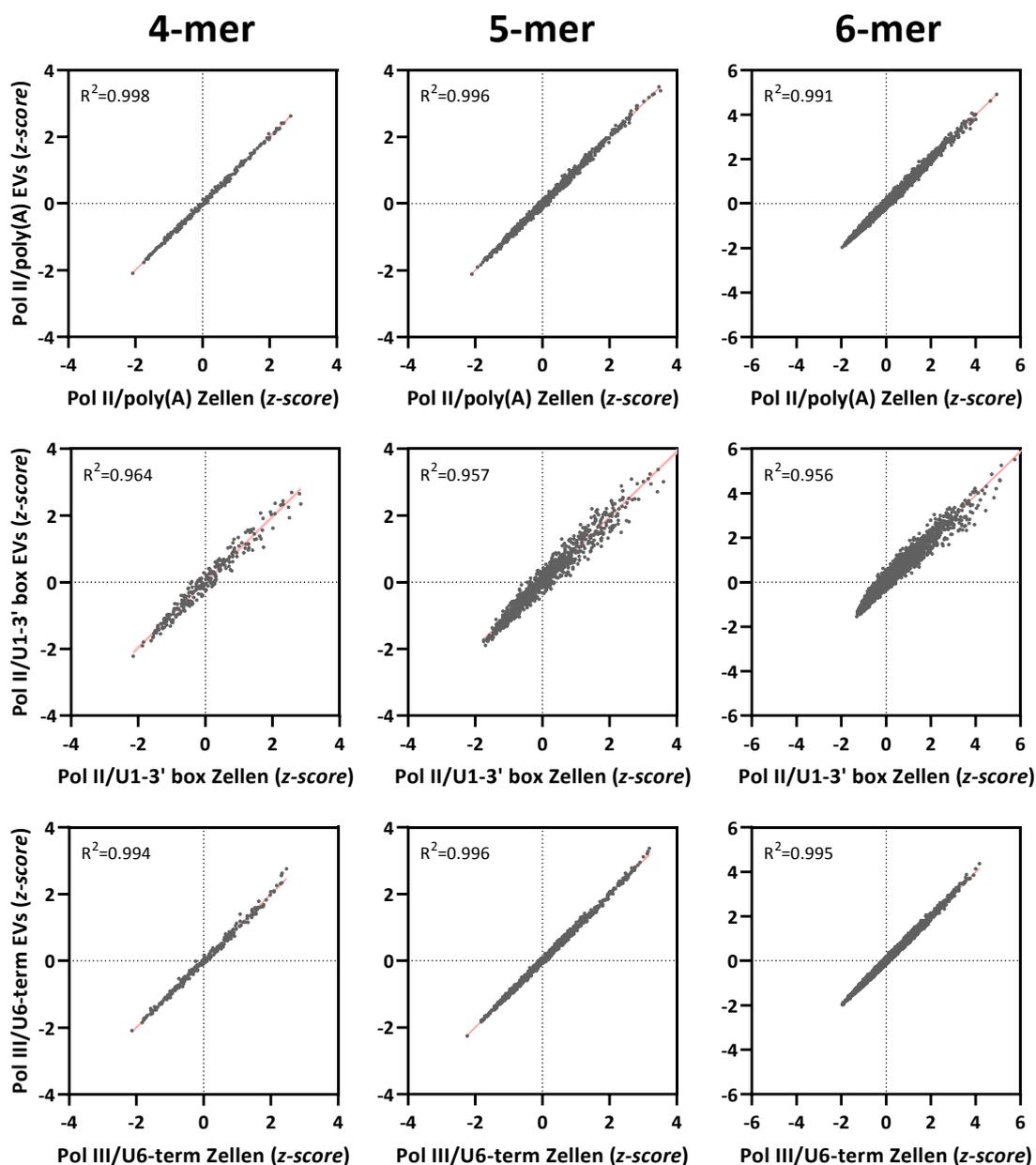
**A)** Schematische Darstellung der drei *in vivo* SELEX-Expressionskonstrukte. Zwei der Konstrukte enthalten einen RNA Pol II-Promotor, gefolgt von einer random Sequenz (N40), die von zwei konstanten Regionen (20 nts) flankiert wird. Das erste Konstrukt endet mit einem Poly(A)-Signal (AAUAAA) und das zweite mit einem U1-Transkriptionsstoppsignal (gelb). Das dritte Konstrukt beginnt mit einem RNA Pol III-Promotor und endet mit einem U6-Transkriptionsstoppsignal (rot). Alle oben genannten Konstrukte wurden in einen pcDNA3-Vektor eingefügt.

**B)** Schematische Darstellung der Transfektion. Die Plasmid-DNA und die Transfektionsreagenz wurden gemischt und für 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurde der Mix auf die Zellen gegeben. Nach 4 Stunden erfolgten ein Mediumwechsel und eine Inkubation der Zellen für 48 Stunden.

**C)** Detektion der Expressionskonstrukte nach Transfektion mittels RT-PCR in HEK293-Zellen und EVs. (bp = Basenpaare, M = Marker)

In **Abbildung 15** ist die Auswertung der bioinformatischen Analyse in Form eines Streudiagramms dargestellt. Aufgetragen sind die z-scores von EVs/Zellen, für jedes der drei Expressionskonstrukte (Pol II/poly(A), Pol II/U1-3'box, Pol III/U6-term). Es ist zu sehen, dass keine spezifische RNA-Anreicherung detektiert werden kann, weder in den 4-mer, 5-mer bzw. 6-





**Abbildung 15. Korrelation der RNA-Anreicherung von 4-mer, 5-mer und 6-mer-Motiven in EVs im Vergleich zu Zellen**  
 Dargestellt ist die Korrelation der RNA-Anreicherung in EVs zu Zellen gemessen durch den z-score. Aufgetragen sind EVs (y-Achse) sowie die in Zellen exprimierte Input-Pools der drei verschiedenen Reporterkonstrukte (Pol II/poly(A), Pol II/U1-3'box, Pol III/U6-term); x-Achse). ( $R^2$  = Bestimmtheitsmaß)

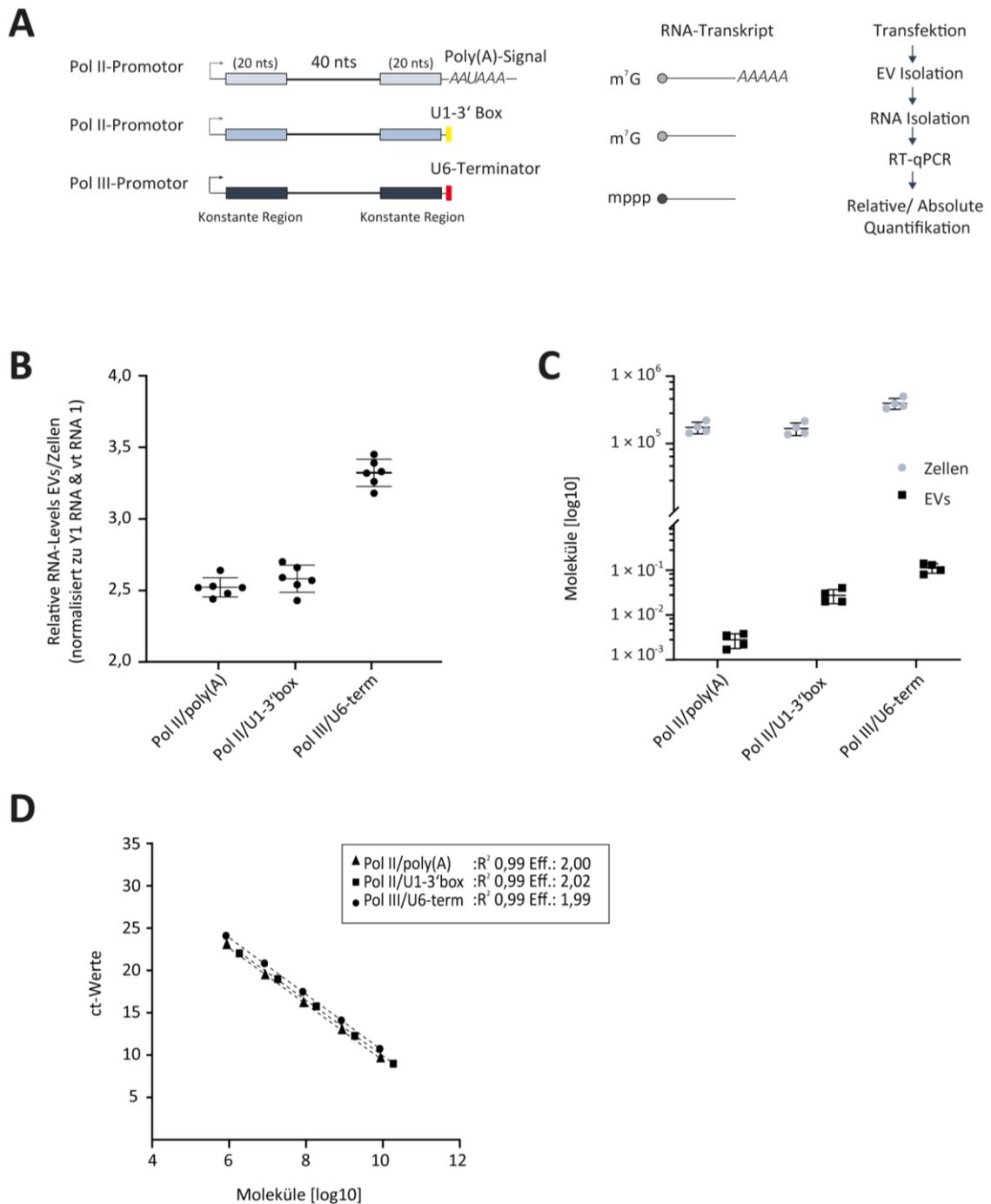
vorhanden. Gleiches gilt für Motive, die in Zellen häufig vorhanden sind. Sie sind ebenfalls in EVs häufig vorhanden. Des Weiteren konnten für alle dargestellten Werte Bestimmtheitsmaße ( $R^2$ ) zwischen 0,956 und 0,998 bestimmt werden.

## 5.6 RNA-Polymerase III-Transkripte werden bevorzugt in EVs geladen

Um festzustellen, ob eine RNA-Polymerase-abhängige Beladung von RNAs in EVs existiert, wurden drei Expressionskonstrukte (**Abbildung 16A**) entworfen. Alle drei Konstrukte weisen eine spezifische konstante Region auf, die die individuelle Detektion der Transkripte ermöglicht sowie dieselbe degenerierte Sequenz (NNNNN) mit einer Länge von 40 nts. Das Pol II/poly(A)-Konstrukt enthält einen RNA-Polymerase II-Promotor (CMV) und endet mit einem klassischen Poly(A)-Signal (AAUAAA), wodurch ein mRNA-ähnliches Transkript entsteht. Das Pol II/U1-3'-box-Konstrukt enthält ebenfalls einen RNA-Polymerase II-Promotor, ist jedoch am 3'-Ende mit einer U1-3'Box terminiert, eine Sequenz die 13 - 16 Nukleotide lang ist und normalerweise an der Bildung des 3'-Endes menschlicher snRNAs beteiligt ist (Egloff *et al.* 2008). So wird ein natürliches Pol II-Transkript ohne Poly(A)-Schwanz erzeugt. Das dritte Reporterkonstrukt enthält einen RNA-Polymerase III-Promotor sowie einen U6-Terminator (UUUUU) am 3'-Ende (Gao *et al.* 2018). Alle drei Konstrukte wurden in HEK293-Zellen co-transfiziert, nach 24 Stunden Inkubationszeit wurden die EVs aufgereinigt und die RNA isoliert.

Die Quantifizierung wurde anschließend relativ (**Abbildung 16B**) und absolut (**Abbildung 16C**) mittels RT-qPCR durchgeführt. Bei der relativen Quantifizierung erfolgte die Normalisierung gegen die endogenen, reichlich vorhandenen EV-RNAs Y1 RNA und vault RNA 1. Dargestellt sind die relativen RNA-Level des Verhältnisses EVs zu Zellen. Es ist deutlich zu erkennen, dass die überexprimierten Pol III-Transkripte in EVs stärker akkumulieren (relatives RNA-Level liegt bei 3), während das relative RNA-Level der beiden Pol II-Transkripte bei ca. 2,5 liegt.

Für die absolute Quantifizierung der Transkripte wurden Standardkurven mit *in vitro* transkribierten RNAs erstellt, die die jeweilige Sequenz der zu quantifizierenden RNA enthielt (**Abbildung 16D**). Zusätzlich zu den EV-RNAs wurden auch die überexprimierten RNAs in den EV-produzierenden Zellen absolut quantifiziert. Innerhalb der Zellen können für Pol III/U6-term  $4,06 \times 10^5$ , für Pol II/U1-3'box  $1,75 \times 10^5$  und für Pol II/poly(A)  $1,8 \times 10^5$  Moleküle pro Zelle bestimmt werden, während die Menge der RNA-Moleküle innerhalb der EVs tendenziell unter einem Molekül pro EV liegt. Das Transkript von Pol III/U6-term ist mit 0,104 Molekülen pro EV am häufigsten in EVs vorhanden. Sowohl bei den Transkripten für Pol II/U1-3'box als auch bei Pol II/poly(A) können nur 0,022 Moleküle pro EV bzw. 0,003 Moleküle pro EV detektiert werden (**Abbildung 16C**).



**Abbildung 16. Einfluss unterschiedlicher RNA-Polymerasen auf die RNA-Verpackung in EVs**

**A)** Schematischer Aufbau der Expressionskonstrukte. Das Konstrukt Pol II/poly(A) enthält einen RNA Pol II-Promotor (CMV-Promotor), gefolgt von einer Sequenz mit 40 nts, flankiert von zwei konstanten Regionen und einem terminalen Poly(A)-Signal (AAUAAA), das zu einem polyadenylierten Transkript mit  $m^7G$ -Kappe führt. Das Konstrukt Pol II/U1-3'box enthält ein zusätzliches U1-Transkriptionsstoppsignal (gelb), das zu einem nicht polyadenylierten Transkript mit  $m^7G$ -Kappe führt. Das Konstrukt Pol III/U6-term enthält einen RNA Pol III-Promotor (U6-Promotor) und ein U6-Transkriptionsstoppsignal (rot), was zu einer RNA mit einer  $\gamma$ -Monomethylkappe (mppp) ohne Poly(A)-Schwanz führt. Nach Co-Transfektion aller drei Konstrukte in HEK293-Zellen wurde die Gesamt-RNA aus Zellen und EVs isoliert, gefolgt von einer RT-PCR mit Primern, die gegen die jeweiligen konstanten Regionen gerichtet waren.

**B)** Die relative Quantifizierung wurde mit RT-qPCR durchgeführt, die Expression der Transkripte wurde auf die Gesamtexpression des geometrischen Mittels der vault RNA 1 (vt RNA 1) und Y1 RNA (n=5) normalisiert, Mittelwert und Standardabweichungen sind dargestellt.

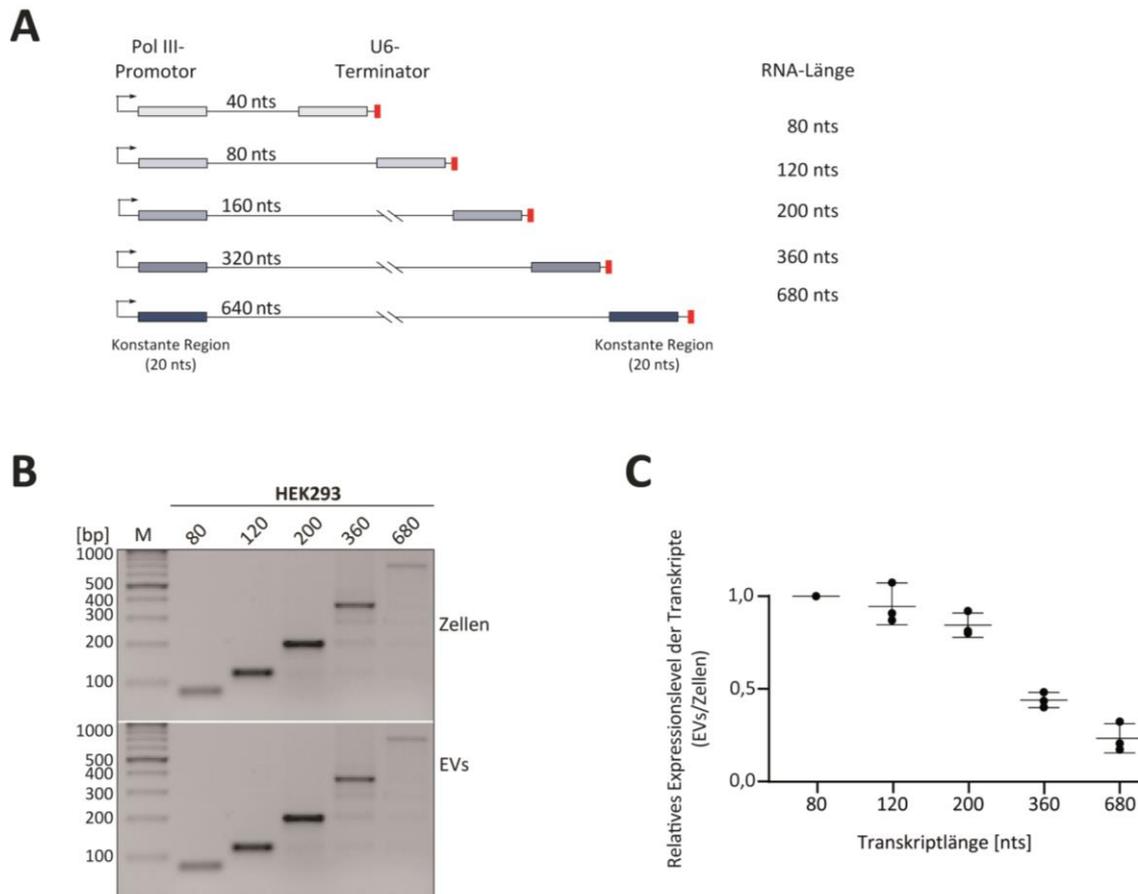
**C)** Die absolute Quantifizierung der RNA-Verpackung in EVs wurde mit RT-qPCR durchgeführt. Die Quantifizierung der absoluten Molekülzahl [log10-Skala] der angegebenen Transkripte in Zellen (grau) und ihren entsprechenden EVs (schwarz) sind mit Mittelwert und Standardabweichungen dargestellt (n=4).

