

Ressortforschungsberichte zum Strahlenschutz

Charakterisierung von Exosomen nach in vitro und in vivo
Bestrahlung als Marker der Strahlenexposition
- Vorhaben 3616S32260

Auftragnehmer:
Helmholtz Zentrum München

PD Dr. S. Moertl

Das Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und nukleare Sicherheit (BMU) und im Auftrag des Bundesamtes für Strahlenschutz (BfS) durchgeführt.

Dieser Band enthält einen Ergebnisbericht eines vom Bundesamt für Strahlenschutz im Rahmen der Ressortforschung des BMU (Ressortforschungsplan) in Auftrag gegebenen Untersuchungsvorhabens. Verantwortlich für den Inhalt sind allein die Autoren. Das BfS übernimmt keine Gewähr für die Richtigkeit, die Genauigkeit und Vollständigkeit der Angaben sowie die Beachtung privater Rechte Dritter. Der Auftraggeber behält sich alle Rechte vor. Insbesondere darf dieser Bericht nur mit seiner Zustimmung ganz oder teilweise vervielfältigt werden.

Der Bericht gibt die Auffassung und Meinung des Auftragnehmers wieder und muss nicht mit der des BfS übereinstimmen.

BfS-RESFOR-168/20

Bitte beziehen Sie sich beim Zitieren dieses Dokumentes immer auf folgende URN:
urn:nbn:de:0221-202011823823

Salzgitter, November 2020

Schlussbericht eFKZ: BfS AG-R – 08313 / 3616S32260

**Charakterisierung von Exosomen nach in vitro und in vivo Bestrahlung als
Marker der Strahlenexposition**

Projektleitung: PD Dr. Simone Moertl, Institut für Strahlenbiologie, Helmholtz Zentrum München

(Der Bericht gibt die Auffassung und Meinung des Auftragsnehmers wieder und muss nicht mit der Meinung der Auftraggeberin übereinstimmen.)

0. Kurzfassung

Exosomen sind eine Klasse extrazellulärer Vesikel, die von den allermeisten Zelltypen freigesetzt werden. Sie enthalten Proteine, Lipide und Nukleinsäuren. Zunächst wurden Exosomen lediglich als Instrumente zur Ausschleusung zellulärer Bestandteile gesehen. Mittlerweile ist aber auch bekannt, dass Exosomen von anderen Zellen aufgenommen werden und deren Phänotyp beeinflussen und somit ein Element der Zell-Zell Kommunikation darstellen. In einigen Tumorzelllinien wurde bereits gezeigt, dass ionisierende Strahlung die Zusammensetzung und Funktion von Exosomen verändert (AP1). Untersuchungen zum Einfluss ionisierender Strahlung auf die exosomen-vermittelte Zell-Zell Kommunikation von nicht-malignen normalen Zellen fehlen derzeit noch weitgehend.

In diesem Projekt wurden strahlen-induzierte Veränderungen in der Protein und microRNA Zusammensetzung von Exosomen aus verschiedenen nicht-malignen Zellkultur Modellsystemen identifiziert (Lymphozyten, Fibroblasten, Endothel- und Epithelzellen, AP2-AP4). Dabei bezogen sich die Proteinveränderungen sowohl auf Proteine in den Exosomen als auch auf deren Oberfläche (AP3). Unter anderem wurden auch Veränderungen in Exosomen nachgewiesen, die aus primären Lymphozyten von gesunden Spendern nach *ex vivo* Bestrahlung freigesetzt wurden. Um diese Ergebnisse *in vivo* Daten gegenüberzustellen wurden in AP5 Kandidatenproteine und microRNAs in Exosomen aus dem Blut von Strahlentherapiepatienten untersucht. Insgesamt zeigte dieses Projekt, dass exosomale microRNA und Protein Signaturen nach *in vitro* Bestrahlung der Donorzellen zelltyp- und dosis-spezifisch verändert werden. Auch nach *in vivo* Bestrahlung (Strahlentherapiepatienten) wurden Veränderungen in der exosomalen microRNA und Proteinzusammensetzung festgestellt.

Da sich Exosomen durch ihre Stabilität auszeichnen und außerdem biologische Marker beinhalten, die nicht immer in den korrespondierenden Körperflüssigkeiten vorkommen, könnten diese besonders empfindliche und spezifische diagnostische Signaturen liefern. Die hier gefundenen Veränderungen sollten in weiteren strahlen-relevanten Kollektiven validiert werden um deren Eignung als Biomarker für Strahlenexposition zu testen.

Zum weiteren Verständnis von Strahlenrisiken sollten auch potentielle funktionelle Unterschiede von Exosomen aus bestrahlten und nichtbestrahlten Zellen in einem Folgeprojekt abgeschätzt werden.

1. Bericht zu Stand von Wissenschaft und Technik (AP1)

1.1. Zusammenfassung

Im letzten Jahrzehnt wurde die Bedeutung von extrazellulären Vesikeln (EV), wie z. B. Exosomen als intrazelluläre Vehikel in der Zell-Zell Kommunikation mehr und mehr erkannt. Dies ist auf ihre Fähigkeit zum Transport von Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren zurückzuführen, wobei sie sowohl physiologische als auch pathologische Bedingungen in Empfänger und Spenderzellen beeinflussen. Da die Beladung extrazellulärer Vesikel charakteristisch für ihre Spenderzellen ist gewinnt auch ihre Erforschung als Biomarker für verschiedene Erkrankungen zunehmend an Bedeutung. Der Einfluss ionisierender Strahlung auf die Zusammensetzung und Funktion von EVs ist bisher nur wenig erforscht. Erste Ergebnisse beschreiben vielfältige Wechselwirkungen zwischen ionisierender Strahlung und Exosomen. Sowohl eine veränderte Freisetzung und Aufnahme als auch Veränderungen in der exosomalen Protein und RNA Beladung wurden gezeigt. Darüberhinaus beeinflussen Exosomen Funktionen in bestrahlten und nichtbestrahlten Exosomen-Empfängerzellen und könnten somit wichtige Komponenten in der Vermittlung von Bystander bzw. apscopalen Effekten während der Strahlenantwort darstellen.

1.2 Gliederung

1.2.1 Extrazelluläre Vesikel

1.2.2 Biogenese und interzelluläre Kommunikation

1.2.3 Exosomenkomponenten und Beladung

1.2.4 Isolierung, Charakterisierung und Qualitätskontrolle

1.2.5 Extrazelluläre Vesikel in der Strahlenantwort

1.2.6 Biomarker und diagnostisches Potential

1.2.7 Exosomen als Vehikel im Wirkstofftransfer

1.2.1 Extrazelluläre Vesikel

Die Kommunikation zwischen Zellen ist eine wesentliche Eigenschaft von mehrzelligen Organismen. Diese kann über Zell-Zell-Kontakte, Botenstoffe oder Hormone erfolgen. Neue Forschungsergebnisse zeigen, dass Zellen auch über Vesikel unterschiedlicher Größe und Herkunft kommunizieren können. Dabei unterscheidet man verschiedene Klassen von extrazellulären Vesikeln, die sich aufgrund der gemeinsamen Eigenschaft der Doppellipidmembran in ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften ähneln, sich jedoch in Größe, Zusammensetzung und Biogenese unterscheiden [1].

In Eukaryonten gibt es drei Hauptklassen von Vesikeln: i) Exosomen sind Nanovesikel (50-100nm Durchmesser), die aus Endosomen stammen und nach der Fusion multivesikulärer Körperchen (MVB) mit der Plasmamembran freigesetzt werden. ii) Mikrovesikel/Mikropartikel/Ectosomen mit einer Größe von 0,1 – 1 µm im Durchmesser werden durch Ausstülpung und Fusion der Plasmamembran produziert. iii) Apoptotische Körperchen sind mit einem Durchmesser von 0,5 – 2 µm die größten extrazellulären Vesikel. Sie werden als Membranbläschen (membrane blebs) während der Apoptose freigesetzt [1, 2].

1.2.2 Biogenese und interzelluläre Kommunikation

Exosomen sind der am meisten untersuchte Typ von extrazellulären Vesikeln. Sie werden von verschiedensten Zelltypen, wie z. B. Stamm-, Endothel- und Tumorzellen sekretiert. Außerdem werden sie in allen Körperflüssigkeiten wie Plasma, Speichel, Gallenflüssigkeit, Urin, Samenflüssigkeit, Fruchtwasser, Muttermilch und Rückenmarksflüssigkeit nachgewiesen [3]. Ihre Biogenese erfolgt über die Bildung eines Clathrin-ummantelten Vesikels, das in ein frühes Endosom aufgenommen wird. Dieses frühe Endosom reift zum multivesikulären Endosom. Letzteres kann entweder die Vesikelinhalte lysosomal abbauen oder mit der Zellmembran fusionieren und Exosomen in den Extrazellulärraum entlassen, die dann mit Empfängerzellen in Wechselwirkung treten können [1]. Eine Exosomen-vermittelte Kommunikation zwischen Zellen kann durch eine Ligand-Rezeptor-Interaktion zwischen Membranproteinen der Exosomen und Rezeptoren auf der Oberfläche von Empfängerzellen stattfinden. Darüber hinaus kann auch der Exosomeninhalt entweder durch direkte Fusion der Exosomen mit der Zellmembran oder durch aktive Aufnahme mittels Endozytose in die Empfängerzelle transferiert werden [1]. Dieser zweite Weg ermöglicht neben der Kommunikation durch

Proteine auch die Übertragung von Nukleinsäuren oder Lipiden. 2007 wurde zum ersten Mal der Exosomen-vermittelte Transfer von RNA zwischen Zellen nachgewiesen [4]. Funktionell sind extrazelluläre Vesikel wichtig für die interzelluläre Kommunikation in einer Vielzahl physiologischer und pathologischer Prozesse (z.B. Proliferation, Differenzierung, Immunsuppression, Antigenpräsentation, Gerinnung, Entzündung, Zelladhäsion, Schutz gegen intra- und extrazellulären Stress) [2, 5].

1.2.3 Exosomenkomponenten und Beladung

In Säugerzellen sind Exosomen durch eine spezifische Zusammensetzung aus Proteinen, Nukleinsäuren und Lipiden gekennzeichnet.

Proteine

Proteomstudien von Exosomen aus verschiedenen Zellkultur-Modellsystemen oder aus Körperflüssigkeiten ergaben ein breites, jedoch Zelltyp-spezifisches Spektrum von Proteinen in Exosomen. Online Datenbanken, wie z.B. Exocarta (www.microvesicles.org), EVpedia (www.evpedia.info) oder ExoCarta (www.exocarta.org), listen diese Proteine auf.

Generell sind Exosomen reich an zytosolischen, Plasma-Membran- und Zytoskelett-Proteinen. Proteine aus intrazellulären Organellen sind weniger häufig. Verschiedene dieser Proteine, wie z.B. Mitglieder des Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT) (Alix, TSG101), Hitzeschockproteine (HSP70/90) oder die als Transmembran Proteine bekannten Tetraspanine (CD63, CD81, CD9) werden auch als Exosomenmarker eingesetzt. Zusätzlich zu einem gemeinsamen Set an Proteinen beinhalten Exosomen auch Zelltyp spezifische Proteine. Beispielsweise sind Exosomen aus Tumorzellen mit Tumorantigenen beladen, die sie auf dendritische Zellen übertragen [6]. Da sich die exosomalen Zusammensetzungen von Zellen unterscheiden sind spezifische Packmechanismen unerlässlich. Beim ESCRT-abhängigen Prozess (*Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*) kontrollieren verschiedene Proteine der ESCRT-Familie und Alix die Aufnahme von ubiquitinierten Proteinen und bewirken eine Einstülpung der Zellmembran [7]. Es werden aber auch ESCRT-unabhängige, über Ceramide, Tetraspanine oder Lipid rafts regulierte Prozesse diskutiert [5, 8, 9]. Interessanterweise unterscheiden sich oft die Glykosilierungsmuster von intrazellulären bzw. exosomalen Proteinen, was auf eine Rolle von Glyco-Interaktionen bei der Beladung oder

Aufnahme von Exosomen hindeutet [10, 11].

RNA

Exosomen beinhalten eine charakteristische Auswahl an microRNAs, anderen kleinen RNAs (piRNA, snRNA, snoRNA, scaRNA, YRNA), natürlichen antisense RNAs, tRNAs, mRNAs, rRNAs, und langen nicht-kodierenden RNAs sowie Fragmenten aller dieser Spezies [2]. Da das exosomale RNA Profil oft nicht das Profil der Spenderzellen widerspiegelt und Exosomen aus verschiedenen Spenderzellen ähnliche RNA Expressionsprofile aufweisen, sind, wie auch für exosomale Proteine, spezifische Packmechanismen naheliegend [1,2]. Die Beladung von Exosomen mit microRNAs wird durch das Heterogeneous Ribonucleoprotein A2B1 (hnRNP A2B1) kontrolliert, welches ubiquitiniert wird und anschließend ein Sequenzmotiv im 3'-Bereich der microRNA (*Exomotif*, GGAG) erkennt [12]. Auch mRNAs zeigen eine selektive Anreicherung in Exosomen. Ähnlich zum *Exomotif* von microRNAs wurde hier eine Konsensus Sequenz im 3'-UTR als Erkennungssequenz für die Exosomenbeladung vorgeschlagen [13].

DNA

Der exosomale DNA Gehalt ist bisher nur sehr wenig untersucht. Jedoch wurde bereits mitochondriale DNA sowie einzel- und doppelsträngige DNA aus dem Zellkern nachgewiesen [14-16]. Exosomale DNA aus Tumorgewebe reflektiert den genetischen Status des Tumors einschließlich möglicher Amplifikationen von Onkogenen (z.B. c-Myc) [14]. Auf dieser Grundlage kann exosomale DNA, ebenso wie andere exosomale Komponenten als nicht-invasiver Biomarker für den Tumor eingesetzt werden. Eine physiologische Bedeutung exosomaler DNA ist bisher nicht bekannt.

Lipide

Exosomen bestehen aus einer Doppellipidmembran, die im Vergleich zur Plasmamembran der Zelle einen höheren Gehalt an Cholesterol, Sphingomyelin und Hexosylceramide aufweist [1, 17, 18]. Diese charakteristische Lipidzusammensetzung ist wichtig für die Bildung bzw. Freisetzung von Exosomen und trägt möglicherweise zu deren Stabilität in verschiedenen extrazellulären Umgebungen bei [19]. Neben den strukturellen Funktionen von Lipiden können auch bioaktive Lipide, wie Eicosanoide, Fettsäuren oder Cholesterol durch Exosomen zwischen Zellen transportiert werden [18]. Insgesamt werden zukünftige Lipidomstudien von

Exosomen einen wichtigen Beitrag zur Funktionsaufklärung von Exosomen liefern.

1.2.4 Isolierung und Charakterisierung und Qualitätskontrolle

Aufgrund der komplexen Zusammensetzung von Körperflüssigkeiten bzw. von Zellkulturmedien ist die Isolierung extrazellulärer Vesikel nicht trivial. Zusätzlich erschwert die geringe Größe von extrazellulären Vesikeln, die unter der Detektionsgrenze vieler Methoden liegt, die Quantifizierung nach der Aufreinigung und auch den Nachweis von möglichen Verunreinigungen. Aufgrund dieser Schwierigkeiten kann eine Kontamination exosomaler Präparationen durch andere zelluläre Vesikel nur schwer ausgeschlossen werden.

Differentielle Ultrazentrifugation ist die bei weitem am häufigsten eingesetzte Methode zur Vesikelisolierung (ca. 50% der Publikationen zwischen 2011 – 2015) [20, 21]. Typischerweise werden nacheinander folgende Beschleunigungen verwendet: 200-1500 x g zur Entfernung von Zellen, 10.000-20.000 x g zur Abtrennung größerer Vesikel (> 200nm), 100.000 – 200.000 x g zur Isolierung von Vesikeln kleiner 200nm. Der letzte Schritt kann in einem Dichtegradienten (Sucrose, Opti-Prep) durchgeführt werden, um eventuelle Verunreinigungen durch Proteine noch besser abzutrennen. Jedoch ist damit häufig eine reduzierte Ausbeute verbunden.

Modernere Methoden wie Ultrafiltration, Größenausschlusschromatografie oder Präzipitation durch Zusatz von Chemikalien ermöglichen eine schnellere Isolierung. Derzeit fehlen aber noch systematische Untersuchungen zu möglichen Verunreinigungen und Schädigung der Vesikel z.B. durch Aggregationen [21].

quantitative und qualitative Beurteilung von Exosomen

Die Morphologie von extrazellulären Vesikeln wird meist mittels Elektronenmikroskopie (EM) untersucht. Durch negative Kontrastierung mit Schwermetallen (Osmiumtetroxid, Uranylacetat) kann die relative Menge, Struktur und auch die Größe von Vesikeln visualisiert werden. Die zusätzliche Verwendung von Antikörpern ermöglicht auch den Nachweis verschiedener Markerproteine (Immuno-EM) [20].

Zwei weitere häufig verwendete Methoden zur Größenbestimmung von Vesikelpräparationen sind *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA, Malvern) und *Resistive Pulse Sensing* (qNano, IZON). Außerdem ermöglichen diese beiden Methoden eine direkte Bestimmung der Vesikelkonzentration. Die NTA-Technologie nutzt die beiden Eigenschaften Lichtstreuung und Brown'sche Bewegung, um die Größenverteilung und die Partikelkonzentration in Suspension zu ermitteln. Bei der qNano Technologie basiert die Messung der Vesikel auf Impedanzbestimmungen an Nanoporen. Beide Methoden erlauben eine Größenbestimmung von Vesikeln zwischen 50 – 1000 nm Durchmesser und eine Angabe der Vesikel-Konzentration pro Volumeneinheit [22].

Durchflusszytometrie ist für die Analyse von Vesikeln nur bedingt geeignet. Konventionelle Geräte erlauben nur eine Bestimmung von Vesikel bis zu einer Größe von minimal 500 nm im Durchmesser. Kleinere Vesikel werden nicht mehr detektiert. Alternativ können Vesikel an *Beads* gekoppelt werden und durchflusszytometrisch analysiert werden. So kann die relative Anwesenheit von Oberflächenmarker bestimmt werden, es ist aber nicht möglich Vesikel zu quantifizieren oder verschiedene Subpopulationen zu unterscheiden[20].

Western Blot kann zum Nachweis von Markerproteinen eingesetzt werden. Häufig verwendete Proteine sind: Tetraspanine (CD63, CD9, CD81), MHC Moleküle, zytosolische Proteine (TSG101, Alix) oder Zytoskelettproteine (Actin, Tubulin). Eine Quantifizierung von Vesikeln mittels Western Blot ist aufgrund von fehlenden *Housekeeping* Proteinen schwierig [20].

Verunreinigungen in exosomalen Präparationen

Zellen sekretieren zelltypspezifisch diverse Populationen extrazellulärer Vesikel deren Verteilung auch durch exogene Faktoren beeinflusst werden kann. Die geringe Größe verbunden mit dem geringen Größenunterschied verschiedener Vesikelklassen erschwert die Unterscheidung und damit eine getrennte Isolierung dieser Populationen. Trotz Fortschritts in den Isolierungsmethoden beinhalten die allermeisten Präparationen verschiedene Vesikeltypen. Neben Verunreinigungen durch andere Vesikel können auch andere Komponenten, wie Lipoproteine, Chromatin- und Proteinaggregate als Verunreinigungen in Exosomenpräparationen vorliegen [21].

1.2.5 Extrazelluläre Vesikel in der Strahlenantwort

Mehrere Studien legen eine Funktion von Exosomen in der Zellantwort auf exogene Stressoren nahe. Zunächst wurde gezeigt, dass sich die exosomale Zusammensetzung nach Stressinduktion ändert. Dies trifft besonders für exosomale RNAs und Proteine zu. So zeigte de Jong et al. eine veränderte Beladung von Exosomen aus Endothelzellen nach Hypoxie, TNFalpha oder erhöhter Zuckerkonzentration der Donorzellen [23]. Eldh et al. zeigte veränderte RNA Transkriptmengen in Exosomen nach H₂O₂ Behandlung. In Empfängerzellen haben Exosomen aus gestressten Donorzellen meist protektive, überlebensfördernde Effekte. Beispielsweise erhöhen Exosomen aus Zellen, die oxidativen Stress ausgesetzt waren, die Resistenz gegenüber oxidativen Stress in nicht-exponierten Zellen [3]. Ebenso führt Hypoxie in Brustkrebszellen zu einer erhöhten Freisetzung von Exosomen, die vermehrt microRNA miR-210 enthalten. Dies fördert das Überleben und die Invasionsfähigkeit in aufnehmenden Zellen [24].

In der zellulären Strahlenantwort gibt es fundierte Beweise für das Vorhandensein von Bystander Effekten in Zellen die keinerlei Strahlung ausgesetzt waren. Erste Studien, die strahleninduzierte Effekte in der Freisetzung, Beladung und Funktion von Exosomen beschreiben, schlagen unter anderem diese als Überträger derartiger Effekte vor (Abbildung 1). Insgesamt sind aber die Funktionen von Exosomen in der Strahlenantwort noch unzureichend analysiert.



Abbildung 1.1: Übersicht über derzeit publizierte Interaktionen zwischen Mikrovesikeln und Zellen während der Strahlenantwort

Bereits die Freisetzung von Mikrovesikeln aus Zellen in den Extrazellularraum wird durch Strahlung beeinflusst. In mehreren Tumor- und Nichttumorzellsystemen wurde gezeigt, dass ionisierende Strahlung die Freisetzung von Mikrovesikeln verstärkt [25-27]. Signifikante Unterschiede wurden meist in einem Zeitfenster zwischen 24 und 48h nach Bestrahlung gefunden. Möglicherweise ist an der gesteigerten Freisetzung das Tumorsuppressorprotein p53 beteiligt, welches sowohl durch Strahlung induziert wird als auch eine Rolle bei der Biogenese von Exosomen spielt [28]. Neben der Abgabe von Vesikeln wurde auch eine strahlen-getriggerte Aufnahme von Vesikeln in Empfängerzellen beschrieben. So zeigte Arscot et al. in verschiedenen Glioblastomzelllinien eine gesteigerte Aufnahme von Exosomen aus bestrahlten Donorzellen und darüberhinaus auch eine verstärkte Aufnahme von Exosomen in bestrahlten Empfängerzellen [25]. Eine vermehrte Aufnahme von Exosomen in bestrahlten Zellen wurde auch für Kopf/Halstumorzellen bestätigt [27]. Ein mechanistisches Modell für die verstärkte Aufnahme nach Bestrahlung lieferte Hazawa et al., indem er zeigte, dass Strahlung die Kolokalisierung von CD29 und CD81 auf der Oberfläche von mesenchymalen Stammzellen induziert. Exosomen binden anschließend spezifisch an diesen dimeren Komplex [29].

Auch die Beladung von Exosomen wird durch Strahlung beeinflusst. So zeigte Arscott et al. veränderte mRNA, miRNA and Proteinbeladungsmuster in Exosomen einer Glioblastomzelllinie nach ionisierender Bestrahlung [25]. Auch in der Kopf-Halstumorzelllinie FADU wurden zahlreiche strahleninduzierte Proteinveränderungen beschrieben [30]. Eigene Arbeiten identifizierten microRNA und Proteinveränderungen sowohl in der Kopf-Halstumorzelllinie BHY als auch in Leukozyten nach *in vitro* Bestrahlung von humanem Vollblut in einem Dosisbereich von 0,5 – 9 Gy (unveröffentlicht). Eine erste *in vivo* Studie zeigte strahlenabhängige Proteinexpressionsmuster in Exosomen aus Serum und Urin aus Mäusen nach Ganzkörperbestrahlung [31]. Eine spezifische Anreicherung von miR-21 in Exosomen, die von Fibroblasten nach Bestrahlung freigesetzt wurden, ist von Xu et al. beschrieben [32].

Auch die Funktionen von Exosomen in der Strahlenantwort werden untersucht. Dabei wurden wiederum sowohl die Effekte von Exosomen aus bestrahlten bzw. nichtbestrahlten Zellen als auch die Effekte auf bestrahlte und nichtbestrahlte Zellen analysiert. Mehrere Studien zeigen, dass die zelluläre Strahlenresistenz durch die Aufnahme von Exosomen erhöht wird. So zeigten mit 8 Gy bestrahlte mesenchymale Stammzellen eine höhere Proliferation, wenn sie

zuvor mit Exosomen behandelt wurden [29]. Ebenso fanden Baulch et al. verminderte strahleninduzierte Effekte auf die Proliferation von Glioblastomzellen, wenn zeitgleich eine Behandlung mit Exosomen stattfand [33]. Vergleichbare Effekte fand Mutschelknaus et al. in Kopf/Halstumorzellen [27]. Hier wurde ein proliferations-stimulierender Effekt von Exosomen auf nicht bestrahlte Empfängerzellen gezeigt ungeachtet, ob diese aus bestrahlten oder unbestrahlten Donorzellen isoliert wurden. Erst eine Untersuchung der klonogenen Überlebensfähigkeit zeigte ein erhöhtes Überleben, wenn Exosomen aus bestrahlten Zellen verwendet wurden, im Vergleich zu Exosomen aus unbestrahlten Donorzellen. Dies war mit einer beschleunigten Reparatur von DNA Doppelstrangbrüchen verbunden. Auch Prozesse der Zellmotilität, wie Migration und Invasion werden durch Exosomen aus bestrahlten Zellen gefördert. Beispielsweise setzen bestrahlte Glioblastomzellen Exosomen frei, die einen erhöhten Gehalt an mRNAs und Proteinen haben, welche die Migration verstärken [25]. Übereinstimmend zeigte Baulch, ebenfalls in Glioblastom, erhöhte Invasion durch Exosomen [33]. Neben einem Informationsaustausch zwischen gleichen Zelltypen wurde auch die exosomen-vermittelte Kommunikation zwischen Stroma und Tumorgewebe in der Strahlenantwort beschrieben [34]. Die Autoren zeigten hier eine exosomen-vermittelte Kommunikation zwischen Fibroblasten und Brustkrebszellen, die die Therapieresistenz gegenüber Strahlung und die Rezidivbildung erhöhen. Abweichend von den oben genannten Untersuchungen gibt es auch Studien, die eine exosomen-vermittelte reduzierte Viabilität bzw. eine erhöhte DNA Schädigung [35, 36] beschreiben. So führten Jella et al. eine reduzierte Viabilität und eine erhöhte Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies in Keratinocyten auf die Wirkung von Exosomen zurück. [26] Im Einklang dazu schlagen Al-Mayah et al. Exosomen aus bestrahlten Brustkrebszellen als Vermittler von erhöhten DNA Schädigungen vor [35, 36].

Eine Erklärung dieser unterschiedlichen Befunde ist mit dem derzeit zur Verfügung stehenden Erkenntnissen schwierig. Ein Vergleich der Versuchsbedingungen ergibt neben Unterschieden in den verwendeten Zelltypen auch unterschiedliche experimentelle Bedingungen bezüglich des Zeitpunkts der Exosomenisolierung nach Bestrahlung der Zellen. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Untersuchungen wurden die Exosomen in den später genannten Untersuchungen bereits kurz nach der Bestrahlung (1-4h gegenüber 24-72h) isoliert. Ein sehr interessanter Aspekt ist hier die Möglichkeit der Sekretion unterschiedlicher Exosomen mit

möglicherweise unterschiedlicher Beladung in verschiedenen Zeitabschnitten der Strahlenantwort.

Zusammengefasst beschreiben diese Arbeiten Exosomen als wichtige Komponenten in der Strahlenantwort. Zukünftige interessante Anwendungen von Exosomen in der Strahlenforschung könnten sowohl in der Strahlentherapie z. B. als Marker für Tumorkontrolle, Prognose oder mögliche Nebenwirkungen als auch als Biomarker zur Detektion der Strahlenexposition liegen. Für derartige Anwendungen ist jedoch ein vertieftes Verständnis der Interaktion zwischen ionisierender Strahlung und Exosomen unabdingbar. Wichtige offene Fragen sind z.B.:

- Zusammensetzung von Exosomen aus gesunden bzw. pathologischen Zellen nach Bestrahlung
- Zelltyp-, Dosis- oder Zeitabhängigkeit strahlenregulierter exosomaler Komponenten
- strahleninduzierte Veränderungen auf Exosomenoberflächen – Einfluss auf Spezifität der Aufnahme

1.2.6 Biomarker und diagnostisches Potential

Eine nicht unwesentliche Anzahl von Publikationen schlägt extrazelluläre Vesikel (meist Exosomen) für verschiedene klinische Anwendungen vor. Diese beinhalten sowohl den Einsatz von Exosomen als Biomarker zur Diagnose, Prognose und Therapieansprechen bei verschiedenen Erkrankungen (reviewed in [37]), als auch die Erforschung zukünftiger Anwendungen als Vehikel im Wirkstofftransfer (zusammengefasst in [38]).