**D)** Standardkurven für die absolute Quantifizierung. Die Standardkurven wurden mittels RT-qPCR für die drei Transkripte quantifiziert. Die Datenpunkte sind Mittelwerte von Dreifachmessungen. ( $R^2$  = Bestimmtheitsmaß, Eff = Amplifikationseffizienzen)

## 5.7 Kleinere Transkripte werden bevorzugt in EVs geladen

Um zu bestimmen, dass kleinere RNAs bevorzugt mit EVs assoziiert sind, wurden fünf RNA-Polymerase III-Promotor-basierte Reporterkonstrukte (Längenkonstrukte) entworfen. Alle Konstrukte enthalten neben dem erwähnten Polymerase III-Promotor einen U6-Terminator. Die so entstehenden RNAs enthalten eine  $\gamma$ -monomethyl Kappe und keinen Poly(A)-Schwanz. Die fünf verschiedenen Längenkonstrukte exprimieren RNAs mit unterschiedlichen Längen (80, 120, 200, 360 und 680 nts). Als Sequenz dienten zwei zufällig generierte Sequenzen von 40 nts, die jeweils verdoppelt wurden. Jedes Längenkonstrukt enthält unterschiedliche, flankierende konstante Regionen, die eine spezifische Detektion der einzelnen Transkripte ermöglicht (**Abbildung 17A**). Die Konstrukte wurden in HEK293-Zellen transfiziert. Die so exprimierten RNAs wurden in EVs verpackt und die freigesetzten EVs wurden nach 48 Stunden isoliert.

Um zu überprüfen, ob die exprimierten RNAs in den Zellen und den entsprechenden EVs nachgewiesen werden können, wurde RNA isoliert und eine RT-PCR durchgeführt. Hierbei wurden Primer verwendet, die sich direkt gegen die konstanten Regionen richteten. Alle fünf Transkripte können in Zellen und EVs nachgewiesen werden (**Abbildung 17B**). Für alle Transkripte wurde ein größenabhängiger Signalabfall detektiert. Um eine mögliche größenabhängige Freisetzung der Transkripte zu evaluieren, wurde eine RT-qPCR durchgeführt. Hierbei wurden die relativen RNA-Level in EVs gegen die der Zellen normalisiert und analysiert (**Abbildung 17C**). Zur besseren Darstellung wurde das kürzeste Transkript (80 nts) als Referenz auf 1 gesetzt. Basierend auf den Größenverteilungen ist zu sehen, dass kleinere RNAs effizienter in EVs freigesetzt werden als größere.



**Abbildung 17. Längenabhängige Freisetzung von RNAs in EVs**

**A)** Schematischer Aufbau der Expressionskonstrukte. Alle Konstrukte enthalten einen RNA Pol III-Promotor, gefolgt von einer Sequenz (40 nts), welche jeweils verdoppelt wurde (40, 80, 160, 320, 640 nts) und von zwei individuellen konstanten Regionen (20 nts) flankiert wird. Alle Konstrukte enthalten ein U6-Terminationssignal (rot), was zu einer RNA mit einer  $\gamma$ -Monomethylkappe ohne Poly(A)-Schwanz führt. (nts = Nukleotide)

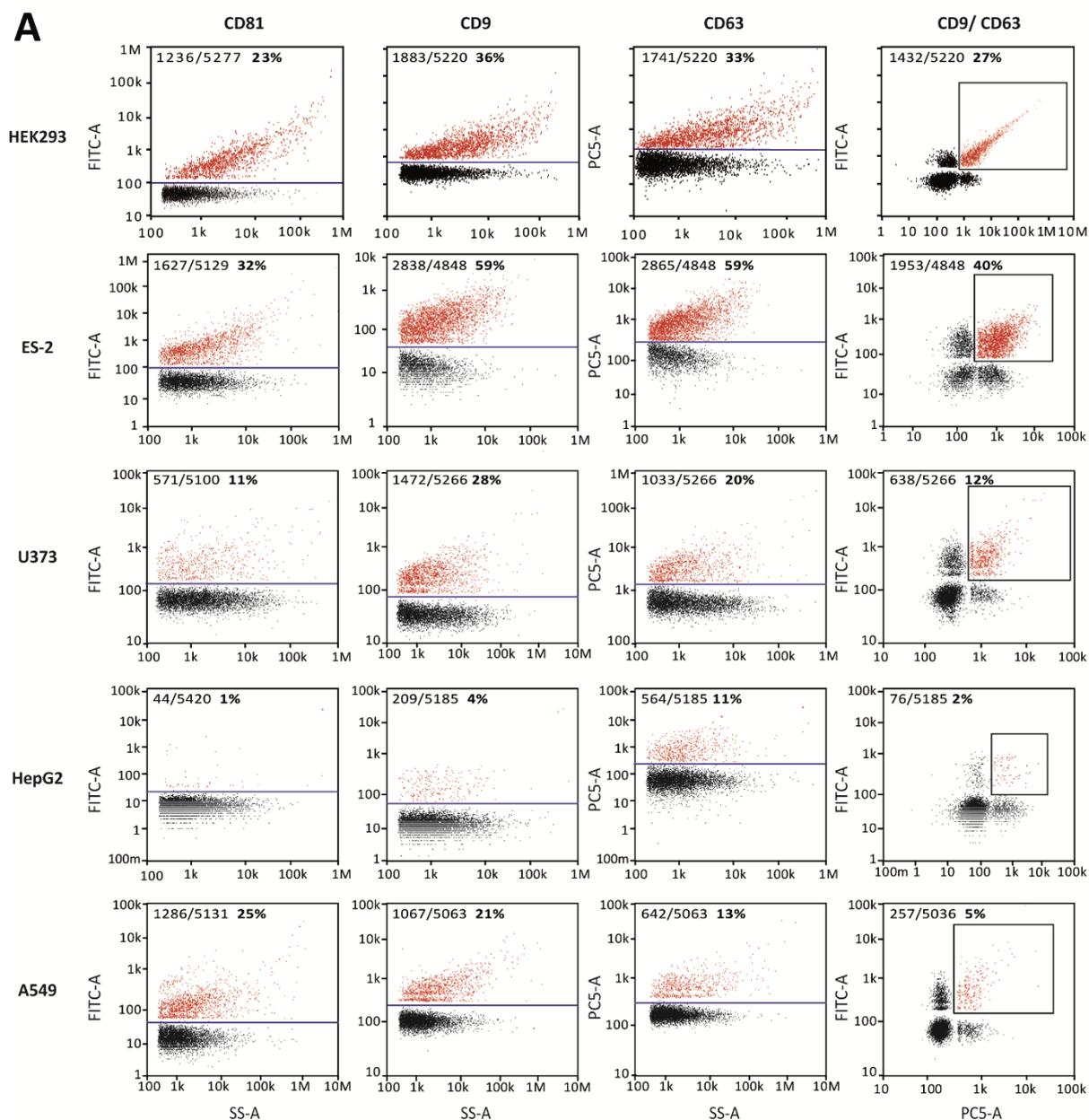
**B)** Nachweis der fünf Transkripte in EVs mittels RT-PCR. Die Konstrukte wurden in HEK293-Zellen co-transfiziert, gefolgt von der Isolierung der Gesamt-RNA aus Zellen und EVs. Die RT-PCR wurde mit spezifischen Primern für die verschiedenen konstanten Regionen durchgeführt. (bp = Basenpaare, M = Marker)

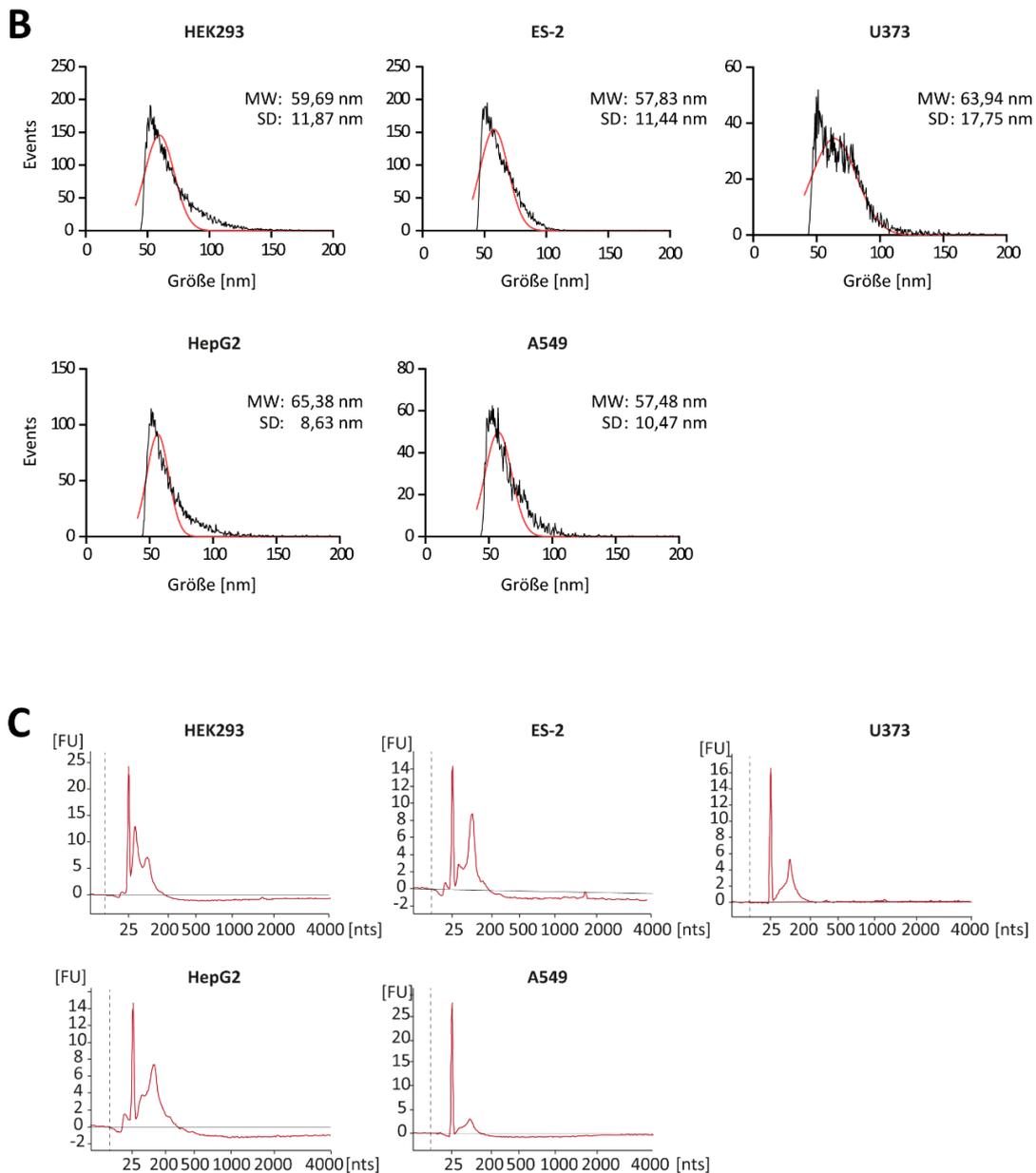
**C)** Relative Quantifizierung der längenabhängigen Freisetzung von RNAs in EVs. Die relative Expression der einzelnen Transkripte (80, 120, 200, 360, 680 nts) in EVs wurde durch RT-qPCR analysiert ( $n=3$ ). Die Expression der Transkripte wurde zu der Gesamtexpression in den Zellen normalisiert.

## 5.8 Absolute Quantifizierung von endogenen RNAs in EVs

### 5.8.1 Charakterisierung von EVs aus fünf verschiedenen Zelllinien

Da die Verwendung von Reporterkonstrukten, die unter der Kontrolle starker Promotoren stehen (CMV und U6), nur begrenzte Informationen über die in EVs vorhandenen endogenen RNAs liefern, wurden endogen vorkommende RNAs quantitativ analysiert.





**Abbildung 18. EV-Charakterisierung der Zelllinien HEK293, ES-2, U373, HepG2 und A549**

**A)** Einzelpartikelphänotypisierung zur Detektion von EV-Markerproteinen. Die EVs wurden mit FITC-konjugierten Antikörpern spezifisch für CD81 und CD9 sowie mit PE-konjugierten Antikörpern spezifisch für CD63 fluoreszierend markiert. (FITC-A = Fluorescein-5-isothiocyanate area, PC5-A = Phycoerythrin cyanine 5 area, SS-A = side scatter area)

**B)** Die Nano-Durchflusszytometrie-Messung (NanoFCM) zeigt die Größenverteilung und Konzentration der isolierten EVs. (MW = Mittelwert (rot), SD = Standardabweichung (schwarz)) Alle NanoFCM-Messungen wurden in Kooperation mit der EV Core Facility, Zentrum für Tumor- und Immunbiologie, Philipps-Universität Marburg, von Dr. Christian Preußner durchgeführt.

**C)** RNA-Profile der EV-RNAs. Die RNA-Isolation erfolgte mittels Total RNA Purification Kit von Norgen Biotek Corp., gefolgt von einem DNase-Verdau und der anschließenden Analyse durch den Bioanalyzer. (FU = Fluorescence units)

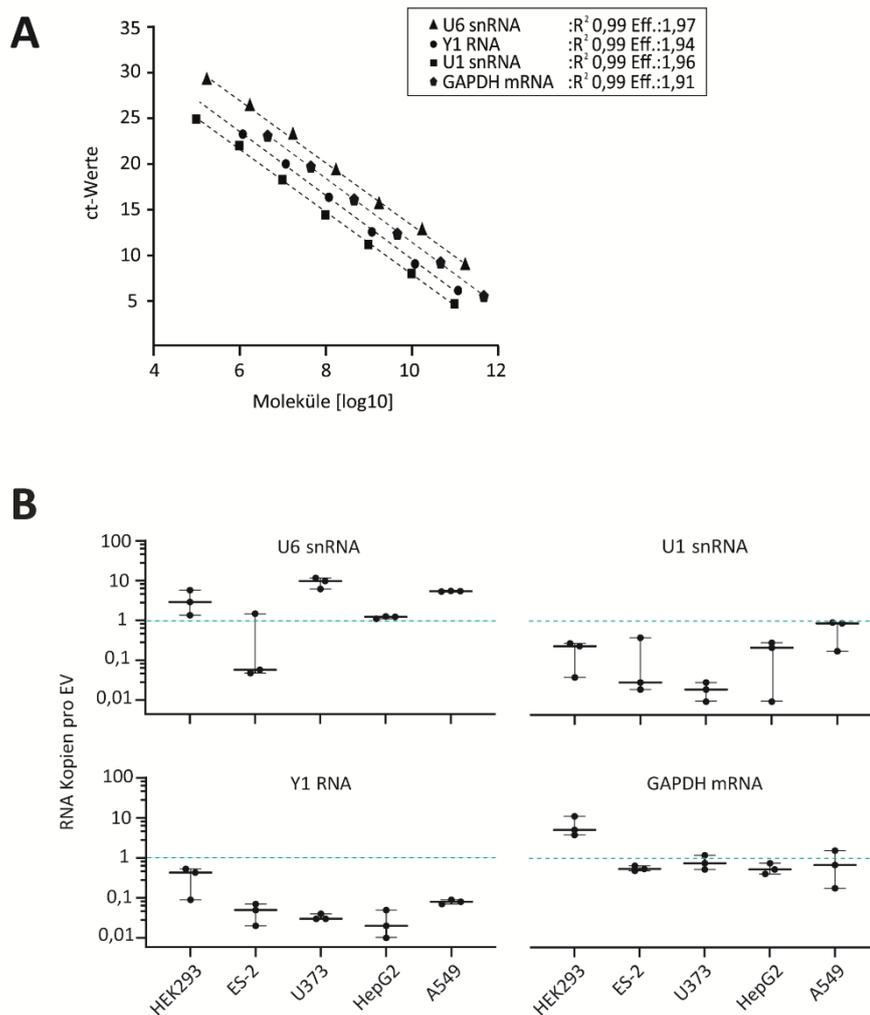
Um vergleichbare endogene RNAs zu unseren Reporterkonstrukten zu verwenden, wurden RNA-Polymerase III-Transkripte (U6 snRNA und Y1 RNA) sowie RNA Pol II-Transkripte (U1 snRNA und GAPDH mRNA) ausgewählt. Um zellspezifische Varianzen in der Beladung vergleichen zu können, wurden neben HEK293-Zellen auch EVs der Zelllinien ES-2 (Ovarial-Klarzell-Adenokarzinom), U373 (Glioblastom), HepG2 (Hepatozytenkarzinom) und A549 (Lungen-Adenokarzinom) verwendet.

Es erfolgte eine Charakterisierung der EVs, stammend aus den oben genannten Zelllinien (**Abbildung 8**), und eine Analyse der EV-RNA-Profile (**Abbildung 18**). Die aus ES-2-Zellen stammenden EVs zeigen, dass 59% der gemessenen Partikel jeweils positiv für CD9 und CD63 sind. Des Weiteren zeigt die Co-Färbung von CD9 und CD63, dass 40% der gemessenen Partikel positiv für CD9 und CD63 sind. 32% der gemessenen EVs sind CD81-positiv. Auffällig sind die aus HepG2-Zellen stammenden EVs; sie emittieren nur sehr schwache Signale (CD81: 1%, CD9: 4%, CD63: 11%, CD9/CD63: 2%). Die anderen Zelllinien (HEK293, U373, A549) ähneln sich bei den gemessenen Ergebnissen: Für CD81 bewegen sie sich zwischen 11 - 15%, für CD9 zwischen 21 - 36% und für CD63 zwischen 11 - 34%. Die Doppelfärbung von CD9/CD36 zeigt einen Wert von 27,4% bei den HEK293-EVs. Bei den EVs der Zelllinien U373 und A549 fällt dieser Wert deutlich geringer aus (12% und 5%).

Bei der Größenbestimmung mittels NanoFCM können Größen zwischen 57 nm und 66 nm kalkuliert werden. Anschließend wurde die RNA aus EVs isoliert und mit dem Bioanalyzer das RNA-Profil für alle fünf Zelllinien ermittelt. Für alle EV-RNAs kann ein ähnliches Profil gezeigt werden, mit einer Größenverteilung von 25 - 500 nts.

### 5.8.2 Absolute Quantifizierung der snRNAs U6 & U1, Y1 RNA und GAPDH mRNA

Für die absolute Quantifizierung der endogenen RNAs wurden Standardkurven mit *in vitro* transkribierten RNAs erstellt, die die jeweilige Sequenz der zu quantifizierenden RNA enthält (**Abbildung 19A**). Ähnlich wie bei den oben erwähnten Reporterkonstrukten wurde festgestellt, dass RNA-Polymerase III-Transkripte in EVs mit am häufigsten vorkommen. Insbesondere die U6 snRNA wird mit 1,0 – 9,0 Molekülen pro EV am häufigsten in allen untersuchten Zelllinien gefunden (mit Ausnahme von ES-2). Für die Y1 RNA sowie die U1 snRNA können zwischen 0,02 - 0,9 Molekülen pro EV nachgewiesen werden. Die GAPDH mRNA kann mit 0,6 - 6,8 Molekülen pro EV detektiert werden (**Abbildung 19B**).



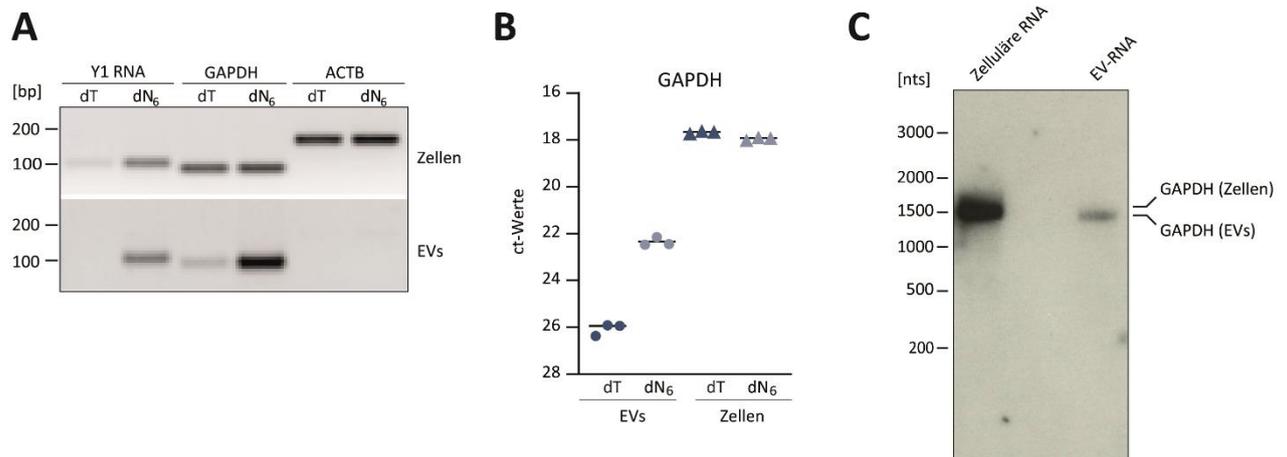
**Abbildung 19. Absolute Quantifizierung der endogenen RNAs U6 snRNA, Y1 RNA, U1 snRNA und der GAPDH mRNA in EVs**

**A)** Standardkurven für die absolute Quantifizierung. Die Standardkurven wurden mittels RT-qPCR ermittelt. Die Datenpunkte sind Mittelwerte von Dreifachmessungen. ( $R^2$  = Bestimmtheitsmaß, Eff = Amplifikationseffizienzen)

**B)** Absolute Quantifizierung mittels RT-qPCR. Es wurden EVs von fünf verschiedenen Zelllinien verwendet. Dargestellt ist die Quantifizierung der absoluten Molekülanzahl [log10-Skala] der angegebenen RNAs in EVs ( $n=3$ ) sowie der Mittelwert und die Standardabweichungen.

## 5.9 Potentielle Modifizierung der GAPDH mRNA in EVs

Die spezifische Modifizierung der einzelnen RNAs innerhalb EVs ist noch nicht vollständig geklärt. Insbesondere, ob mRNAs, die in EVs nachweisbar sind, in voller Länge vorliegen und/oder einen vollständigen Poly(A)-Schwanz haben, wurde noch nicht näher verifiziert. Um dies zu analysieren, wurden RNAs aus ES-2-Zellen und den entsprechenden EVs isoliert und mittels semi-quantitativer RT-PCR analysiert (**Abbildung 20A**).



**Abbildung 20. EV-RNA und zelluläre RNA unterscheiden sich in Größe und Polyadenylierungsstatus der GAPDH mRNA**

**A)** Gesamt-RNA aus ES-2-Zellen und den entsprechenden EVs wurde isoliert und anschließend eine RT-PCR mit Primern gegen Y1 RNA, GAPDH und ACTB mRNA durchgeführt. Für die reverse Transkription wurden Oligo(dT) Primer (dT) bzw. Random-Hexamer Primer (dN<sub>6</sub>) verwendet. (bp = Basenpaare, M = Marker)

**B)** Zur Quantifizierung der GAPDH mRNA wurde eine RT-qPCR durchgeführt, dargestellt sind die ermittelten Ct-Werte.

**C)** Nachweis der GAPDH mRNA in EVs durch Glyoxal-Northern Blot. Zelluläre und EV-RNA wurden mittels Glyoxal-Agarose-Gelelektrophorese und Northern Blot analysiert. (nts = Nukleotide)

Für die cDNA-Synthese wurden Oligo(dT) Primer (dT) oder Random-Hexamer Primer (dN<sub>6</sub>) verwendet, um das mögliche Vorhandensein eines Poly(A)-Schwanzes zu evaluieren. Alle RNAs des dN<sub>6</sub>-Ansatzes sind sowohl in Zellen als auch in EVs nachweisbar. Wurde die cDNA-Synthese jedoch stattdessen mit Oligo(dT) Primern durchgeführt, ist eine Abnahme des Signals der nicht-polyadenylierten Y1 RNA zu beobachten.  $\beta$ -Aktin kann in EVs nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu bleibt das Signal für GAPDH in den Zellen im Vergleich zum dN<sub>6</sub>-Ansatz ähnlich, nimmt aber in den EVs im dT-Ansatz signifikant ab, was darauf hindeutet, dass GAPDH mRNA überwiegend in einer nicht-polyadenylierten Form vorliegt, wenn sie mit EVs assoziiert ist. Um dies weiterführend zu untersuchen, wurde die zuvor durchgeführte RT mittels qPCR quantifiziert. Hierbei ist zu sehen, dass die GAPDH mRNA isoliert aus EVs und revers-transkribiert mit Random-Hexamer Primern einen Ct-Wert von 22,8 aufweist, wohingegen die GAPDH mRNA

isoliert aus EVs und revers-transkribiert mit Oligo(dT) Primern einen Ct-Wert von 26 aufweist. Für die aus Zellen isolierte Gesamt-RNA, revers-transkribiert mit Oligo(dT) Primer bzw. Random-Hexamer Primern, können Ct-Werte von ca. 18 detektiert werden (**Abbildung 20B**). Anschließend wurde ein Northern Blot durchgeführt, um die Größe der GAPDH mRNA zu bestimmen. Hierzu wurde EV-RNA als auch Gesamt-RNA aus ES-2-Zellen verwendet (**Abbildung 20C**). Zu sehen ist, dass das Signal der GAPDH mRNA, isoliert aus EVs, ca. 100 - 150 nts unter der aus Zellen isolierten GAPDH mRNA läuft. Da ein definiertes Signal zu erkennen ist, handelt es sich nicht um fragmentierte RNA, sondern um eine verkürzte Form der GAPDH mRNA.

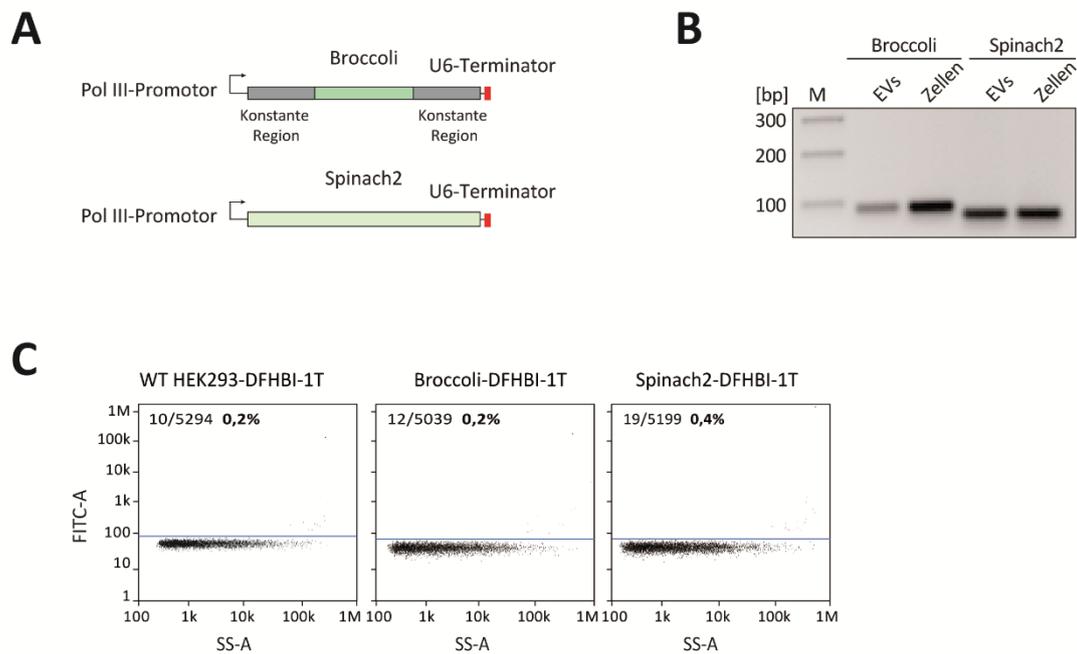
## 5.10 Spezifisches Beladen von EVs mit RNAs

### 5.10.1 Passives Beladen von RNA-Aptameren

Für das spezifische Beladen von RNAs in EVs wurde in der vorliegenden Arbeit eine passive Methode verwendet. Hierbei wurde ein Reporterkonstrukt (Plasmid) in die EV-produzierende Zelle mittels Transfektion eingebracht. Danach folgte eine Wachstumsphase von 24 - 48 Stunden in chemisch definiertem Medium. Durch die anschließende Überexpression der RNA in der EV-produzierenden Zelle kam es zu einer vermehrten Freisetzung der produzierten RNAs in EVs. Dabei konnte je nach verwendeten Promotor eine Konzentration von 0,002 und 0,1 RNA-Molekül pro EV erreicht werden (siehe Abschnitt 5.6).

Um die Menge der in EVs enthaltenen RNAs zu quantifizieren, sollte eine Detektion von RNA-Aptameren mittels Fluoreszenz in EVs erfolgen. Hierzu wurden die Sequenzen der RNA-Aptamere Broccoli und Spinach2 in einen Vektor kloniert, der einen Pol III-Promoter enthält sowie einen U6-Terminator (**Abbildung 21A**). Anschließend wurden diese Konstrukte in HEK293-Zellen transfiziert und die EVs isoliert. Um sicherzustellen, dass die durch die Konstrukte exprimierten RNA-Aptamere in die EVs verpackt wurden, wurde eine RT-PCR durchgeführt (**Abbildung 21B**). Es ist deutlich zu erkennen, dass beide RNA-Aptamere in EVs als auch in Zellen vorhanden sind. Vor der NanoFCM-Messung wurden die aufgereinigten EVs mit dem DFHBI-1T (3,5-Difluor-4-hydroxybenzylidenimidazolinon) Farbstoff inkubiert, einem Molekülderivat von GFP, das an RNA-Aptamere bindet. DFHBI ist membrandurchlässig und nicht toxisch für Zellen (Weinstein 2019). Nach einem anschließenden Waschschrift wurden die EVs mit dem NanoFCM gemessen (**Abbildung 21C**). Gemessen wurden EVs isoliert aus nicht transfizierten Zellen (WT HEK293-DFHBI-1T), die als Negativkontrolle fungierten, EVs isoliert aus transfizierten Zellen mit dem Broccoli-Konstrukt (Broccoli-DFHBI-1T) sowie EVs isoliert aus Zellen, die mit dem Spinach2-Konstrukt transfiziert wurden (Spinach2-DFHBI-1T). Für alle drei Messungen konnten nur zwischen 0,2% und 0,4% positive Ereignisse detektiert werden. Die RNA-Aptamer-tragenden EVs

unterscheiden sich hierbei nicht von der Negativkontrolle. Dies lässt vermuten, dass zu wenige RNA-Aptamere in den EVs vorhanden sind, um ein ausreichendes Signal detektieren zu können.



**Abbildung 21. Detektion von RNA-Aptameren in EVs**

**A)** Schematische Darstellung der Aptamerkonstrukte Broccoli und Spinach2. Beide Konstrukte enthalten einen Pol III-Promotor, die Sequenz von Broccoli plus konstanter Regionen oder die Sequenz von Spinach2 und einen U6-Terminator.

**B)** Detektion der Aptamerkonstrukte nach Transfektion mittels RT-PCR in HEK293-Zellen und EVs. (bp = Basenpaare, M = Marker)

**C)** Einzelpartikelphänotypisierung zur Detektion der RNA-Aptamere. Inkubation der EVs mit DFHBI-1T, einer RNA-Aptamer aktivierten Fluoreszenzsonde, und anschließender Detektion des Fluoreszenzsignals mittels NanoFCM-Messung. (FITC = Fluorescein-5-isothiocyanate, SS-A = side scatter area)



Die Reporterkonstrukte (1 - 4) wurden in HEK293-Zellen transfiziert und für 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurde aus den Zellen sowie den isolierten EVs die Gesamt-RNA extrahiert. Zum Nachweis der RNA-Expression in den Zellen und der anschließenden Verpackung in die EVs wurde eine RT-PCR durchgeführt (**Abbildung 22B**).

Es ist zu sehen, dass alle RNAs in den Zellen und den EVs nachweisbar sind. Für die relative Quantifizierung der Expression wurde eine RT-qPCR durchgeführt (**Abbildung 22C**). Dargestellt sind die Expression der Transkripte, normalisiert zu Y1 RNA, sowie das Verhältnis der Transkript-Expression (EVs/Zellen [Log2]). Es ist zu sehen, dass die Expression der RNA-Transkripte für alle Konstrukte in einem Bereich zwischen 2 und 2,5 liegt, was die Vermutung nahe legt, dass die RNA-Sequenz in diesem Experiment keine entscheidende Rolle spielt.

## 6 DISKUSSION

### 6.1 Isolation und Charakterisierung von EVs

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigte sich mit der Isolierung von EVs sowie deren Charakterisierung. Derzeit zählen zu den am häufigsten verwendeten Verfahren zur Isolierung von EVs die Ultrazentrifugation, die Dichtegradientenzentrifugation, die Größenausschluss-Chromatographie sowie die polymerbasierte Präzipitation. Je nach Isolationsmethode variiert die Menge an gewonnenen EVs, die Abreicherung von Lipoproteinen und Proteinverunreinigungen sowie der Arbeitsaufwand und die Kosten (Brennan *et al.* 2020). Zurzeit gilt die Dichtegradientenzentrifugation als die beste Methode zur Aufreinigung von EVs. Hierbei werden EVs anhand ihrer Dichte aufgetrennt und so etwaige Proteinkontaminationen zum größten Teil vermieden. Die Methode hat den Vorteil, dass sie sehr reine EVs isoliert, jedoch in geringer Menge.

Da sich die vorliegende Arbeit ausschließlich mit EV-RNA beschäftigt, wurde die Dichtegradientenzentrifugation nicht verwendet, da sonst aufgrund der generell sehr geringen EV-RNA-Ausbeute wesentlich größere Mengen des Ausgangsmaterials zur Durchführung der Experimente erforderlich gewesen wären. Die in der vorliegenden Arbeit etablierte Methode zur Isolation von EVs (vgl. Abschnitt 5.1) ist eine Kombination aus differentieller Zentrifugation, Filtration, Ultrafiltration, Größenausschluss-Chromatographie und Ultrazentrifugation (**Abbildung 7**). Sie stellt einen Kompromiss zwischen Qualität und Quantität dar. Um genug EV-RNA isolieren zu können, mussten zusätzlich Optimierungen der Zellkulturbedingungen vorgenommen werden. Anstelle des üblich verwendeten Zellkulturmediums wurde ein chemisch definiertes Medium verwendet, damit es zu keiner Kontamination durch EVs aus fetalem Kälberserum kam. Des Weiteren wurde die Inkubationszeit der Zellen, in welcher sie EVs freisetzen, erhöht.

Die gemäß den ISEV-Richtlinien durchgeführte Charakterisierung (**Abbildung 8 & Abbildung 18**) zeigte, dass die hier verwendete und etablierte Aufreinigungsmethode die geltenden Qualitätskriterien erfüllt.

Um RNA-Kontaminationen durch die verwendeten Zellkulturmedien sowie durch den EV-Isolationsprozess ausschließen zu können, wurden zusätzlich zu den von der ISEV vorgeschlagenen Methoden zur Charakterisierung weiterführende Experimente durchgeführt (**Abbildung 11 & Abbildung 12**). Hierbei konnte deutlich gezeigt werden, dass es zu keiner RNA-Kontamination durch die verwendeten Zellkulturmedien kam. Des Weiteren war zu erkennen, dass die isolierte RNA hauptsächlich aus EVs stammt und es sich dabei nicht um Protein-assoziierte RNAs oder freizirkulierende RNAs handelte.

Für die Charakterisierung der EV-Größenverteilung kann neben der häufig verwendeten NTA auch die NanoFCM verwendet werden. Die beiden Methoden wurden direkt miteinander verglichen (**Abbildung 10**). Hierbei war deutlich zu sehen, dass die mit der NTA gemessene Probe eine durchschnittliche Größenverteilung ermittelte, die mehr als doppelt so groß war wie die der NanoFCM-Messung. Dieser Unterschied lässt sich auf die verschiedenen Methoden zur Kalkulation der Größen zurückführen (Arab *et al.* 2021).

Des Weiteren wurden transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen für die Begutachtung der EV-Morphologie sowie -Integrität verwendet (**Abbildung 9**). Es wurden zwei Probenvorbereitungsprotokolle direkt miteinander verglichen. Dabei konnten durch die Fixierung mit Formaldehyd und die Einbettung der Probe in Methylcellulose, wobei diese als Schutzschicht fungierte (Mulisch & Welsch 2015), erhebliche Verbesserungen in der Auflösung erzielt werden.