In Studien zu exosomalen Biomarkern wurden bisher hauptsächlich RNA und Protein Moleküle als Indikatoren für pathologische Zustände herangezogen. Im Vergleich zu Biomarkern, die direkt aus Körperflüssigkeiten detektiert werden, zeigen exosomale Vesikel eine bessere Spezifität und Sensitivität, die sich aus ihrer Stabilität ergibt. Besonders RNA Moleküle sind in Exosomen vor der Degradierung durch RNasen geschützt. Als Ressourcen für die Exosomenisolierung sind leicht zugängliche Körperflüssigkeiten, wie Urin oder Speichel von besonderem Interesse. Verschiedenste Proteine wurden bereits als Biomarker für Erkrankungen einschließlich Krebs, Leber- oder Nierenerkrankungen vorgeschlagen. Ein Beispiel ist das zur Tetraspaninfamilie gehörige membranständige CD63 Protein. Dieses Protein ist in Exosomen aus dem Blutplasma von Melanompatienten höher exprimiert als in Exosomenpräparationen von gesunden Spendern [39]. Dazu passend zeigte Yoshioka et al., 2013 erhöhte CD63 Spiegel in Zellkulturüberständen verschiedener Krebszelllinien im Vergleich mit zu normalen Zellen [40]. CD81, ein weiteres Mitglied der Tetraspaninfamilie zeigte sich in Plasmaexosomen nach Hepatitis C Infektion erhöht [41]. Neben exosomalen Proteinen aus Blutplasma wurden auch aus Urin isolierte exosomale Proteine als Biomarker beschrieben. Diese wurden vorwiegend zur Diagnose von Blasen- und Nierenerkrankungen herangezogen.

Neben Proteinen sind vorallem auch microRNAs als exosomale Biomarker beschrieben. Dabei wurden meist Expressionssignaturen mehrerer microRNAs für die Diagnose von Krebserkrankungen verwendet. Als ein Beispiel für eine zentrale microRNA in diesen Signaturen ist miR-21 zu nennen. Diese als Onkogen beschriebene miRNA liegt in Exosomen von Patienten mit verschiedenen Krebsentitäten (z.B. Eierstock, Lunge, Speiseröhre oder Brust) in erhöhter Konzentration vor [42-45].

Zusätzlich zu exosomal Proteinen und RNAs wurden in einer Studie exosomale Lipide aus Urin als Biomarker für Nierenkarzinom beschrieben [46].

1.2.7 Exosomen als Vehikel im Wirkstofftransfer

Neben der Anwendung als Biomarker gibt es auch erste Ansätze Exosomen als Vehikel zum Wirkstofftransfer einzusetzen [38]. Als Vorteile werden hierbei genannt, dass Exosomen nicht immunogen und nicht mutagen wirken und über eine sehr gute Permeabilität biologischer Membranen verfügen (z.B. auch Blut-Hirn-Schranke). Trotzdem findet eine Anreicherung und schnelle Ausscheidung unmodifizierter Exosomen über Leber und Niere statt. Neueste Arbeiten versuchen dies durch Modifikationen der Exosomenoberfläche (exosome engineering) mit verschiedenen Peptiden und Liganden zu umgehen. Modifizierte Exosomen sollen eine erhöhte Halbwertszeit und eine Anreicherung im Zielgewebe in therapeutischen Konzentrationen erzielen. Derartige Exosomen können noch zusätzlich in ihrer Beladung mit therapeutisch aktiven Substanzen verändert werden. Als Methoden hierzu werden derzeit Überexpression in Donorzellen oder Elektroporation von isolierten Exosomen erprobt.

1.3 Literatur

1. Raposo G, Stoorvogel W: **Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends.** *The Journal of cell biology* 2013, **200**(4):373-383.
2. Yanez-Mo M, Siljander PR, Andreu Z, Zavec AB, Borrás FE, Buzas EI, Buzas K, Casal E, Cappello F, Carvalho J *et al*: **Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions.** *Journal of extracellular vesicles* 2015, **4**:27066.
3. Eldh M, Ekström K, Valadi H, Sjöstrand M, Olsson B, Jernas M, Lotvall J: **Exosomes communicate protective messages during oxidative stress; possible role of exosomal shuttle RNA.** *PloS one* 2010, **5**(12):e15353.
4. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lotvall JO: **Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells.** *Nature cell biology* 2007, **9**(6):654-659.
5. de Gassart A, Geminard C, Fevrier B, Raposo G, Vidal M: **Lipid raft-associated protein sorting in exosomes.** *Blood* 2003, **102**(13):4336-4344.
6. Andre F, Scharitz NE, Chaput N, Flament C, Raposo G, Amigorena S, Angevin E, Zitvogel L: **Tumor-derived exosomes: a new source of tumor rejection antigens.** *Vaccine* 2002, **20 Suppl 4**:A28-31.
7. Henne WM, Buchkovich NJ, Emr SD: **The ESCRT pathway.** *Developmental cell* 2011, **21**(1):77-91.
8. Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L, Wenzel D, Wieland F, Schwille P, Brugger B, Simons M: **Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes.** *Science (New York, NY)* 2008, **319**(5867):1244-1247.
9. Kajimoto T, Okada T, Miya S, Zhang L, Nakamura S: **Ongoing activation of sphingosine 1-phosphate receptors mediates maturation of exosomal multivesicular endosomes.** *Nature communications* 2013, **4**:2712.
10. Barres C, Blanc L, Bette-Bobillo P, Andre S, Mamoun R, Gabius HJ, Vidal M: **Galectin-5 is bound onto the surface of rat reticulocyte exosomes and modulates vesicle uptake by macrophages.** *Blood* 2010, **115**(3):696-705.
11. Batista BS, Eng WS, Pilobello KT, Hendricks-Munoz KD, Mahal LK: **Identification of a conserved glycan signature for microvesicles.** *Journal of proteome research* 2011, **10**(10):4624-4633.
12. Villarroya-Beltri C, Gutierrez-Vazquez C, Sanchez-Cabo F, Perez-Hernandez D, Vazquez J, Martin-Cofreces N, Martinez-Herrera DJ, Pascual-Montano A, Mittelbrunn M, Sanchez-Madrid F: **Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs.** *Nature communications* 2013, **4**:2980.
13. Bolukbasi MF, Mizrak A, Ozdener GB, Madlener S, Strobel T, Erkan EP, Fan JB, Breakefield XO, Saydam O: **miR-1289 and "Zipcode"-like Sequence Enrich mRNAs in Microvesicles.** *Molecular therapy Nucleic acids* 2012, **1**:e10.
14. Balaj L, Lessard R, Dai L, Cho YJ, Pomeroy SL, Breakefield XO, Skog J: **Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences.** *Nature communications* 2011, **2**:180.
15. Thakur BK, Zhang H, Becker A, Matei I, Huang Y, Costa-Silva B, Zheng Y, Hoshino A, Brazier H, Xiang J *et al*: **Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection.** *Cell research* 2014, **24**(6):766-769.
16. Waldenstrom A, Genneback N, Hellman U, Ronquist G: **Cardiomyocyte microvesicles contain DNA/RNA and convey biological messages to target cells.** *PloS one* 2012, **7**(4):e34653.
17. Choi DS, Kim DK, Kim YK, Gho YS: **Proteomics, transcriptomics and lipidomics of exosomes and ectosomes.** *Proteomics* 2013, **13**(10-11):1554-1571.
18. Record M, Carayon K, Poirot M, Silvente-Poirot S: **Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiologicals.** *Biochimica et biophysica acta* 2014, **1841**(1):108-120.

19. Smyth TJ, Redzic JS, Graner MW, Anchordoquy TJ: **Examination of the specificity of tumor cell derived exosomes with tumor cells in vitro.** *Biochimica et biophysica acta* 2014, **1838**(11):2954-2965.
20. Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A: **Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids.** In: *Current Protocols in Cell Biology*. John Wiley & Sons, Inc.; 2001.
21. Lobb RJ, Becker M, Wen SW, Wong CS, Wiegmanns AP, Leimgruber A, Moller A: **Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma.** *Journal of extracellular vesicles* 2015, **4**:27031.
22. van der Pol E, Hoekstra AG, Sturk A, Otto C, van Leeuwen TG, Nieuwland R: **Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes.** *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2010, **8**(12):2596-2607.
23. de Jong OG, Verhaar MC, Chen Y, Vader P, Gremmels H, Posthuma G, Schiffelers RM, Gucek M, van Balkom BW: **Cellular stress conditions are reflected in the protein and RNA content of endothelial cell-derived exosomes.** *Journal of extracellular vesicles* 2012, **1**.
24. King TL, Heesch CM, Clark CG, Kline DD, Hasser EM: **Hypoxia activates nucleus tractus solitarius neurons projecting to the paraventricular nucleus of the hypothalamus.** *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 2012, **302**(10):R1219-1232.
25. Arscott WT, Tandle AT, Zhao S, Shabason JE, Gordon IK, Schlaff CD, Zhang G, Tofilon PJ, Camphausen KA: **Ionizing radiation and glioblastoma exosomes: implications in tumor biology and cell migration.** *Translational oncology* 2013, **6**(6):638-648.
26. Jella KK, Rani S, O'Driscoll L, McClean B, Byrne HJ, Lyng FM: **Exosomes are involved in mediating radiation induced bystander signaling in human keratinocyte cells.** *Radiation research* 2014, **181**(2):138-145.
27. Mutschelknaus L, Peters C, Winkler K, Yentrapalli R, Heider T, Atkinson MJ, Moertl S: **Exosomes Derived from Squamous Head and Neck Cancer Promote Cell Survival after Ionizing Radiation.** *PloS one* 2016, **11**(3):e0152213.
28. Yu X, Harris SL, Levine AJ: **The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein.** *Cancer research* 2006, **66**(9):4795-4801.
29. Hazawa M, Tomiyama K, Saotome-Nakamura A, Obara C, Yasuda T, Gotoh T, Tanaka I, Yakumaru H, Ishihara H, Tajima K: **Radiation increases the cellular uptake of exosomes through CD29/CD81 complex formation.** *Biochemical and biophysical research communications* 2014, **446**(4):1165-1171.
30. Jelonek K, Wojakowska A, Marczak L, Muer A, Tinhofer-Keilholz I, Lysek-Gladysinska M, Widlak P, Pietrowska M: **Ionizing radiation affects protein composition of exosomes secreted in vitro from head and neck squamous cell carcinoma.** *Acta biochimica Polonica* 2015, **62**(2):265-272.
31. Kulkarni S, Koller A, Mani KM, Wen R, Alfieri A, Saha S, Wang J, Patel P, Bandeira N, Guha C *et al*: **Identifying Urinary and Serum Exosome Biomarkers for Radiation Exposure Using a Data Dependent Acquisition and SWATH-MS Combined Workflow.** *International journal of radiation oncology, biology, physics* 2016.
32. Xu S, Ding N, Pei H, Hu W, Wei W, Zhang X, Zhou G, Wang J: **MIR-21 is involved in radiation-induced bystander effects.** *RNA biology* 2014, **11**(9):1161-1170.
33. Baulch JE, Geidzinski E, Tran KK, Yu L, Zhou YH, Limoli CL: **Irradiation of primary human gliomas triggers dynamic and aggressive survival responses involving microvesicle signaling.** *Environmental and molecular mutagenesis* 2016, **57**(5):405-415.
34. Boelens MC, Wu TJ, Nabat BY, Xu B, Qiu Y, Yoon T, Azzam DJ, Twyman-Saint Victor C, Wiemann BZ, Ishwaran H *et al*: **Exosome transfer from stromal to breast cancer cells regulates therapy resistance pathways.** *Cell* 2014, **159**(3):499-513.
35. Al-Mayah A, Bright S, Chapman K, Irons S, Luo P, Carter D, Goodwin E, Kadhim M: **The non-targeted effects of radiation are perpetuated by exosomes.** *Mutation research* 2015, **772**:38-45.

36. Al-Mayah AH, Irons SL, Pink RC, Carter DR, Kadhim MA: **Possible role of exosomes containing RNA in mediating nontargeted effect of ionizing radiation.** *Radiation research* 2012, **177**(5):539-545.
37. Lin J, Li J, Huang B, Liu J, Chen X, Chen XM, Xu YM, Huang LF, Wang XZ: **Exosomes: novel biomarkers for clinical diagnosis.** *TheScientificWorldJournal* 2015, **2015**:657086.
38. Xitong D, Xiaorong Z: **Targeted therapeutic delivery using engineered exosomes and its applications in cardiovascular diseases.** *Gene* 2016, **575**(2 Pt 2):377-384.
39. Logozzi M, De Milito A, Lugini L, Borghi M, Calabro L, Spada M, Perdicchio M, Marino ML, Federici C, Iessi E *et al*: **High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients.** *PloS one* 2009, **4**(4):e5219.
40. Yoshioka Y, Konishi Y, Kosaka N, Katsuda T, Kato T, Ochiya T: **Comparative marker analysis of extracellular vesicles in different human cancer types.** *Journal of extracellular vesicles* 2013, **2**.
41. Welker MW, Reichert D, Susser S, Sarrazin C, Martinez Y, Herrmann E, Zeuzem S, Piiper A, Kronenberger B: **Soluble serum CD81 is elevated in patients with chronic hepatitis C and correlates with alanine aminotransferase serum activity.** *PloS one* 2012, **7**(2):e30796.
42. Corcoran C, Friel AM, Duffy MJ, Crown J, O'Driscoll L: **Intracellular and extracellular microRNAs in breast cancer.** *Clinical chemistry* 2011, **57**(1):18-32.
43. Rabinowits G, Gercel-Taylor C, Day JM, Taylor DD, Kloecker GH: **Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer.** *Clinical lung cancer* 2009, **10**(1):42-46.
44. Tanaka Y, Kamohara H, Kinoshita K, Kurashige J, Ishimoto T, Iwatsuki M, Watanabe M, Baba H: **Clinical impact of serum exosomal microRNA-21 as a clinical biomarker in human esophageal squamous cell carcinoma.** *Cancer* 2013, **119**(6):1159-1167.
45. Taylor DD, Gercel-Taylor C: **MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer.** *Gynecologic oncology* 2008, **110**(1):13-21.
46. Del Boccio P, Raimondo F, Pieragostino D, Morosi L, Cozzi G, Sacchetta P, Magni F, Pitto M, Urbani A: **A hyphenated microLC-Q-TOF-MS platform for exosomal lipidomics investigations: application to RCC urinary exosomes.** *Electrophoresis* 2012, **33**(4):689-696.

2. Charakterisierung des Proteoms von Exosomen

2.1 Aufgabenstellung AP2

Zur Identifizierung von exosomalen Proteinen als Strahlenexpositionsmarker werden Proteomanalysen von Exosomen aus vier verschiedenen humanen Zellsystemen (Fibroblasten, Epithelzellen, Endothelzellen, Leukozyten) durchgeführt. Anschließend werden ausgewählte Proteine mittels Immuno-Blot validiert.

Fragestellungen:

- Induziert ionisierende Strahlung Proteomveränderungen in Exosomen?
- Gibt es Dosis-abhängige Änderungen?
- Sind die Änderungen zelltyp-spezifisch?

2.1 Hintergrund

Exosomen sind ein Typ extrazellulärer Vesikel deren Bedeutung in der Zell-Zell Kommunikation mehr und mehr erkannt wird. Neben Nukleinsäuren und Lipiden sind Proteine wesentliche Bestandteile von Exosomen, die durch diese zwischen Zellen transportiert werden (Yanez-Mo et al. 2015). Einige Studien charakterisierten bereits die Proteinbeladung von Exosomen aus verschiedenen Zelltypen und auch stress-induzierte Veränderungen sind bereits beschrieben (de Jong et al. 2012). In wie weit ionisierende Strahlung das exosomale Proteom beeinflusst ist jedoch bisher wenig untersucht, erst wenige Studien beschreiben derartige Veränderungen in Tumorzellen (Arscott et al. 2013, Jelonek et al. 2015). Arbeiten über strahleninduzierte Veränderungen in Exosomen aus gesunden Zellen wurden erst in einer Studie gezeigt (Yentrapalli et al. 2017).

2.2 Durchführung

2.2.1 Isolierung von Exosomen

Zur Isolierung von Exosomen aus 1BR.3, MCF10A und HCAEC Zelllinien wurden pro Dosis etwa 10×10^6 Zellen in Flaschen (175 cm^2) ausgesät und für 48 h bei 37°C und 5 % CO_2 kultiviert. Es wurden folgende Medien verwendet:

Tabelle 2.1: Medien und Zusätze zur Kultivierung der Zellsysteme

	Zelltyp	Medium	Zusätze
1BR.3	Fibroblasten	DMEM low Glucose (+	15% HyClone Serum 1 ng/ml FGF 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Insulin
MCF10A	Epithelzellen	DMEM/F12 (L-Glutamin + HEPES)	5% Horse Serum 0,5 mg/ml Hydrocortison 100 ng/ml Cholera Toxin 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Insulin
HCAEC	Endothelzellen	MesoEndo Cell growth medium Kit (Cell Applications)	
MNC	primäre Leukozyten	Immunzellmedium (Bio&Sell)	5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PHA

Anschließend wurde das Medium durch exosomen-freies Medium ersetzt und die Zellen wurden mit 0,1, 2 und 6 Gy bestrahlt. Nach einer weiteren Inkubation von 24 h wurden die Exosomen durch serielle Zentrifugation aus dem konditionierten Zellkulturüberstand isoliert. Zunächst wurden Zellen und Zellfragmente durch Zentrifugation bei 10.000 g (30 min, 4°C) entfernt. Anschließend wurde das Medium zur Entfernung größerer Vesikel filtriert ($0,22 \mu\text{m}$ Porengröße). Das Filtrat wurde dann bei 100.000 g für 75 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das Exosomenpellet in PBS resuspendiert. Nach

einer weiteren Zentrifugation (100,000 g, 75 min, 4 °C) wurde das Pellet in PBS aufgenommen und bei -20°C gelagert.

Für die Isolierung von Exosomen aus Leukozyten wurden pro Dosis 50 ml frisches Vollblut bestrahlt und unmittelbar danach die Leukozyten mittels Ficoll-Gradient isoliert. Anschließend wurden die isolierten Zellen für 24 h in exosomen-freiem Zellkulturmedium inkubiert.

2.2.2 Quantitative Proteomanalyse

Proteine wurden durch Zugabe von 20 µl Lyse-Puffer II (25 mM Tris pH 7.5, 120 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% PSMF, 1 mM NOV, 1 mM Leupeptin) zu 40 µl Exosomen-Suspension (isoliert aus 1.5×10^7 Zellen) aus Exosomen freigesetzt. Dazu wurden die Proben 4 h auf Eis unter wiederholtem Mischen inkubiert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration mittels BCA-Technologie ermittelt (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific).

Probenvorbereitung, LC-MS/MS Messung, markierungsfreie quantitative Analyse und Datenbank-Suchen wurden wie kürzlich beschrieben durchgeführt (Yentrapalli, 2017). Zusammengefasst wurden 5 µg Protein mittels filter-assistierter Probenvorbereitung (FASP) verdaut und dann durch LC-MS/MS Messung an einem LTQ OrbitrapXL (Thermo Fisher Scientific), verbunden mit einem Ultimate3000 Nano High-performance Flüssig-Chromatographie-System (Dionex), gemessen. Zur Identifizierung der Peptide wurde eine Sequenzhomologie von mindestens 89.5% festgesetzt und Ladungen $< +2$ und $> +7$ wurden ausgeschlossen. Die Mascot Suchmaschine (Matrix Science, version 2.5.0) mit der Ensembl Human Datenbank (version 83, 31236148 residues, 83462 sequences) wurde zur Identifizierung eingesetzt.

2.2.3 Quantifizierung spezifischer Proteine

Die Quantifizierung spezifischer exosomaler Proteine erfolgte mittels Western Blot. Dazu wurden Exosomen analog zu den Proteomanalysen lysiert und der Proteingehalt der Lysate wurde mittels BCA bestimmt. Anschließend wurden 2 µg exosomale Proteine nach einem Standard Western Blot Protokoll analysiert. Folgende Antikörper wurden verwendet: Anti-ALIX (#2171, Cell Signaling), anti-TSG101 (GTX70255, GeneTex), anti-GAPDH (sc-47724, SantaCruz), anti-Calnexin (sc11397, SantaCruz), VIM (ab92547, Abcam), ITIH4 (ab118283, Abcam), VWF (sc-53466, Santa Cruz), EIF3A (#2538, Cell Signaling), LGALS3 (sc-32790, Santa

Cruz), LMAN (ab137625, Abcam). Als sekundäre Antikörper dienten Meerrettich-Peroxidase konjugierte Antikörper (anti-rabbit: sc-2004 und anti-mouse: sc-2005) und die Detektion erfolgte mittels Chemolumineszenz (Amersham ECL reaction kit, GE Healthcare).

2.2.4 Partikelanalyse

Die Größenverteilung und Konzentration isolierter Exosomen wurde im Nanosight LM10 Mikroskop (Malvern) analysiert. 2 µl Exosomenpräparationen wurden im Verhältnis 1:600 mit H₂O verdünnt um eine ungefähre Konzentration von 15 bis 50 Partikel pro Bildausschnitt für die Bewegungsanalyse zu haben. Jede Probe wurde dreimal für jeweils 30 s gemessen.

2.3 Ergebnisse

2.3.1 Qualitätskontrolle isolierter Exosomen

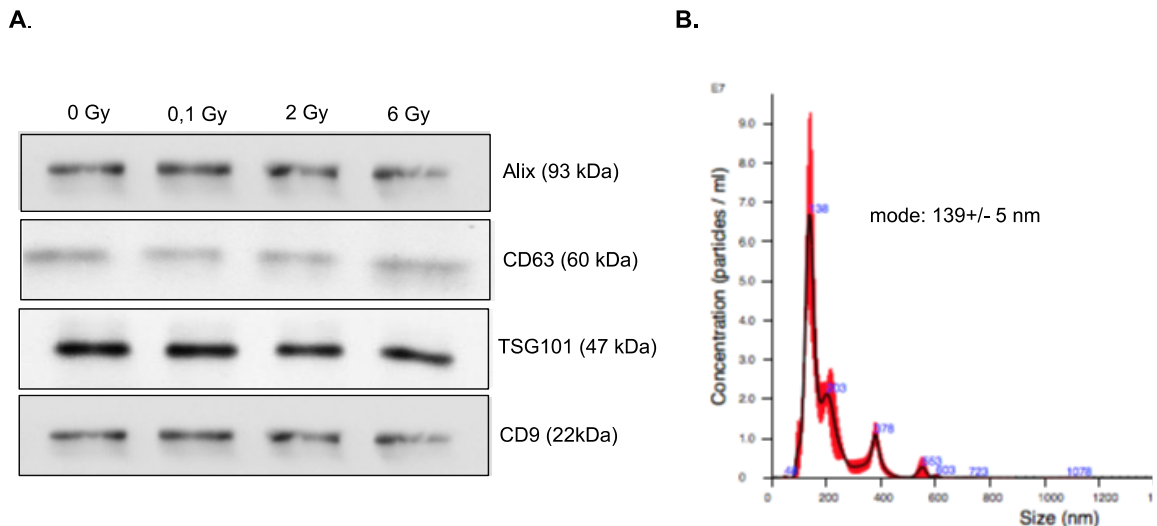


Abbildung 2.1: Qualitätskontrolle von Exosomenpräparationen. A. Nachweis exosomaler Markerproteine mittels Western Blot in Exosomen aus der Fibroblastenzelllinie 1BR.3 B. Größen- und Konzentrationsbestimmung von Exosomen aus unbestrahlten 1BR.3 Zellen mittels Nanosight.

Zur Qualitätskontrolle der Exosomenpräparationen wurden vor den Proteomanalysen ein Nachweis publizierter und allgemein anerkannter Exosomenmarkerproteine (Alix, CD63, CD9) erfolgreich durchgeführt (siehe Tabelle 2.2). Um zelluläre Verunreinigungen auszuschließen wurden die Proben auf Calnexin (CNX) untersucht. Interessanterweise konnte das Protein TSG101 (Tumor susceptibility gene 101), welches in vielen Veröffentlichungen als typisches exosomales Protein aufgeführt ist, nicht in der Zelllinie HCAEC und MCF10A nachgewiesen werden. Für alle isolierten Vesikel wurde ein Durchmesser zwischen 120 – 165 nm bestimmt. Zwischen den unterschiedlichen Zelltypen waren keine signifikanten Unterschiede (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 2.2: Nachweis typischer Exosomenmarkerproteine in Exosomenpräparationen aus den genannten Zellsystemen

	Alix	CD63	TSG101	CD9	CNX
leucocytes	✓	✓	✓	✓	-
1BR3	✓	✓	✓	✓	-
HCAEC	✓	✓	-	✓	-
MCF-10A	✓	✓	-	✓	-

2.3.2 Quantifizierung der Exosomenausbeute

Zur Quantifizierung von Exosomen wurde zum einen die Menge an isolierten exosomalen Proteinen (Tabelle 2.3) und zum anderen die Konzentration der isolierten Vesikel bestimmt (Tabelle 2.4). Die Analysen ergaben eine Ausbeute zwischen 0,4 bis 6,5 µg an Protein pro 10⁶ Donorzellen. Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Zelltypen. So konnten aus Fibroblasten und Endothelzellen deutlich höhere Ausbeuten erzielt werden als aus Epithelzellen und Leukozyten. Darüberhinaus ergab die Proteinbestimmung für alle vier Zellsysteme eine erhöhte Proteinkonzentration nach Bestrahlung der Donorzellen mit 6 Gy. Eine erhöhte Proteinmenge konnte auch nach einer Dosis von 2 Gy zumindest in drei Zelltypen MCF-10A, 1BR.3 und HCAEC nachgewiesen werden, wogegen 0,1 Gy in keinem der untersuchten Systeme zu einem Anstieg führte. Neben der Proteinkonzentration wurde auch die Partikelkonzentration der Isolate gemessen. Auch hier ist eine Tendenz zu höheren Konzentrationen erkennbar, jedoch konnten aufgrund der höheren Messvarianz dieser Methode kein statistisch signifikanter Anstieg festgestellt werden.

Tabelle 2.3: Ausbeute (in µg) an exosomalen Proteinen pro 10⁶ Donorzellen (* p< 0,05). Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten.

	0 Gy	0,1 Gy	2 Gy	6 Gy
MCF10A	0,7	0,8	1,7	1,4
MCF10A	0,4 ± 0,03	0,54 ± 0,07	0,7 ± 0,05*	1,6 ± 0,07*

1BR3	$2,2 \pm 0,1$	$2,4 \pm 0,2$	$6,5 \pm 0,4^*$	$6,1 \pm 0,2^*$
HCAEC	$3,8 \pm 0,08$	$3,9 \pm 0,1$	$5,2 \pm 0,21^*$	$6,4 \pm 0,14^*$
leucocytes	$0,7 \pm 0,04$	$0,7 \pm 0,05$	$0,8 \pm 0,06$	$1,1 \pm 0,05^*$

Tabelle 2.4: Konzentration (Partikel/ml) von Exosomen mittels Nanosight

	0 Gy	0, 1 Gy	2 Gy	6 Gy
MCF10A	5×10^8	5×10^8	5×10^8	7×10^8
1BR3	3×10^9	5×10^9	6×10^9	8×10^9
HCAEC	3×10^9	3×10^9	5×10^9	7×10^9
leucocytes	7×10^8	6×10^8	1×10^9	1×10^9

2.3.3 Proteomanalyse von Exosomen

2.3.3.1 Proteinzusammensetzung von Exosomen

Für die Proteomanalyse von Exosomen wurden exosomale Lysate mit einem Proteingehalt von 5 µg mittels Massenspektrometrie untersucht. Als identifiziert wurden Proteine gewertet, die mit zwei oder mehr spezifischen Peptiden und einem Confidence Score von > 20 bestimmt wurden. Tabelle 2.5 zeigt die Anzahl von Proteinen, die bei den genannten Dosen in jeweils allen drei biologischen Replikaten nachgewiesen wurden. Eine Übersicht aller Proteine befindet sich in den angefügten Dateien: 1BR.3_proteins, MCF10-A_proteins, HCAEC_proteins und leucocytes_proteins.

Tabelle 2.5: Anzahl identifizierter Proteine

	0 Gy	0, 1 Gy	2 Gy	6 Gy
MCF10A	138	137	137	137
1BR3	341	342	342	342
HCAEC	432	431	431	431
leucocytes	605	599	606	596

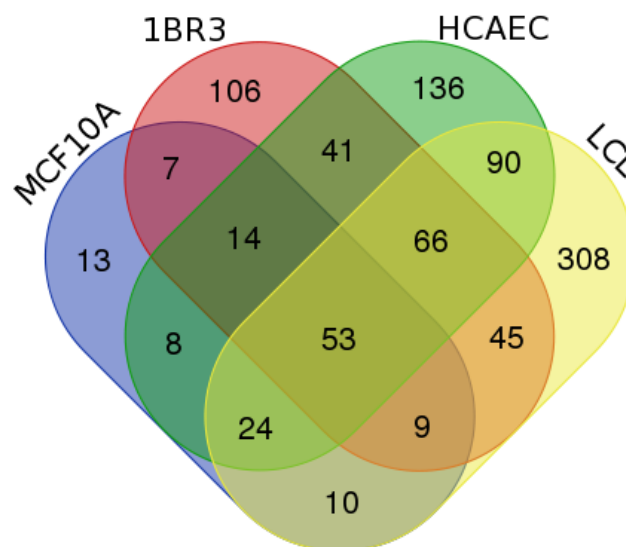


Abbildung 2.2: Proteomvergleich von Exosomen aus verschiedenen Zellsystemen ohne Bestrahlung.