Abschließend ist zu erwähnen, dass immer berücksichtigt werden muss, dass sich die Isolationsmethoden noch in der Entwicklung bzw. in einem ständigen Optimierungs- und Validierungsprozess befinden, so dass eine einheitliche Standardisierung zurzeit noch nicht möglich ist. Einen einheitlichen Goldstandard zur Isolation von EVs werden wir wohl nie erhalten, da die Ausgangsmaterialien sowie die EVs selbst zu heterogen sind.

## 6.2 Molekulare Determinanten, die das Beladen von RNAs in EVs begünstigen

Die spezifische Beladung von EVs mit RNAs, die für therapeutische Zwecke genutzt werden kann, ist ein vielversprechender Ansatz für die Medizin (Mathivanan & Simpson 2010, Thakur *et al.* 2014). Wie oben schon mehrfach erwähnt, gelten EVs in der Theorie als perfekte Kandidaten für den medizinischen Transport von Biomolekülen. Sie sind endogen, demnach nicht immunogen, und können sehr spezifisch adressiert werden (Jeppesen *et al.* 2019). Die spezifische Verpackung dieser Biomoleküle muss jedoch vorab optimiert und besser verstanden werden. Bisher konnte noch kein allgemein gültiger Mechanismus gefunden werden, jedoch konnten bisher mehrere Studien Mechanismen für die selektive Freisetzung spezifischer RNAs beschreiben (Batagov & Kurochkin 2013, Villarroya-Beltri *et al.* 2014, Santangelo *et al.* 2016, Shurtleff *et al.* 2016, Groot & Lee 2020).

Unter der Annahme, dass der RNA-Biogeneseweg die EV-vermittelte Verpackung beeinflussen kann, wurden verschiedene Expressionskonstrukte entworfen. Darunter ein Konstrukt, welches repräsentativ für alle Polymerase III-transkribierten RNAs ist (Pol III-U6-term) sowie ein

Konstrukt, welches fragmentierte mRNAs mit intaktem 5'-Ende oder snRNAs (außer U6 snRNA) repräsentiert (Pol II-U1-3'box) und eines, welches intakte mRNAs repräsentiert, da die so exprimierten RNAs eine m<sup>7</sup>G-Kappe und einen Poly(A)-Schwanz haben (Pol II-poly(A)).

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl in der relativen als auch in der absoluten Quantifizierung die von der Polymerase III-transkribierten Transkripte im Vergleich zu Polymerase II-transkribierten Transkripte effizienter in EVs geladen wurden. Die relativen Konzentrationen der Polymerase II-transkribierten Transkripte mit Poly(A)-Schwanz waren am niedrigsten (**Abbildung 16**). Dies spiegelt die aktuelle Literatur genau wider. Die ursprüngliche Annahme, dass RNAs einer der Hauptbestandteile von EVs sind, wurde kürzlich durch mehrere quantitative Studien in Frage gestellt (Chevillet *et al.* 2014, Wei *et al.* 2017, Albanese *et al.* 2021).

Um die Ergebnisse der transient exprimierten RNAs auf endogener Ebene zu verifizieren, wurden vier endogene RNAs (Y1 RNA, U1 snRNA, U6 snRNA und GAPDH mRNA) quantifiziert. Die Auswahl der vier RNAs erfolgte anhand mehrerer Parameter. Zum einen anhand der Polymerase, die sie synthetisiert und zum anderen aufgrund des daraus resultierenden 5'-Endes. Y1 RNA und U6 snRNA wurden ausgewählt, da sie beide von der RNA-Polymerase III generiert werden, sich dennoch in ihren 5'-Enden unterscheiden (5'-Triphosphat und  $\gamma$ -monomethyl-Phosphat) (Köhn *et al.* 2013, Singh *et al.* 1989). Des Weiteren wurden die U1 snRNA und die mRNA von GAPDH ausgewählt, da sie von der RNA-Polymerase II transkribiert werden, aber unterschiedliche 5'-Enden (m<sub>3</sub>G-Kappe bzw. m<sup>7</sup>G-Kappe) sowie 3'-Enden (3'-OH-Gruppe bzw. Poly(A)-Schwanz) aufweisen.

Es konnte in diesem Experiment gezeigt werden, dass die U6 snRNA im Vergleich zu den anderen RNAs in vier der fünf Zelllinien mit mehr als 1 Molekül/EV am häufigsten vorkam (**Abbildung 19B**). Für die Y1 RNA und U1 snRNA konnten ähnliche Mengen ermittelt werden (0,01 - 1 Molekül/ EV). Für die GAPDH mRNA konnten Mengen von ca. 1 Molekül/EV ermittelt werden, wobei in den EVs, stammend aus HEK293-Zellen, ein Wert von 6,8 Molekülen/EV detektiert werden konnte.

Die hier ermittelten Ergebnissen stimmen generell mit den Ergebnissen der Studie von Wei *et al.* (2017) überein. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass  $\geq 1$  Molekül pro EV an snRNA-Fragmenten mit EVs assoziiert sind. Für Y RNAs und U1 snRNA-Fragmente geben sie Mengen von etwa 1 Molekül pro EV an (Wei *et al.* 2017).

Aufgrund des recht hohen und konstanten Vorkommens der U6 snRNA in allen fünf Zelllinien, scheint sie ein geeigneter Kandidat für ein „EV-RNA-Houskeeping-Gen“ zu sein.

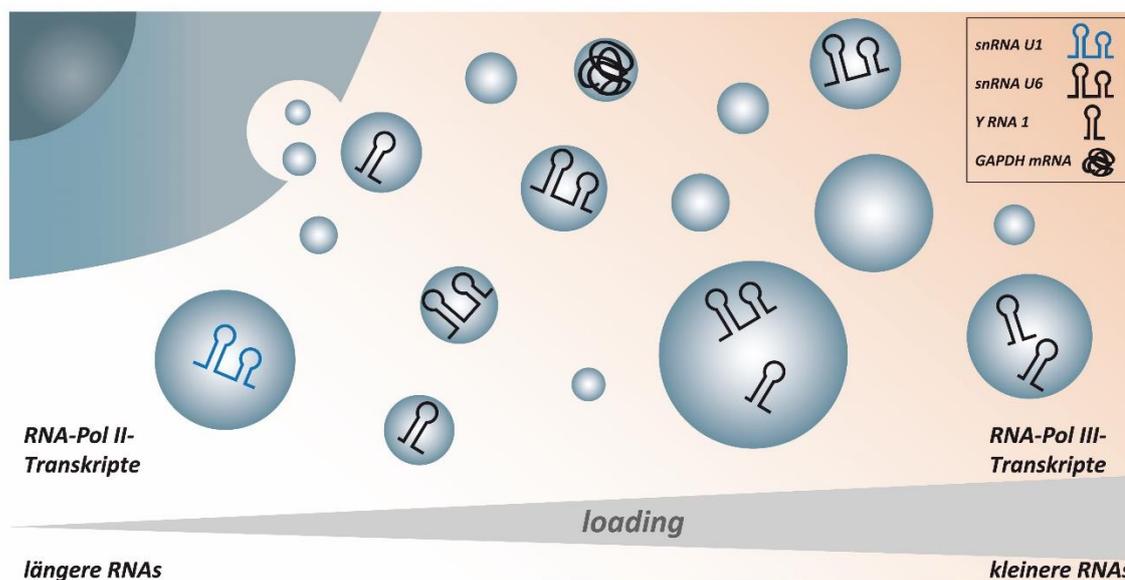
Ein weiterer entscheidender Faktor, wenn es um die allgemeine Charakterisierung von RNAs aus EVs geht, ist die Größe. Die mit dem Bioanalyzer analysierten EV-RNA-Profile aus fünf verschiedenen Zelllinien (**Abbildung 18C**) zeigten sehr ähnliche RNA-Profile mit einer Größe zwischen 25 - 500 nts (Peak bei 200 nts). Um zu zeigen, dass kleinere RNAs bevorzugt in EVs geladen werden, wurden fünf Expressionskonstrukte entworfen, die fünf RNAs unterschiedlicher Länge produzieren. Es ist eine klare Präferenz für kleine RNAs zu erkennen (**Abbildung 17**). Dies ist konsistent mit natürlich vorkommenden EV-RNAs, welche sich in einem Größenbereich von < 200 nts befinden (Turchinovich *et al.* 2019).

Die Frage, warum kleine RNAs bevorzugt in EVs sezerniert werden, könnte einerseits damit beantwortet werden, dass EVs einen Entsorgungsweg darstellen, bei dem RNA-Fragmente in EVs verpackt werden oder andererseits, dass innerhalb des Vesikels einfach nicht genug Platz für größere RNA-Moleküle ist (Mosbach *et al.* 2021).

Einige Studien konnten sequenzspezifische Beladungsmechanismen für RNAs in EVs beschreiben. Hierbei wurde meistens die Gesamt-RNA aus isolierten EVs vollständig sequenziert und anschließend angereicherte RNA-Motive bioinformatisch identifiziert.

Da sich die meisten dieser Studien ausschließlich auf miRNAs beziehen, wurde in der vorliegenden Arbeit ein *in vivo* SELEX mit drei verschiedenen Expressionsplattformen durchgeführt. Beim SELEX handelt es sich um eine Methode zur spezifischen Selektion. Bei dem klassischen SELEX-Experiment wird zu Anfang ein DNA-Pool mit zufälligen Sequenzen mit einer Länge zwischen 20 und 100 Nukleotiden synthetisiert. Diese zufälligen Sequenzen werden von konstanten Sequenzen flankiert (konstante Regionen), welche zur Detektion und PCR-Amplifikation erforderlich sind. Im Falle eines RNA-SELEXs muss der DNA-Pool zuerst durch eine T7-Transkription in RNA umgeschrieben werden. Danach erfolgt eine Selektionsrunde, bei der die RNA und z.B. ein Protein miteinander inkubiert werden. Durch anschließende Aufreinigung des Proteins und den daran befindlichen RNAs kommt es zur Selektion der RNAs. Durch Freisetzung der gebunden RNAs vom Protein, einer reversen Transkription in cDNA sowie anschließender PCR-Amplifikation, wird ein neuer Ausgangspool geschaffen. Durch Wiederholung dieser Schritte kommt es zur spezifischen Anreicherung der RNAs, die spezifisch mit dem Protein interagieren. Anschließend kann eine Library-Präparation, Sequenzierung und bioinformatische Analyse folgen (Urak *et al.* 2016, Ellington & Szostak 1990, Klug & Famulok 1994, Tuerk & Gold 1990). Durch das SELEX-Experiment sollte erreicht werden, dass nicht nur Pol II-Transkripte, sondern auch die häufiger vorkommenden Pol III-Transkripte spezifisch analysiert werden können. Des Weiteren diene die Verwendung von transient exprimierten

Transkripten dazu, einen spezifischen Mechanismus für das Beladen von synthetischen RNAs in EVs zu identifizieren.



**Abbildung 23. Molekulare Determinanten, die das Beladen von RNA in EVs begünstigen**

Schematische Zusammenfassung der Parameter, die das Beladen von RNA in EVs begünstigen, darunter die Länge sowie die Abhängigkeit von der exprimierenden RNA-Polymerase (Mosbach et al. 2021, Abbildung modifiziert).

Es konnte jedoch für keines der Expressionskonstrukte eine spezifische Sequenzanreicherung gefunden werden (**Abbildung 15**). Dies könnte zum einen an dem experimentellen Aufbau liegen und zum anderen daran, dass nur eine SELEX-Runde durchgeführt wurde. Es ist vorstellbar, dass zu einem Selektionsschritt durch die Klonierung der N40-Sequenz in den Vektor kam, bei dem ein Teil der Sequenzvarianz verloren ging. Des Weiteren ist es möglich, dass auch die Transfektion der Plasmide sowie die Transkription der RNAs in der Zelle unterschiedlich effizient waren. Da die gewonnene EV-RNA-Menge sehr gering war, war es nicht umsetzbar, mehrere SELEX-Runden durchzuführen, weshalb es am besten wäre, die natürlich vorkommenden EV-RNAs direkt zu analysieren und nach spezifischen Anreicherungen zu suchen.

Des Weiteren konnte aber auch die Verwendung vier unterschiedlicher Sequenzen mit einer definierten Länge von 79 und 80 Nukleotiden zu keiner unterschiedlichen Beladungseffizienz führen (**Abbildung 22**). Dies legt nahe, dass es keinen allgemeinen nur sequenzspezifischen Beladungsmechanismus gibt. Neben der reinen Sequenzabfolge könnten zusätzlich auch Sekundärstrukturen sowie Modifikationen eine entscheidende Rolle spielen.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass kürzere und vor allem Polymerase III-transkribierte RNAs häufiger in EVs verpackt werden (zusammengefasst in **Abbildung 23**) und

dass in den hier vorliegenden Experimenten keine sequenzspezifische Abhängigkeit detektiert werden konnte.

### 6.3 Nur geringe RNA-Mengen sind mit EVs assoziiert

Da sich EVs in den letzten Jahren als neues, zukunftssträchtiges Thema herauskristallisiert haben, hat die Anzahl der Berichte über Nukleinsäuren in EVs zugenommen. Die Identifizierung neuer RNA-Subtypen in EVs basiert größtenteils auf den fortschreitenden und zunehmend sensitiveren Sequenzierungsmethoden. So konnten verschiedene RNA-Spezies in EVs umfassend identifiziert werden. Zu diesen RNA-Spezies gehören hauptsächlich nicht-kodierende RNAs wie miRNAs, lncRNAs, snoRNAs, tRNAs, rRNAs, piRNAs, Y RNAs und circRNAs (Preußner *et al.* 2018, Nolte-'t Hoen *et al.* 2012, Turchinovich *et al.* 2019, O'Brien *et al.* 2020). Darüber hinaus wurden auch mRNA-Fragmente sowie funktionell aktive mRNAs in EVs nachgewiesen (Zomer *et al.* 2015, Vojtech *et al.* 2014, Valadi *et al.* 2007).

Viele Studien fokussierten sich auf miRNAs (He *et al.* 2021, Yan *et al.* 2019, Mu *et al.* 2021, Go *et al.* 2020, Ozawa *et al.* 2020, Mizohata *et al.* 2021, Li *et al.* 2015, Garcia-Martin *et al.* 2022), da lange angenommen wurde, dass sie besonders stark in EVs angereichert sind.

In den letzten Jahren wurden jedoch die Stimmen lauter, die annehmen, dass RNAs, insbesondere miRNAs, in EVs weniger häufig vorkommen als zunächst angenommen (Chevillet *et al.* 2014, Wei *et al.* 2017, Albanese *et al.* 2021, Mosbach *et al.* 2021). Stattdessen konnte gezeigt werden, dass miRNAs als stabile extrazelluläre RNAs in nichtvesikulären Fraktionen auftreten (Jeppesen *et al.* 2019). Durch Studien die EV-assoziierte RNAs absolut quantifizierten konnte gezeigt werden, dass nur sehr wenige Moleküle pro EVs vorhanden sind (Chevillet *et al.* 2014, Wei *et al.* 2017, Albanese *et al.* 2021). Das geringe Vorhandensein bezieht sich nicht nur auf miRNAs, sondern auch auf andere EV-assoziierte RNA-Spezies. Dabei spielt es keine Rolle, ob es sich um endogene RNAs handelt oder mittels Reporterkonstrukt (über)exprimierte RNAs.

Durch die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente konnte, basierend auf der Messung von absoluten Kopienzahlen spezifischer RNA-Transkripte, sowohl nach Überexpression von Transkripten als auch endogenen RNAs (U6 und U1 snRNAs, Y1 RNA, GAPDH mRNA) und durch den Vergleich von EVs aus fünf verschiedenen Zelllinien, eindeutig gezeigt werden, dass die RNA-Ladefähigkeit von EVs auf eine geringe Anzahl von RNA-Molekülen beschränkt ist. Auch die Detektion von RNA-Aptameren mittels Fluoreszenz gelang nicht, da vermutlich die Menge an RNA-Aptameren pro Vesikel zu gering war (**Abbildung 21**). Da dies die Anwendung von EVs als Transportsystem einschränkt, wäre es sinnvoll, alternativ neben den hier verwendeten

Expressionsplattformen (CMV- und U6-Promoter) auch andere Expressionsplattformen und andere Zelllinien zu evaluieren.

Diese Ergebnisse spiegeln den sich vollziehenden Wandel auf dem Gebiet der EV-RNA-Forschung wider. Die anfängliche Annahme, dass verschiedene RNAs (insbesondere miRNAs) in EVs angereichert sind, muss neu betrachtet werden. Entweder sind RNAs nur mit EVs assoziiert oder sie sind nur in geringem Umfang in EVs auffindbar.

Der Grund dafür liegt vor allem in den verbesserten Isolationsmethoden. Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass es eine direkte Korrelation zwischen der EV-Aufreinigungsmethode und der RNA-Ausbeute gibt (Buschmann *et al.* 2018). Dies deutet darauf hin, dass frühere Ergebnisse durch RNA-Kontaminationen verfälscht wurden und sie nicht direkt mit in EVs verpackten RNAs zusammenhängen.

Während in den Anfängen der EV-Forschung die differentielle Ultrazentrifugation die Methode der Wahl war, werden heute Kombinationen mehrerer Methoden bevorzugt (Théry *et al.* 2018). Dies wirkt zumindest teilweise der Co-Isolation von freizirkulierenden RNAs und RNA-bindenden Proteinkomplexen entgegen. Dies hat jedoch den Nachteil, dass es zu einer geringeren RNA-Ausbeute kommt (Kowal *et al.* 2016, Jeppessen *et al.* 2019).