Ein Vergleich der insgesamt in Exosomen identifizierten Proteine zeigte deutliche Unterschiede zwischen den Zellsystemen. In Exosomen aus MCF10A Epithelzellen wurden lediglich 138 Proteine identifiziert wogegen in Exosomen aus Leukozyten über 600 Proteine gefunden wurden. Ein erheblicher Anteil dieser Proteine ist spezifisch für die individuellen Zelltypen (10 % in MCF10A; 50 % in Leukozyten). Es gibt aber auch Proteine (40 % in MCF10A; 8 % in Leukozyten) die in Exosomen aller Zelltypen gefunden wurden (Abbildung 2.2).

2.3.3.2 Strahleninduzierte Veränderungen exosomaler Proteine

Zur Untersuchung potentieller Unterschiede im Proteom von Exosomen aus unbestrahlten und bestrahlten Zellen wurden die gesamten Proteomdaten eines Zelltyps einer Principal Component Analyse (PCA) unterzogen. Die Clusterbildung der Kontrollen bzw. der bestrahlten Proben ist in Abbildung 2.3 dargestellt. Dabei ist für alle vier Zellsysteme die Separierung zwischen Exosomen aus bestrahlten und unbestrahlten Zellen ersichtlich. Für die Zellsysteme MCF10A, 1BR.3 und LCL zeigt sich die Dosis-abhängigkeit der Proteinzusammensetzung im mit der Dosis-zunehmenden Abstand der Cluster von den Kontrollen. Allein die Linie HCAEC zeigt keine Korrelation zwischen Cluster Abstand und Dosis, wobei aber auch eine klare Separation von bestrahlten und unbestrahlten Proben vorliegt.

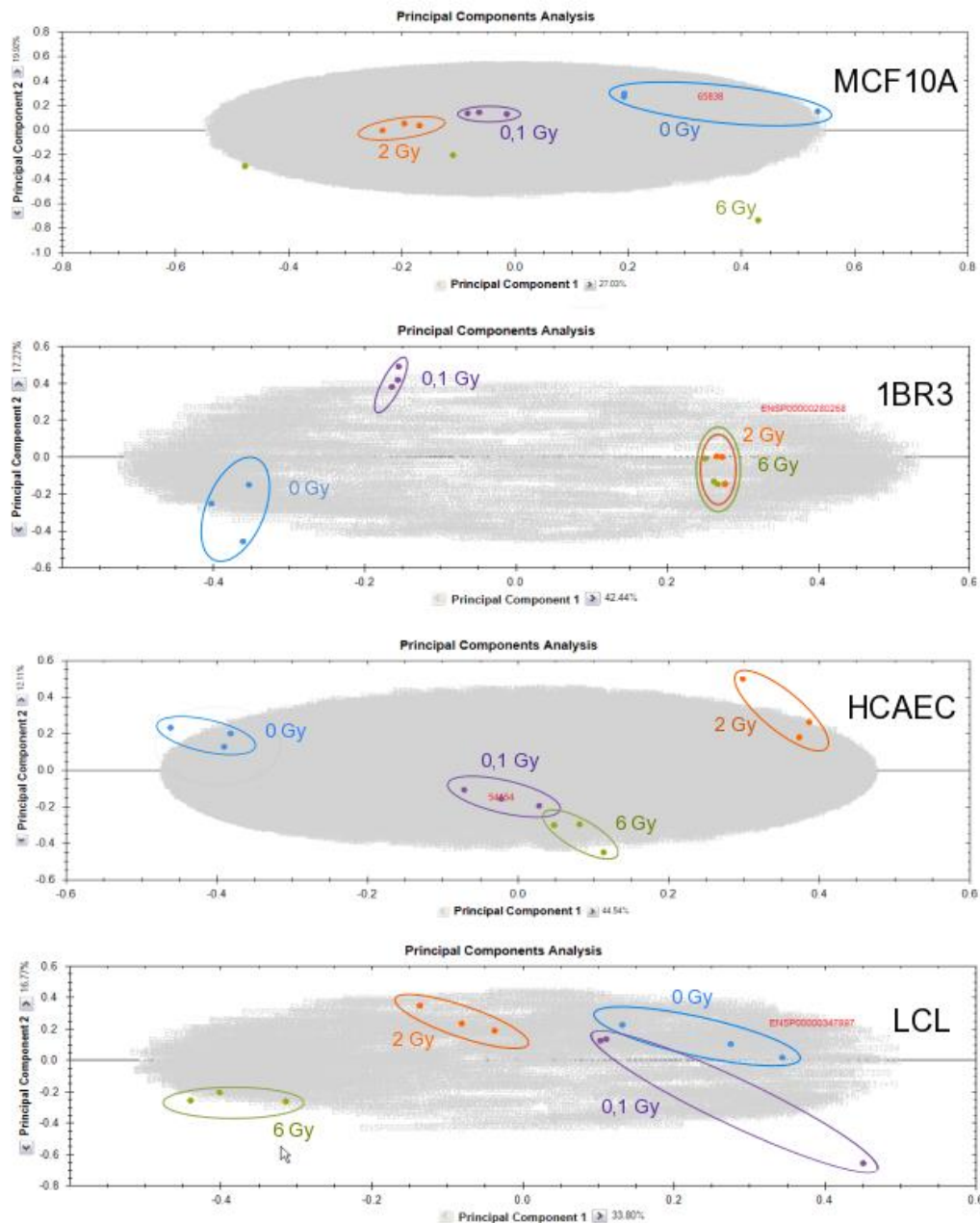


Abbildung 2.3: Principal component analysis (PCA) basierten auf den gesamten Proteomdaten aller bestrahlten und bestrahlten Proben. In der PCA wurden alle Elemente mit Ladungen zwischen +2 und +7 verwendet, was zu folgenden PC1 und PC2 führte: MCF10A (PC1 27,0 %, PC2 19,9%), 1BR.3 (PC1 42,4 %, PC2 17,2%), HCAEC (PC1 44,5%, PC2 12,1%), LCL (PC1 33,8 %, PC2 16,8 %)

Zur Identifizierung signifikant veränderter Proteine wurden FDR-korrigierte p-Werte (q-Wert) aus drei biologischen Replikaten berechnet. Proteine, die mit ≥ 2 spezifischen (unique) Peptiden identifiziert, und einer ≤ 0.5 bzw. ≥ 1.3 fachen Regulation und einem q-Wert von < 0.05 gefunden wurden, wurden als statistisch signifikant reguliert betrachtet. Der Vergleich

von Exosomen aus unbestrahlten Zellen und Zellen, die bestrahlt wurden, ergab für alle vier untersuchten Zellsysteme, dass ionisierende Strahlung die Proteinzusammensetzung von Exosomen verändert. Dies traf für alle drei verwendeten Dosen (0,1; 2 und 6 Gy) zu. Die in Abbildung 2.4 gezeigten Venn-Diagramme geben einen Überblick über die Anzahl der strahlenregulierten Proteine

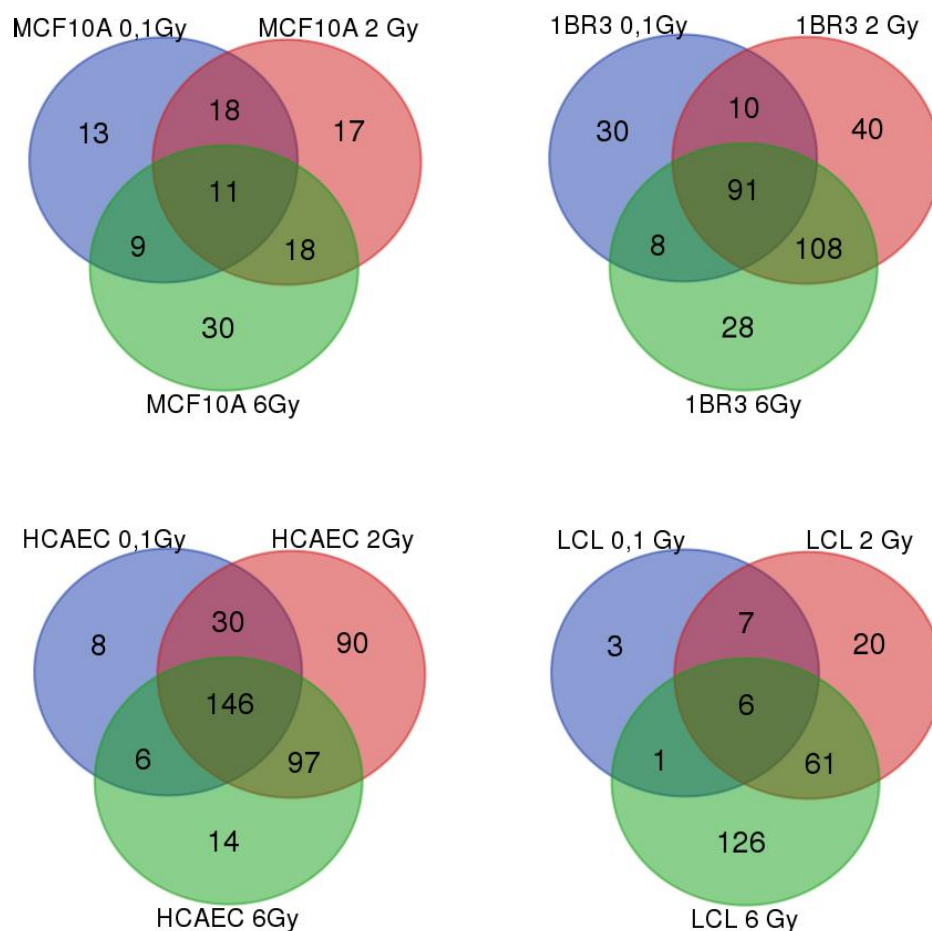


Abbildung 2.4: Venn Diagramme strahlenregulierter exosomaler Proteine. Gezeigt ist die Anzahl der regulierten (up and down) Proteine nach Bestrahlung der Donorzellen mit 0,1, 2 und 6 Gy. (LCL = Leukozyten).

Zu beobachten war, dass sich die regulierten Proteine aus generell strahlen-regulierten (bei allen Dosen) Proteinen und dosis-abhängig regulierten zusammensetzten. Darüberhinaus steigt in allen Zellsystem die Anzahl der regulierten Proteine mit der Dosis an. Eine Übersicht aller regulierten Proteine befindet sich in den angefügten Dateien: 1BR.3_proteins, MCF10-A_proteins, HCAEC_proteins und leucocytes_proteins.

Tabelle 2.6: Anzahl der nach Bestrahlung hoch (↑) bzw. herunterregulierten (↓) Proteine

	0, 1 Gy	2 Gy	6 Gy
MCF10A	21↑, 30↓	43↑, 21↓	48↑, 20↓
1BR3	41↑, 154↓	107↑, 119↓	107↑, 142↓
HCAEC	54↑, 133↓	119↑, 241↓	82↑, 178↓
leucocytes	14↑, 3↓	75↑, 19↓	159↑, 35↓

2.3.3.3 Zelltyp übergreifende Regulation von Proteinen

Besonders hinsichtlich der Entwicklung von Strahlenbiomarkern sind zell-typ unabhängige strahlenregulierte Proteine von besonderem Interesse. Zur Identifizierung solcher Proteine wurde, ungeachtet der Dosis, die Schnittmenge aller regulierten Proteine gebildet (Abbildung 2.5).

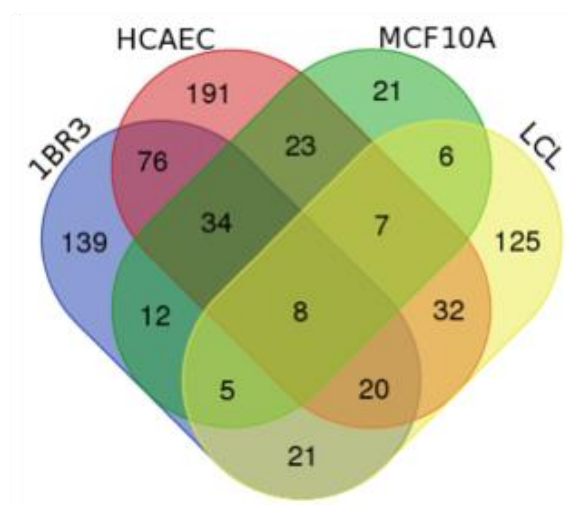


Abbildung 2.5: Venn Diagramm zur Darstellung zelltyp-übergreifender strahleninduzierter Proteinveränderungen. Gezeigt ist die Anzahl der regulierten Proteine (alle Dosen).

Insgesamt wurden acht Proteine gefunden die in allen Zelltypen mindestens bei einer Dosis reguliert waren. Jedoch wurde für kein einziges Protein eine konstante Regulation (hoch oder herunter) gefunden, alle acht Proteine zeigten je nach Zelltyp eine Hoch- oder Herunterregulation. Dagegen waren diese zelltypspezifischen Regulationen im untersuchten Dosisbereich konstant (Tabelle 2.7). Eine erste Betrachtung der Proteinfunktionen ergab ein breites Spektrum an Funktionen. Lediglich die gewöhnliche Lokalisation der Proteine deutet auf eine besondere Rolle von Membranproteinen unter den regulierten Proteinen hin (Tabelle 2.8).

Tabelle 2.7: Strahleninduzierte Regulation von Proteinen, die in allen Zelltypen verändert waren (n-fache Veränderungen)

	1BR3	HCAEC	MCF-10A	LCL	1BR3	HCAEC	MCF-10A	LCL	1BR3	HCAEC	MCF-10A	LCL
	0,1 Gy	0,1 Gy	0,1 Gy	0,1 Gy	2 Gy	2 Gy	2 Gy	2 Gy	6 Gy	6 Gy	6 Gy	6 Gy
HP	1,1	1,7	1,3	0,6	2,6	1,5	1,5	0,5	3	0,9	2	0,3
ANPEP	0,6	1,1	0,9	0,9	0,5	0,5	1,5	1,6	0,5	1,5	1,4	2
ATP1A1	0,9	1,1	1,2	1,1	0,6	0,9	1,9	1	0,8	1,3	2,4	1,4
HIST1H4F	0,5	2,4	0,7	0,7	0,8	2,1	1	0,9	0,6	1,3	2,7	1,6
TGM1	0,8	12,2	0,6	1	0,3	23,7	0,6	0,3	0,1	15,9	0,5	0,4
MHY9	1,3	0,9	0,6	1,4	1,5	0,5	0,8	1,4	1,4	0,8	0,9	1,2
VCP	0,6	0,5	1,3	0,8	1	0,8	1,4	1,4	1	0,8	2,2	2,3
MVP	0,4	0,8	1	1,4	0,3	0,5	1,3	1,5	0,4	0,8	1,2	1,2

Tabelle 2.8: Funktion und Lokalisation zelltyp-übergreifend strahlenregulierter Proteine

protein		localization	function
HP	haptoglobin	extracellular	antioxidative, acute phase response
ANPEP	Alanyl aminopeptidase	membrane	signalling, differentiation
ATP1A1	ATPase Na ⁺ /K ⁺ Transporting Subunit Alpha 1	membrane, extracellular	ion transport, cytoskeletal signaling
HIST1H4F	Histone H4	nucleus, extracellular	DNA, RNA binding protein
TGM1	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase K	cytosol, extracellular, membrane	cell cycle, proliferation, differentiation
MHY9	myosin 9	cytoskeleton, mebrane, extracellular	RNA binding, motor activity
VCP	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	endoplasmatic reticulum, exosomes	ubiquitination
MVP	Major vault protein	many compartments, including membrane	signalling, kinase activity

2.3.3.4 Proteine mit Tendenz zur Hoch- und Herunterregulation

Zur Identifizierung von Proteinen, bei denen ein Trend im Ausmaß der Regulation über den Dosisbereich hinweg vorliegt, wurde der Jonckheere - Terpstra Test angewendet (Dosisabhängigkeit). Ziel war es signifikante „up- bzw. „down-trending“ Proteine als Kandidaten für Biomarker zu finden. Als p-Wert wurde ein cut-off von 0,001 gesetzt. Eine Übersicht aller signifikant identifizierten Proteine befindet sich im Anhang (Trending_proteins). Abbildung 2.6 zeigt ausgewählte Beispiele aller vier Zellsysteme.

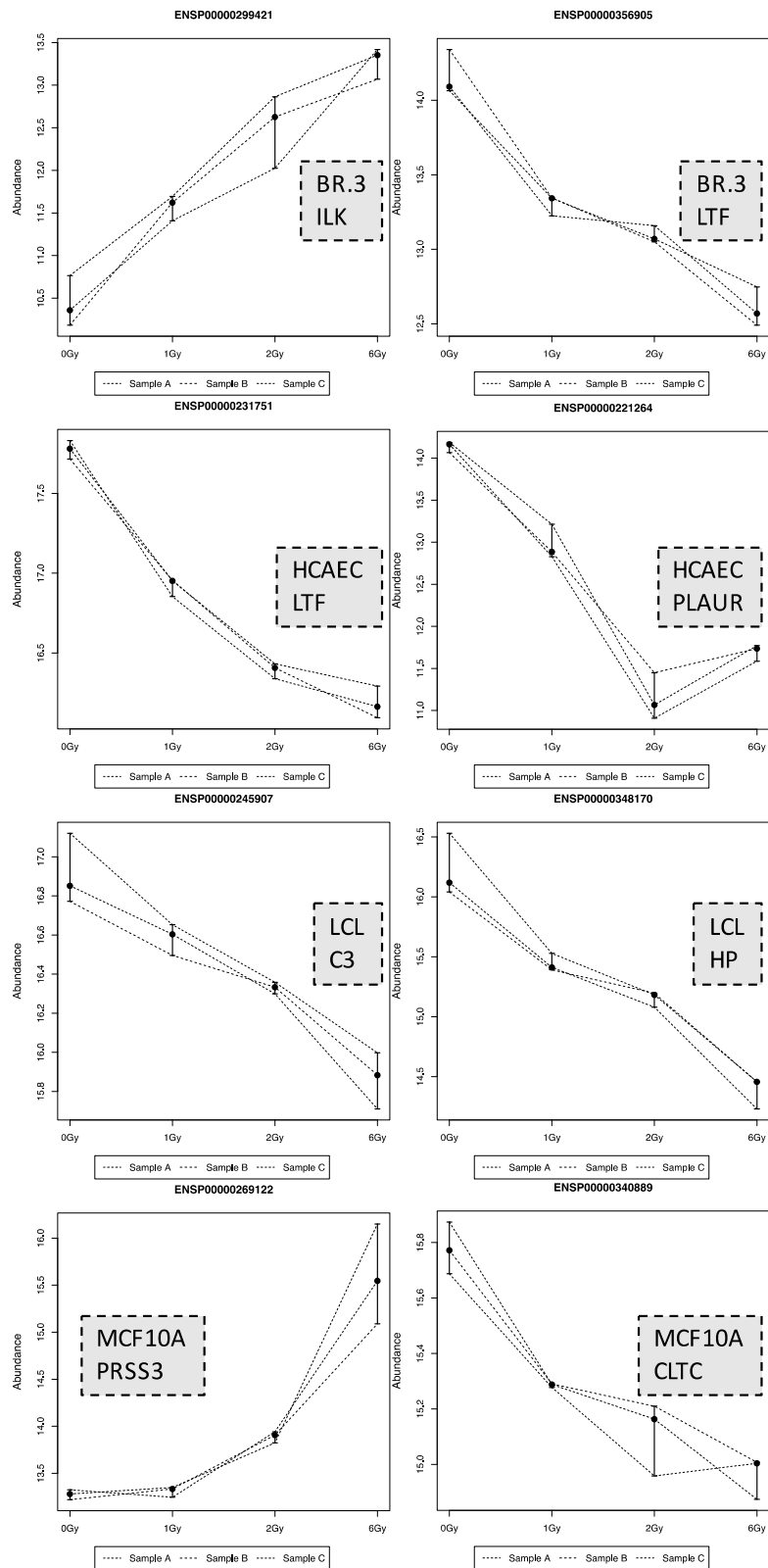


Abbildung 2.6: Dosisabhängige Regulation ausgewählter exosomaler Proteine. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert der Expression aus den drei biologischen Replikaten (Sample A, B, C) mit Standardabweichung (Dosisangabe 1 Gy steht für 0,1 Gy).

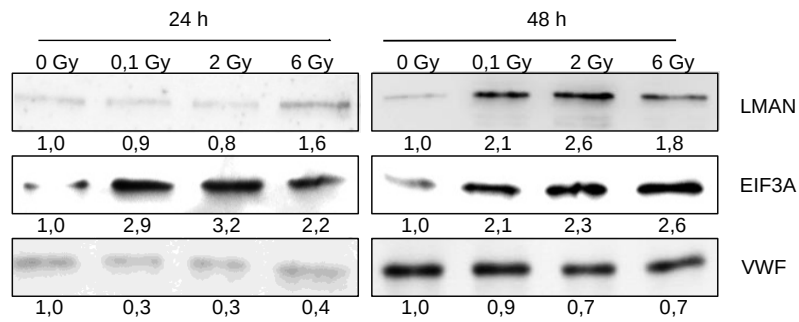
2.3.3.5 Validierung strahlenregulierter exosomaler Proteine

Aus den in 2.3.3.2 identifizierten strahlen-regulierten Proteinen wurden pro Zelltyp drei für eine weitere Validierung im Western Blot ausgewählt (Tabelle 2.9). Die Kriterien für die Auswahl waren (i) Expressionsniveau (ii) Grad der Regulation (iii) Regulation bei verschiedenen Dosen. Zusätzlich zur Validierung der Proteomdaten (24 h nach Bestrahlung), wurden auch Exosomenpräparationen, die nach 12 und 48 h nach Bestrahlung isoliert wurden, analysiert. Ein reproduzierbarer Nachweis der Proteine konnte an den 24 und 48 h nach Bestrahlung gewonnenen Isolaten, durchgeführt werden (Abbildung 2.5). Alle Kandidatenproteine konnten auch im Immunoblot der nach 24 h isolierten Proben erfolgreich nachgewiesen und die zuvor massenspektroskopisch ermittelten Regulationen konnten zumindest tendenziell für alle gezeigten Proteine bestätigt werden. Auch in nach 48h isolierten Exosomen war die zum früheren Zeitpunkt gefundene Regulation weiterhin sichtbar. 12h nach Behandlung gewonnene Exosomenisolate zeigten keinen reproduzierbaren Nachweis von Proteinen. Es ist davon auszugehen, dass die zu diesem Zeitpunkt akkumulierte Menge an Exosomen für einen Nachweis der Proteine mittels Immunoblot nicht ausreichte.

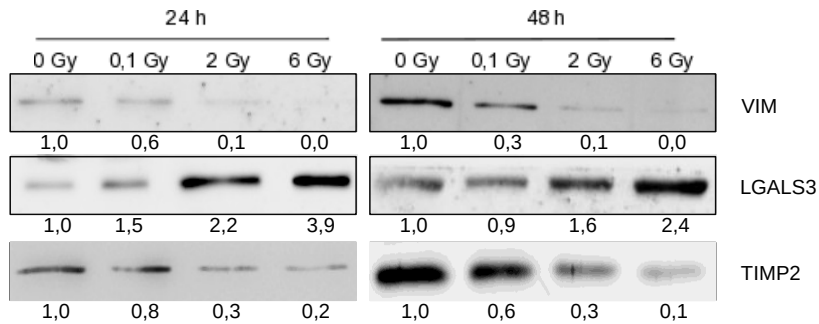
Tabelle 2.9: Kandidatenproteine zur Validierung mittels Immunoblot zusammen mit massenspektroskopisch bestimmten strahleninduzierten Expressionsveränderungen.

LCL	0,1 Gy	2 Gy	6 Gy	1BR.3	0,1 Gy	2 Gy	6 Gy
LMAN	10,0	7,3	8,4	Timp2	0,5	0,4	0,3
EIF3A	2,4	2,3	1,7	LGALS3	0,8	2,6	2,9
VWF	0,4	0,5	0,4	VIM	0,5	0,7	0,6

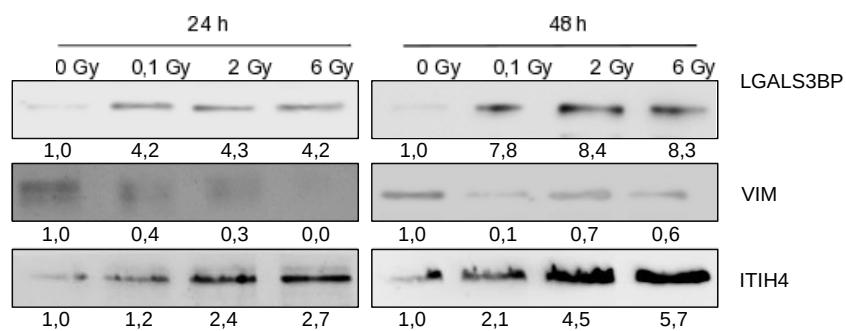
HCAEC	0,1 Gy	2 Gy	6 Gy	MCF10A	0,1 Gy	2 Gy	6 Gy
LGALS3	1,0	0,9	0,7	ITIH4	1,8	3,1	3,4
VIM	1,5	1,6	1,6	LGALS3	2,0	2,0	2,0
VWF	0,4	0,2	0,3	VIM	0,1	0,1	0,1



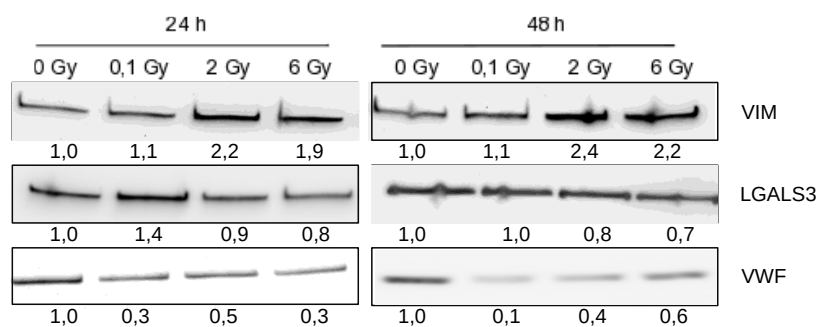
LEUCOS



1BR3



MCF10A



HCAEC

Abbildung 2.7: Validierung ausgewählter Proteine der Proteomanalysen. Gezeigt sind Western Blot von Exosomen aus den genannten vier Zellsystemen mit und ohne Bestrahlung der Donorzellen. Die Exosomen wurden 24 bzw. 48 h nach Bestrahlung isoliert. Unter den Blot ist jeweils die n-fache Veränderung zur unbestrahlten Kontrolle für jeden Zeitwert angegeben. Die Normalisierung erfolgte auf die detektierte Gesamtproteinmenge (Ponceau-Rot Färbung).

2.3.3.6 Zelltyp-übergreifende Proteomanalyse

Als weiteren Ansatz zur Untersuchung von potentiellen Proteomveränderungen in Exosomen nach Bestrahlung der Donorzellen wurde nach Unterschieden in Proteinen gesucht, die in allen Zelltypen in Exosomen nachgewiesen wurden. Um eine statistisch relevante Anzahl an Proteinen zu erhalten wurden in diesem Ansatz alle identifizierten Proteine (einschließlich Identifikationen mit einem spezifischen Peptid) einbezogen.