Neben der Annahme, dass EV-assoziierte RNAs größtenteils im Inneren von EVs zu finden sind, besteht die Möglichkeit, dass sich Nukleinsäuren an der Oberfläche von EVs befinden können. In einigen wenigen Studien wurden EV-Oberflächen-assoziierte DNAs und ihre Funktionen im horizontalen Gentransfer, der Induktion von Autoimmunität und der zellulären Aufnahme untersucht (zusammengefasst in Buzás *et al.* 2018). Es ist denkbar, dass auch RNAs, welche sich auf der Oberfläche von EVs befinden, ähnliche Funktionen haben. In einer Studie von Flynn *et al.* (2021) konnte gezeigt werden, dass kleine nicht kodierende RNAs, die mit N-Glykanen modifiziert sind, auf der Oberfläche lebender Zellen zu finden sind. Diese so genannten „GlycoRNAs“ sind mit Sialinsäure und Fucose angereichert und konnten in verschiedenen Zelltypen und Säugetierarten sowie in kultivierten Zellen gefunden werden. Es konnte gezeigt werden, dass die auf der Zelloberfläche vorhandenen GlycoRNAs mit Anti-dsRNA-Antikörpern und Siglec-Rezeptoren interagieren können (Flynn *et al.* 2021).

Es wäre denkbar, dass solche GlycoRNAs auch auf der Oberfläche von EVs vorhanden sind, da die EV-Membran der Zellmembran ähnelt. Des Weiteren ist es bekannt, dass EVs durch das Andocken an eine Zielzelle verschiedene Signaltransduktionskaskaden auslösen können (Kwok *et al.* 2021, Gurung *et al.* 2021). Es wäre denkbar, dass auch GlycoRNAs an solchen Mechanismen beteiligt sind.

## 6.4 Integrität von EV-RNA

Auch die Frage nach der Integrität der in EVs enthaltenen RNAs muss gestellt werden. In vielen Studien, die Sequenzierungsdaten von EV-assoziierten RNAs zeigen, findet man vermehrt Hinweise darauf, dass es sich größtenteils um RNA-Fragmente handelt. Dies bezieht sich in erster Linie auf mRNAs (Batagov & Kurochkin 2013).

Um experimentell zu untersuchen, ob die in der Arbeit untersuchte GAPDH mRNA fragmentiert bzw. in voller Länge in EVs vorliegt, wurden verschiedene Primer für die reverse Transkription verwendet. Zum einen Random-Hexamer Primer, die an jede RNA-Sequenz binden können, zum anderen Oligo(dt) Primer, die spezifisch nur an A-reiche Regionen bzw. an einen Poly(A)-Schwanz binden.

Anhand der RT-PCR in **Abbildung 20** war zu erkennen, dass die aus Zellen stammende GAPDH mRNA keinen Unterschied zwischen der reversen Transkription mit Random-Hexamer oder Oligo(dt) Primern zeigte. Im Gegensatz dazu zeigte die EV-RNA einen deutlichen Unterschied. Das Signal des dt-Ansatzes war deutlich schwächer. Dies konnte in zwei verschiedenen Zelllinien (ES-2-Zellen, siehe **Abbildung 20**; HEK293-Zellen, Daten nicht gezeigt) beobachtet werden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die GAPDH mRNA, welche sich in EVs befindet, nicht intakt ist, da aufgrund eines nicht vollständigen Poly(A)-Schwanzes, die reverse Transkription ineffizienter war. Des Weiteren ist auffällig, dass ACTB in der EV-RNA in beiden Zelllinien nicht detektiert werden konnte (Daten für HEK293-Zellen nicht gezeigt).

Die oben genannten Ergebnisse als auch die Ergebnisse von **Abbildung 20C** deuten darauf hin, dass die GAPDH mRNA stammend aus EVs als verkürzte Version vorliegt, aber nicht nachweisbar fragmentiert ist. Dies führt zu der Überlegung ob lediglich der Poly(A)-Schwanz und die mRNA-typische Kappe fehlen. Um dies weiter zu evaluieren, wäre eine Sequenzierung des gesamten Transkripts notwendig.

Es wäre denkbar, dass unvollständige mRNAs durch das Verpacken in EVs entsorgt werden. Dies würde zu der Funktion passen, die von Johnstone *et al.* (1987) beschrieben wurde.

## 6.5 EV-Beladungsstrategien

Für das Einbringen von RNAs in EVs können zwei Strategien verwendet werden. EVs können entweder direkt nach der Isolierung durch Elektroporation, Biokonjugation oder Click-Chemie modifiziert oder mit Biomolekülen beladen werden (*post-isolation engineering*) oder durch die EV-produzierende Zelle (*parental cell-based engineering*) (Sabanovic *et al.* 2021, Jafari *et al.* 2020).

In der vorliegenden Arbeit wurden die RNAs durch die EV-produzierende Zelle in die EVs eingebracht. Hierbei wurde eine RNA mittels Plasmid in der EV-Ursprungszelle überexprimiert, was zu einer erhöhten RNA-Konzentration im Zytoplasma der Zelle (Collino *et al.* 2017) und zum anschließenden Transfer der RNAs in die EVs führte. Das Vorhandensein der überexprimierten RNAs in die EVs konnte anschließend mittels RT-PCR verifiziert werden. Dies gelang ausnahmslos für alle verwendeten Reporterkonstrukte (vgl. **Abbildung 13, 16, 17, 21 & 22**). Diese Methode hat jedoch den Nachteil, dass die Menge an RNAs, welche in die EVs eingebracht wird, nicht spezifisch kontrolliert werden kann. Des Weiteren legt dieser Beladungsmechanismus die Vermutung nahe, dass EVs wie früher lange angenommen, auch dazu dienen überflüssige RNAs aus der Zelle zu transportieren.

Andere Methoden, die die EV-produzierende Zelle nutzen, um therapeutische mRNAs in EVs einzubringen, sind z.B. das *EXOosomal transfer into cells (EXOtic) devices* bestehend aus CD63-L7Ae, ein archaisches ribosomales Protein, das an die Box C/D in der 3' untranslatierten Region einer beliebigen RNA-Struktur binden kann, Cx43 S368A (*cytosolic delivery helper*) und RVG-Lamp2b (*targeting module*) (Kojima *et al.* 2018) oder RNA-bindende Proteine wie HuR. In einer Studie von Li *et al.* (2019) wurde HuR an das C-terminale Ende von CD9 fusioniert, um im exosomalen Lumen lokalisiert zu werden. Die Bindung an miR-155 und die gleichzeitige Lokalisierung des HuR-Moduls im Inneren der Exosomen führten dazu, dass miR-155 in die Exosomen geladen wurde. Diese Methoden bieten gezieltere Vorgehensweisen für das spezifische Beladen von EVs.

## 6.6 Fazit/Ausblick

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine EV-Isolationsmethode etabliert werden konnte, die eine ausreichende Menge an EVs mit ausreichender Qualität aufreinigt. Neben der Qualität und der Quantität wurde darauf geachtet, dass die Handhabbarkeit sowie der Zeitaufwand angemessen sind.

Es konnte gezeigt werden, dass kleinere RNA-Transkripte als auch Polymerase III-transkribierte RNAs, welche transient exprimiert wurden, häufiger in EVs verpackt werden. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass dies auch tendenziell für endogene RNAs zutrifft; vor allem die U6 snRNA konnte in vergleichbar großer Menge in allen fünf Zelllinien nachgewiesen werden.

Entgegen der Erwartungen konnte kein spezifisches RNA-Motiv identifiziert werden. Dies entspricht nicht der aktuellen Literatur, da hier deutlich gezeigt werden konnte, dass es

zumindest für miRNAs RNA-Motive gibt, die das Beladen von RNAs in EVs begünstigen (Garcia-Martin *et al.* 2022).

Da eines der Ziele der vorliegenden Arbeit die Optimierung bzw. die Charakterisierung von molekularen Determinanten war, die das Beladen von EVs mit RNA verbessern oder begünstigen, ist es ungünstig, dass kein RNA-Motiv identifiziert werden konnte. Mittels solcher Sequenz hätten vor allem RNAs in EVs eingebracht werden können, die einen therapeutischen Effekt induzieren, jedoch durch bestimmte Faktoren (z.B. ihre Größe) eher schwieriger in EVs zu verpacken sind. Auch für das Einbringen von mRNA, welche für ein spezifisches Protein/Antigen etc. kodiert, wäre es sehr nützlich gewesen.

In einer kürzlich veröffentlichten Studie von Garcia-Martin *et al.* (2022) konnten für fünf verschiedene Mauszelllinien jeweils spezifische Motive identifiziert werden, die entweder das Verpacken von miRNAs in EVs (EXOMotif) oder den Verbleib in der Zelle (CELLmotif) begünstigen. Was die Vermutung nahe legt, dass diese Motive auch für andere RNA-Spezies vorhanden sind. Des Weiteren konnte in der Studie gezeigt werden, dass für jede Zelllinie eigene Motive vorhanden sind (Garcia-Martin *et al.* 2022), was darauf hindeutet, dass es vermutlich keinen allgemeingültigen Mechanismus gibt, sondern unterschiedliche Proteine an diesem Mechanismus, abhängig von der jeweiligen Zelllinie, beteiligt sind.

Nichtsdestotrotz ist das Wissen darüber, dass vor allem kleinere RNAs und Polymerase III-transkribierte RNAs effizienter in EVs verpackt werden, von Vorteil, da solche RNAs regulatorische Funktionen in der Zielzelle erfüllen können.

Um EVs generell für die medizinische Therapie nutzen zu können, muss neben einer Hochskalierbarkeit der Produktion auch das spezifische Beladen mit Nukleinsäuren, Proteinen etc. verbessert werden. Hierbei gibt es viele Fragen, die adressiert werden müssen. Wie viele RNA-Moleküle befinden sich nach spezifischer Beladung mit synthetischen RNAs tatsächlich im EV? Bleiben die transportierten Moleküle intakt? Außerdem muss eine stabile Reproduzierbarkeit gewährleistet sein.

In Bezug auf mRNAs, muss die Frage gestellt werden, ob auch größere RNA-Moleküle von mehreren Kilobasen in EVs effizient verpackt werden können. Die Frage nach der maximalen Ladekapazität von EVs muss geklärt werden. Des Weiteren muss die Effizienz der passiven und aktiven Beladung von RNAs in EVs thematisiert werden. Neben dem spezifischen Beladen, also dem Einbringen von Molekülen in EVs, ist auch die Frage wichtig, ob es möglich ist, Moleküle während der Biogenese selektiv aus EVs auszuschließen.

All diese Fragen müssen geklärt werden, bevor EVs in Zukunft vor allem in den Bereichen der regenerativen Medizin, der Diagnostik, des Transports von Biomolekülen und der Immunisierung genutzt werden können.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

**Albanese, M.,** Chen, Y. A., Hüls, C., Gärtner, K., Tagawa, T., Mejias-Perez, E., Keppler, O. T., Göbel, C., Zeidler, R., Shein, M., Schütz, A. K., & Hammerschmidt, W. (2021). MicroRNAs are minor constituents of extracellular vesicles that are rarely delivered to target cells. *PLoS genetics*, 17 (12), e1009951. doi: 10.1371/journal.pgen.1009951.

**Arab, T.,** Mallick, E. R., Huang, Y., Dong, L., Liao, Z., Zhao, Z., Gololobova, O., Smith, B., Haughey, N. J., Pienta, K. J., Slusher, B. S., Tarwater, P. M., Tosar, J. P., Zivkovic, A. M., Vreeland, W. N., Paulaitis, M. E., & Witwer, K. W. (2021). Characterization of extracellular vesicles and synthetic nanoparticles with four orthogonal single-particle analysis platforms. *Journal of extracellular vesicles*, 10 (6), e12079. doi: 10.1002/jev2.12079.

**Arroyo, J. D.,** Chevillet, J. R., Kroh, E. M., Ruf, I. K., Pritchard, C. C., Gibson, D. F., Mitchell, P. S., Bennett, C. F., Pogosova-Agadjanian, E. L., Stirewalt, D. L., Tait, J. F., & Tewari, M. (2011). Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 5003–5008. doi: 10.1073/pnas.1019055108.

**Baglio, S. R.,** Rooijers, K., Koppers-Lalic, D., Verweij, F. J., Pérez Lanzón, M., Zini, N., Naaijken, B., Perut, F., Niessen, H. W., Baldini, N., & Pegtel, D. M. (2015). Human bone marrow- and adipose-mesenchymal stem cells secrete exosomes enriched in distinctive miRNA and tRNA species. *Stem cell research & therapy*, 6 (1), 127. doi: 10.1186/s13287-015-0116-z.

**Balaj, L.,** Lessard, R., Dai, L., Cho, Y. J., Pomeroy, S. L., Breakefield, X. O., & Skog, J. (2011). Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nature communications*, 2, 180. doi: 10.1038/ncomms1180.

**Bauer, F. N. und Giebel, B.** (2015). Therapeutic potential of mesenchymal stromal cell-derived small extracellular vesicles, *Extracellular Vesicles: Applications to Regenerative Medicine, Therapeutics and Diagnostics*, 1-21 doi: 10.1039/9781839164552-00001.

**Batagov, A. O., & Kurochkin, I. V.** (2013). Exosomes secreted by human cells transport largely mRNA fragments that are enriched in the 3'-untranslated regions. *Biology direct*, 8, 12. doi: 10.1186/1745-6150-8-12.

**Börger, V.,** Görgens, A., Rohde, E., Giebel, B. (2015) Therapeutisches Potenzial von extrazellulären Vesikeln aus mesenchymalen Stamm- bzw. Stromazellen. *Transfusionsmedizin*, 5 (03), 131-137. doi: 10.1055/s-0041-102981.

- Börger, V.,** Weiss, D. J., Anderson, J. D., Borràs, F. E., Bussolati, B., Carter, D., Dominici, M., Falcón-Pérez, J. M., Gimona, M., Hill, A. F., Hoffman, A. M., de Kleijn, D., Levine, B. L., Lim, R., Lötvall, J., Mitsialis, S. A., Monguió-Tortajada, M., Muraca, M., Nieuwland, R., Nowocin, A., O'Driscoll, L., Ortiz, L. A., Phinney, D. G., Reischl, I., Rohde, E., Sanzenbacher, R., Théry, C., Toh, W. S., Witwer, K. W., Lim, S. K., Giebel, B. (2020). International society for extracellular vesicles and international society for cell and gene therapy statement on extracellular vesicles from mesenchymal stromal cells and other cells: considerations for potential therapeutic agents to suppress coronavirus disease-19. *Cytotherapy*, 22 (9), 482–485. doi: 10.1016/j.jcyt.2020.05.002.
- Brennan, K.,** Martin, K., FitzGerald, S. P., O'Sullivan, J., Wu, Y., Blanco, A., Richardson, C., & McGee, M. M. (2020). A comparison of methods for the isolation and separation of extracellular vesicles from protein and lipid particles in human serum. *Scientific reports*, 10 (1), 1039. doi: 10.1038/s41598-020-57497-7.
- Bunggulawa, E. J.,** Wang, W., Yin, T., Wang, N., Durkan, C., Wang, Y., & Wang, G. (2018). Recent advancements in the use of exosomes as drug delivery systems. *Journal of nanobiotechnology*, 16 (1), 81. doi: 10.1186/s12951-018-0403-9.
- Buschmann, D.,** Kirchner, B., Hermann, S., Märte, M., Wurmser, C., Brandes, F., Kotschote, S., Bonin, M., Steinlein, O. K., Pfaffl, M. W., Schelling, G., & Reithmair, M. (2018). Evaluation of serum extracellular vesicle isolation methods for profiling miRNAs by next-generation sequencing. *Journal of extracellular vesicles*, 7 (1), 1481321. doi: 10.1080/20013078.2018.1481321.
- Buzás, E. I.,** Tóth, E. Á., Sódar, B. W., & Szabó-Taylor, K. É. (2018). Molecular interactions at the surface of extracellular vesicles. *Seminars in immunopathology*, 40 (5), 453–464. doi: 10.1007/s00281-018-0682-0.
- Carnino, J. M.,** Lee, H., & Jin, Y. (2019). Isolation and characterization of extracellular vesicles from broncho-alveolar lavage fluid: a review and comparison of different methods. *Respiratory research*, 20 (1), 240. doi: 10.1186/s12931-019-1210-z.
- Caruso, S.,** Poon, I. K. H. (2018). Apoptotic cell-derived extracellular vesicles: more than just debris. *Frontiers in immunology*, 9, 1486. doi: 10.3389/fimmu.2018.01486.
- Chevillet, J. R.,** Kang, Q., Ruf, I. K., Briggs, H. A., Vojtech, L. N., Hughes, S. M., Cheng, H. H., Arroyo, J. D., Meredith, E. K., Gallichotte, E. N., Pogossova-Agadjanyan, E. L., Morrissey, C., Stirewalt, D. L., Hladik, F., Yu, E. Y., Higano, C. S., & Tewari, M. (2014). Quantitative and stoichiometric analysis

of the microRNA content of exosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111, 14888–14893. doi: 10.1073/pnas.1408301111.

**Chiou**, N. T., Kageyama, R., & Ansel, K. M. (2018). Selective export into extracellular vesicles and function of tRNA fragments during T cell activation. *Cell reports*, 25 (12), 3356–3370. doi: 10.1016/j.celrep.2018.11.073.

**Christianson**, H. C., Svensson, K. J., van Kuppevelt, T. H., Li, J. P., & Belting, M. (2013). Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110 (43), 17380–17385. doi: 10.1073/pnas.1304266110.

**Ciferri**, M. C., Quarto, R., & Tasso, R. (2021). Extracellular vesicles as biomarkers and therapeutic tools: from pre-clinical to clinical applications. *Biology*, 10 (5), 359. doi: 10.3390/biology10050359.

**Cocoza**, F., Grisard, E., Martin-Jaular, L., Mathieu, M., Théry, C. (2020). Snapshot: extracellular vesicles. *Cell*, 182 (1), 262–262.e1. doi: 10.1016/j.cell.2020.04.054.

**Collino**, F., Pomatto, M., Bruno, S., Lindoso, R. S., Tapparo, M., Sicheng, W., Quesenberry, P., & Camussi, G. (2017). Exosome and microvesicle-enriched fractions isolated from mesenchymal stem cells by gradient separation showed different molecular signatures and functions on renal tubular epithelial cells. *Stem cell reviews and reports*, 13 (2), 226–243. doi: 10.1007 /s12015-016-9713-1.

**Doepfner**, T. R., Herz, J., Görgens, A., Schlechter, J., Ludwig, A. K., Radtke, S., de Miroshedji, K., Horn, P. A., Giebel, B., & Hermann, D. M. (2015). Extracellular vesicles improve post-stroke neuroregeneration and prevent postischemic immunosuppression. *Stem cells translational medicine*, 4 (10), 1131–1143. doi: 10.5966/sctm.2015-0078.

**Doyle**, L. M., & Wang, M. Z. (2019). Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis. *Cells*, 8. doi: 10.3390/cells8070727.