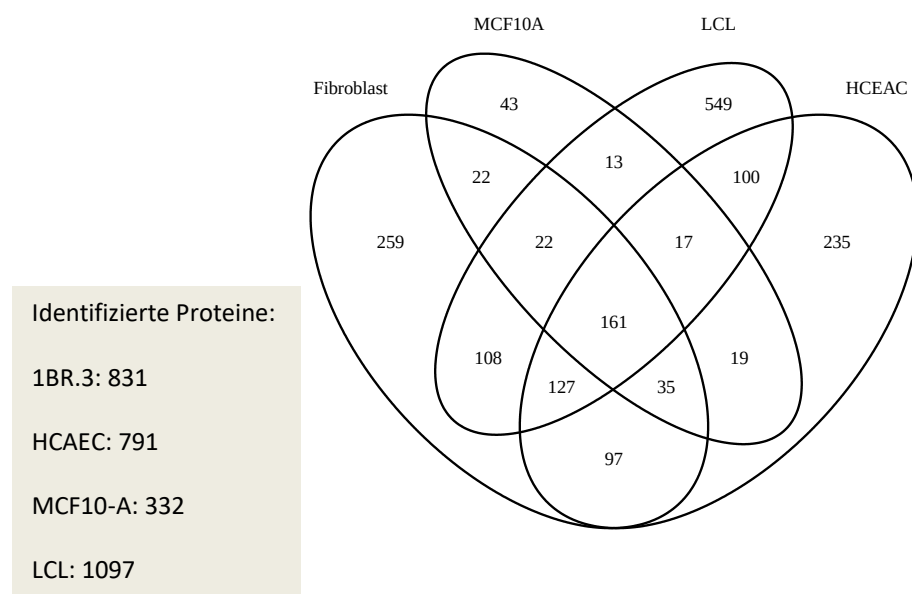
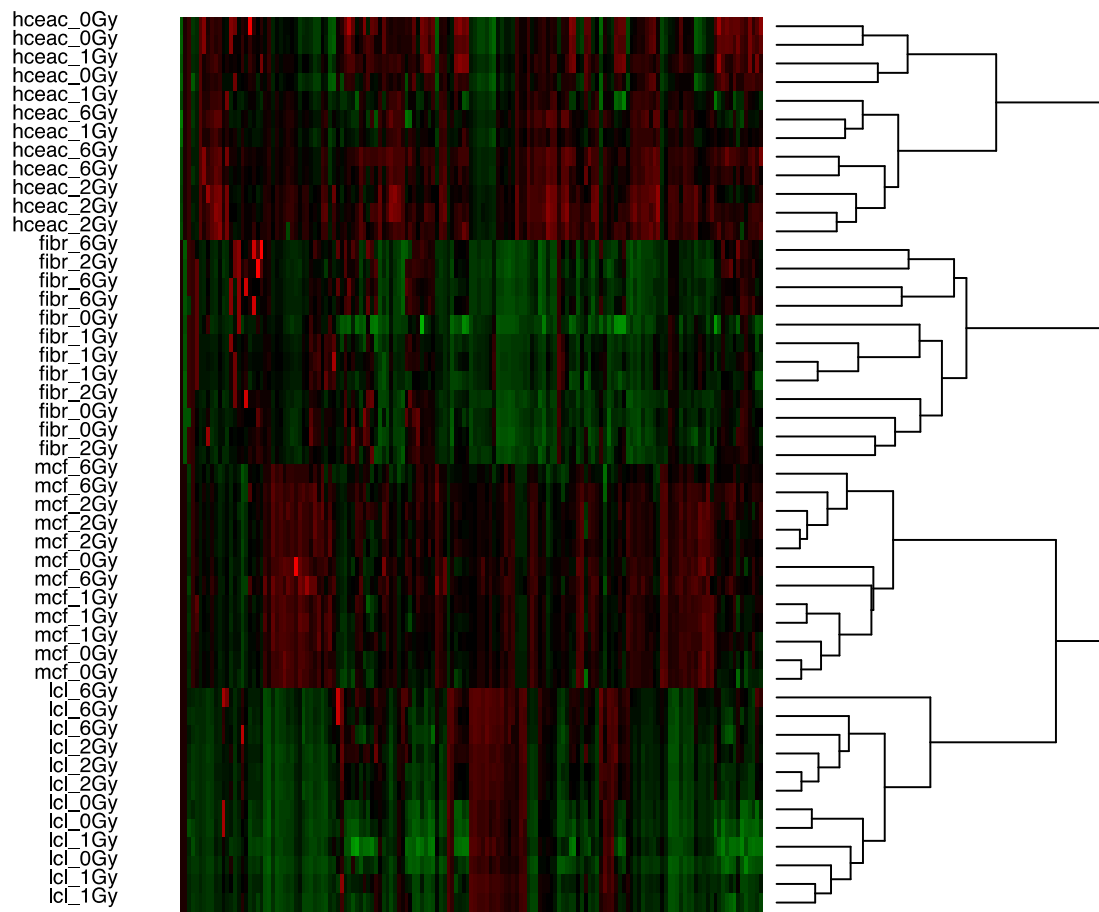


Abbildung 2.8: Venn Diagramm aller identifizierten Proteine (≥ 1 spezifisches Peptid) der vier Zellsysteme 1BR.3, MCF10-A, HCAEC und primärer Leukozyten (LCL).

Wie auch in der vorangegangenen Analyse (siehe 4.3) entspricht die Anzahl gemeinsamer Proteine mit 161 zwischen 15 und 45 % des gesamten Exosomenproteomes. Anhand der Expression dieses „Kernsets“ an exosomalen Proteinen wurde dann eine Clusteranalyse durchgeführt, wobei die Berechnung des *Similarity index* nach (Frank et al. 2008) erfolgte (Abbildung 2.9). Sowohl die Clusteranalyse als auch die berechneten *Similarity Scores* zeigte die dominante Rolle der gewebsspezifischen Unterschiede zwischen den Proben, die Clusterbildung von bestrahlten und unbestrahlten Proben ist nachrangig. Wobei aber bis auf wenige Ausnahmen auch mit diesem Proteinset eine Differenzierung zwischen den hohen Dosen (2 und 6 Gy) und den niedriger bzw. unbestrahlten Proben gelingt.



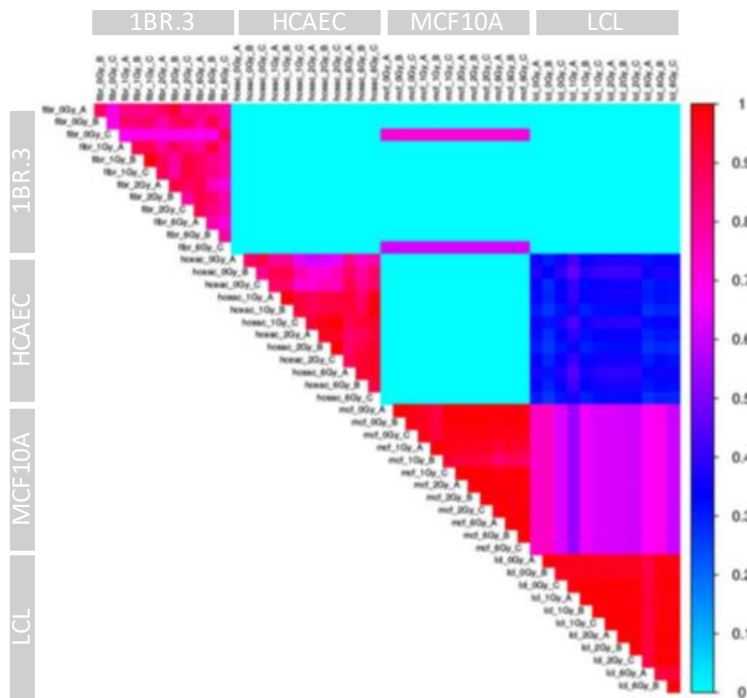


Abbildung 2.9: Zelltypübergreifende Analyse exosomaler Proteine. Heatmap der Expression aller in den vier Zelltypen nachgewiesenen Proteine (oben). Similarity Scores zwischen den einzelnen Proben (unten).

2.4. Zusammenfassung

Die molekulare Zusammensetzung von Exosomen zeigt sich charakteristisch für verschiedenen pathologischen Bedingungen (Nilsson 2009) und zahlreiche Studien schlagen Exosomen als attraktive Biomarker mit diagnostischen Potential in verschiedenen Erkrankungen vor (Al-Nedawi et al. 2009, De Toro et al. 2015). In dieser Studie zeigen wir, dass ionisierende Strahlung Veränderungen in der Proteomzusammensetzung von Exosomen aus verschiedenen gesunden Spenderzellen induziert. Diese Veränderungen waren meist zelltypspezifisch, nur acht Proteine wurden in allen Zellsystemen als strahlenreguliert gefunden.

Interessanterweise konnte für einige Proteine eine Dosis-abhängige Regulation gefunden werden, was diese als Kandidaten in der Biodosimetrie nahelegt.

Die in dieser Studie identifizierten strahlen-regulierte Proteine sollten unter weiteren experimentellen Bedingungen untersucht werden um deren zeit- und dosis-abhängige Regulation detaillierter aufzuklären. Besonders die Daten der *ex vivo* Bestrahlung von Vollblut ermutigen zu weiteren Projekten in denen das Potential exosomaler Proteine in der Biodosimetrie analysiert wird.

Der Transfer von Proteinen durch Exosomen ist von physiologischer Bedeutung und Proteine aus Exosomen werden in Empfängerzellen internalisiert. Besonders Tumorzellen machen von diesem Kommunikationsweg Gebrauch (Al-Nedawi, et al. 2009). Die in dieser Studie gefunden Daten eröffnen die interessante Frage nach den Funktionen exosomaler Proteine in der Strahlenantwort von gesunden, nicht malignen Zellen.

2.5 Literatur

Al-Nedawi K, Meehan B, Rak J. 2009. Microvesicles: messengers and mediators of tumor progression. Cell cycle. Jul 1;8:2014-2018. Epub 2009/06/19.

Arscott WT, Tandle AT, Zhao S, Shabason JE, Gordon IK, Schlaff CD, Zhang G, Tofilon PJ, Camphausen KA. 2013. Ionizing radiation and glioblastoma exosomes: implications in tumor biology and cell migration. Translational oncology. Dec 1;6:638-648.

de Jong OG, Verhaar MC, Chen Y, Vader P, Gremmels H, Posthuma G, Schiffelers RM, Gucek M, van Balkom BW. 2012. Cellular stress conditions are reflected in the protein and RNA content of endothelial cell-derived exosomes. Journal of extracellular vesicles.1.

De Toro J, Herschlik L, Waldner C, Mongini C. 2015. Emerging roles of exosomes in normal and pathological conditions: new insights for diagnosis and therapeutic applications. Front Immunol.6:203. Epub 2015/05/23.

Frank AM, Bandeira N, Shen Z, Tanner S, Briggs SP, Smith RD, Pevzner PA. 2008. Clustering millions of tandem mass spectra. *Journal of proteome research*. Jan;7:113-122. Epub 2007/12/11.

Jelonek K, Wojakowska A, Marczak L, Muer A, Tinhofer-Keilholz I, Lysek-Gladysinska M, Widlak P, Pietrowska M. 2015. Ionizing radiation affects protein composition of exosomes secreted in vitro from head and neck squamous cell carcinoma. *Acta biochimica Polonica*.62:265-272.

Yanez-Mo M, Siljander PR, Andreu Z, Zavec AB, Borrás FE, Buzas EI, Buzas K, Casal E, Cappello F, Carvalho J, et al. 2015. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of extracellular vesicles*.4:27066.

Yentrapalli R, Merl-Pham J, Azimzadeh O, Mutschelknaus L, Peters C, Hauck SM, Atkinson MJ, Tapio S, Moertl S. 2017. Quantitative changes in the protein and miRNA cargo of plasma exosome-like vesicles after exposure to ionizing radiation. *International journal of radiation biology*. Jun;93:569-580. Epub 2017/03/08.

3. Charakterisierung der Oberflächenproteine von Exosomen

3.1 Aufgabenstellung AP3

In diesem Arbeitspaket soll ein potentieller Einfluss von ionisierender Strahlung auf die Expression ausgewählter Proteine auf der Oberfläche von Exosomen untersucht werden.

Fragestellungen:

- Induziert ionisierende Strahlung Proteinveränderungen auf der Oberfläche von Exosomen?
- Gibt es Dosis-abhängige Änderungen?
- Sind die Änderungen zelltyp-spezifisch?

3.2 Hintergrund

Exosomen sind ein Typ extrazellulärer Vesikel deren Bedeutung in der Zell-Zell Kommunikation mehr und mehr erkannt wird. Neben Nukleinsäuren und Lipiden sind Proteine, die sich sowohl im Inneren von Exosomen als auch auf deren Oberflächen befinden wesentliche Bestandteile (Yanez-Mo et al. 2015). Einige Studien charakterisierten bereits die Proteinbeladung von Exosomen aus verschiedenen Zelltypen und auch stress-induzierte Veränderungen sind bereits beschrieben (de Jong et al. 2012). Erste wenige Studien beschreiben durch ionisierende Strahlung induzierte Veränderungen (Arscott et al. 2013, Jelonek et al. 2015, Yentrapalli et al. 2017, Mutschelknaus et al. 2017). Ob sich diese veränderten Proteine auf der Oberfläche von Exosomen oder in deren Inneren befinden, wurde bisher nicht untersucht. Exosomale Oberflächenproteine sind aus zwei Gründen von besonderem Interesse: Zum einen können zelluläre Oberflächenproteine durch Exosomen entsorgt werden, zum anderen kann durch die Wechselwirkung exosomaler Oberflächenproteine mit der Zelloberfläche die Aufnahme oder die Induktion von Signalkaskaden in Empfängerzellen verändert werden (De Toro et al., 2015; Al-Nedawi et al. 2009).

3.3 Durchführung

3.3.1 Isolierung von Exosomen

Zur Isolierung von Exosomen aus 1BR.3, MCF10A und HCAEC Zelllinien wurden pro Dosis etwa 10×10^6 Zellen in Flaschen (175 cm^2) ausgesät und für 48 h bei 37°C und 5 % CO_2 kultiviert. Es wurden folgende Medien verwendet:

Tabelle 3.1: Medien und Zusätze zur Kultivierung der Zellsysteme

	Zelltyp	Medium	Zusätze
1BR.3	Fibroblasten	DMEM low Glucose (+	15% HyClone Serum 1 ng/ml FGF 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Insulin
MCF10A	Epithelzellen	DMEM/F12 (L-Glutamin + HEPES)	5% Horse Serum 0,5 mg/ml Hydrocortison 100 ng/ml Cholera Toxin 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Insulin
HCAEC	Endothelzellen	MesoEndo Cell growth medium Kit (Cell Applications)	
MNC	primäre Leukozyten	Immunzellmedium (Bio&Sell)	5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PHA

Anschließend wurde das Medium durch exosomen-freies Medium ersetzt und die Zellen wurden mit 0,1, 2 und 6 Gy bestrahlt. Nach einer weiteren Inkubation von 24 h wurden die Exosomen durch serielle Zentrifugation aus dem konditionierten Zellkulturüberstand isoliert. Zunächst wurden Zellen und Zellfragmente durch Zentrifugation bei 10.000 g (30 min, 4°C) entfernt. Anschließend wurde das Medium zur Entfernung größerer Vesikel filtriert ($0,22 \mu\text{m}$ Porengröße). Das Filtrat wurde dann bei 100.000 g für 75 min bei 4°C zentrifugiert. Der

Überstand wurde vorsichtig entfernt und das Exosomenpellet in PBS resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (100,000 g, 75 min, 4 °C) wurde das Pellet in PBS aufgenommen und bei -20°C gelagert.

Für die Isolierung von Exosomen aus Leukozyten wurden pro Dosis 50 ml frisches Vollblut bestrahlt und unmittelbar danach die Leukozyten mittels Ficoll-Gradient isoliert. Anschließend wurden die isolierten Zellen für 24 h in exosomen-freiem Zellkulturmedium inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte die Isolierung der Exosomen nach dem oben beschriebenen Protokoll.

3.3.2 Partikelanalyse

Die Größenverteilung und Konzentration isolierter Exosomen wurde im Nanosight LM10 Mikroskop (Malvern) analysiert. 2 µl Exosomenpräparationen wurden im Verhältnis 1:600 mit H₂O verdünnt um eine ungefähre Konzentration von 15 bis 50 Partikel pro Bildausschnitt für die Bewegungsanalyse zu haben. Jede Probe wurde dreimal für jeweils 30 s gemessen.

3.3.3 Bestimmung exosomaler Oberflächenproteine

Da Exosomen einen kleinen Durchmesser haben, können sie von Standard-FACS-Geräten nicht direkt detektiert werden. Deshalb wurden die Exosomen zunächst an Latex Beads gekoppelt und dann erfolgte die immunologische Detektion der Oberflächenproteine. Exosomensuspensionen (0,2-10 µl, 5×10^6 Partikel pro Ansatz) wurden mit 10 µl Latex Beads (Aldehyde/Sulfate latex beads, 4 % w/v 4 µm, Life Technologies) für 1h bei Raumtemperatur im Rotator inkubiert und anschließend mit PBS auf 100µl aufgefüllt. Es folgte eine weitere Inkubation für 12 h bei 4 °C.

Anschließend wurden vorsichtig 110 µl 1M Glycin hinzu pipettiert und 30 min bei 4°C inkubiert. Dieser Schritt wurde durchgeführt um aktivierte Oberflächen an den Beads zu blockieren. Es folgten zwei Waschschrte, wobei die Beads durch eine 3-minütige Zentrifugation bei 4.000rpm pelletiert und dann jeweils in 500µl PBS/ 0.5 % BSA resuspendiert wurden.

Danach wurden die Beads-gekoppelten Exosomen in 100 µl PBS/ 0.5 % BSA aufgenommen. 10 µl der gekoppelten Exosomen wurden mit 50 µl primären Antikörper (1:40 verdünnt in PBS/ 0.5 % BSA) für 2 h bei 4°C inkubiert. Die Suspensionen wurden erneut zweimal mit 500 µl PBS/ 0.5 % BSA gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe von 50 µl sekundärem Antikörper (1:40 verdünnt in PBS/ 0.5 % BSA) und eine Inkubation von 1 h bei 4°C. Abschließend wurden die Proben nochmals zweimal mit 500 µl PBS/ 0.5 % BSA gewaschen, zentrifugiert (3 min, 4°C, 4.000 rpm) und in 500 µl PBS/ 0.5 % BSA aufgenommen. Die Proben wurden in FACS-Röhrchen überführt und am Durchflusszytometer gemessen. Folgende Antikörper wurden verwendet: ITIH4 (ab118283, Abcam), LGALS3BP (sc-374541, Santa Cruz), CD63 (sc-15363, Santa Cruz), CD9 (sc-13118, Santa Cruz), MVP (sc-23916, Santa Cruz), Alexa Fluor-488 goat-anti-mouse (A11029, Life Technologies), Alexa Fluor-488 goat-anti-rabbit (A11008, Life Technologies) und donkey-anti-goat-Cy3 (#705-165-143, Jackson Lab).

3.3.4 Auswahl zu untersuchender Oberflächenproteine

Die massenspektrometrischen Proteomanalysen der Exosomen aus den vier Zelltypen (Fibroblasten, Leukozyten, Endothel- und Epithelzellen) identifizierten eine hohe Anzahl potentiell membranständiger Exosomenproteine. Aus diesen Listen wurden dann Proteine zur Oberflächenanalyse ausgewählt, die in mehreren Zelltypen eine strahlen-induzierte Regulation zeigten und deren Regulation auch mittels Western Blot bestätigt werden konnte. Außerdem wurde CD63 als validiertes exosomales Oberflächenprotein als Kontrolle bestimmt. Folgende Proteine wurden für die Untersuchung der Oberflächenexpression ausgewählt:

ITIH4 (inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain family member 4): ITIH-4 gehört zur Familie der Inter-alpha Trypsin Inhibitoren, die hauptsächlich extrazellulär lokalisiert sind. Funktionell ist die ITIH-Familie an *acute phase response* Reaktionen und an der Modulierung der extrazellulären Matrix beteiligt. ITIH-4 liegt dereguliert im Plasma von Blasen-, Brust- und Eierstockkrebspatienten vor. Besonders die Verteilung der fragmentierten Formen (85 und 35 kDa) im Verhältnis zum vollständigen Protein (120 kDa) eignete sich als Biomarker für verschiedene Krebsarten. Das Protein wurde bereits in Exosomen aus verschiedenen Zelltypen

nachgewiesen, dessen Membranständigkeit ist jedoch nicht abschließend geklärt (Lu et al., PlosOne (2014)).

MVP (major vault protein): Das MVP Protein ist Hauptbestandteil des Vault-Komplexes. Vaults sind Ribonukleoproteinkomplexe, die nach derzeitigem Wissensstand für den Transport von Molekülen zwischen Kern, Zytoplasma und Plasmamembran wichtig sind. Durch diese Funktion beeinflusst MVP wichtige zelluläre *Signalling Pathways* (MAP Kinase, JAK/STAT, PI3K/Akt) und unterstützt die zelluläre Stressresistenz (Berger et al., 2009). Interessanterweise wurde kürzlich die Beteiligung von MVP an der Beladung von Exosomen mit microRNAs und Proteinen beschrieben (Yun Teng et al., 2017). Die Lokalisation von MVP in Exosomen und in der Plasmamembran ist bereits bekannt.

LGALS3BP (Galectin-3-binding protein): Das Galectin-3-Bindeprotein ist ein glykolisiertes sekretiertes Protein, welches in verschiedenen Krebsformen hochreguliert ist. Funktionell ist LGALS3BP an der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion und somit an der Zelladhäsion bzw. Metastasenbildung beteiligt. Außerdem wurde eine Beteiligung an der Immunantwort beschrieben (Läubli et al., 2014). Eine Lokalisation auf der Exosomenoberfläche ist bereits beschrieben (Castillio et al., 2018).

CD9 und CD63: CD9 und CD63 sind etablierte oberflächenständige Exosomenmarkerproteine aus der Gruppe der Tetraspanine. Beide Proteine sind an verschiedenen Prozessen der Zellmotilität und Adhäsion sowie an der Suppression der Apoptose beteiligt. In der Zelle befindet sich CD63 und CD9 auf der Zellmembran, in Endosomen- Lysosomenmembranen. Außerhalb von Zellen kommt es in Exosomen vor (Termini and Gilette, 2017).

Tabelle 3.2: Übersicht über die mittels Massenspektrometrie detektierte Mengen ausgewählter Proteine und deren strahlen-induzierte Regulation. In Spalte 1 ist die Spenderzelllinie und die eingesetzte Dosis angegeben. Der Wert bei 0 Gy gibt die mittlere Abundanz des Proteins an. Die Werte bei 0,1, 2 und 6 Gy zeigen die n-fache Veränderung im Vergleich zu den 0 Gy Proben. n.d. nicht detektiert.

Spalte1	CD9	CD63	LGALS3BP	MVP	ITIH4
1BR3_0Gy	1800000	41000000	13000000	124000000	5500000
1BR3_0,1Gy	0,6	0,9	0,8	0,4	0,9
1BR3_2 Gy	0,4	1,4	2,6	0,3	0,7
1BR3_6 Gy	0,4	1,5	2,9	0,4	0,5
HCAEC_0 Gy	34000000	2600000	146000000	4400000	n.d.
HCAEC_0,1Gy	0,8	1	1	0,8	
HCAEC_2Gy	0,7	0,8	0,9	0,5	
HCAEC_6Gy	0,8	1	0,7	0,8	
MCF10A_0Gy	24000000	4500000	17000000	490000	130000
MCF10A_0,1Gy	0,8	0,7	2	1	1,8
MCF10A_2Gy	1,2	0,9	1,8	1,3	3,1
MCF10A_6Gy	1,3	0,7	2,1	1,2	3,2
LCL_0Gy	9500000	33000000	5200000	73000000	29000000
LCL_0,1Gy	0,8	1	0,8	1,3	0,6
LCL_2Gy	0,9	0,9	0,9	1,6	0,5
LCL_6Gy	0,9	0,9	0,9	1,2	0,4

in fett: signifikante Veränderungen (Student T-Test, $p < 0,05$)

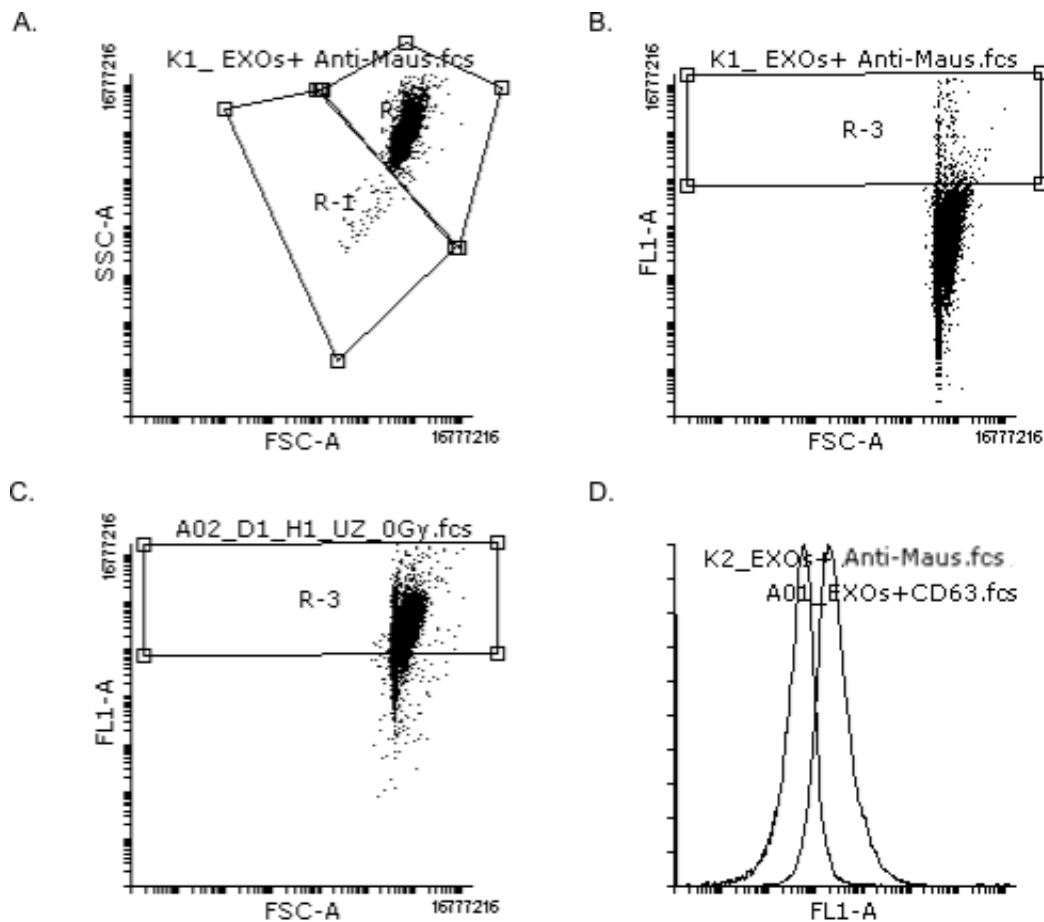


Abbildung 3.1: FACS Analyse bead-gekoppelter Exosomen. (A) Größe (FSC) und Granularität (SSC) von Latex-Beads nach Kopplung mit Exosomen aus 1BR.3 (B) Fluoreszenzintensität (FL1-A) von Beads-gekoppelten Exosomen nach Färbung mit anti-Maus-Alexa-488 Antikörper (Gate R-2 aus (A)) (C) Fluoreszenzintensität (FL1-A) von Beads-gekoppelten Exosomen nach Färbung mit anti-CD63 und anti-Maus- Alexa-488 Antikörper (D) Überlagerung der Histogramme der Fluoreszenzverteilung aller sich in Gate R-2 exosomen-gekoppelter Beads. Gezeigt ist die Fluoreszenzverteilung von Antikörper-gefärbten (anti-CD63 und anti-Maus-Alexa-488 bzw. kontrollgefärbten (anti-Maus-Alexa-488) Beads.

Abbildung 3.1 zeigt exemplarisch für das Protein CD63 den Ablauf der FACS Auswertung zum Nachweis und zur Quantifizierung exosomaler Oberflächenproteine. Zunächst erfolgt die Bestimmung der Größe und Granularität der exosomen-gekoppelten Latex Beads. Aus dieser Analyse wird die Hauptpopulation (Gate R-2) zur Bestimmung der Fluoreszenz verwendet (Fig.3.1A). Der Mittelwert der Fluoreszenz von Antikörper-gefärbten und Kontroll-gefärbten Beads wird als Maß für die Oberflächenexpression genommen. Die positive Detektion von CD63 auf der Exosomenoberfläche ist durch die erhöhte Fluoreszenz dieser Beads ersichtlich. Für den Nachweis eines Proteins auf der Oberfläche von Exosomen wird ein n-facher Anstieg der mittleren Fluoreszenz von mindestens 20 im Vergleich zu den Kontroll-gefärbten Beads festgesetzt.

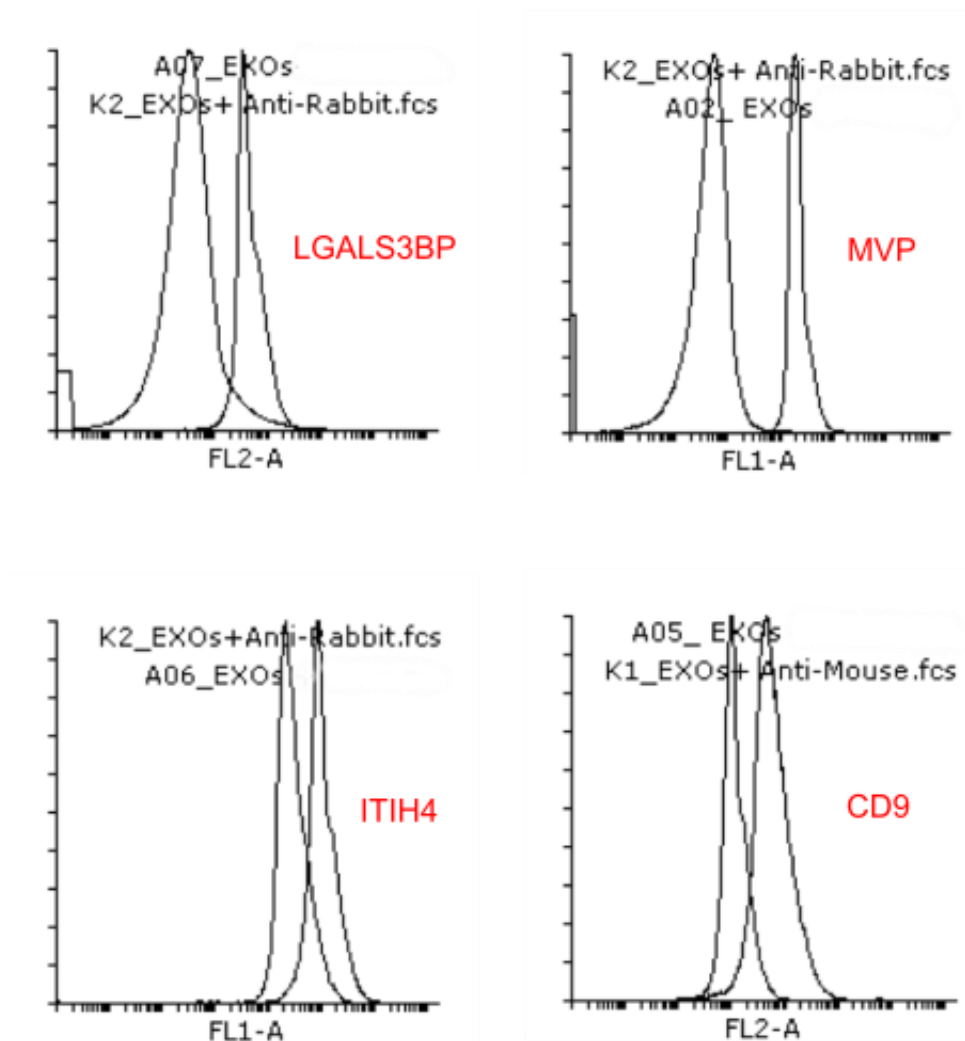
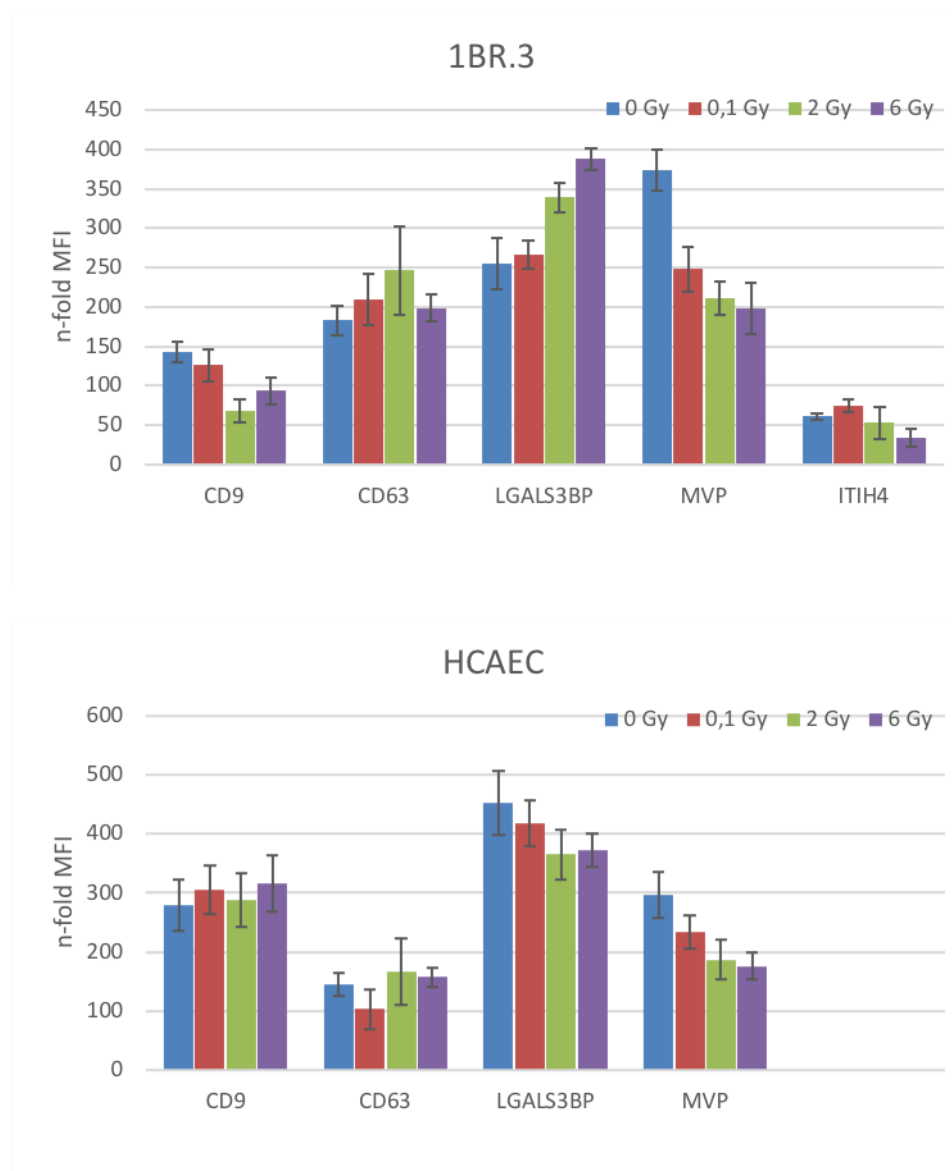


Abbildung 3.2: Nachweis der Proteine MVP, LGALS3BP, CD9 und ITIH4 auf der Oberfläche von Exosomen aus Fibroblasten. Exosomen aus der Zelllinie 1BR.3 Zellen wurden isoliert und an Latex Beads gekoppelt. Anschließend wurden die Beads mit spezifischen primären und sekundären Antikörpern bzw. nur mit sekundärem Antikörper gefärbt. Gezeigt ist eine Überlagerung der Fluoreszenzverteilung nach der Detektion.

Abbildung 3.2 zeigt die positive Detektion der Proteine MVP, LGALS3BP, CD9 und ITIH-4 auf der Oberfläche von Exosomen, die aus der Fibroblastenzelllinie 1BR.3 isoliert wurden. Für alle fünf Proteine konnte im FACS ein Anstieg in der Fluoreszenz bei Verwendung spezifischer primärer Antikörper im Vergleich zu einer alleinigen Verwendung des Sekundärantikörpers gezeigt werden (CD63, siehe 1D). Ein ähnliches Ergebnis hatte die Analyse der anderen Zelltypen. Mit der Ausnahme von ITIH-4 in Exosomen aus der Endothelzelllinie HCAEC konnten die genannten Proteine auf der Oberfläche aller Exosomen aus den vier Zelltypen detektiert werden (Abb. 3 MFI 0 Gy).

Abbildung 3.3 zeigt die Quantifizierung der Proteine sowohl auf Exosomen aus unbestrahlten wie auch aus bestrahlten Spenderzellen. In Exosomen aus 1BR.3 Zellen wurde eine strahlenregulierte Verminderung von exosomalem CD9, MVP und ITIH-4 (nur bei 6 Gy) sowie eine Erhöhung von LGALS3BP gefunden. CD63 ist weitgehend konstant. Aus HCAEC Zellen isolierte Exosomen zeigten eine strahlungsunabhängige Expression von CD9 und CD63, wogegen LGALS3BP geringfügig und MVP deutlich in ihrer Expression erniedrigt waren. Exosomen aus MCF-10A Zellen zeigten nach Bestrahlung erhöhte Level an LGALS3BP, MVP und ITIH-4. CD63 und CD9 zeigten sich unverändert. Die Analyse von aus Leukozyten isolierten Exosomen ergab für CD9, CD63, LGALS3 und MVP keine deutlichen Expressionsänderungen durch Bestrahlung. Für ITIH-4 wurde eine Erniedrigung gemessen.



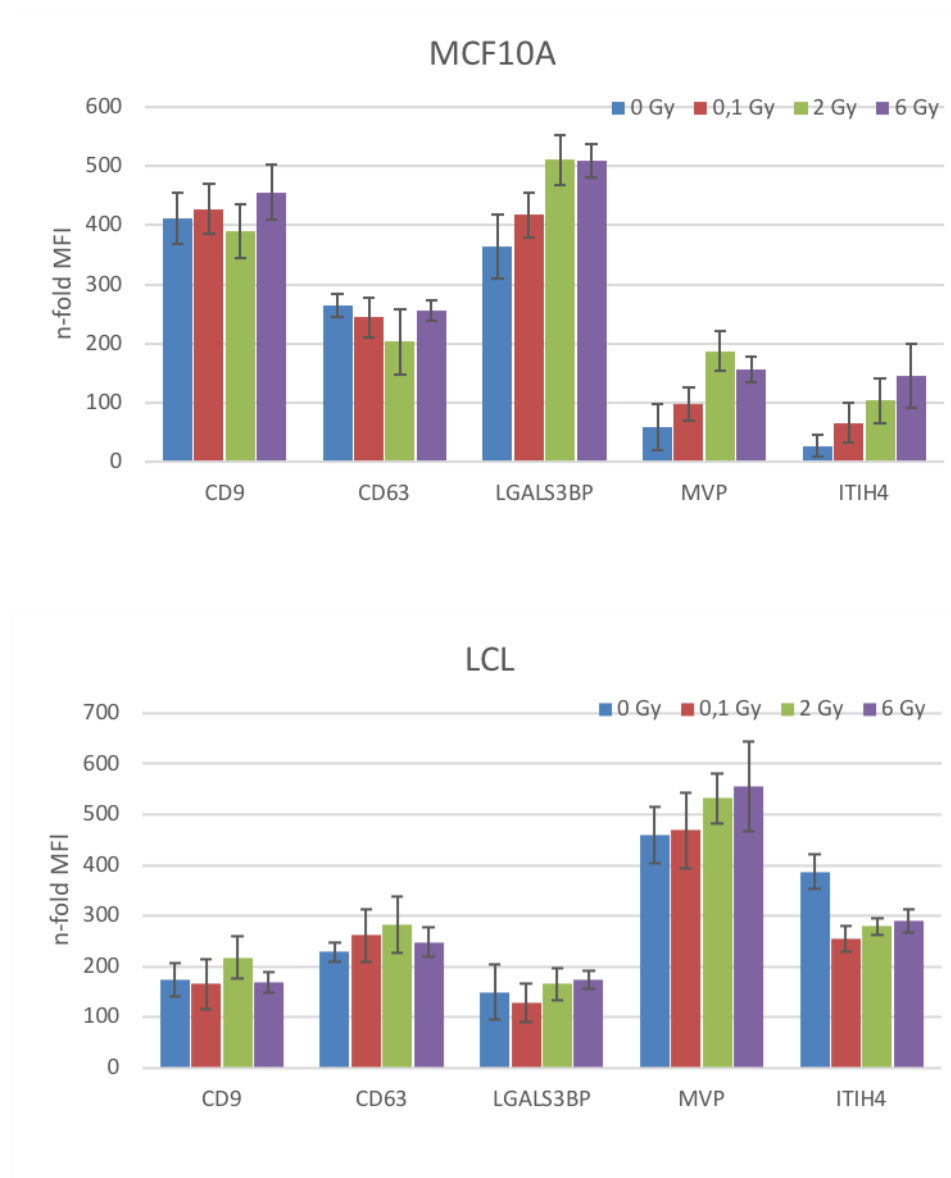


Abbildung 33: Quantifizierung exosomaler Oberflächenproteine nach Bestrahlung. Die Proteine CD9, CD63, LGALS3BP, MVP und ITIH4 wurden auf Exosomen aus Fibroblasten (1BR.3) (A), Endothelzellen (HCAEC) (B), Epithelzellen (MCF10A) (C) und humanen primären Leukozyten (LCL) (D), nachdem die Exosomen an Latex Beads gekoppelt wurden, mittels FACS detektiert. Es sind Daten für Exosomen aus unbestrahlten und mit 0,1, 2 und 6 Gy bestrahlten Donorzellen gezeigt. Die n-fache Veränderung der Fluoreszenz (MFI AK-Beads/MFI- Ko-Beads) der mit primärem und sekundärem Antikörper gefärbten Beads im Vergleich zu den Kontroll Beads (nur sekundärer Antikörper) ist als n-fold MFI gezeigt. Die Ergebnisse von drei biologischen und jeweils zwei technischen Replikaten sind gezeigt.

Insgesamt zeigten diese Versuche, dass ionisierende Strahlung in der Lage ist die Proteinbeladung an der Exosomenoberfläche zu verändern, wobei sowohl Expressionserniedrigungen als auch Erhöhungen zu beobachten waren. Ein Vergleich der

Regulation bei den verschiedenen Dosen ergab meist nur geringe Veränderungen bei 0,1 Gy, erst die Dosen von 2 und 6 Gy führten zu deutlichen Änderungen. Ein Vergleich mit den mittels Massenspektrometrie ermittelten Proteinveränderungen (Tab. 3.1) zeigte eine ausgeprägte Übereinstimmung zwischen beiden Versuchsansätzen. Sowohl die basale Proteinexpression als auch der Grad der Regulation ist aus den relativen Änderungen der mittleren Fluoreszenz ersichtlich. Aus methodischer Sicht zeigt dieser Vergleich, dass diese Bead-basierte Analyse von Exosomen eine schnelle, technisch wenig aufwändige Alternative zu Massenspektrometrie oder Western Blot zur Quantifizierung von Oberflächenproteinen darstellt. Ein weiterer Vorteil ist der deutlich geringere Bedarf an Ausgangsmaterial. Aus biologischer Sicht bedeuten diese Ergebnisse, dass sich zumindest ein Teil der Proteine CD9, CD63, LGALS3BP, MVP und ITIH4 auf der Exosomenoberfläche befindet und die beobachteten Veränderungen auch dort stattfinden. Interessanterweise sind einige Veränderungen zelltypspezifisch. Die größten Unterschiede zwischen den Zelltypen zeigte ITIH-4. Dieses Protein wurde nur in Exosomen aus Fibroblasten, Epithelzellen und Leukozyten gefunden und zeigte entgegengesetzte strahlen-induzierte Regulationen. Zu welchen funktionellen Konsequenzen diese Veränderungen führen muss in zukünftigen Versuchen geklärt werden.

3.4 Literatur

Al-Nedawi K, Meehan B, Rak J. 2009. Microvesicles: messengers and mediators of tumor progression. *Cell cycle*. Jul 1;8:2014-2018. Epub 2009/06/19.

Arscott WT, Tandle AT, Zhao S, Shabason JE, Gordon IK, Schlaff CD, Zhang G, Tofilon PJ, Camphausen KA. 2013. Ionizing radiation and glioblastoma exosomes: implications in tumor biology and cell migration. *Translational oncology*. Dec 1;6:638-648.

Berger W, Steiner E, Grusch M, Elbling L, Micksche M
Vaults and the major vault protein: novel roles in signal pathway regulation and immunity. *Cell Mol Life Sci*. 2009 Jan;66(1):43-61.

de Jong OG, Verhaar MC, Chen Y, Vader P, Gremmels H, Posthuma G, Schiffelers RM, Gucek M, van Balkom BW. 2012. Cellular stress conditions are reflected in the protein and RNA content of endothelial cell-derived exosomes. *Journal of extracellular vesicles*.1.

Castillo J, Bernard V, San Lucas FA, Allenson K, Capello M, Kim DU, Gascoyne P, Mulu FC, Stephens BM, Huang J, Wang H, Momin AA, Jacamo RO, Katz M, Wolff R, Javle M, Varadhachary G, Wistuba II, Hanash S, Maitra A, Alvarez H Surfaceome profiling enables isolation of cancer-specific exosomal cargo in liquid biopsies from pancreatic cancer patients. *Ann Oncol*. 2018 Jan 1;29(1):223-229. doi: 10.1093/annonc/mdx542.

De Toro J, Herschlik L, Waldner C, Mongini C. 2015. Emerging roles of exosomes in normal and pathological conditions: new insights for diagnosis and therapeutic applications. *Front Immunol*.6:203. Epub 2015/05/23.

Jelonek K, Wojakowska A, Marczak L, Muer A, Tinhofer-Keilholz I, Lysek-Gladysinska M, Widlak P, Pietrowska M. 2015. Ionizing radiation affects protein composition of exosomes secreted in vitro from head and neck squamous cell carcinoma. *Acta biochimica Polonica*.62:265-272.

Läubli H, Alisson-Silva F, Stanczak MA, Siddiqui MS, Deng L, Verhagen A, Varki N, Varki A, Lectin Galactoside-binding Soluble 3 Binding Protein (LGALS3BP) Is a Tumor-associated Immunomodulatory Ligand for CD33-related Siglecs*, *J Biol Chem*. 2014 Nov 28; 289(48): 33481–33491.

Lu W, Wan X, Liu B, Rong X, Zhu L, Li P, Li J, Wang L, Cui L, Wang X, Specific changes of serum proteins in Parkinson's disease patients. *PLoS One*. 2014 Apr 25;9(4):e95684.

Mutschelknaus L, Azimzadeh O, Heider T, Winkler K, Vetter M, Kell R, Tapio S, Merl-Pham J, Huber SM, Edalat L, Radulović V, Anastasov N, Atkinson MJ, Moertl S Radiation alters the cargo of exosomes released from squamous head and neck cancer cells to promote migration of recipient cells *Sci Rep*. 2017; 7: 12423.

Termini CM and Gillette JM, Tetraspanins Function as Regulators of Cellular Signaling, *Front Cell Dev Biol*. 2017; 5: 34.

Yanez-Mo M, Siljander PR, Andreu Z, Zavec AB, Borrás FE, Buzas EI, Buzas K, Casal E, Cappello F, Carvalho J, et al. 2015. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of extracellular vesicles*.4:27066.

Yentrapalli R, Merl-Pham J, Azimzadeh O, Mutschelknaus L, Peters C, Hauck SM, Atkinson MJ, Tapio S, Moertl S. 2017. Quantitative changes in the protein and miRNA cargo of plasma exosome-like vesicles after exposure to ionizing radiation. *International journal of radiation biology*. Jun;93:569-580. Epub 2017/03/08.

Yun Teng, Yi Ren, Xin Hu, Jingyao Mu, Abhilash Samykutty, Xiaoying Zhuang, Zhongbin Deng, Anil Kumar, Lifeng Zhang, Michael L. Merchant, Jun Yan, Donald M. Miller & Huang-Ge Zhang, MVP-mediated exosomal sorting of miR-193a promotes colon cancer progression *Nature Communications* volume 8, Article number: 14448 (2017)

4. Bestimmung von microRNAs aus Exosomen

4.1 Aufgabenstellung AP4

Zur Identifizierung von exosomalen microRNAs als Strahlenexpositionsmarker werden microRNA Analysen von Exosomen aus vier verschiedenen humanen Zellsystemen (Fibroblasten, Epithelzellen, Endothelzellen, Leukozyten) durchgeführt. Anschließend werden ausgewählte microRNAs mittels qPCR validiert.

Fragestellungen:

- Induziert ionisierende Strahlung microRNA Veränderungen in Exosomen?
- Gibt es Dosis-abhängige Änderungen?
- Sind die Änderungen zelltyp-spezifisch?

4.2 Hintergrund

Exosomen sind ein Typ extrazellulärer Vesikel deren Bedeutung in der Zell-Zell Kommunikation mehr und mehr erkannt wird. Neben Proteinen und Lipiden sind Nukleinsäuren wesentliche Bestandteile von Exosomen, die durch diese zwischen Zellen transportiert werden (Valadi et al., 2007) (Yanez-Mo et al. 2015). Einige Studien charakterisierten bereits die microRNA Beladung von Exosomen aus verschiedenen Zelltypen und auch stress-induzierte Veränderungen sind bereits beschrieben (Chevillet et al., 2014). In wie weit ionisierende Strahlung die exosomale Beladung mit microRNAs beeinflusst ist jedoch bisher kaum untersucht. Erst wenige Studien beschreiben derartige Veränderungen in Tumorzellen (Arscott et al. 2013). Arbeiten über strahleninduzierte Veränderungen in Exosomen aus gesunden Zellen sind noch limitierter (Szatmari et al., 2018) (Yentrapalli et al. 2017).

4.3 Durchführung

4.3.1 Isolierung von Exosomen

Zur Isolierung von Exosomen aus 1BR.3, MCF10A und HCAEC Zelllinien wurden pro Dosis etwa 10×10^6 Zellen in Flaschen (175 cm²) ausgesät und für 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Es wurden folgende Medien verwendet:

Tabelle 4.1: Medien und Zusätze zur Kultivierung der Zellsysteme

	Zelltyp	Medium	Zusätze
1BR.3	Fibroblasten	DMEM low Glucose	15% HyClone Serum 1 ng/ml FGF 5 µg/ml Insulin
MCF10A	Epithelzellen	DMEM/F12 (L-Glutamin + HEPES)	5% Horse Serum 0,5 mg/ml Hydrocortison 100 ng/ml Cholera Toxin 10 µg/ml Insulin
HCAEC	Endothelzellen	MesoEndo Cell growth medium Kit (Cell Applications)	
MNC	primäre Leukozyten	Immunzellmedium (Bio&Sell)	5 µg/ml PHA

Anschließend wurde das Medium durch exosomen-freies Medium ersetzt und die Zellen wurden mit 0,1, 2 und 6 Gy bestrahlt. Nach einer weiteren Inkubation von 24 h wurden die Exosomen aus dem konditionierten Zellkulturüberstand isoliert. Zunächst wurden erst Zellen (300 g, 10 min, 4 °C) und dann Zellfragmente (10.000 g, 30 min, 4 °C) durch Zentrifugation entfernt. Anschließend wurde das Medium zur Entfernung größerer Vesikel filtriert (0,22 µm Porengröße). Das Filtrat wurde dann durch Ultrafiltration aufkonzentriert. Dann erfolgte die Präzipitation der Exosomen mittels miRCURY Exosome Isolation Kit (Exiqon, #300102). Dazu wurden je 5ml konzentriertes konditioniertes Medium mit 2ml Precipitation Buffer versetzt,

gut gemischt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend werden die Exosomen durch Zentrifugation (3200g, 30 min, RT) pelletiert, der Überstand verworfen und die Exosomen in 350 µl Lyse-Puffer resuspendiert.

Die Isolierung von miRNA aus Exosomen erfolgte mittels miRCURY RNA Isolation Kit (Exiqon, #300110) nach den Angaben des Herstellers. Die Konzentration der RNA Proben wurde mittels Nanodrop durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die RNA Isolate bei -80°C gelagert.

Für die Isolierung von Exosomen aus Leukozyten wurden pro Dosis 50 ml frisches Vollblut bestrahlt und unmittelbar danach wurden die Leukozyten mittels Ficoll-Gradienten isoliert. Anschließend wurden die isolierten Zellen für 24 h in exosomen-freiem Zellkulturmedium inkubiert. Die Isolierung der Exosomen RNA erfolgte analog zu den Zelllinien aus dem konditionierten Medium.

4.3.2 Quantifizierung spezifischer Proteine

Proteine wurden durch Zugabe von 20 µl Lyse-Puffer II (25 mM Tris pH 7.5, 120 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% PSMF, 1 mM NOV, 1 mM Leupeptin) zu 40 µl Exosomen-Suspension (isoliert aus 1.5×10^7 Zellen) aus Exosomen freigesetzt. Dazu wurden die Proben 4 h auf Eis unter wiederholtem Mischen inkubiert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration mittels BCA-Technologie ermittelt (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific). Anschließend wurden 2 µg exosomale Proteine nach einem Standard Western Blot Protokoll analysiert. Folgende Antikörper wurden verwendet: Anti-Alix (#2171, Cell Signaling), anti-TSG101 (GTX70255, GeneTex), anti-CD9 (sc-13118, Santa Cruz), anti-GAPDH (sc-47724, SantaCruz) und anti-Calnexin (sc11397, SantaCruz). Als sekundäre Antikörper dienten Meerrettich-Peroxidase konjugierte Antikörper (anti-rabbit: sc-2004 und anti-mouse: sc-2005, Santa Cruz) und die Detektion erfolgte mittels Chemolumineszenz (Amersham ECL Reaction Kit, GE Healthcare).

4.3.3 Quantitative microRNA Analyse

- *Next-Generation Sequencing / Small RNA-Sequenzierung:*

Die Herstellung der Bibliotheken und die smallRNA Sequenzierung erfolgte wie kürzlich beschrieben (Buschmann et al., 2018). Dazu wurde die exosomale RNA zunächst in einem Rotationsverdampfer getrocknet und dann in 10 µl resuspendiert. 6 µl der aufkonzentrierten RNA wurden als Ausgangsmaterial zur Herstellung der Bibliotheken mittels NEBNext Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina (New England BioLabs) eingesetzt. Zur Bibliotheken Herstellung wurden alle Adaptoren und Primer aufgrund der geringen RNA Konzentrationen in einer 1:2 Verdünnung verwendet. Nach 15 Zyklen einer PCR-basierten Amplifikation wurden die Bibliotheken mittels Kapillarelektrophorese bewertet (DNA1000 Assay, 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies). Anschließend wurde eine Größenselektion der Bibliotheken mittels hochauflösender Gelelektrophorese (4% Agarose) durchgeführt und DNA Banden im Größenbereich von miRNAs wurden extrahiert. Nach einer abschließenden Qualitätskontrolle (High Sensitivity DNA Assay, 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies) wurden die Bibliotheken durch Illumina „single-end sequencing by synthesis“ unter Verwendung von 50 Zyklen auf einem HiSeq2500 (Illumina) analysiert.

▪ *NGS Datenanalyse*

Die Software FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data)) wurde zur Qualitätsermittlung und Analyse der Längenverteilung eingesetzt. Dann wurden Adaptersequenzen mittels Btrim (Kong, 2011) gekappt. Sequenzen ohne Adapter oder kürzer als 16 nt wurden von der Analyse ausgeschlossen. Zusätzlich wurden Sequenzen mit Homologie zu rRNA, tRNA, snRNA and snoRNA Sequenzen (geladen von RNACentral (RNA consortium, 2014)) depletiert, um die Wahrscheinlichkeit von Falschpositiven während der miRNA Identifizierung zu verringern. Die verbleibenden Sequenzen wurden unter Verwendung von Bowtie (Langmead et al., 2009) und “best algorithm“ mit miRBase version 21 (Kozomara et al., 2014) aligned. Ein Mismatch pro Sequenz war für alle Stufen erlaubt. “Read counts” wurden durch Aufsummierung aller reads pro Sequenz ermittelt (Bowtie Output).

Differentiell exprimierte miRNAs wurden mit dem Bioconductor package DESeq2 (version 1.8.1) für R (Love et al., 2014) und der entsprechenden Normalisierungsstrategie (median ratios of mean expression) inklusive *false discovery* Korrektur (Benjamini-Hochberg) ermittelt. Als Grenzwerte für den Nachweis signifikant regulierter miRNAs wurde ein read count ≥ 50 ,

ein $\log_2 \text{Fold Change} \geq |1|$ und $\text{padj} \leq 0.05$ festgesetzt (padj : auf multiples Testen korrigierter p-Wert nach Benjamini-Hochberg). Die Visualisierung der Ergebnisse der principal component analysis (regularized log-transformed, DESeq2-corrected counts) erfolgte mit den R Paketen gplots, ggplots2, RColorBrewer, dendexted and ggfortify.

4.3.4 Quantifizierung spezifischer microRNAs:

Die Expressionsbestimmung ausgewählter miRNAs erfolgte mittels quantitativer real-time PCR. Dazu wurde die miRNA zuerst in cDNA transkribiert (TaqMan Advanced MicroRNA cDNA Synthesis Kit, Applied Biosystems). Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Dieses Kit beinhaltet keine spezifischen Primer und die generierte cDNA kann für alle zu analysierenden miRNAs eingesetzt werden.

Für die anschließende qPCR wurde das TaqMan Advanced miRNA Kit (#A25576, Applied, Biosystems) verwendet. Die Durchführung erfolgte ebenfalls nach den Herstellerangaben mit 20 μl einer 1:5 Verdünnung der zuvor erzeugten cDNA und den entsprechenden TaqMan Advanced microRNA Primern (Applied Biosystems).

4.4 Ergebnisse

4.4.1 Qualitätskontrolle isolierter Exosomen

Zur Qualitätskontrolle der Exosomenpräparationen wurde ein Nachweis publizierter und allgemein anerkannter Exosomenmarkerproteine (Alix, TSG101, CD9) erfolgreich durchgeführt (siehe Abbildung 4.1). Der Literatur entsprechend wurde GAPDH in Exosomen nur gering exprimiert gefunden. Um zelluläre Verunreinigungen auszuschließen wurden die Proben auf Calnexin (CNX) untersucht. Damit zeigt diese Isolierungsmethode ein zur Isolierung mittels Ultrazentrifugation identisches Proteinmuster der Exosomen (siehe AP2) und beweist die Reinheit der Präparationen.