**Driedonks**, T., & Nolte-'t Hoen, E. (2019). Circulating Y-RNAs in extracellular vesicles and ribonucleoprotein complexes; implications for the immune system. *Frontiers in immunology*, 9, 3164. doi: 10.3389/fimmu.2018.03164.

**Egloff**, S., O'Reilly, D., & Murphy, S. (2008). Expression of human snRNA genes from beginning to end. *Biochemical Society transactions*, 36 (Pt 4), 590–594. doi: 10.1042/BST0360590

- Ellington, A. D., & Szostak, J. W. (1990).** In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 346 (6287), 818–822. doi: 10.1038/346818a0
- Elsharkasy, O. M., Nordin, J. Z., Hagey, D. W., de Jong, O. G., Schiffelers, R. M., Andaloussi, S. E., & Vader, P. (2020).** Extracellular vesicles as drug delivery systems: why and how? *Advanced drug delivery reviews*, 159, 332–343. doi: 10.1016/j.addr.2020.04.004.
- Fabbiano, F., Corsi, J., Gurrieri, E., Trevisan, C., Notarangelo, M., & D'Agostino, V. G. (2020).** RNA packaging into extracellular vesicles: an orchestra of RNA-binding proteins? *Journal of extracellular vesicles*, 10 (2), e12043. doi: 10.1002/jev2.12043.
- Feng, D., Zhao, W. L., Ye, Y. Y., Bai, X. C., Liu, R. Q., Chang, L. F., Zhou, Q., & Sui, S. F. (2010).** Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 11 (5), 675–687. doi: 10.1111/j.1600-0854.2010.01041.x.
- Fernandez-Trillo, F., Grover, L. M., Stephenson-Brown, A., Harrison, P., Mendes, P. M. (2016).** Vesikel in der Natur und im Labor: die Aufklärung der biologischen Eigenschaften und die Synthese zunehmend komplexer synthetischer Vesikel. *Angewandte Chemie*, 3188-3208. doi: 10.1002/ange.201607825.
- Flynn, R. A., Pedram, K., Malaker, S. A., Batista, P. J., Smith, B., Johnson, A. G., George, B. M., Majzoub, K., Villalta, P. W., Carette, J. E., & Bertozzi, C. R. (2021).** Small RNAs are modified with N-glycans and displayed on the surface of living cells. *Cell*, 184 (12), 3109–3124.e22. doi: 10.1016/j.cell.2021.04.023.
- Fuentes, P., Sesé, M., Guijarro, P. J., Emperador, M., Sánchez-Redondo, S., Peinado, H., Hümmer, S., & Ramón Y Cajal, S. (2020).** ITGB3-mediated uptake of small extracellular vesicles facilitates intercellular communication in breast cancer cells. *Nature communications*, 11 (1), 4261. doi: 10.1038/s41467-020-18081-9.
- Gámbaro, F., Li Calzi, M., Fagúndez, P., Costa, B., Greif, G., Mallick, E., Lyons, S., Ivanov, P., Witwer, K., Cayota, A., & Tosar, J. P. (2020).** Stable tRNA halves can be sorted into extracellular vesicles and delivered to recipient cells in a concentration-dependent manner. *RNA biology*, 17, 1168–1182. doi: 10.1080/15476286.2019.1708548.
- Gandham, S., Su, X., Wood, J., Nocera, A. L., Alli, S. C., Milane, L., Zimmerman, A., Amiji, M., & Ivanov, A. R. (2020).** Technologies and standardization in research on extracellular vesicles. *Trends in biotechnology*, 38 (10), 1066–1098. doi: 10.1016/j.tibtech.2020.05.012.

- Gao, Z.,** Herrera-Carrillo, E., & Berkhout, B. (2018). Delineation of the exact transcription termination signal for type 3 polymerase III. *Molecular therapy. Nucleic acids*, 10, 36–44. doi: 10.1016/j.omtn.2017.11.006.
- Garcia-Martin, R.,** Wang, G., Brandão, B. B., Zanotto, T. M., Shah, S., Kumar Patel, S., Schilling, B., & Kahn, C. R. (2022). MicroRNA sequence codes for small extracellular vesicle release and cellular retention. *Nature*, 601 (7893), 446–451. doi: 10.1038/s41586-021-04234-3.
- Gardiner, C.,** Di Vizio, D., Sahoo, S., Théry, C., Witwer, K. W., Wauben, M., & Hill, A. F. (2016). Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide survey. *Journal of extracellular vesicles*, 5, 32945. doi: 10.3402/jev.v5.32945.
- Go, V.,** Bowley, B., Pessina, M. A., Zhang, Z. G., Chopp, M., Finklestein, S. P., Rosene, D. L., Medalla, M., Buller, B., & Moore, T. L. (2020). Extracellular vesicles from mesenchymal stem cells reduce microglial-mediated neuroinflammation after cortical injury in aged rhesus monkeys. *GeroScience*, 42 (1), 1–17. doi: 10.1007/s11357-019-00115-w.
- Go, H.,** Maeda, H., Miyazaki, K., Maeda, R., Kume, Y., Namba, F., Momoi, N., Hashimoto, K., Otsuru, S., Kawasaki, Y., Hosoya, M., & Dennery, P. A. (2020). Extracellular vesicle miRNA-21 is a potential biomarker for predicting chronic lung disease in premature infants. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 318 (5), L845–L851. doi: 10.1152/ajplung.00166.2019.
- Groot, M.,** & Lee, H. (2020). Sorting mechanisms for microRNAs into extracellular vesicles and their associated diseases. *Cells*, 9 (4), 1044. doi: 10.3390/cells9041044.
- Guerreiro, E. M.,** Vestad, B., Steffensen, L. A., Aass, H., Saeed, M., Øvstebø, R., Costea, D. E., Galtung, H. K., & Sjøland, T. M. (2018). Efficient extracellular vesicle isolation by combining cell media modifications, ultrafiltration, and size-exclusion chromatography. *PLoS one*, 13 (9), e0204276. doi: 10.1371/journal.pone.0204276.
- Guescini, M.,** Guidolin, D., Vallorani, L., Casadei, L., Gioacchini, A. M., Tibollo, P., Battistelli, M., Falcieri, E., Battistin, L., Agnati, L. F., & Stocchi, V. (2010). C2C12 myoblasts release micro-vesicles containing mtDNA and proteins involved in signal transduction. *Experimental cell research*, 316 (12), 1977–1984. doi: 10.1016/j.yexcr.2010.04.006.
- Gurung, S.,** Perocheau, D., Touramanidou, L., & Baruteau, J. (2021). The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell communication and signaling: CCS*, 19 (1), 47. doi: 10.1186/s12964-021-00730-1.

- György, B., Hung, M. E., Breakefield, X. O., Leonard, J.N.** (2015). Therapeutic applications of extracellular vesicles: clinical promise and open questions. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 55, 439–464. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010814-124630.
- Ha, D., Yang, N., Nadithe, V.** (2016). Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges. *Acta pharmaceutica Sinica. B*, 6 (4), 287–296. doi: 10.1016/j.apsb.2016.02.001.
- Hagiwara, K., Katsuda, T., Gailhouse, L., Kosaka, N., & Ochiya, T.** (2015). Commitment of Annexin A2 in recruitment of microRNAs into extracellular vesicles. *FEBS letters*, 589 (24 Pt B), 4071–4078. doi: 10.1016/j.febslet.2015.11.036.
- Hartjes, T. A., Mytnyk, S., Jenster, G. W., van Steijn, V., & van Royen, M. E.** (2019). Extracellular vesicle quantification and characterization: common methods and emerging approaches. *Bioengineering (Basel, Switzerland)*, 6 (1), 7. doi: 10.3390/bioengineering6010007.
- He, X., Park, S., Chen, Y., & Lee, H.** (2021). Extracellular vesicle-associated miRNAs as a biomarker for lung cancer in liquid biopsy. *Frontiers in molecular biosciences*, 8, 630718. doi: 10.3389/fmolb.2021.630718.
- Herrmann, I.K., Wood, M. J. A. & Fuhrmann, G.** (2021). Extracellular vesicles as a next-generation drug delivery platform. *Nature nanotechnology*, 16, 748–759. doi: 10.1038/s41565-021-00931-2.
- Hobor, F., Dallmann, A., Ball, N. J., Cicchini, C., Battistelli, C., Ogrodowicz, R. W., Christodoulou, E., Martin, S. R., Castello, A., Tripodi, M., Taylor, I. A., & Ramos, A.** (2018). A cryptic RNA-binding domain mediates Syncrin recognition and exosomal partitioning of miRNA targets. *Nature communications*, 9 (1), 831. doi: 10.1038/s41467-018-03182-3.
- Horos, R., Büscher, M., Kleinendorst, R., Alleaume, A. M., Tarafder, A. K., Schwarzl, T., Dziuba, D., Tischer, C., Zielonka, E. M., Adak, A., Castello, A., Huber, W., Sachse, C., & Hentze, M. W.** (2019). The small non-coding vault RNA1-1 acts as a riboregulator of autophagy. *Cell*, 176 (5), 1054–1067.e12. doi: 10.1016/j.cell.2019.01.030.
- Hou, X., Zaks, T., Langer, R., Dong, Y.** (2021). Lipid nanoparticles for mRNA delivery. *Nature reviews materials*, 6, 1078–1094. doi: 10.1038/s41578-021-00358-0.
- Hurwitz, S. N., & Meckes, D. G., Jr** (2019). Extracellular vesicle integrins distinguish unique cancers. *Proteomes*, 7 (2), 14. doi: 10.3390/proteomes7020014.

- Iavello, A.,** Frech, V. S., Gai, C., Deregibus, M. C., Quesenberry, P. J., & Camussi, G. (2016). Role of Alix in miRNA packaging during extracellular vesicle biogenesis. *International journal of molecular medicine*, 37 (4), 958–966. doi: 10.3892/ijmm.2016.2488.
- Ionescu, L.,** Byrne, R. N., van Haaften, T., Vadivel, A., Alphonse, R. S., Rey-Parra, G. J., Weissmann, G., Hall, A., Eaton, F., & Thébaud, B. (2012). Stem cell conditioned medium improves acute lung injury in mice: in vivo evidence for stem cell paracrine action. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 303 (11), L967–L977. doi: 10.1152/ajplung.00144.2011.
- Jafari, D.,** Shajari, S., Jafari, R., Mardi, N., Gomari, H., Ganji, F., Forouzandeh Moghadam, M., & Samadikuchaksaraei, A. (2020). Designer exosomes: a new platform for biotechnology therapeutics. *BioDrugs: clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*, 34 (5), 567–586. doi: 10.1007/s40259-020-00434-x.
- Jeppesen, D. K.,** Fenix, A. M., Franklin, J. L., Higginbotham, J. N., Zhang, Q., Zimmerman, L. J., Liebler, D. C., Ping, J., Liu, Q., Evans, R., Fissell, W. H., Patton, J. G., Rome, L. H., Burnette, D. T., & Coffey, R. J. (2019). Reassessment of exosome composition. *Cell*, 177, 428–445. doi: 10.1016/j.cell.2019.02.029.
- Jiang, J.,** Kao, C. Y., & Papoutsakis, E. T. (2017). How do megakaryocytic microparticles target and deliver cargo to alter the fate of hematopoietic stem cells?. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 247, 1–18. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.12.021.
- Johnstone, R. M.,** Adam, M., Hammond, J. R., Orr, L., Turbide, C. (1987). Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *The Journal of biological chemistry*, 262 (19), 9412–9420.
- Jung, M. K.,** & Mun, J. Y. (2018). Sample preparation and imaging of exosomes by transmission electron microscopy. *Journal of visualized experiments*, (131), 56482. doi: 10.3791/56482.
- Kaminski, N.,** Köster, C., Mouloud, Y., Börger, V., Felderhoff-Müser, U., Bendix, I., Giebel, B., & Herz, J. (2020). Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles reduce neuroinflammation, promote neural cell proliferation and improve oligodendrocyte maturation in neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Frontiers in cellular neuroscience*, 14, 601176. doi: 10.3389/fncel.2020.601176.
- Kahlert, C.,** Melo, S. A., Protopopov, A., Tang, J., Seth, S., Koch, M., Zhang, J., Weitz, J., Chin, L., Futreal, A., & Kalluri, R. (2014). Identification of double-stranded genomic DNA spanning all chromosomes with mutated KRAS and p53 DNA in the serum exosomes of patients with

pancreatic cancer. *The Journal of biological chemistry*, 289 (7), 3869–3875. doi: 10.1074/jbc.C113.532267.

**Karn, V., Ahmed, S., Tsai, L. W., Dubey, R., Ojha, S., Singh, H. N., Kumar, M., Gupta, P. K., Sadhu, S., Jha, N. K., Kumar, A., Pandit, S., & Kumar, S. (2021).** Extracellular vesicle-based therapy for COVID-19: promises, challenges and future prospects. *Biomedicines*, 9 (10), 1373. doi: 10.3390/biomedicines9101373.

**Klug, S.J. & Famulok, M. (1994).** All you wanted to know about SELEX. *Mol Biol Rep*, 20, 97–107. doi: 10.1007/BF00996358.

**Kodam, S. P., & Ullah, M. (2021).** Diagnostic and therapeutic potential of extracellular vesicles. *Technology in cancer research & treatment*, 20, 15330338211041203. doi: 10.1177/15330338211041203.

**Kojima, R., Bojar, D., Rizzi, G., Hamri, G. C., El-Baba, M. D., Saxena, P., Ausländer, S., Tan, K. R., & Fussenegger, M. (2018).** Designer exosomes produced by implanted cells intracerebrally deliver therapeutic cargo for parkinson's disease treatment. *Nature communications*, 9(1), 1305. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03733-8>

**Konoshenko, M. Y., Lekchnov, E. A., Vlassov, A. V., & Laktionov, P. P. (2018).** Isolation of extracellular vesicles: general methodologies and latest trends. *BioMed research international*, 2018, 8545347. doi: 10.1155/2018/8545347.

**Kordelas, L., Rebmann, V., Ludwig, A. K., Radtke, S., Ruesing, J., Doeppner, T. R., Epple, M., Horn, P. A., Beelen, D. W. & Giebel, B. (2014).** MSC-derived exosomes: a novel tool to treat therapy-refractory graft-versus-host disease. *Leukemia*, 28 (4), 970–973. doi: 10.1038/leu.2014.41.

**Kowal, J., Arras, G., Colombo, M., Jouve, M., Morath, J. P., Primdal-Bengtson, B., Dingli, F., Loew, D., Tkach, M., & Théry, C. (2016).** Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113 (8), E968–E977. doi: 10.1073/pnas.1521230113.

**Kwok, Z. H., Wang, C., & Jin, Y. (2021).** Extracellular vesicle transportation and uptake by recipient cells: a critical process to regulate human diseases. *Processes (Basel, Switzerland)*, 9 (2), 273. doi: 10.3390/pr9020273.

**Köhn, M., Pazaitis, N., & Hüttelmaier, S. (2013).** Why YRNAs? About versatile RNAs and their functions. *Biomolecules*, 3 (1), 143–156. doi: 10.3390/biom3010143.

- Lai, R. C., Arslan, F., Lee, M. M., Sze, N. S., Choo, A., Chen, T. S., Salto-Tellez, M., Timmers, L., Lee, C. N., El Oakley, R. M., Pasterkamp, G., de Kleijn, D. P., Lim, S. K. (2010).** Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem cell research*, 4 (3), 214-222. doi: 10.1016/j.scr.2009.12.003.
- Laulagnier, K., Motta, C., Hamdi, S., Roy, S., Fauvelle, F., Pageaux, J. F., Kobayashi, T., Salles, J. P., Perret, B., Bonnerot, C., & Record, M. (2004).** Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization. *The Biochemical journal*, 380 (Pt 1), 161–171. doi: 10.1042/BJ20031594.
- Lee, H., Li, C., Zhang, Y., Zhang, D., Otterbein, L. E., & Jin, Y. (2019).** Caveolin-1 selectively regulates microRNA sorting into microvesicles after noxious stimuli. *The Journal of experimental medicine*, 216 (9), 2202–2220. doi: 10.1084/jem.20182313.
- Leng, Z., Zhu, R., Hou, W., Feng, Y., Yang, Y., Han, Q., Shan, G., Meng, F., Du, D., Wang, S., Fan, J., Wang, W., Deng, L., Shi, H., Li, H., Hu, Z., Zhang, F., Gao, J., Liu, H., Li, X., Zhao, Y., Yin, K., He, X., Gao, Z., Wang, Y., Yang, B., Jin, R., Stambler, I., Lim, L. W., Huanxing Su, H., Moskalev, A., Cano, A., Chakrabarti, S., Min, K.-J., Ellison-Hughes, G., Caruso, C., Jin, K., Zhao, R. C. (2020).** Transplantation of ACE2<sup>+</sup> mesenchymal stem cells improves the outcome of patients with COVID-19 pneumonia. *Aging and disease*, 11 (2), 216–228. doi: 10.14336/AD.2020.0228.
- Li, Y., Zheng, Q., Bao, C., Li, S., Guo, W., Zhao, J., Di Chen, Gu, J., He, X., & Huang, S. (2015).** Circular RNA is enriched and stable in exosomes: a promising biomarker for cancer diagnosis. *Cell research*, 25, 981–984. doi: 10.1038/cr.2015.82.
- Li, Z., Zhou, X., Wei, M., Gao, X., Zhao, L., Shi, R., Sun, W., Duan, Y., Yang, G., & Yuan, L. (2019).** In vitro and in vivo RNA inhibition by CD9-HuR functionalized exosomes encapsulated with miRNA or CRISPR/dCas9. *Nano letters*, 19 (1), 19–28. doi: 10.1021/acs.nanolett.8b02689.
- Li, M., Liao, L., & Tian, W. (2020).** Extracellular vesicles derived from apoptotic cells: an essential link between death and regeneration. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 573511. doi: 10.3389/fcell.2020.573511.
- Liangsupree, T., Multia, E., & Riekkola, M. L. (2021).** Modern isolation and separation techniques for extracellular vesicles. *Journal of chromatography A*, 1636, 461773. doi: 10.1016/j.chroma.2020.461773.
- Lin, F., Zeng, Z., Song, Y., Li, L., Wu, Z., Zhang, X., Li, Z., Ke, X., & Hu, X. (2019).** YBX-1 mediated sorting of miR-133 into hypoxia/reoxygenation-induced EPC-derived exosomes to increase

fibroblast angiogenesis and MEndoT. *Stem cell research & therapy*, 10 (1), 263. doi: 10.1186/s13287-019-1377-8.

**Lötvall, J.**, Hill, A. F., Hochberg, F., Buzás, E. I., Di Vizio, D., Gardiner, C., Ghossein, Y. S., Kurochkin, I. V., Mathivanan, S., Quesenberry, P., Sahoo, S., Tahara, H., Wauben, M. H., Witwer, K. W., & Théry, C. (2014). Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *Journal of extracellular vesicles*, 3, 26913. doi: 10.3402/jev.v3.26913.

**Ludwig, A. K.**, De Miroschedji, K., Doeppner, T. R., Börger, V., Ruesing, J., Rebmann, V., Durst, S., Jansen, S., Bremer, M., Behrmann, E., Singer, B. B., Jastrow, H., Kuhlmann, J. D., El Magraoui, F., Meyer, H. E., Hermann, D. M., Opalka, B., Raunser, S., Epple, M., Horn, P. A., Giebel, B. (2018). Precipitation with polyethylene glycol followed by washing and pelleting by ultracentrifugation enriches extracellular vesicles from tissue culture supernatants in small and large scales. *Journal of extracellular vesicles*, 7 (1), 1528109. doi: 10.1080/20013078.2018.1528109.

**Ma, Y.**, Dong, L., Zhou, D., Li, L., Zhang, W., Zhen, Y., Wang, T., Su, J., Chen, D., Mao, C., & Wang, X. (2019). Extracellular vesicles from human umbilical cord mesenchymal stem cells improve nerve regeneration after sciatic nerve transection in rats. *Journal of cellular and molecular medicine*, 23 (4), 2822–2835. doi: 10.1111/jcmm.14190.

**Mashouri, L.**, Yousefi, H., Aref, A. R., Ahadi, A. M., Molaei, F., & Alahari, S. K. (2019). Exosomes: composition, biogenesis, and mechanisms in cancer metastasis and drug resistance. *Molecular cancer*, 18 (1), 75. doi: 10.1186/s12943-019-0991-5.

**Mateescu, B.**, Kowal, E. J. K., van Balkom, B. W. M., Bartel, S., Bhattacharyya, S. N., Buzás, E. I., Buck, A. H., de Candia, P., Chow, F. W. N., Das, S., Driedonks, T. A. P., Fernández-Messina, L., Haderk, F., Hill, A. F., Jones, J. C., van Keuren-Jensen, K. R., Lai, C. P., Lässer, C., Di Liegro, I., Nolte-'t Hoen, E. N. M. (2017). Obstacles and opportunities in the functional analysis of extracellular vesicle RNA - an ISEV position paper. *Journal of extracellular vesicles*, 6, 1286095. doi: 10.1080/20013078.2017.1286095.

**Mathivanan, S.**, Ji, H., & Simpson, R. J. (2010). Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *Journal of proteomics*, 73, 1907–1920. doi: 10.1016/j.jprot.2010.06.006.

**McKenzie, A. J.**, Hoshino, D., Hong, N. H., Cha, D. J., Franklin, J. L., Coffey, R. J., Patton, J. G., & Weaver, A. M. (2016). KRAS-MEK signaling controls Ago2 sorting into exosomes. *Cell reports*, 15 (5), 978–987. doi: 10.1016/j.celrep.2016.03.085.

- Mentkowski**, K. I., Snitzer, J. D., Rusnak, S., & Lang, J. K. (2018). Therapeutic potential of engineered extracellular vesicles. *The AAPS journal*, 20 (3), 50. doi: 10.1208/s12248-018-0211-z.
- Miyanishi**, M., Tada, K., Koike, M., Uchiyama, Y., Kitamura, T., & Nagata, S. (2007). Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature*, 450 (7168), 435–439. doi: 10.1038/nature06307.
- Mizohata**, Y., Toda, H., Koga, M., Saito, T., Fujita, M., Kobayashi, T., Hatakeyama, S., & Morimoto, Y. (2021). Neural extracellular vesicle-derived miR-17 in blood as a potential biomarker of subthreshold depression. *Human cell*, 34 (4), 1087–1092. doi: 10.1007/s13577-021-00553-9.
- Moore**, T. L., Bowley, B., Pessina, M. A., Calderazzo, S. M., Medalla, M., Go, V., Zhang, Z. G., Chopp, M., Finklestein, S., Harbaugh, A. G., Rosene, D. L., & Buller, B. (2019). Mesenchymal derived exosomes enhance recovery of motor function in a monkey model of cortical injury. *Restorative neurology and neuroscience*, 37 (4), 347–362. doi: 10.3233/RNN-190910.
- Morelli**, A. E., Larregina, A. T., Shufesky, W. J., Sullivan, M. L., Stolz, D. B., Papworth, G. D., Zahorchak, A. F., Logar, A. J., Wang, Z., Watkins, S. C., Falo, L. D., Jr, & Thomson, A. W. (2004). Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood*, 104 (10), 3257–3266. doi: 10.1182/blood-2004-03-0824.
- Mosbach**, M. L., von Strandmann, E. P., Preußner, C. (2021). RNAs and extracellular vesicles – keeping up the appearances. *Trillium ev*, 3 (1). doi: 10.47184/tev.2021.01.01.
- Mosbach**, M. L., Pfafenrot, C., von Strandmann, E. P., Bindereif, A., & Preußner, C. (2021). Molecular determinants for RNA release into extracellular vesicles. *Cells*, 10 (10), 2674. doi: 10.3390/cells10102674.
- Mu**, Y., McManus, D. P., Gordon, C. A., & Cai, P. (2021). Parasitic helminth-derived microRNAs and extracellular vesicle cargos as biomarkers for helminthic infections. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11, 708952. doi: 10.3389/fcimb.2021.708952.
- Mukherjee**, K., Ghoshal, B., Ghosh, S., Chakrabarty, Y., Shwetha, S., Das, S., & Bhattacharyya, S. N. (2016). Reversible HuR-microRNA binding controls extracellular export of miR-122 and augments stress response. *EMBO reports*, 17 (8), 1184–1203. doi: 10.15252/embr.201541930.
- Mulisch**, M., & Welsch, U. (Eds.) (2015). Romeis-mikroskopische Technik. *Springer-Verlag*, 26-32. doi: 10.1007/978-3-642-55190-1.

- Nanbo, A., Kawanishi, E., Yoshida, R., & Yoshiyama, H. (2013).** Exosomes derived from Epstein-Barr virus-infected cells are internalized via caveola-dependent endocytosis and promote phenotypic modulation in target cells. *Journal of virology*, 87 (18), 10334–10347. doi: 10.1128/JVI.01310-13.
- Nanofcm. (2021)** The origin and phenotyping of extracellular vesicles. <https://www.nanofcm.com/extracellular-vesicles/> (zuletzt abgerufen am 14.10.2021/ 14:54).
- Nolte-'t Hoen, E. N. M., Buermans, H. P. J., Waasdorp, M., Stoorvogel, W., Wauben, M. H. M., & 't Hoen, Peter A. C. (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 research*, 40, 9272–9285. doi: 10.1093/nar/gks658.
- O'Brien, K., Breyne, K., Ughetto, S., Laurent, L. C., & Breakefield, X. O. (2020).** RNA delivery by extracellular vesicles in mammalian cells and its applications. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 21 (10), 585–606. doi: 10.1038/s41580-020-0251-y.
- Ozawa, P., Jucoski, T. S., Vieira, E., Carvalho, T. M., Malheiros, D., & Ribeiro, E. (2020).** Liquid biopsy for breast cancer using extracellular vesicles and cell-free microRNAs as biomarkers. *Translational research: the journal of laboratory and clinical medicine*, 223, 40–60. doi: 10.1016/j.trsl.2020.04.002.
- Pang, B., Zhu, Y., Ni, J., Thompson, J., Malouf, D., Bucci, J., Graham, P., & Li, Y. (2020).** Extracellular vesicles: the next generation of biomarkers for liquid biopsy-based prostate cancer diagnosis. *Theranostics*, 10 (5), 2309–2326. doi: 10.7150/thno.39486.
- Pardridge W. M. (2005).** The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 2 (1), 3–14. doi: 10.1602/neurorx.2.1.3.
- Pardridge W. M. (2012).** Drug transport across the blood-brain barrier. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 32 (11), 1959–1972. doi: 10.1038/jcbfm.2012.126.
- Pedrioli, G., Piovesana, E., Vacchi, E., & Balbi, C. (2021).** Extracellular vesicles as promising carriers in drug delivery: considerations from a cell biologist's perspective. *Biology*, 10 (5), 376. doi: 10.3390/biology10050376.
- Purushothaman, A., Bandari, S. K., Liu, J., Mobley, J. A., Brown, E. E., & Sanderson, R. D. (2016).** Fibronectin on the surface of myeloma cell-derived exosomes mediates exosome-cell

interactions. *The Journal of biological chemistry*, 291 (4), 1652–1663. doi: 10.1074/jbc.M115.686295.

**Preußner, C.,** Hung, L.-H., Schneider, T., Schreiner, S., Hardt, M., Moebus, A., Santoso, S., & Bindereif, A. (2018). Selective release of circRNAs in platelet-derived extracellular vesicles. *Journal of extracellular vesicles*, 7, 1424473. doi: 10.1080/20013078.2018.1424473.

**Qiu, Y.,** Li, P., Zhang, Z., & Wu, M. (2021). Insights into exosomal non-coding RNAs sorting mechanism and clinical application. *Frontiers in oncology*, 11, 664904. doi: 10.3389/fonc.2021.664904.

**Ragusa, M.,** Barbagallo, C., Cirnigliaro, M., Battaglia, R., Brex, D., Caponnetto, A., Barbagallo, D., Di Pietro, C., & Purrello, M. (2017). Asymmetric RNA distribution among cells and their secreted exosomes: biomedical meaning and considerations on diagnostic applications. *Frontiers in molecular biosciences*, 4, 66. doi: 10.3389/fmolb.2017.00066.

**Rana, S.,** Yue, S., Stadel, D., & Zöller, M. (2012). Toward tailored exosomes: the exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 44 (9), 1574–1584. doi: 10.1016/j.biocel.2012.06.018.

**Ratajczak, J.,** Miekus, K., Kucia, M., Zhang, J., Reca, R., Dvorak, P., & Ratajczak, M. Z. (2006). Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia*, 20, 847–856. doi: 10.1038/sj.leu.2404132.

**Reiners, K. S.,** Dassler-Plenker, J., Coch, C. & Hartmann, G. (2017). Funktion von extrazellulären Vesikeln und Bedeutung für die labormedizinische Diagnostik. *LaboratoriumsMedizin*, 41 (6), 299-308. doi: 10.1515/labmed-2017-0078.

**Romanelli, P.,** Bieler, L., Scharler, C., Pachler, K., Kreutzer, C., Zaunmair, P., Jakubecova, D., Mrowetz, H., Benedetti, B., Rivera, F. J., Aigner, L., Rohde, E., Gimona, M., Strunk, D., & Couillard-Despres, S. (2019). Extracellular vesicles can deliver anti-inflammatory and anti-scarring activities of mesenchymal stromal cells after spinal cord injury. *Frontiers in neurology*, 10, 1225. doi: 10.3389/fneur.2019.01225.

**Royo, F.,** Théry, C., Falcón-Pérez, J. M., Nieuwland, R., & Witwer, K. W. (2020). Methods for separation and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide survey performed by the ISEV rigor and standardization subcommittee. *Cells*, 9 (9), 1955. doi: 10.3390/cells9091955.

- Rufino-Ramos**, D., Albuquerque, P. R., Carmona, V., Perfeito, R., Nobre, R. J., & Pereira de Almeida, L. (2017). Extracellular vesicles: novel promising delivery systems for therapy of brain diseases. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 262, 247–258. doi: 10.1016/j.jconrel.2017.07.001.
- Sabanovic**, B., Piva, F., Cecati, M., & Giulietti, M. (2021). Promising extracellular vesicle-based vaccines against viruses, including SARS-CoV-2. *Biology*, 10 (2), 94. doi: 10.3390/biology10020094.
- Salmond**, N., and Williams, K. C. (2021). Isolation and characterization of extracellular vesicles for clinical applications in cancer – time for standardization? *Nanoscale advances*, 3, 1830–1852. doi: 10.1039/D0NA00676A.
- Santangelo**, L., Giurato, G., Cicchini, C., Montaldo, C., Mancone, C., Tarallo, R., Battistelli, C., Alonzi, T., Weisz, A., & Tripodi, M. (2016). The RNA-binding protein SYNCRIP is a component of the hepatocyte exosomal machinery controlling microRNA sorting. *Cell reports*, 17, 799–808. doi: 10.1016/j.celrep.2016.09.031.
- Santos**, P., & Almeida, F. (2021). Exosome-based vaccines: history, current state, and clinical trials. *Frontiers in immunology*, 12, 711565. doi: 10.3389/fimmu.2021.711565.
- Schneider**, T., Hung, L. H., Aziz, M., Wilmen, A., Thaum, S., Wagner, J., Janowski, R., Müller, S., Schreiner, S., Friedhoff, P., Hüttelmaier, S., Niessing, D., Sattler, M., Schlundt, A., & Bindereif, A. (2019). Combinatorial recognition of clustered RNA elements by the multidomain RNA-binding protein IMP3. *Nature communications*, 10 (1), 2266. doi: 10.1038/s41467-019-09769-8.
- Shimoda**, A., Tahara, Y., Sawada, S. I., Sasaki, Y., & Akiyoshi, K. (2017). Glycan profiling analysis using evanescent-field fluorescence-assisted lectin array: importance of sugar recognition for cellular uptake of exosomes from mesenchymal stem cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 491 (3), 701–707. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.07.126.
- Shurtleff**, M. J., Temoche-Diaz, M. M., Karfilis, K. V., Ri, S., & Schekman, R. (2016). Y-box protein 1 is required to sort microRNAs into exosomes in cells and in a cell-free reaction. *eLife*, 5. doi: 10.7554/eLife.19276.
- Shurtleff**, M. J., Yao, J., Qin, Y., Nottingham, R. M., Temoche-Diaz, M. M., Schekman, R., & Lambowitz, A. M. (2017). Broad role for YBX1 in defining the small noncoding RNA composition of exosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114 (43), E8987–E8995. doi: 10.1073/pnas.1712108114.

- Sidhom, K.,** Obi, P. O., & Saleem, A. (2020). A Review of exosomal isolation methods: is size exclusion chromatography the best option?. *International journal of molecular sciences*, 21 (18), 6466. doi: 10.3390/ijms21186466.
- Singh, R.,** & Reddy, R. (1989). Gamma-monomethyl phosphate: a cap structure in spliceosomal U6 small nuclear RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86 (21), 8280–8283. doi: 10.1073/pnas.86.21.8280
- Simons, M.,** & Raposo, G. (2009). Exosomes - vesicular carriers for intercellular communication. *Current opinion in cell biology*, 21, 575–581. doi: 10.1016/j.ceb.2009.03.007.
- Skog, J.,** Würdinger, T., van Rijn, S., Meijer, D. H., Gainche, L., Sena-Esteves, M., Curry, W. T., Carter, B. S., Krichevsky, A. M., & Breakefield, X. O. (2008). Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature cell biology*, 10, 1470–1476. doi: 10.1038/ncb1800.
- Squadrito, M. L.,** Baer, C., Burdet, F., Maderna, C., Gilfillan, G. D., Lyle, R., Ibberson, M., & De Palma, M. (2014). Endogenous RNAs modulate microRNA sorting to exosomes and transfer to acceptor cells. *Cell reports*, 8 (5), 1432–1446. doi: 10.1016/j.celrep.2014.07.035.
- Sun, G.,** Li, G., Li, D., Huang, W., Zhang, R., Zhang, H., Duan, Y., & Wang, B. (2018). hucMSC derived exosomes promote functional recovery in spinal cord injury mice via attenuating inflammation. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 89, 194–204. doi: 10.1016/j.msec.2018.04.006.
- Svensson, K. J.,** Christianson, H. C., Wittrup, A., Bourseau-Guilmain, E., Lindqvist, E., Svensson, L. M., Mörgelin, M., & Belting, M. (2013). Exosome uptake depends on ERK1/2-heat shock protein 27 signaling and lipid raft-mediated endocytosis negatively regulated by caveolin-1. *The Journal of biological chemistry*, 288 (24), 17713–17724. doi: 10.1074/jbc.M112.445403.
- Szataneck, R.,** Baj-Krzyworzeka, M., Zimoch, J., Lekka, M., Siedlar, M., & Baran, J. (2017). The methods of choice for extracellular vesicles (EVs) characterization. *International journal of molecular sciences*, 18 (6), 1153. doi: 10.3390/ijms18061153.
- Temoche-Diaz, M. M.,** Shurtleff, M. J., Nottingham, R. M., Yao, J., Fadadu, R. P., Lambowitz, A. M., & Schekman, R. (2019). Distinct mechanisms of microRNA sorting into cancer cell-derived extracellular vesicle subtypes. *eLife*, 8, e47544. doi: 10.7554/eLife.47544.
- Teng, Y.,** Ren, Y., Hu, X., Mu, J., Samykutty, A., Zhuang, X., Deng, Z., Kumar, A., Zhang, L., Merchant, M. L., Yan, J., Miller, D. M., & Zhang, H. G. (2017). MVP-mediated exosomal sorting

of miR-193a promotes colon cancer progression. *Nature communications*, 8, 14448. doi: 10.1038/ncomms14448.

**Teng, F., & Fussenegger, M. (2020).** Shedding light on extracellular vesicle biogenesis and bioengineering. *Advanced science (Weinheim, Baden-Württemberg, Germany)*, 8 (1), 2003505. doi: 10.1002/advs.202003505.

**Thakur, B. K., Zhang, H., Becker, A., Matej, I., Huang, Y., Costa-Silva, B., Zheng, Y., Hoshino, A., Brazier, H., Xiang, J., Williams, C., Rodriguez-Barrueco, R., Silva, J. M., Zhang, W., Hearn, S., Elemento, O., Paknejad, N., Manova-Todorova, K., Welte, K., Bromberg, J., Héctor, P., Lyden, D. (2014).** Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell research*, 24 (6), 766–769. doi: 10.1038/cr.2014.44.