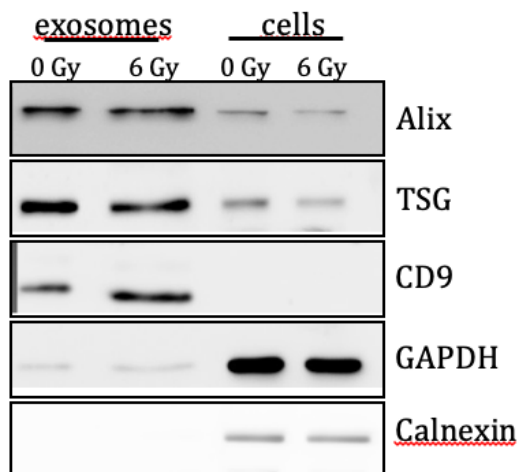


Abbildung 4.1: Qualitätskontrolle von Exosomenpräparationen. Nachweis exosomaler Markerproteine mittels Western Blot in Exosomen aus humanen Leukozyten.

4.4.2 microRNA Konzentration

Vor Beginn der microRNA Analysen wurde der Gesamtgehalt exosomaler RNAs analysiert. Aus den Zelllinien konnten Exosomenmengen zwischen 280 und 540 ng isoliert werden, wobei die epitheliale Linie MCF-10A die größten Mengen und die Endotheliallinie HCAEC die geringsten Mengen sekretierte. Die Bestrahlung der Donorzellen hatte in diesen Zellsystemen keinen Einfluss auf die RNA Menge. Im Gegensatz dazu wurde aus Leukozyten mit steigender Bestrahlungsdosis mehr RNA in Exosomen ausgeschleust. Außerdem sekretierten Leukozyten bereits im unbestrahlten Zustand die höchsten Mengen exosomaler microRNAs.

Tabelle 4.2: miRNA Mengen (in ng) in 50 µl Endvolumen nach der Isolierung aus Exosomen der angegebenen Zelltypen

Exosomendonor	0 Gy	0,1 Gy	2 Gy	6 Gy
MCF10A	11,2	12,2	13,6	12,1
1BR.3	9,7	11,1	10,6	11,7
HCAEC	7,0	6,9	6,9	7,0
Leukozyten	16,8	21,6	32,3	39,5

4.4.3 RNA Größenverteilung

Die Größenverteilung der isolierten RNAs wurde mittels Kapillarelektrophorese analysiert. Als Beispiel ist in Abbildung 4.2 die RNA Größenverteilung in Exosomen aus der Epithelzelllinie MCF10A dargestellt. Sowohl in Exosomen aus unbestrahlten als auch aus bestrahlten Donorzellen Zellen enthalten diese vorwiegend kleine RNA Moleküle zwischen 20 und 200nt. Im Gegensatz dazu dominieren in zellulären RNAs größere RNA Moleküle (rRNA bei 200 und 4000 nt). RNA Profile aus den anderen analysierten Zelltypen sind analog zu diesen Ergebnissen. Das Fehlen intakter ribosomaler RNAs kann als Indiz für die Reinheit der exosomalen Präparationen interpretiert werden.

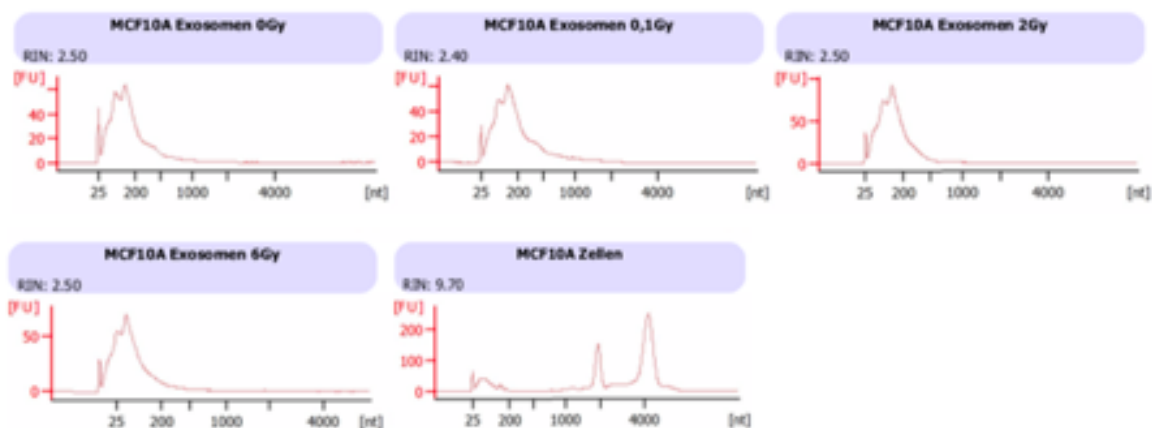


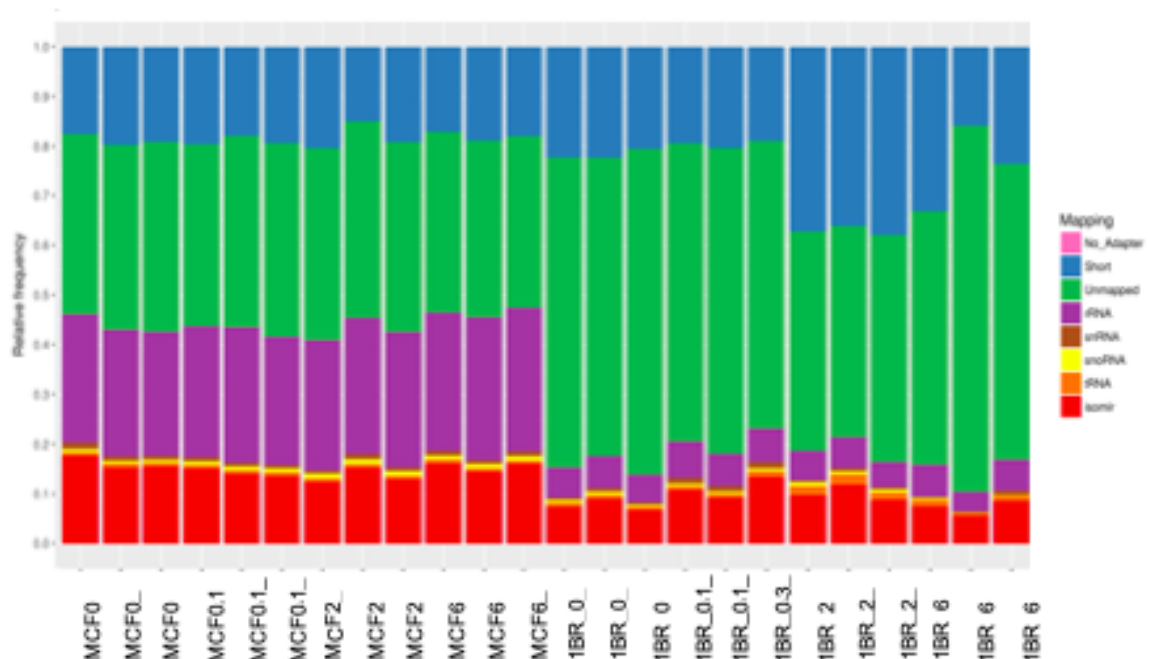
Abbildung 4.2: Größenverteilung exosomaler RNAs aus MCF-10A. Mittels Bioanalyser (Total RNA Chip) wurde die Größenverteilung exosomaler RNAs ermittelt. Als Kontrolle ist die Größenverteilung einer zellulären RNA Präparation gezeigt.

4.4.4 NGS Analyse exosomaler microRNAs

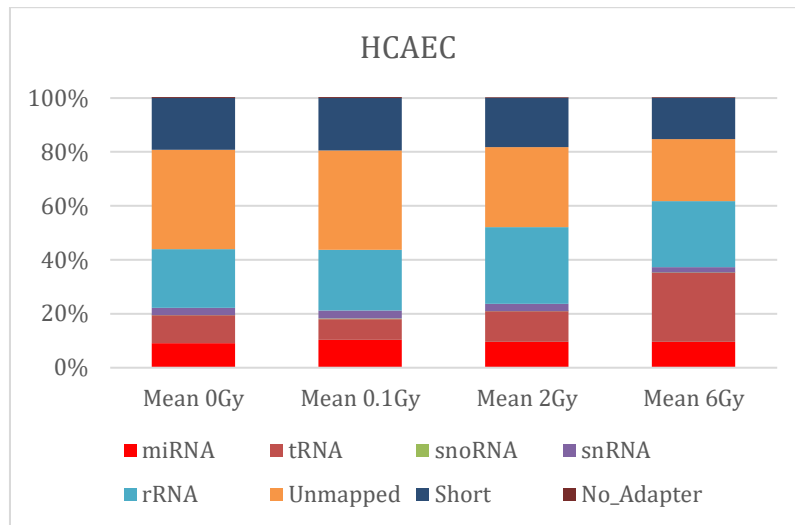
4.4.4.1 Zuordnung der reads zu RNA Klassen

Nach der Identifizierung der Sequenzen anhand der Datenbank RNCentral wurden die gefundenen RNAs nach Funktionen klassifiziert (Abbildung 4.3). Ein Vergleich der vier Zelltypen zeigte deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung der Sequenzen. Ein erster Unterschied lag in der Identifizierbarkeit der Reads. In der Fibroblastenlinie 1BR.3 konnten nur etwa 40 % der Reads identifiziert werden, wogegen in MCF10A und HCAEC 60 % und in Leukozyten etwa 80 % identifiziert wurden. Weitere ca. 20% sind kurze Sequenzabschnitte, die nicht weiter analysiert wurden. Von den identifizierten Sequenzen kann ein konstanter Anteil zwischen 5 und 10% in allen Zellsystemen snoRNAs, snRNAs und tRNAs zugeordnet werden. Der Gehalt an microRNAs (=isomir) lag in allen drei Zelllinien relativ konstant zwischen 10 – 20% (Abbildung 3). Im Unterschied zu den Zelllinien wurde in den Bibliotheken der Leukozyten mit etwa 40% ein erheblich höherer Anteil an microRNAs und damit ein geringerer Teil von nicht zugeordneten Reads detektiert (Abb. 4.3C). Die anderen RNA Klassen (tRNA, snoRNA, snRNA) zeigten auch hier einen konstant geringen Anteil. Der Vergleich von Proben aus bestrahlten und unbestrahlten Donoren zeigte in keinem Zellsystem Unterschiede.

A.



B.



C.

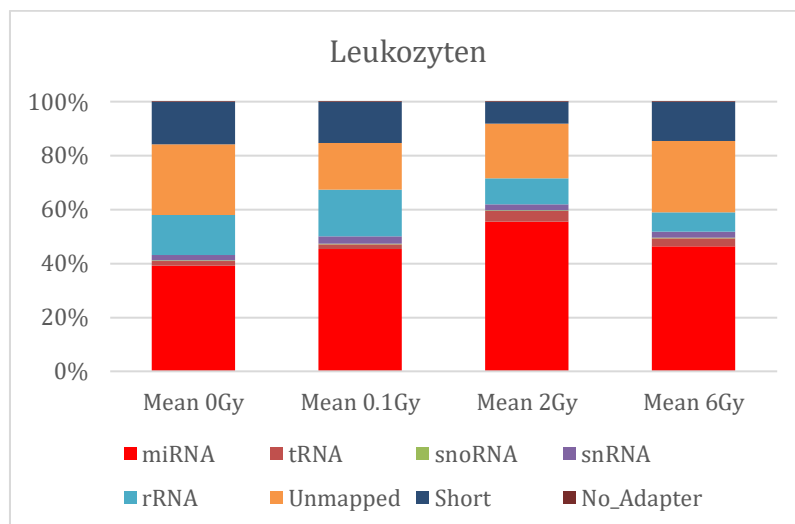


Abbildung 4.3. Relative Verteilung identifizierter RNAs. Alle identifizierten RNAs wurden den Klassen miRNA (isomir), tRNA, snoRNA, snRNA, rRNA, unmapped, short und ohne Adapter zugeordnet

Mit dieser Methode konnten zwischen 76 (1BR.3) und 335 (Leukozyten) microRNAs als Bestandteile von Exosomen identifiziert werden (Tabelle 4.3). Als eindeutig identifiziert wurde eine microRNA mit ≥ 50 Reads gewertet. Die Bestrahlung der Donorzellen hatte keine signifikante Auswirkung auf diese Anzahl.

4.4.4.2 exosomale microRNAs

Eine weiterführende Analyse der relativen microRNA Häufigkeiten in den Exosomen zeigte erhebliche Unterschiede. So entfallen in allen vier Zellsystemen der Großteil der Reads nur auf eine kleine Zahl verschiedener miRNAs (Abbildung 4.4) und die allermeisten anderen miRNAs sind nur in sehr geringer Read-Zahl vorhanden. Als besonders hoch in Exosomen exprimiert wurden die microRNAs miR-21-5p und miR-122-5p gefunden. miR-21-5p macht in MCF10-A und Leukozyten Exosomen jeweils mehr als 20 % der Reads aus. In HCAEC und 1BR.3 wurde miR-122-5p mit 35 bzw. 12 % der Reads nachgewiesen.

Tabelle 4.3: Anzahl identifizierter microRNAs (≥ 50 reads) in Exosomen und Anzahl der Gesamtreads pro Bibliothek

	MCF10A	Leukozyten	HCAEC	1BR.3
identifizierte miRNA	173	335	98	76
Anzahl Gesamtreads	$3,2 \times 10^6$	$13,6 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$	$5,5 \times 10^5$

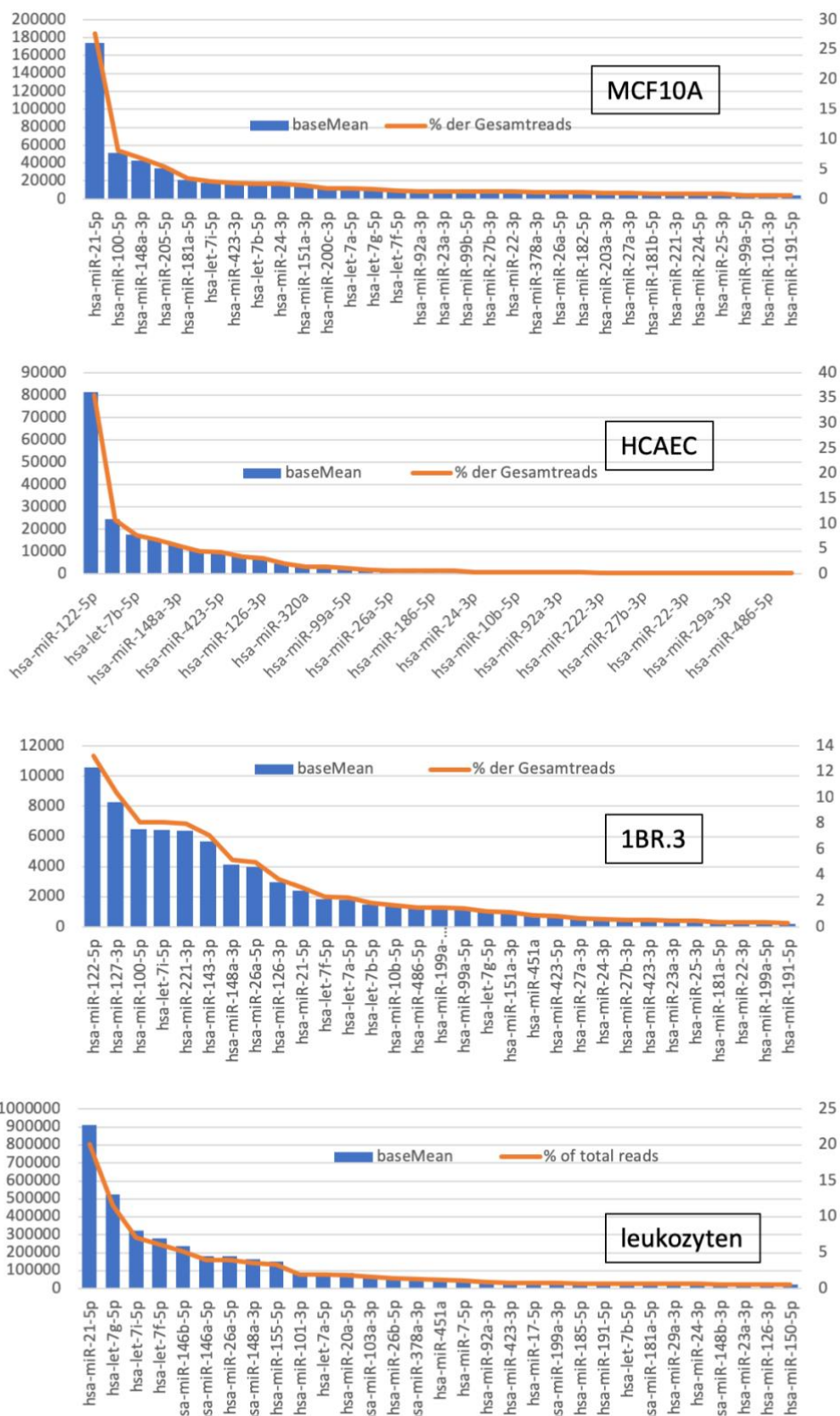
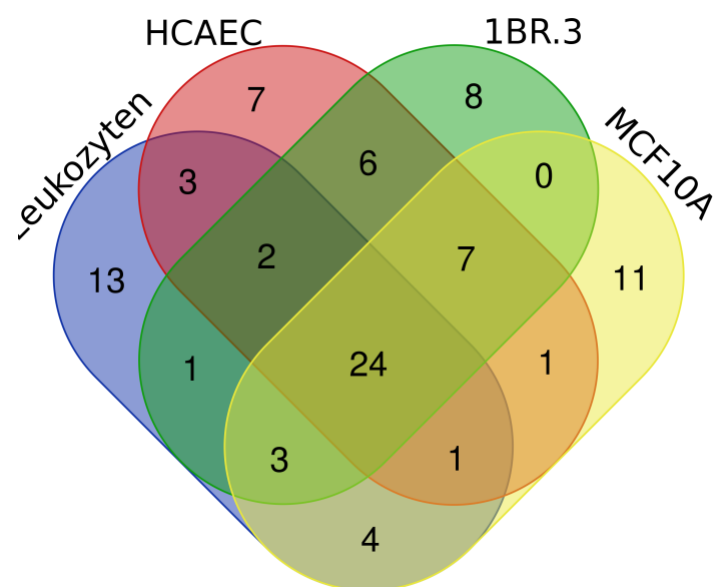


Abbildung 4.4: relative Häufigkeit von microRNAs in Exosomen aus den verschiedenen Zelltypen

Ein Vergleich aller in Exosomen identifizierten microRNAs zeigte deutliche Unterschiede zwischen den Zellsystemen. In Exosomen aus 1BR.3 Fibroblasten wurden lediglich 76 miRNAs identifiziert, wogegen in Exosomen aus Leukozyten über 335 miRNAs gefunden wurden. Ein erheblicher Anteil dieser microRNAs wurde in Exosomen aus allen vier Zelltypen nachgewiesen. Dies wird sowohl bei Betrachtung der TOP50 exprimierten (25 von 50 miRNAs werden in Exosomen aus allen vier Zelltypen) als auch bei allen identifizierten microRNAs (58 gemeinsame miRNAs) ersichtlich. Dieser Befund legt ein spezifisches „Core Set“ von microRNAs in Exosomen nahe und wirft die interessante Frage nach spezifischen Beladungsmechanismen auf. Eine erste bioinformatische Analyse der miRNA Sequenzen konnte jedoch noch keine gemeinsamen Sequenzmotive in diesen miRNAs identifizieren.

A.



B.

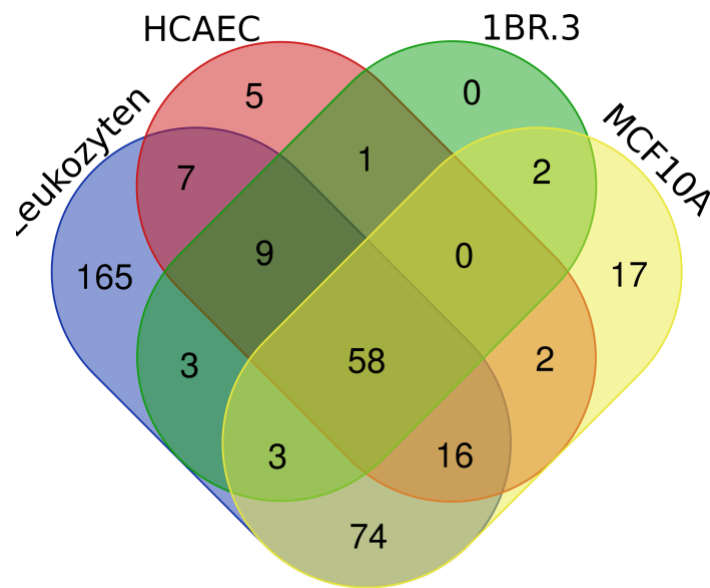


Abbildung 4.5: Venn Diagramm der microRNA Population in Exosomen aus verschiedenen Zellsystemen (A) TOP50 exprimiert, (B) alle identifizierten microRNAs

4.4.4.3 Strahlenregulierte miRNAs

Zur Untersuchung potentieller Unterschiede in der microRNA Zusammensetzung von Exosomen aus unbestrahlten und bestrahlten Zellen wurden die gesamten NGS-Daten eines Zelltyps einer Principal Component Analyse (PCA) unterzogen. Die Clusterbildung der Kontrollen bzw. der bestrahlten Proben ist in Abbildung 4.6-4.9 dargestellt. Dabei ist für alle vier Zellsysteme die Separierung zwischen Exosomen aus bestrahlten und unbestrahlten Zellen ersichtlich. Eine dosis-abhängige Clusterbildung ist nur für Leukozyten klar ersichtlich.

Zur Identifizierung signifikant veränderter microRNAs wurden FDR-korrigierte p-Werte (padj-Wert) aus drei biologischen Replikaten berechnet. microRNAs, die mit ≥ 50 reads identifiziert, und mit einer ≤ 1 bzw. ≥ 1 log2-fachen Veränderung und einem padj-Wert von < 0.05 gefunden wurden, wurden als statistisch signifikant reguliert betrachtet. Der Vergleich von Exosomen aus unbestrahlten Zellen und Zellen die bestrahlt wurden ergab für die vier untersuchten Zellsysteme unterschiedliche Resultate. In 1BR.3 wurde lediglich microRNA miR-203a-5p als strahlenreguliert bei allen drei untersuchten Dosen gefunden (Tabelle 4.7). Deutlich mehr strahlenregulierte miRNAs wurden in den anderen Zellsystem gefunden. In MCF10A wurden 9 hochregulierte und 2 herunterregulierte miRNAs (Tabelle 4.4A, B) und in HCAEC 23 erhöhte

und 19 nach Bestrahlung erniedrigte miRNAs gefunden (Tabelle 4.6A, B). Diese Veränderungen waren allerdings alle nach 6 Gy Bestrahlung vorhanden, die geringeren Dosen führten zu keinen signifikanten Veränderungen. Im Gegensatz dazu wurde in Exosomen aus Leukozyten nach allen drei Dosen veränderte miRNAs detektiert. Nach 0,1 Gy waren 2 erhöht und eine erniedrigt, nach 2 Gy 6 hoch und 9 erniedrigt und nach 6 Gy entsprechend 9 und 16 miRNAs (Tabelle 4.5A, B). Insgesamt waren die absoluten Veränderungen mit einem Bereich zwischen 8 und 0,1 gemäßigt.

Tabelle 4.4.1: MCF10A – hochregulierte microRNAs (base mean: mittlere Readzahl bei allen Dosen, padj: auf multiples Testen korrigierter p-Wert)

		baseMean	log2FoldChange		padj	
6 Gy	hsa-miR-34c-5p	364,83	2,53		2,39E-31	
	hsa-miR-95-3p	94,42	1,76		1,51E-07	
	hsa-miR-514a-3p	68,51	1,58		3,33E-05	
	hsa-miR-509-3p	152,04	1,52		4,10E-09	
	hsa-let-7g-5p	8329,44	1,14		1,39E-07	
	hsa-miR-941	159,34	1,11		6,27E-05	
	hsa-miR-200c-3p	787,18	1,10		1,61E-11	
	hsa-miR-146a-5p	51,01	1,09		2,95E-02	
	hsa-miR-93-5p	508,02	1,02		9,93E-04	

Tabelle 4.4.2: MCF10A – herunterregulierte microRNAs (base mean: mittlere Readzahl bei allen Dosen, padj: auf multiples Testen korrigierter p-Wert)

		baseMean	log2FoldChange		padj	
6 Gy	hsa-miR-1-3p	76,53	-1,06		2,35E-03	
	hsa-miR-3168	272,29	-1,10		1,39E-03	

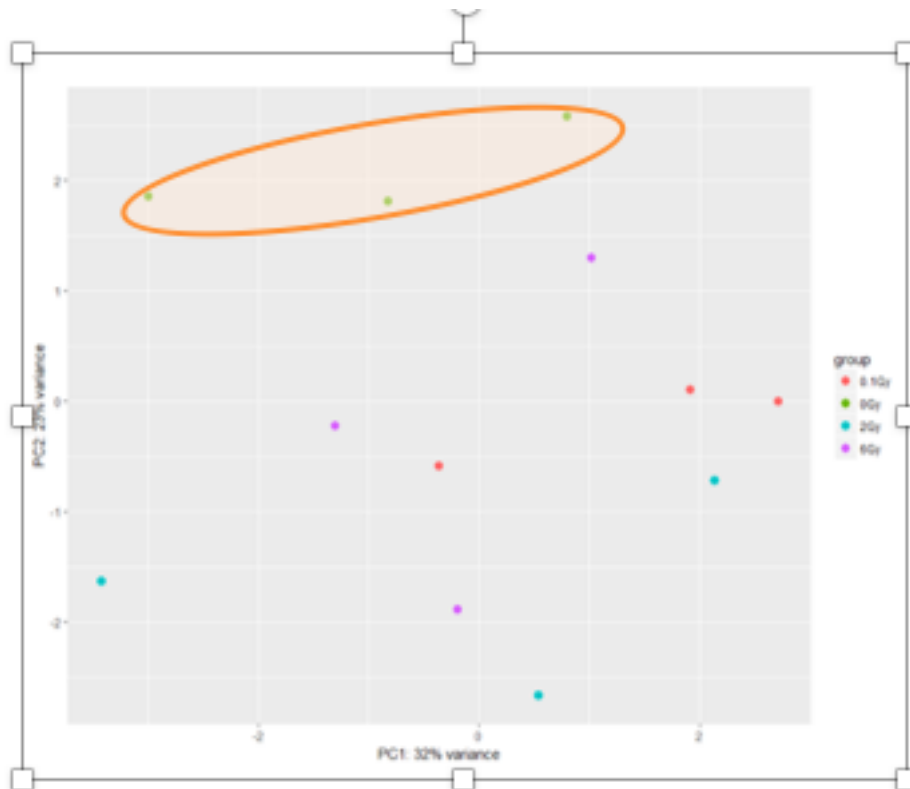


Abbildung 4.6: MCF10A - Principal component analysis (PCA) der microRNA Expression in bestrahlten und bestrahlten Proben.