**Théry, C., Ostrowski, M., & Segura, E. (2009).** Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nature reviews. Immunology*, 9, 581–593. doi: 10.1038/nri2567.

**Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-Smith, G. K., Ayre, D. C., Bach, J.-M., Bachurski, D., Baharvand, H., Balaj, L., Baldacchino, S., Bauer, N. N., Baxter, A. A., & Bebawy, M... Zuba-Surma, E. K. (2018).** Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of extracellular vesicles*, 7, 1535750. doi: 10.1080/20013078.2018.1535750.

**Tian, T., Zhu, Y. L., Zhou, Y. Y., Liang, G. F., Wang, Y. Y., Hu, F. H., & Xiao, Z. D. (2014).** Exosome uptake through clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis and mediating miR-21 delivery. *The Journal of biological chemistry*, 289 (32), 22258–22267. doi: 10.1074/jbc.M114.588046.

**Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brügger, B., & Simons, M. (2008).** Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science (New York, N.Y.)*, 319 (5867), 1244–1247. doi: 10.1126/science.1153124.

**Turchinovich, A., Weiz, L., Langheinz, A., & Burwinkel, B. (2011).** Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic acids research*, 39, 7223–7233. doi: 10.1093/nar/gkr254.

**Turchinovich, A., Drapkina, O., & Tonevitsky, A. (2019).** Transcriptome of extracellular vesicles: state-of-the-art. *Frontiers in immunology*, 10, 202. doi: 10.3389/fimmu.2019.00202.

- Tuerk, C., & Gold, L. (1990).** Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science (New York, N.Y.)*, 249 (4968), 505–510. doi:10.1126/science.2200121.
- Urak, K. T., Shore, S., Rockey, W. M., Chen, S. J., McCaffrey, A. P., & Giangrande, P. H. (2016).** In vitro RNA SELEX for the generation of chemically-optimized therapeutic RNA drugs. *Methods (San Diego, Calif.)*, 103, 167–174. doi: 10.1016/j.ymeth.2016.03.003.
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J., & Lötvall, J. O. (2007).** Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology*, 9, 654–659. doi: 10.1038/ncb1596.
- van Niel, G., Porto-Carreiro, I., Simoes, S., & Raposo, G. (2006).** Exosomes: a common pathway for a specialized function. *Journal of biochemistry*, 140 (1), 13–21. doi: 10.1093/jb/mvj128.
- van Niel, G., Charrin, S., Simoes, S., Romao, M., Rochin, L., Saftig, P., Marks, M. S., Rubinstein, E., & Raposo, G. (2011).** The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis. *Developmental cell*, 21 (4), 708–721. doi: 10.1016/j.devcel.2011.08.019.
- van Niel, G., D'Angelo, G., Raposo, G. (2018):** Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 19 (4), 213–228. doi: 10.1038/nrm.2017.125.
- Veziroglu, E. M., & Mias, G. I. (2020).** Characterizing extracellular vesicles and their diverse RNA contents. *Frontiers in genetics*, 11, 700. doi: 10.3389/fgene.2020.00700.
- Villarroya-Beltri, C., Gutiérrez-Vázquez, C., Sánchez-Cabo, F., Pérez-Hernández, D., Vázquez, J., Martín-Cofreces, N., Martínez-Herrera, D. J., Pascual-Montano, A., Mittelbrunn, M., & Sánchez-Madrid, F. (2013).** Sumoylated hnRNP A2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nature communications*, 4, 2980. doi: 10.1038/ncomms3980.
- Villarroya-Beltri, C., Baixauli, F., Gutiérrez-Vázquez, C., Sánchez-Madrid, F., & Mittelbrunn, M. (2014).** Sorting it out: regulation of exosome loading. *Seminars in cancer biology*, 28, 3–13. doi: 10.1016/j.semcancer.2014.04.009.
- Vogel, R., Savage, J., Muzard, J., Camera, G. D., Vella, G., Law, A., Marchioni, M., Mehn, D., Geiss, O., Peacock, B., Aubert, D., Calzolari, L., Caputo, F., & Prina-Mello, A. (2021).** Measuring particle concentration of multimodal synthetic reference materials and extracellular vesicles with orthogonal techniques: who is up to the challenge?. *Journal of extracellular vesicles*, 10 (3), e12052. doi: 10.1002/jev2.12052.

- Vojtech**, L., Woo, S., Hughes, S., Levy, C., Ballweber, L., Sauteraud, R. P., Strobl, J., Westerberg, K., Gottardo, R., Tewari, M., & Hladik, F. (2014). Exosomes in human semen carry a distinctive repertoire of small non-coding RNAs with potential regulatory functions. *Nucleic acids research*, 42 (11), 7290–7304. doi: 10.1093/nar/gku347.
- Wang**, K., Zhang, S., Weber, J., Baxter, D., & Galas, D. J. (2010). Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic acids research*, 38 (20), 7248–7259. doi: 10.1093/nar/gkq601.
- Wang**, B. Z., Luo, L. J., & Vunjak-Novakovic, G. (2021). RNA and protein delivery by cell-secreted and bioengineered extracellular vesicles. *Advanced healthcare materials*, e2101557. Advance online publication. doi: 10.1002/adhm.202101557.
- Wei**, Z., Batagov, A. O., Schinelli, S., Wang, J., Wang, Y., El Fatimy, R., Rabinovsky, R., Balaj, L., Chen, C. C., Hochberg, F., Carter, B., Breakefield, X. O., & Krichevsky, A. M. (2017). Coding and noncoding landscape of extracellular RNA released by human glioma stem cells. *Nature communications*, 8, 1145. doi: 10.1038/s41467-017-01196-x.
- Weinstein**, A. (2019) What is an RNA aptamer? <https://blog.addgene.org/the-fluorescent-vegetables-in-aptamer-soup> (zuletzt abgerufen am 28.10.2021/15:28).
- Witwer**, K. W., Soekmadji, C., Hill, A. F., Wauben, M. H., Buzás, E. I., Di Vizio, D., Falcon-Perez, J. M., Gardiner, C., Hochberg, F., Kurochkin, I. V., Lötvall, J., Mathivanan, S., Nieuwland, R., Sahoo, S., Tahara, H., Torrecilhas, A. C., Weaver, A. M., Yin, H., Zheng, L., Gho, Y. S., Quesenberry, P., Théry, C. (2017). Updating the MISEV minimal requirements for extracellular vesicle studies: building bridges to reproducibility. *Journal of extracellular vesicles*, 6, 1396823. doi: 10.1080/20013078.2017.1396823.
- Xu**, Y. F., Xu, X., Gin, A., Nshimiyimana, J. D., Mooers, B., Caputi, M., Hannafon, B. N., & Ding, W. Q. (2020). SRSF1 regulates exosome microRNA enrichment in human cancer cells. *Cell communication and signaling: CCS*, 18 (1), 130. doi: 10.1186/s12964-020-00615-9.
- Yan**, C., Hu, J., Yang, Y., Hu, H., Zhou, D., Ma, M., & Xu, N. (2019). Plasma extracellular vesicle-packaged microRNAs as candidate diagnostic biomarkers for early-stage breast cancer. *Molecular medicine reports*, 20 (5), 3991–4002. doi: 10.3892/mmr.2019.10669.
- Yáñez-Mó**, M., Siljander, P. R., Andreu, Z., Zavec, A. B., Borràs, F. E., Buzas, E. I., Buzas, K., Casal, E., Cappello, F., Carvalho, J., Colás, E., Cordeiro-da Silva, A., Fais, S., Falcon-Perez, J. M., Ghobrial, I. M., Giebel, B., Gimona, M., Graner, M., Gursel, I., Gursel, M., Heegaard, N. H., Hendrix, A., Kierulf, P., Kokubun, K., Kosanovic, M., Kralj-Iglic, V., Krämer-Albers, E. M., Laitinen, S., Lässer,

C., Lener, T., Ligeti, E., Linē, A., Lipps, G., Llorente, A., Lötval, J., Manček-Keber, M., Marcilla, A., Mittelbrunn, M., Nazarenko, I., Nolte-'t Hoen, E. N., Nyman, T. A., O'Driscoll, L., Olivan, M., Oliveira, C., Pállinger, É., Del Portillo, H. A., Reventós, J., Rigau, M., Rohde, E., Sammar, M., Sánchez-Madrid, F., Santarém, N., Schallmoser, K., Ostefeld, M. S., Stoorvogel, W., Stukelj, R., Van der Grein, S. G., Vasconcelos, M. H., Wauben, M. H., De Wever, O. (2015) Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of extracellular vesicles*, 4, 27066. doi: 10.3402/jev.v4.27066.

**Yoshioka**, Y., Konishi, Y., Kosaka, N., Katsuda, T., Kato, T., & Ochiya, T. (2013). Comparative marker analysis of extracellular vesicles in different human cancer types. *Journal of extracellular vesicles*, 2, 20424. doi: 10.3402/jev.v2i0.20424.

**Zaborowski**, M. P., Balaj, L., Breakefield, X. O., & Lai, C. P. (2015). Extracellular vesicles: composition, biological relevance, and methods of study. *Bioscience*, 65, 783–797. doi: 10.1093/biosci/biv084.

**Zhang**, L., Zhang, S., Yao, J., Lowery, F. J., Zhang, Q., Huang, W. C., Li, P., Li, M., Wang, X., Zhang, C., Wang, H., Ellis, K., Cheerathodi, M., McCarty, J. H., Palmieri, D., Saunus, J., Lakhani, S., Huang, S., Sahin, A. A., Aldape, K. D., Steeg, P. S., Yu, D. (2015). Microenvironment-induced PTEN loss by exosomal microRNA primes brain metastasis outgrowth. *Nature*, 527 (7576), 100–104. doi: 10.1038/nature15376.

**Zhang**, H., & Lyden, D. (2019). Asymmetric-flow field-flow fractionation technology for exomere and small extracellular vesicle separation and characterization. *Nature protocols*, 14 (4), 1027–1053. doi: 10.1038/s41596-019-0126-x.

**Zhang**, Y., Liu, Y., Liu, H., & Tang, W. H. (2019). Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell & bioscience*, 9, 19. doi: 10.1186/s13578-019-0282-2.

**Zhu**, S., Ma, L., Wang, S., Chen, C., Zhang, W., Yang, L., Hang, W., Nolan, J. P., Wu, L., & Yan, X. (2014). Light-scattering detection below the level of single fluorescent molecules for high-resolution characterization of functional nanoparticles. *ACS nano*, 8 (10), 10998–11006. doi: 10.1021/nn505162u.

**Zietzer**, A., Hosen, M. R., Wang, H., Goody, P. R., Sylvester, M., Latz, E., Nickenig, G., Werner, N., & Jansen, F. (2020). The RNA-binding protein hnRNPU regulates the sorting of microRNA-30c-5p into large extracellular vesicles. *Journal of extracellular vesicles*, 9, 1786967. doi: 10.1080/20013078.2020.1786967.

**Zomer, A.,** Maynard, C., Verweij, F. J., Kamermans, A., Schäfer, R., Beerling, E., Schiffelers, R. M., de Wit, E., Berenguer, J., Ellenbroek, S. I. J., Wurdinger, T., Pegtel, D. M., & van Rheenen, J. (2015). In Vivo imaging reveals extracellular vesicle-mediated phenocopying of metastatic behavior. *Cell*, 161, 1046–1057. doi: 10.1016/j.cell.2015.04.042.

## 8 TABELLENVERZEICHNIS

<b>Tabelle 1.</b> Pipettierschema für SDS-PAGE .....	29
<b>Tabelle 2.</b> qPCR-Primer .....	31
<b>Tabelle 3.</b> Primer zur Herstellung der Northern Blot-Sonden .....	31
<b>Tabelle 4.</b> DNA-Oligonukleotide für die Klonierung der SELEX-Konstrukte.....	32
<b>Tabelle 5.</b> PCR-Primer zur Detektion der SELEX-Konstrukte .....	33
<b>Tabelle 6.</b> Barcodes und Primer für die Herstellung der RNA-Seq-Library.....	33
<b>Tabelle 7.</b> DNA-Oligonukleotide für die Klonierung der Quantifizierungs-Konstrukte .....	34
<b>Tabelle 8.</b> qPCR-Primer zur Detektion der Quantifizierungs-Konstrukte .....	34
<b>Tabelle 9.</b> DNA-Oligonukleotide für die Klonierung der Längen-Konstrukte (LC) .....	35
<b>Tabelle 10.</b> qPCR-Primer zur Detektion der Längen-Konstrukte (LC) .....	37
<b>Tabelle 11.</b> DNA-Oligonukleotide für die Klonierung des Broccoli- und Spinach2-Konstrukts....	37
<b>Tabelle 12.</b> PCR-Primer zur Detektion des Broccoli- und Spinach2-Konstrukts.....	37
<b>Tabelle 13.</b> DNA-Oligonukleotide für die Klonierung der Expressionskonstrukte 1 - 4 .....	38
<b>Tabelle 14.</b> qPCR-Primer zur Detektion der Expressionskonstrukte 1 - 4.....	39
<b>Tabelle 15.</b> PCR-Reaktionschema .....	41
<b>Tabelle 16.</b> PCR-Programm für das Annealing von Oligonukleotiden .....	44

## 9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<b>Abbildung 1.</b> Übersicht über die Subtypen, Funktionen und die Zusammensetzung von extrazellulären Vesikeln .....	2
<b>Abbildung 2.</b> Mechanismen der Biogenese von Exosomen. Dargestellt sind verschiedene molekulare Mechanismen der ILV-Bildung im MVE.....	5
<b>Abbildung 3.</b> Aufnahme von extrazellulären Vesikeln an der Zielzelle .....	7
<b>Abbildung 4.</b> Mechanismen des selektiven Verpackens von RNAs in EVs .....	8
<b>Abbildung 5.</b> Mögliche Funktionen von EV-RNA.....	11
<b>Abbildung 6.</b> Darstellung der konventionellen Methoden zur Aufreinigung von extrazellulären Vesikeln .....	14
<b>Abbildung 7.</b> Isolation von extrazellulären Vesikeln (EVs).....	51
<b>Abbildung 8.</b> Charakterisierung von EVs aus HEK293-Zellen.....	53
<b>Abbildung 9.</b> Unterschiede in der Präparation beeinflussen Qualität und EV-Morphologie in der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM). .....	54
<b>Abbildung 10.</b> Vergleich der Größenbestimmungsmethoden für EVs: Nanopartikel-Tracking-Analyse (NTA) vs. Nano-Durchflusszytometrie (NanoFCM). .....	56
<b>Abbildung 11.</b> Überprüfung der Zellkulturmedien auf RNA-Kontaminationen. ....	57
<b>Abbildung 12.</b> EV-assoziierte RNAs sind vor dem Abbau durch RNasen geschützt. ....	58
<b>Abbildung 13.</b> Identifizierung von RNA-Motiven für das selektive Beladen von RNAs in EVs. ...	61
<b>Abbildung 14.</b> Generierung einer Library für RNA-Seq. ....	62
<b>Abbildung 15.</b> Korrelation der RNA-Anreicherung von 4-mer, 5-mer und 6-mer-Motiven in EVs im Vergleich zu Zellen.....	63
<b>Abbildung 16.</b> Einfluss unterschiedlicher RNA-Polymerasen auf die RNA-Verpackung in EVs. ...	65
<b>Abbildung 17.</b> Längenabhängige Freisetzung von RNAs in EVs.....	67
<b>Abbildung 18.</b> EV-Charakterisierung der Zelllinien HEK293, ES-2, U373, HepG2 und A549. ....	69
<b>Abbildung 19.</b> Absolute Quantifizierung der endogenen RNAs U6 snRNA, Y1 RNA, U1 snRNA und der GAPDH mRNA in EVs. ....	71
<b>Abbildung 20.</b> EV-RNA und zelluläre RNA unterscheiden sich in Größe und Polyadenylierungsstatus der GAPDH mRNA.....	72
<b>Abbildung 21.</b> Detektion von RNA-Aptameren in EV.....	74
<b>Abbildung 22.</b> RNA-sequenzunabhängige Freisetzung in EVs. ....	75
<b>Abbildung 23.</b> Molekulare Determinanten, die das Beladen von RNA in EVs begünstigen.....	81

## 10 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
A ( <i>area</i> )	Bereich, Fläche
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
cDNA ( <i>complementary DNA</i> )	Komplementäre DNA
ct ( <i>cycle threshold</i> )	Zyklus-Schwelle
DIG	Digoxigenin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMPC	Dimethylpyrocarbonat
dN <sub>6</sub>	Random-Hexamer
DNA ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dT	Oligo(dT)
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Eff	Effizienz
EVs	Extrazelluläre Vesikel
et al. ( <i>et alii</i> )	Und andere
FBS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FU	Fluorescence units

fwd ( <i>forward</i> )	Vorwärts
H <sub>2</sub> O	Wasser
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Konz	Konzentration
LB-Medium ( <i>lysogeny broth</i> )	Nährmedium für Bakterien
log	Logarithmus
M	Molar
m <sup>7</sup> G	7-Methylguanosin
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
mM	Millimolar
Mock	Scheinbehandlung
mppp	γ-Monomethyl
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nts	Nukleotide
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PC5	Phycoerythrin-Cyanin 5.1
PCF ( <i>procyclic form</i> )	Prozyklische Form
PCR ( <i>polymerase chain reaction</i> )	Polymerase-Kettenreaktion
pg	Pikogramm
pH ( <i>pondus hydrogenii</i> )	Potential des Wasserstoffs
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
R <sup>2</sup>	Bestimmtheitsmaß

rev ( <i>reverse</i> )	Rückwärts
RNA ( <i>ribonucleic acid</i> )	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	Ribosomale RNA
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOC-Medium ( <i>super optimal broth</i> )	Nährmedium für Bakterien
SS ( <i>sidescatter</i> )	Seitwärtsstreulicht
SSC ( <i>saline sodium citrate</i> )	Salzlösung Natriumcitrat
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	Tetramethylethylenediamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u.a.	unter anderem
U ( <i>unit</i> )	Einheit
v/v ( <i>volume by volume</i> )	Volumenprozent
Vgl	Vergleiche
w/v ( <i>weight by volume</i> )	Gewichtsprozent
x g	n-faches der Erdbeschleunigung

## **11 SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG**

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Ich stimme einer evtl. Überprüfung meiner Dissertation durch eine Antiplagiat-Software zu. 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.“

Gießen, den

Marie-Luise Mosbach