Tabelle 4.5.1: Leukozyten – hochregulierte microRNAs (base mean: mittlere Readzahl bei allen Dosen, padj: auf multiples Testen korrigierter p-Wert)

		baseMean	log2FoldChange		padj	
0,1 Gy	let-7e-5p	1975,10	1,35		1,21E-03	
	miR-147b	171,44	1,01		1,21E-03	
2 Gy	miR-34a-5p	831,04	2,75		5,12E-67	
	miR-20b-5p	5507,84	1,39		5,02E-05	
	miR-106a-5p	5424,13	1,36		1,26E-02	
	miR-147b	171,44	1,28		3,95E-06	
	miR-155-5p	152345,19	1,10		4,41E-19	
	miR-139-5p	1691,01	1,02		6,27E-09	
	miR-34a-5p	831,04	2,78		7,33E-68	
6 Gy	miR-34c-5p	422,01	1,42		2,08E-10	

	miR-20a-5p	86199,02	1,33		1,09E-02	
	miR-1299	156,81	1,27		6,86E-13	
	miR-106a-5p	5424,13	1,27		2,70E-02	
	miR-20b-5p	5507,84	1,23		5,47E-04	
	miR-17-5p	37053,28	1,14		5,75E-03	
	miR-101-3p	89243,30	1,13		1,31E-05	
	miR-125b-5p	285,33	1,06		2,93E-07	

Tabelle 4.5.2: Leukozyten– herunterregulierte microRNAs (base mean: mittlere Readzahl bei allen Dosen, padj: auf multiples Testen korrigierter p-Wert)

		baseMean	log2FoldChange	padj	
0,1 Gy	miR-493-5p	180,33	-1,32	1,26E-09	
2 Gy	miR-23b-3p	1258,41	-1,04	6,74E-13	
	miR-338-5p	295,38	-1,04	6,27E-09	
	miR-30d-5p	13428,16	-1,04	3,44E-25	
	miR-1260b	187,45	-1,05	5,96E-12	
	miR-331-3p	153,67	-1,12	1,21E-09	
	miR-511-5p	470,76	-1,17	9,22E-06	
	miR-493-5p	180,33	-1,22	2,60E-09	
	miR-451a	54907,66	-1,23	1,26E-10	
	miR-3168	629,88	-2,10	3,35E-02	
6 Gy	miR-151b	309,42	-1,05	9,76E-05	
	let-7d-5p	9330,03	-1,06	3,48E-04	
	let-7e-5p	1975,10	-1,09	8,40E-03	
	miR-132-3p	2979,58	-1,11	1,66E-21	
	miR-23a-3p	27497,62	-1,11	1,02E-11	

	miR-574-5p	101,70	-1,16		4,42E-03	
	miR-23b-3p	1258,41	-1,17		2,05E-16	
	miR-133a-3p	200,18	-1,23		3,68E-11	
	miR-443b-3p	281,28	-1,23		1,41E-03	
	miR-574-3p	295,26	-1,23		2,26E-11	
	miR-212-3p	157,09	-1,33		2,32E-08	
	miR-197-3p	336,78	-1,43		1,88E-20	
	miR-4286	176,88	-1,47		8,80E-15	
	miR-326	259,57	-1,64		2,24E-17	
	miR-451a	54907,66	-1,69		6,86E-20	
	miR-331-3p	153,67	-1,81		7,62E-21	

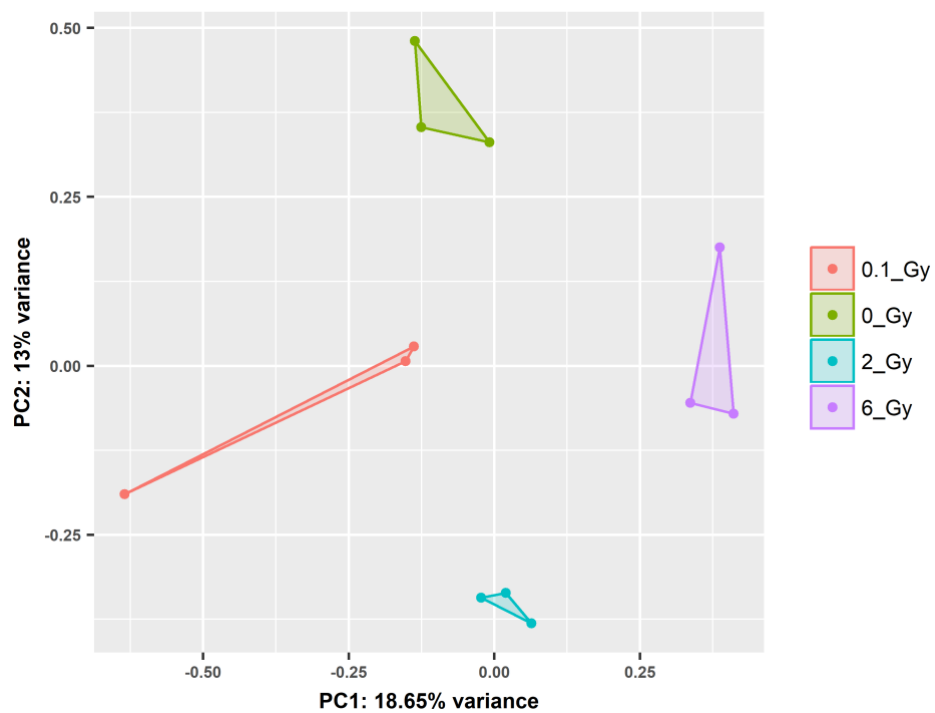


Abbildung 4.7: Leukozyten - Principal component analysis (PCA) der microRNA Expression in bestrahlten und bestrahlten Proben.

Tabelle 4.6.1: HCAEC – hochregulierte microRNAs (base mean: mittlere Readzahl bei allen Dosen, padj: auf multiples Testen korrigierter p-Wert)

		baseMean	log2FoldChange		padj	
6 Gy	hsa-miR-148a-3p	12876,89	3,96		3,81E-14	
	hsa-miR-122-5p	81431,15	3,02		3,81E-14	
	hsa-miR-127-3p	905,69	2,20		2,64E-11	
	hsa-miR-151a-3p	24728,11	2,09		9,94E-05	
	hsa-miR-10b-5p	902,21	2,05		3,94E-06	
	hsa-miR-381-3p	118,49	1,86		1,81E-05	
	hsa-miR-99b-5p	350,07	1,75		5,30E-06	
	hsa-miR-143-3p	248,32	1,73		9,92E-09	
	hsa-miR-92a-3p	720,77	1,66		3,22E-05	
	hsa-miR-423-5p	9988,83	1,59		2,80E-05	
	hsa-miR-28-3p	119,31	1,57		5,37E-05	
	hsa-miR-30e-3p	309,31	1,52		1,97E-03	
	hsa-miR-2682-5p	118,70	1,51		1,90E-02	
	hsa-miR-486-5p	394,98	1,49		1,14E-07	
	hsa-miR-432-5p	111,43	1,39		2,68E-03	
	hsa-miR-409-3p	271,40	1,28		2,35E-04	
	hsa-miR-30a-3p	286,43	1,26		1,63E-03	
	hsa-miR-25-3p	286,84	1,25		1,61E-05	
	hsa-miR-193b-5p	122,64	1,22		1,08E-02	
	hsa-miR-379-5p	239,87	1,20		2,83E-05	
	hsa-miR-101-3p	346,11	1,11		1,81E-03	
	hsa-miR-378a-3p	103,66	1,07		3,05E-03	

Tabelle 4.6.2: HCAEC – herunterregulierte microRNAs (base mean: mittlere Readzahl bei allen Dosen, padj: auf multiples Testen korrigierter p-Wert)

		baseMean	log2FoldChange	padj	
6 Gy	hsa-miR-99a-5p	2734,92	-1,17	6,24E-03	
	hsa-miR-222-3p	625,86	-1,19	2,88E-03	
	hsa-miR-320a	3344,21	-1,23	8,80E-04	
	hsa-miR-181a-5p	430,33	-1,28	2,53E-03	
	hsa-let-7d-5p	150,36	-1,32	9,38E-03	
	hsa-miR-191-5p	141,95	-1,34	2,38E-02	
	hsa-miR-193a-5p	330,45	-1,40	1,43E-03	
	hsa-miR-125b-5p	128,83	-1,42	1,90E-02	
	hsa-miR-27a-3p	1607,16	-1,47	1,02E-02	
	hsa-let-7g-5p	1381,20	-1,48	8,57E-03	
	hsa-miR-21-5p	10444,19	-1,63	8,38E-04	
	hsa-miR-218-5p	165,33	-1,68	1,45E-05	
	hsa-miR-26b-5p	135,48	-1,69	1,10E-03	
	hsa-miR-29a-3p	455,42	-1,71	3,43E-04	
	hsa-miR-24-3p	947,61	-1,72	8,65E-05	
	hsa-miR-20a-5p	105,75	-2,32	8,33E-09	
	hsa-miR-221-3p	622,33	-2,36	2,43E-06	
	hsa-miR-186-5p	1424,72	-2,78	1,30E-07	
	hsa-miR-23a-3p	4777,17	-2,92	4,60E-07	

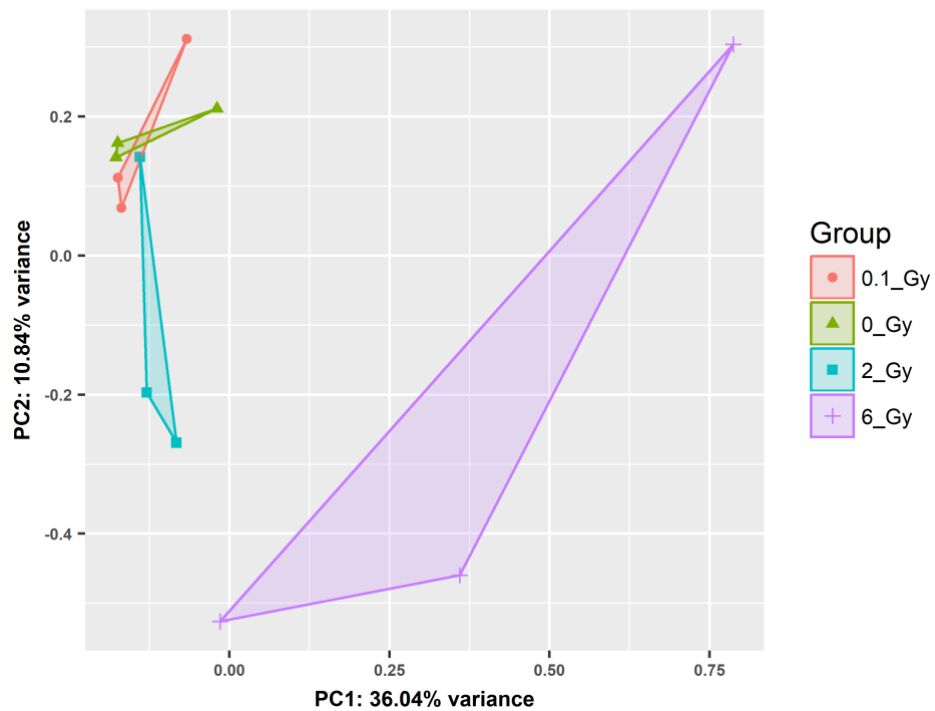


Abbildung 4.8: HCAEC - Principal component analysis (PCA) der microRNA Expression in bestrahlten und bestrahlten Proben.

Tabelle 4.7: 1BR.3 – hochregulierte microRNAs (base mean: mittlere Readzahl bei allen Dosen, padj: auf multiples Testen korrigierter p-Wert)

		baseMean	log2FoldChange		padj	
0,1 Gy	hsa-miR-203a-3p	87,74	2,02		7,00E-08	
2 Gy	hsa-miR-203a-3p	87,74	2,07		1,79E-08	
6 Gy	hsa-miR-203a-3p	87,74	1,49		2,12E-03	

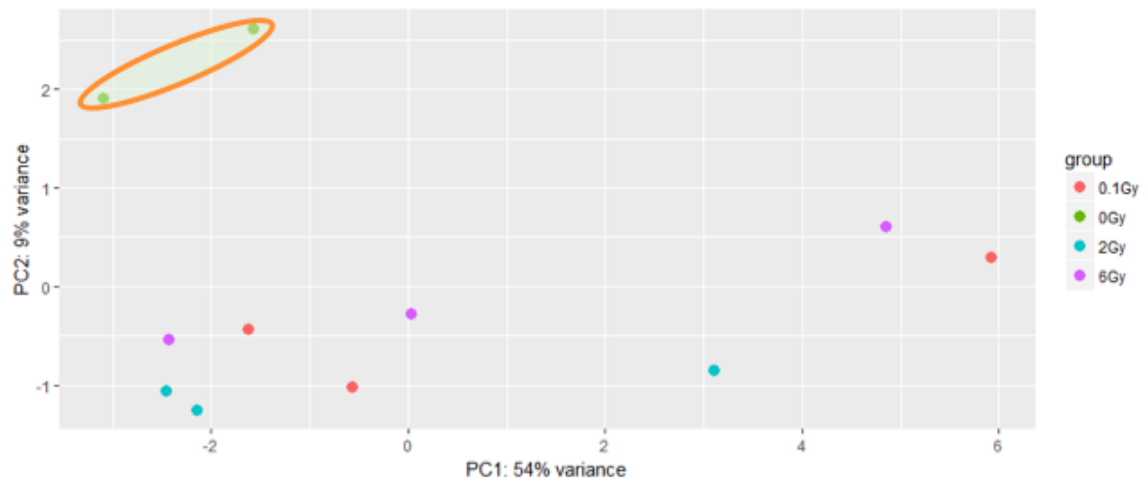


Abbildung 4.9: 1BR.3 - Principal component analysis (PCA) der microRNA Expression in bestrahlten und bestrahlten Proben.

Ein Vergleich der strahlenregulierten microRNAs in den verschiedenen Zelltypen ist in Abbildung 10 dargestellt. Es ist ersichtlich, dass nur wenige zelltyp-übergreifend, strahlenregulierte microRNA identifiziert werden konnten.

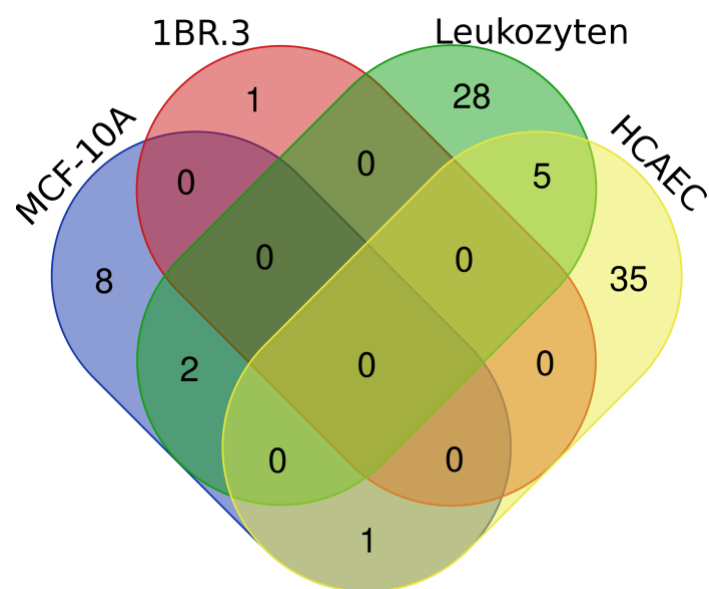


Abbildung 4.10: Vergleich strahlenregulierter microRNAs in den verschiedenen Zelltypen

4.4.4.4 Validierung strahlenregulierter microRNAs

Aus den in 4.4.3.3 identifizierten strahlen-regulierten microRNAs wurden Kandidaten-microRNAs für eine weitere Validierung mittels qPCR ausgewählt. Die Kriterien für die Auswahl waren (i) Expressionsniveau (ii) Grad der Regulation (iii) Regulation bei verschiedenen Dosen. Zusätzlich zur Validierung der NGS-Daten (24 h nach Bestrahlung), wurden auch Exosomenpräparationen, die 12 und 48 h nach Bestrahlung isoliert wurden, analysiert (analog zu Proteinanalysen in AP2). Ein reproduzierbarer Nachweis der miRNAs konnte an den 24 und 48 h nach Bestrahlung gewonnenen Isolaten durchgeführt werden (Abbildung 4.11A-D). Alle ausgewählten microRNAs konnten auch in qPCR Analysen in den nach 24 h isolierten Proben erfolgreich nachgewiesen werden und die zuvor mittels NGS ermittelten Regulationen konnten zumindest tendenziell in den allermeisten Proben bestätigt werden. Auch in nach 48h isolierten Exosomen war die zum früheren Zeitpunkt gefundene Regulation weiterhin sichtbar. 12h nach Behandlung gewonnene Exosomenisolate zeigten, wie auch bei den Proteinanalysen gefunden (siehe AP2) keinen reproduzierbaren Nachweis von miRNAs. Es ist davon auszugehen, dass die zu diesem Zeitpunkt akkumulierte Menge an Exosomen für einen Nachweis nicht ausreichte.

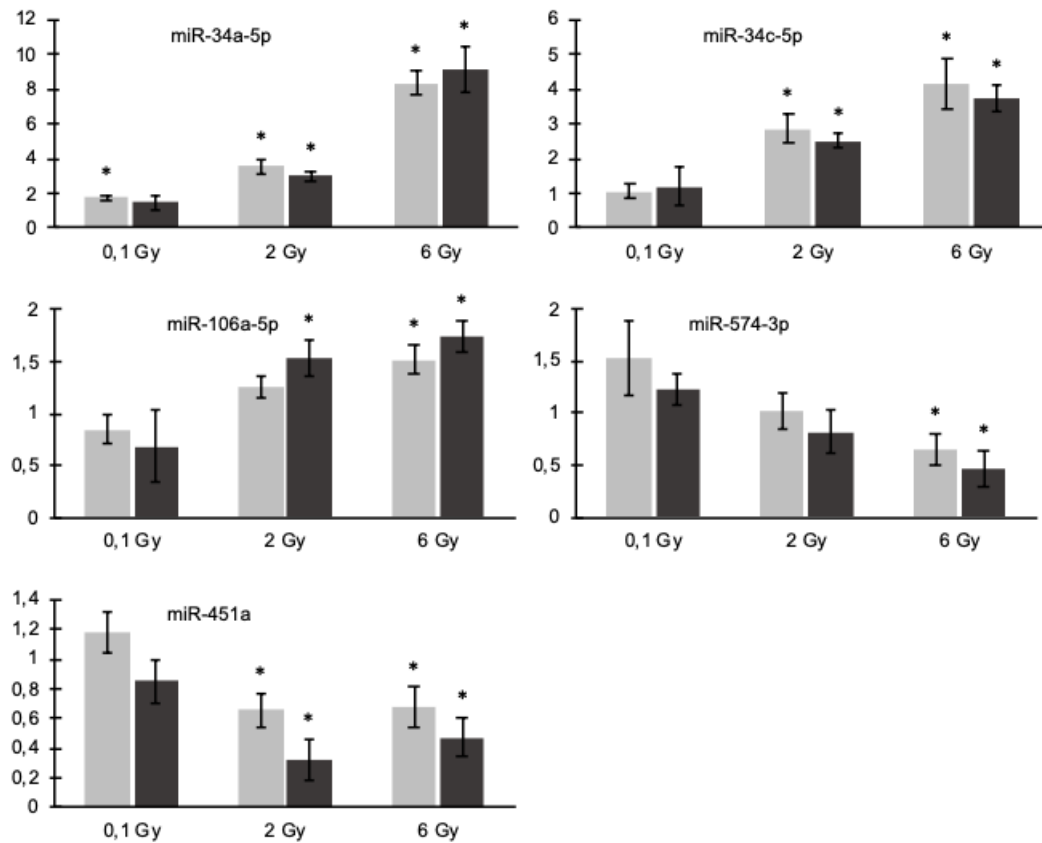


Abbildung 4.11A. microRNA Expression in Exosomen aus Leukozyten. Die Expression ausgewählter microRNAs wurde mittels qPCR gemessen. Auf der y-Achse ist die n-fache Regulation im Vergleich zu Exosomen aus unbestrahlten Zellen gezeigt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten $\pm$ Standardabweichung, * $p \leq 0,05$ (Student T-Test), hellgrau = Regulation nach 24 h, dunkelgrau = Regulation nach 48h).

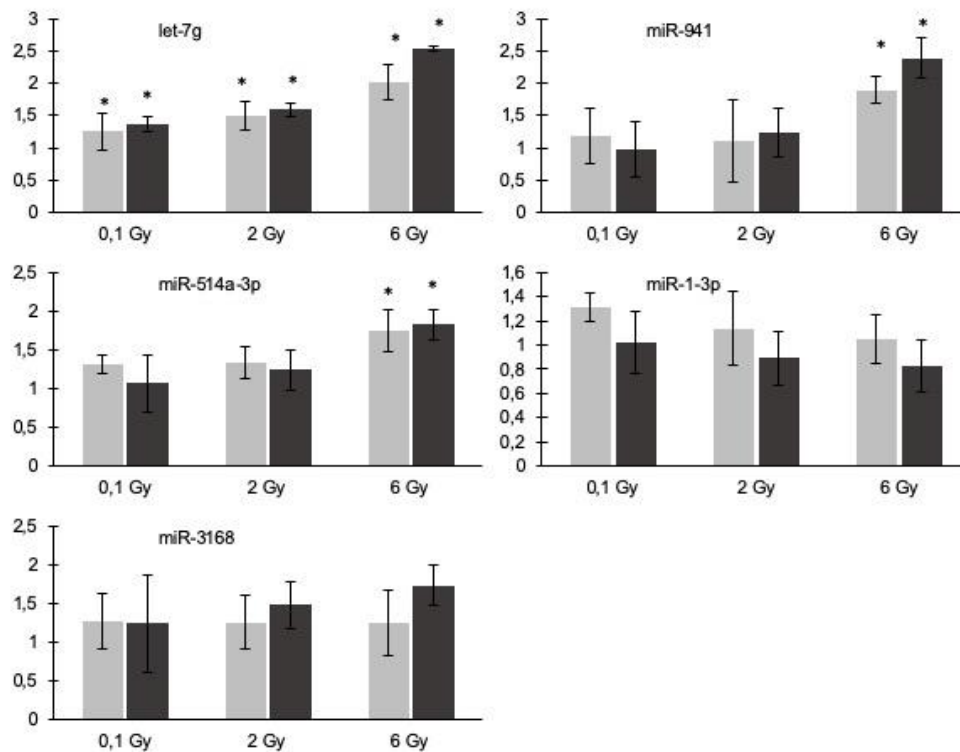


Abbildung 4.11B: microRNA Expression in Exosomen aus MCF10A. Die Expression ausgewählter microRNAs wurde mittels qPCR gemessen. Auf der y-Achse ist die n-fache Regulation im Vergleich zu Exosomen aus unbestrahlten Zellen gezeigt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten $\pm$ Standardabweichung, * $\leq 0,05$ (Student T-Test), hellgrau = Regulation nach 24 h, dunkelgrau = Regulation nach 48h.

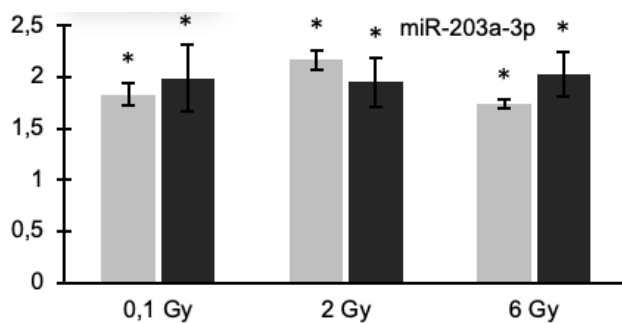


Abbildung 4.11C: microRNA Expression in Exosomen aus 1BR.3. Die Expression ausgewählter microRNAs wurde mittels qPCR gemessen. Auf der y-Achse ist die n-fache Regulation im Vergleich zu Exosomen aus unbestrahlten Zellen gezeigt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten $\pm$ Standardabweichung, * $p \leq 0,05$ (Student T-Test), hellgrau = Regulation nach 24 h, dunkelgrau = Regulation nach 48h).

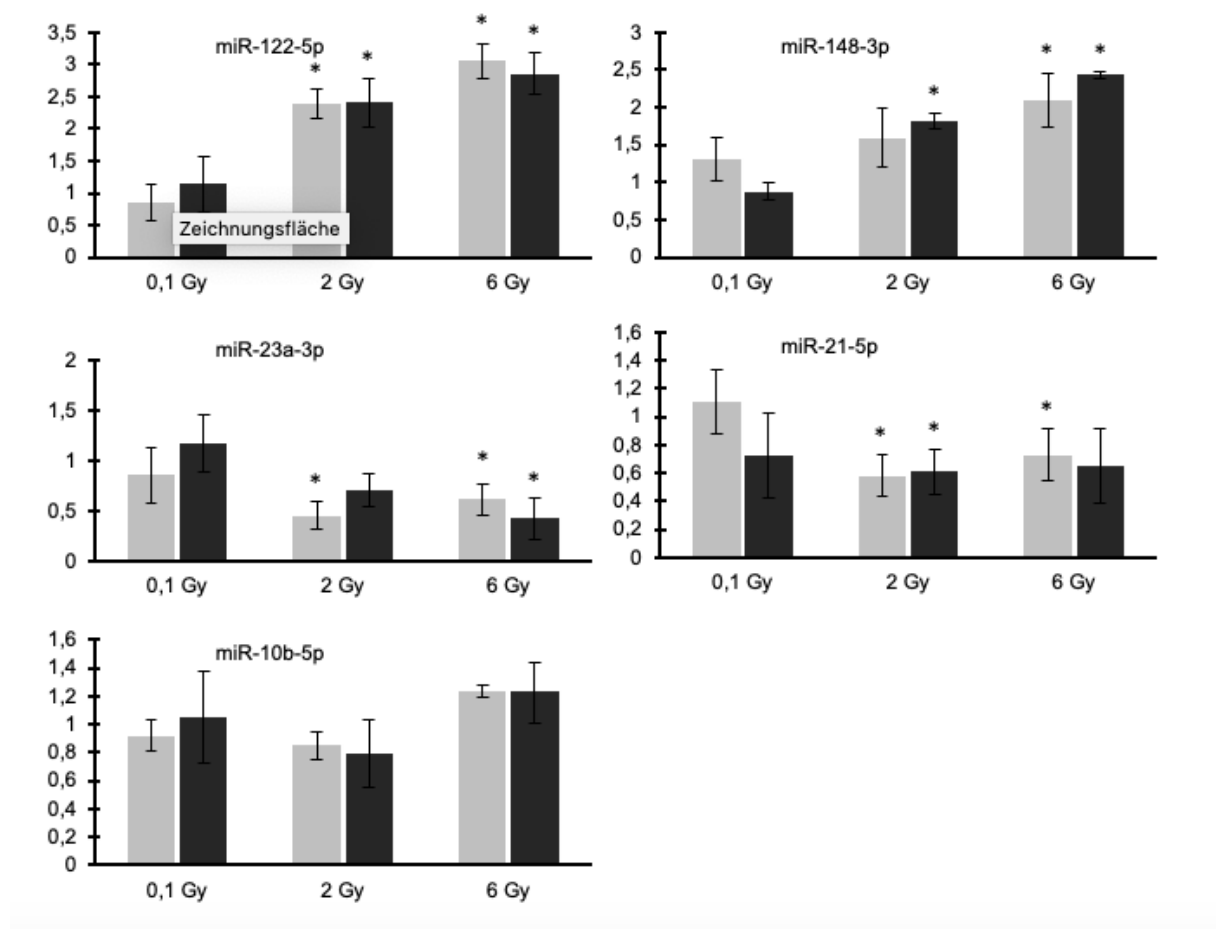


Abbildung 4.11D. microRNA Expression in Exosomen aus HCAEC. Die Expression ausgewählter microRNAs wurde mittels qPCR gemessen. Auf der y-Achse ist die n-fache Regulation im Vergleich zu Exosomen aus unbestrahlten Zellen gezeigt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten $\pm$ Standardabweichung, * $p \leq 0,05$ (Student T-Test), hellgrau = Regulation nach 24 h, dunkelgrau = Regulation nach 48h).

4.5. Zusammenfassung

Die molekulare Zusammensetzung von Exosomen zeigt sich charakteristisch für verschiedene pathologische Bedingungen (Nilsson 2009) und zahlreiche Studien schlagen Exosomen als attraktive Biomarker mit diagnostischen Potential in verschiedenen Erkrankungen vor (Al-Nedawi et al. 2009, De Toro et al. 2015). In dieser Studie zeigen wir, dass ionisierende Strahlung Veränderungen in der microRNA-Zusammensetzung von Exosomen aus verschiedenen gesunden Spenderzellen induziert. Diese Veränderungen waren überwiegend

zelltyp-spezifisch und keine einzige microRNA wurde in allen Zelltypen als strahlenreguliert gefunden. Interessanterweise konnte für einige microRNAs eine Dosis-abhängige Regulation gefunden werden, was diese als Kandidaten in der Biodosimetrie nahelegt.

Die in dieser Studie identifizierte strahlen-regulierten microRNAs sollten unter weiteren experimentellen Bedingungen untersucht werden um deren zeit- und dosis-abhängige Regulation detaillierter aufzuklären. Ebenso wie die Proteinzusammensetzung von Exosomen aus Leukozyten, ermutigen auch die Daten der microRNA-Analysen zu weiteren Projekten in denen das Potential exosomaler microRNAs in der Biodosimetrie analysiert wird.

Der exosomen-vermittelte Transfer von microRNAs ist von pysiologischer Bedeutung und microRNAs aus Exosomen werden in Empfängerzellen internalisiert und verändern deren Phänotyp (Valadi et al., 2007). Die in dieser Studie gefunden Daten eröffnen die interessante Frage nach den Funktionen exosomaler microRNAs in der Strahlenantwort von gesunden, nicht malignen Zellen.

4.5 Literatur

Al-Nedawi K, Meehan B, Rak J. 2009. Microvesicles: messengers and mediators of tumor progression. Cell cycle. Jul 1;8:2014-2018. Epub 2009/06/19.

Arscott WT, Tandle AT, Zhao S, Shabason JE, Gordon IK, Schlaff CD, Zhang G, Tofilon PJ, Camphausen KA. 2013. Ionizing radiation and glioblastoma exosomes: implications in tumor biology and cell migration. Translational oncology. Dec 1;6:638-648.

Chevillet JR, Kang Q, Ruf IK, Briggs HA, Voitech LN, Hughes SM, Cheng HH, Arroyo JD, Meredith EK, Gallichotte EN, Pogosova-Agadjanyan EL, Morrissey C, Stirewalt DL, Hladik F, Yu EY, Higano CS, Tewari M Quantitative and stoichiometric analysis of the microRNA content of exosomes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Oct 14;111(41):14888-93. doi: 10.1073/pnas.1408301111. Epub 2014 Sep 29.

De Toro J, Herschlik L, Waldner C, Mongini C. 2015. Emerging roles of exosomes in normal and pathological conditions: new insights for diagnosis and therapeutic applications. *Front Immunol*.6:203. Epub 2015/05/23.

Yanez-Mo M, Siljander PR, Andreu Z, Zavec AB, Borrás FE, Buzas EI, Buzas K, Casal E, Cappello F, Carvalho J, et al. 2015. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of extracellular vesicles*.4:27066.

Yentrapalli R, Merl-Pham J, Azimzadeh O, Mutschelknaus L, Peters C, Hauck SM, Atkinson MJ, Tapio S, Moertl S. 2017. Quantitative changes in the protein and miRNA cargo of plasma exosome-like vesicles after exposure to ionizing radiation. *International journal of radiation biology*. Jun;93:569-580. Epub 2017/03/08.

Buschmann D, Kirchner B, Hermann S, Märte M, Wurmser C, Brandes F, Kotschote S, Bonin M, Steinlein OK, Pfaffl MW, Schelling G, Reithmair M Evaluation of serum extracellular vesicle isolation methods for profiling miRNAs by next-generation sequencing. *J Extracell Vesicles*. 2018 Jun 4;7(1):1481321. doi: 10.1080/20013078.2018.1481321. eCollection 2018.

Kong Y Btrim: a fast, lightweight adapter and quality trimming program for next-generation sequencing technologies. *Genomics*. 2011 Aug;98(2):152-3. doi: 10.1016/j.ygeno.2011.05.009. Epub 2011 May 30.

RNAcentral Consortium, Petrov AI, Kay SJE, Gibson R, Kulesha E, Staines D, Bruford EA, Wright MW, Burge S, Finn RD, Kersey PJ, Cochrane G, Bateman A, Griffiths-Jones S, Harrow J, Chan PP, Lowe TM, Zwiab CW, Wower J, Williams KP, Hudson CM, Gutell R, Clark MB, Dinger M, Quek XC, Bujnicki JM, Chua NH, Liu J, Wang H, Skogerboe G, Zhao Y, Chen R, Zhu W, Cole JR, Chai B, Huang HD, Huang HY, Cherry JM, Hatzigeorgiou A, Pruitt KD RNAcentral: an international database of ncRNA sequences. *Nucleic Acids Res*. 2015 Jan;43(Database issue):D123-9. doi: 10.1093/nar/gku991. Epub 2014 Oct 28.

Langmead B1, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL
Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol*. 2009;10(3):R25. doi: 10.1186/gb-2009-10-3-r25. Epub 2009 Mar 4.

Kozomara A1, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2014 Jan;42(Database issue):D68-73. doi: 10.1093/nar/gkt1181. Epub 2013 Nov 25.

Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014;15(12):550.

Szatmári T, Persa E, Kis E, Benedek A, Hargitai R, Sáfrány G, Lumniczky K.

Extracellular vesicles mediate low dose ionizing radiation-induced immune and inflammatory responses in the blood. *Int J Radiat Biol.* 2018 Mar 29:1-11.

Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO

Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007 Jun;9(6):654-9. Epub 2007 May 7.

5. Bestimmung von microRNAs und ausgewählten Proteinen in Exosomen von Radiotherapiepatienten

5.1 Aufgabenstellung AP5

In diesem Arbeitspaket wurde untersucht, in wieweit exosomale Strahlenexpositionsmarker die von Lymphozyten freigesetzt wurden (AP2 und AP4) auch nach *in vivo* Bestrahlung nachgewiesen werden können. Außerdem wurde die Stabilität von strahleninduzierten Veränderungen untersucht. Dazu wurden Proteine und microRNAs in Exosomen analysiert, die aus dem Blutplasma von Strahlentherapiepatienten isoliert wurden. Die Analysen erfolgten mittels Western Blot und qPCR für ausgewählte Kandidaten, die in AP2 und AP4 detektiert wurden. Als Patientenkollektiv dienten 30 Plasmaproben von Brustkrebspatientinnen. Es wurden Proben vor und nach Ende (6 Wochen, 3 Monate) der Strahlentherapie analysiert. Die Daten der *in vitro* Bestrahlungsexperimenten wurden mit den *in vivo* Daten korreliert.

5.2 Hintergrund

Exosomen sind extrazelluläre Vesikel, die von allen bisher untersuchten Zellen durch Fusion intrazellulärer multivesikulärer Körperchen mit der Plasmamembran sekretiert werden. Sie werden in allen Körperflüssigkeiten nachgewiesen und beinhalten Nukleinsäuren, Lipide und Proteine, die sich sowohl im Inneren von Exosomen als auch auf deren Oberflächen befinden können (Yanez-Mo et al. 2015). Im Gegensatz zu anderen extrazellulären Vesikeln zeigen Exosomen eine homogene Größenverteilung zwischen 50 und 200 nm.

Funktionell sind Exosomen an einer Vielzahl biologischer Funktionen, sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Bedingungen, beteiligt. Beispielsweise tragen aus Tumorzellen sekretierte Exosomen zur Tumorigenese, Bildung von Metastasen und auch zur Regulation der Aktivität von Immunzellen bei. Auch Exosomen aus Immunzellen sind wesentlich an der Regulation der Immunantwort beteiligt.

Einige Studien charakterisierten bereits die Proteinbeladung von Exosomen aus verschiedenen Zelltypen und auch stress-induzierte Veränderungen sind bereits beschrieben

(de Jong et al. 2012). Erste wenige Studien beschreiben durch ionisierende Strahlung induzierte Veränderungen in Zellkultursystemen oder nach ex vivo Bestrahlung von Blut (Arscott et al. 2013, Jelonek et al. 2015, Yentrapalli et al. 2017, Mutschelknaus et al. 2017).

5.3 Durchführung

5.3.1 Patientenkollektiv

Die untersuchten Proben sind Bestandteil der IMEP-Studie (Immunologische und epigenetische Phänomene der lokalen Strahlentherapie), die im Zeitraum von August 2012 bis Mai 2013 am Klinikums Rechts der Isar durchgeführt wurde. Die Proben wurden von Brustkrebspatientinnen gewonnen, die bei einem invasiven Mamma-Karzinom mit einer adjuvanten Strahlentherapie nach Brusterhaltender Operation behandelt wurden. Patientinnen mit Zweittumoren, Metastasen oder vorangegangenen Strahlentherapien bzw. immunsuppressiver Therapien wurden ausgeschlossen. Alle Plasmaproben wurden konstant bei -80°C gelagert. Die Proben wurden 6 Wochen und 3 Monate nach der Therapie genommen. Als Kontrolle dienten gepoolte Proben von jeweils drei gesunden Spendern.

5.3.2 Isolierung von Exosomen

Exosomen wurden aus 500 µl Plasma isoliert. Dazu wurden die Proben zunächst mit 300 g, (10 min, 4 °C) zur Abtrennung von Zellen und dann mit 10.000 g (30 min, 4 °C) zur Entfernung von Zellfragmenten zentrifugiert. Anschließend wurde das Plasma zur Entfernung größerer Vesikel filtriert (0,22 µm Porengröße). Die Präzipitation der Exosomen erfolgte mittels miRCURY Exosome Isolation Kit (Exiqon, #300102). Dazu wurden je 500 µl Plasma mit 200 µl Precipitation Buffer versetzt, gut gemischt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Exosomen durch Zentrifugation (3200 g, 30 min, RT) pelletiert, der Überstand verworfen und die Exosomen in 35 µl Lyse-Puffer resuspendiert.

5.3.3 Partikelanalyse

Die Größenverteilung und Konzentration isolierter Exosomen wurde im Nanosight LM10

Mikroskop (Malvern) analysiert. 2 µl Exosomenpräparationen wurden im Verhältnis 1:600 mit H₂O verdünnt um eine ungefähre Konzentration von 15 bis 50 Partikel pro Bildausschnitt für die Bewegungsanalyse zu haben. Jede Probe wurde dreimal für jeweils 30 s gemessen.

5.3.4 RNA Isolierung

Die Isolierung von miRNAs aus Exosomen erfolgte mittels miRCURY RNA Isolation Kit (Exiqon, #300110) nach den Angaben des Herstellers. Die Konzentration der RNA Proben wurde mittels Nanodrop durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die RNA Isolate bei -80°C gelagert.

5.3.5 Quantifizierung spezifischer microRNAs

Die Expressionsbestimmung ausgewählter miRNAs erfolgte mittels quantitativer real-time PCR. Dazu wurde die miRNAs zuerst in cDNA transkribiert (TaqMan Advanced MicroRNA cDNA Synthesis Kit, Applied Biosystems). Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Dieses Kit beinhaltet keine spezifischen Primer und die generierte cDNA kann für alle zu analysierenden miRNAs eingesetzt werden.

Für die anschließende qPCR wurde das TaqMan Advanced miRNA Kit (#A25576, Applied, Biosystems) verwendet. Die Durchführung erfolgte ebenfalls nach den Herstellerangaben mit 20 µl einer 1:5 Verdünnung der zuvor erzeugten cDNA und den entsprechenden TaqMan Advanced microRNA Primern (Applied Biosystems).

5.3.6 Quantifizierung der Proteinmenge

Die Proteinmenge in Exosomenlysaten wurde mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Die Bestimmungslösung bestand aus einer Mischung von BCA Reagent A und BCA Reagent B im Verhältnis 50:1. 200 µl dieser Lösung wurden mit 20 µl verdünntem Lysat gemischt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 562 nm gemessen (Infinite® 200 PRO (Tecan)). Die Proteinmenge wurde anhand einer Kalibrierkurve mit BSA in bekannten Konzentrationen ermittelt.

5.3.7 Quantifizierung spezifischer Proteine

Die Quantifizierung spezifischer exosomaler Proteine erfolgte mittels Western Blot. Die Lyse von Exosomen erfolgte durch Zugabe von 20 µl Lyse-Puffer II (25 mM Tris pH 7.5, 120 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% PSMF, 1 mM NOV, 1 mM Leupeptin) zu 40 µl Exosomen-Suspension (isoliert aus 1.5×10^7 Zellen). Dazu wurden die Proben 4 h auf Eis unter wiederholtem Mischen inkubiert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration mittels BCA-Technologie ermittelt (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific). Anschließend wurden 2 µg exosomale Proteine nach einem Standard Western Blot Protokoll analysiert. Folgende Antikörper wurden verwendet: Anti- ALIX (#2171, Cell Signaling), anti-CD9 (sc-13118, Santa Cruz), anti-TSG101 (GTX70255, GeneTex), anti-Calnexin (sc11397, SantaCruz), anti-ITIH4 (ab118283, Abcam), anti-VWF (sc-53466, Santa Cruz), anti-Ku70 (sc-5309, Santa Cruz), anti-ENO (sc-271384, Santa Cruz). Als sekundäre Antikörper dienten die Meerrettich-Peroxidase konjugierter Antikörper (anti-rabbit: sc-2004 und anti-mouse: sc-2005) und die Detektion erfolgte mittels Chemolumineszenz (Amersham ECL reaction kit, GE Healthcare). Die Normalisierung aller Proteinexpressionen erfolgte auf die Gesamtproteinmenge (Ponceau-Färbung).

5.4 Ergebnisse

5.4.1 Charakterisierung von Exosomen aus Plasma

Zur Isolierung von Exosomen wurde aufgrund der geringen Menge des vorhandenen Ausgangsmaterials die Methode der Exosomen Präzipitation anstelle der in AP2-AP4 verwendeten differentiellen Zentrifugation eingesetzt. Vorversuche an Plasmaproben von gesunden Spendern zeigten, dass mit dem ursprünglichen Protokoll keine ausreichenden miRNA bzw. Protein Mengen gewonnen werden konnten (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu konnte mittels Präzipitation ausreichende Mengen an Exosomen aus 500 µl Plasma isoliert werden. Die Charakterisierung der Exosomen erfolgte mittels Nanopartikelanalyse und Nachweis von Exosomenmarkerproteinen exemplarisch an drei biologischen Replikaten von gesunden Spendern. Sowohl die Größenverteilung (mittlerer Durchmesser 140 nm) als auch der Nachweis von Exosomenmarkerproteinen bestätigt die Isolierung von Exosomen

(Abbildung 5.1). Darüberhinaus zeigt der negative Nachweis von Calnexin die Abwesenheit zellulärer Verunreinigungen an.

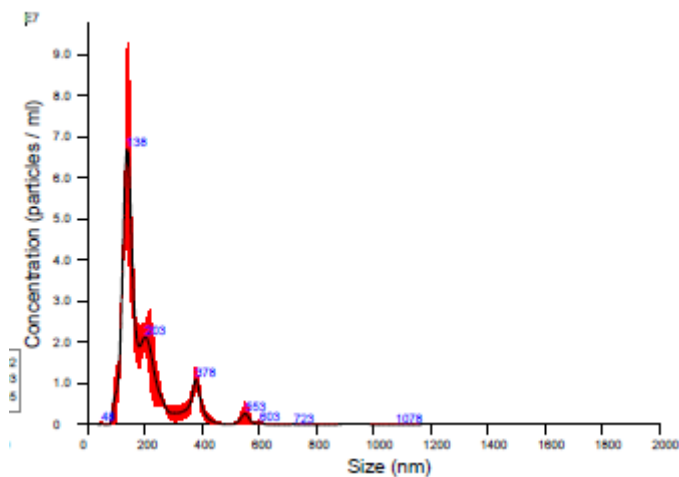
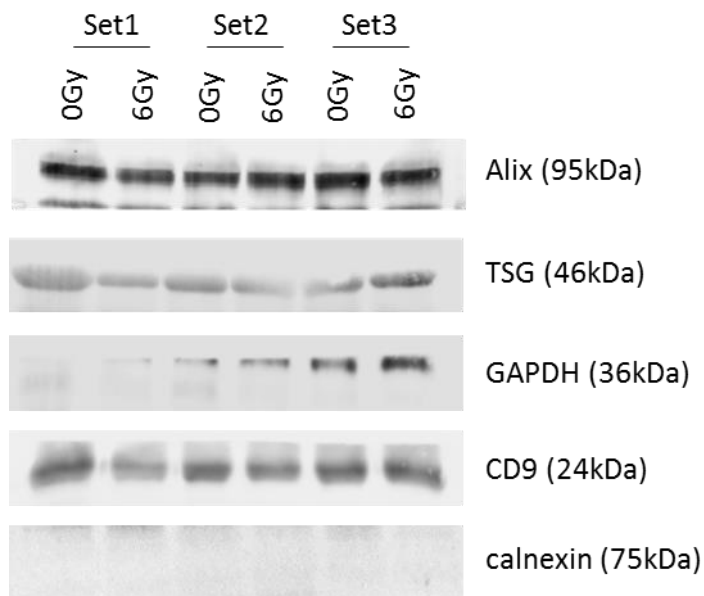


Abbildung 5.1: Western Blot von Exosomen aus dem Plasma gesunder Spender (oben), Partikelanalyse von Exosomen aus Plasma (gesunder Spender) mittels *Nanosight Tracking Analysis* (unten).

5.4.2 Quantifizierung exosomaler RNA bzw. Proteinmengen

Als ersten Schritt zur Analyse der aus dem Blut von Strahlentherapiepatienten gewonnenen Exosomen erfolgte die Quantifizierung der isolierten RNA bzw. Proteinmenge. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.1 und Abbildung 5.2 zusammengefasst. Die RNA Menge lag in allen untersuchten Proben zwischen 90 und 600 ng RNA aus 500 µl Plasma (Volumen aus dem Exosomen isoliert wurden). Die gewonnenen Proteinmengen lagen zwischen 850 und 2300 µg. Weder die RNA noch die Proteinmenge zeigte signifikante Veränderungen im Verlauf der Therapie.

Tabelle 5.1: RNA und Proteinmengen in Exosomen, die aus Plasma von Strahlentherapiepatienten isoliert wurden. ES/MS Initialen der Probennehmer.

Nr.	Sample	Entnahme	RNA ng/μl	Protein μg/μl
1	AE081040	01.10.12 ES	13,11	56,9
2	AE081040	11.01.13 ES	2,71	46,7
3	AE081040	08.07.13 MS	5,64	--
4	AW171046	02.11.12 ES/MS	3,43	37,3
5	AW171046	11.02.13 ES/MS	4,32	34,6
6	AW171046	24.07.13	3,28	34,2
7	CF030768	22.11.12 ES/MS	2,13	51,4
8	CF030768	05.03.13 ES/MS	6,35	62,9
9	CF030768	05.08.13 ES/MS	10,62	--
10	DN090861	05.11.12 ES/MS	6,81	35,2
11	DN090861	13.02.13 ES/MS	8,4	35,9
12	DN090861	13.08.13 ES	5,74	
13	GR210936	29.10.12 ES/MS	10,35	52,4
14	GR210936	12.02.13 ES	7,94	42,9
15	GR210936	21.05.13 ES/MS	5,28	--
16	GS010152	19.11.12 ES/MS	6,52	42,9
17	GS010152	19.02.13 ES/MS	10,14	--
18	GS010152	30.07.13 ES/MS	16,75	--
19	HD271049	23.10.12 MS/ES	7,82	24,4
20	HD271049	29.01.13 ES	8,31	--
21	HD271049	30.04.13 ES/MS	6,63	64,9
22	IB180540	19.11.12 ES/MS	12,28	30,5
23	IB180540	12.03.13 ES/MS	6,42	--
24	IB180540	02.09.13 ES/MS	20,5	--
25	IR190966	13.11.12 ES/MS	13,64	38,4
26	IR190966	11.02.13 ES/MS	24,37	58,5
27	IR190966	11.06.13 ES/MS	6,95	--
28	IR300766	31.10.12 ES/MS	7,28	66,2
29	IR300766	01.03.13 ES	18,72	--
30	IR300766	04.09.13 ES/MS	16,37	--

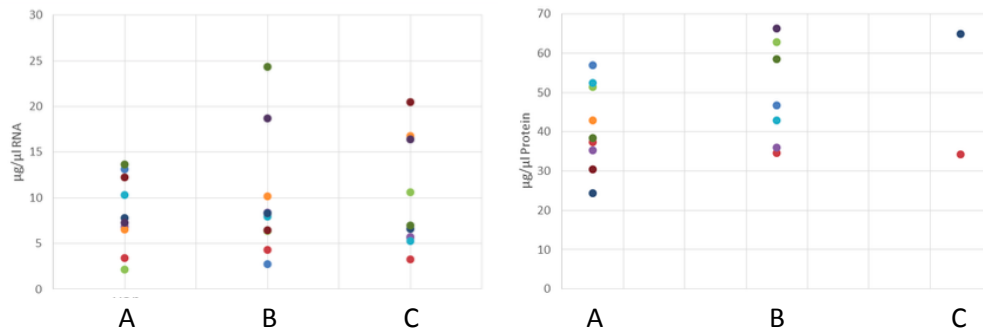


Abbildung 5.2: RNA (links) und Proteinmengen (rechts) in Exosomen aus Strahlentherapiepatienten vor Bestrahlungsbeginn (A) und 6 Wochen (B) bzw. 3 Monate (C) nach der Therapie.

5.4.3 Quantifizierung spezifischer microRNAs

Mittels qPCR wurden ausgewählte microRNAs in Exosomen aus Strahlentherapiepatienten quantifiziert. Die microRNAs wurden aufgrund der Ergebnisse von AP4 ausgewählt. Die Kriterien waren eine strahleninduzierte Regulation in Exosomen aus Lymphozyten und zusätzlich ein ausreichendes Expressionsniveau (Tabelle 5.2). Auf dieser Grundlage wurden die microRNAs let-7e, miR-34a-5p, miR-106a-5p, miR-155-5p und miR-451 für die Bestimmung ausgewählt. Vier der fünf ausgewählten microRNAs konnten in den Patientenproben gut detektiert werden. Allein miR-34a-5p lag in vielen Präparationen unter der Nachweisgrenze. Tabelle 5.3 und Abbildung 5.3 zeigt die n-fache Veränderung dieser microRNAs 6 Wochen und 3 Monate nach Therapieende im Vergleich zur Expression vor Bestrahlungsbeginn. Insgesamt konnte für die allermeisten Proben strahleninduzierte Veränderungen festgestellt werden, was zeigt, dass ionisierende Strahlung die Exosomenzusammensetzung nach Therapieende beeinflusst. Inwieweit es sich dabei um stabile, über mehrere Monate anhaltende oder spät auftretende Effekte handelt, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Die über alle Patienten konsistenteste Veränderung zeigte miR-155-5p, die in 18 von 20 untersuchten Proben nach Bestrahlung hochreguliert gefunden wurde.

Tabelle 5.2: n-fache Regulation ausgewählter exosomaler microRNAs aus primären Lymphozyten. Die Expression wurde auf miR-26a-5p normalisiert. (siehe AP 4)

<u>microRNA</u>	0,1 Gy	2 Gy	6 Gy
<i>Let-7e-5p</i>	2,5	1	0,5
<i>miR-34a-5p</i>	1	6,7	6,8
<i>miR-34c-5p</i>	1	1	2,7
<i>miR-106a-5p</i>	1	2,6	2,4
<i>miR-155-5p</i>	1	2,1	1,4
<i>miR-451a</i>	1	0,4	0,3

Tabelle 5.3: n-fache Veränderung von microRNAs 6 Wochen und 3 Monate nach Ende der Strahlentherapie im Vergleich zu den entsprechenden unbestrahlten Proben

let-7e	3 Wochen	6 Monate
AE081040	0,82	1,36
AW171046	2,69	1,33
CF030768	0,44	1,01
DN090861	1,51	1,26
GR210936	0,52	0,58
GS010152	7,13	7,12
HD271049	1,57	0,6
IB180540	2,44	3,17
IR190966	7,65	1,69
IR300766	1,17	0,83

miR-155-5p	3 Wochen	6 Monate
AE081040	0,69	1,75
AW171046	5,19	1,82
CF030768	2,37	2,56
DN090861	3,77	1,81
GR210936	3,76	2,4
GS010152	28,27	7,98
HD271049	4,2	0,56
IB180540	2,56	7,53
IR190966	12,95	4,55
IR300766	2,8	1,92

miR-106a-5p	3 Wochen	6 Monate
AE081040	0,71	0,2
AW171046	2,18	1,24
CF030768	0,63	0,99
DN090861	0,95	0,97
GR210936	3,21	0,18
GS010152	n.d.	n.d.
HD271049	0,98	0,31
IB180540	n.d.	0,04
IR190966	2,82	1,33
IR300766	1,14	0,24

miR-451	3 Wochen	6 Monate
AE081040	0,63	0,42
AW171046	0,52	0,93
CF030768	0,49	2,91
DN090861	0,95	1,35
GR210936	1,49	1,62
GS010152	1,1	1,84
HD271049	0,83	0,21
IB180540	1,31	1,25
IR190966	0,91	1,09
IR300766	0,61	0,17

miR-34a-5p	3 Wochen	6 Monate
AE081040	n.d.	n.d.
AW171046	n.d.	n.d.
CF030768	1,09	2,12
DN090861	n.d.	2,62
GR210936	0,42	3,12
GS010152	n.d.	n.d.
HD271049	n.d.	n.d.
IB180540	n.d.	n.d.
IR190966	n.d.	16,70
IR300766	22,49	n.d.

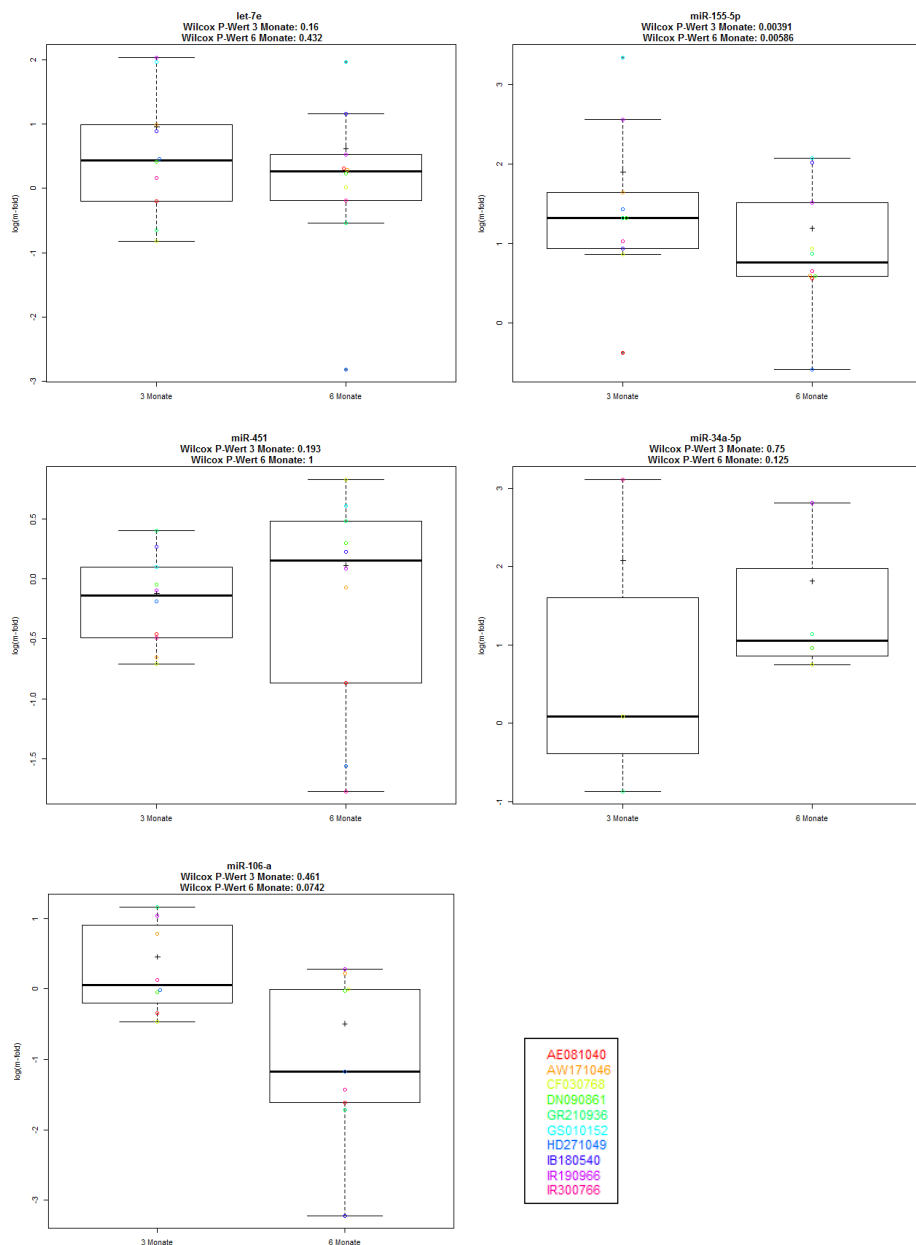


Abbildung 5.3: Deregulation exosomaler miRNAs im Plasma von Strahlentherapiepatientinnen. Gezeigt ist die n-fache Veränderung (3 Wochen bzw. 6 Monate) im Vergleich zu unbestrahlten Proben.

Interessanterweise wurde miR-155-5p auch akut nach Bestrahlung (72h)* in Exosomen aus Lymphozyten von gesunden Spendern erhöht gefunden. Somit könnten akut nach Bestrahlung aus Lymphozyten freigesetzte Exosomen zu einer erhöhten exosomalen miR-155-5p Konzentration im Plasma von Strahlentherapiepatienten beitragen. Da Exosomen in der Lage sind von anderen Zellen aufgenommen zu werden und ihren Inhalt an die Empfängerzelle abgeben, könnte ein erhöhter miR-155-5p Gehalt auch zu funktionellen Auswirkungen in Empfängerzellen führen. * (in vitro)

miR-155-5p wird derzeit als Schlüsselregulator in der Immunantwort beschrieben der besonders bei der Regulation von Entzündungsprozessen an der Aktivierung von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen beteiligt ist (Alivernini, 2018).

5.4.4 Quantifizierung spezifischer Proteine

Mittels Western Blot wurden ausgewählte Proteine in Exosomen aus Strahlentherapiepatientinnen quantifiziert. Die Proteine wurden aufgrund der Ergebnisse von AP2 ausgewählt. Die Kriterien waren analog zu den ausgewählten microRNAs, eine strahleninduzierte Regulation in Exosomen aus Lymphozyten und zusätzlich ein ausreichendes Expressionsniveau (Tabelle 5.4). Auf dieser Grundlage wurden die Proteine Ku70, ITIH4, VWF und ENO1 für die Bestimmung ausgewählt. Zusätzlich wurden in allen Proben die Exosomenmarkerproteine Alix, CD9 und Tsg101 bestimmt. CD9, ENO1 und VWF zeigten im Mittel über alle Patienten keine strahleninduzierte Veränderungen. Für Alix ist ein Trend zu einer erhöhten Expression nach Bestrahlung ersichtlich.

Tabelle 5.4: n-fache Regulation ausgewählter Proteine in Exosomen aus primären Lymphozyten. (siehe AP 2)

<i>Protein</i>	<i>0,1 Gy</i>	<i>2 Gy</i>	<i>6 Gy</i>
<i>VWF</i>	0,4	0,5	0,4
<i>ENO1</i>	1	1	1,5
<i>Ku70</i>	1,2	1,5	1,8
<i>ITIH4</i>	1	0,5	0,004

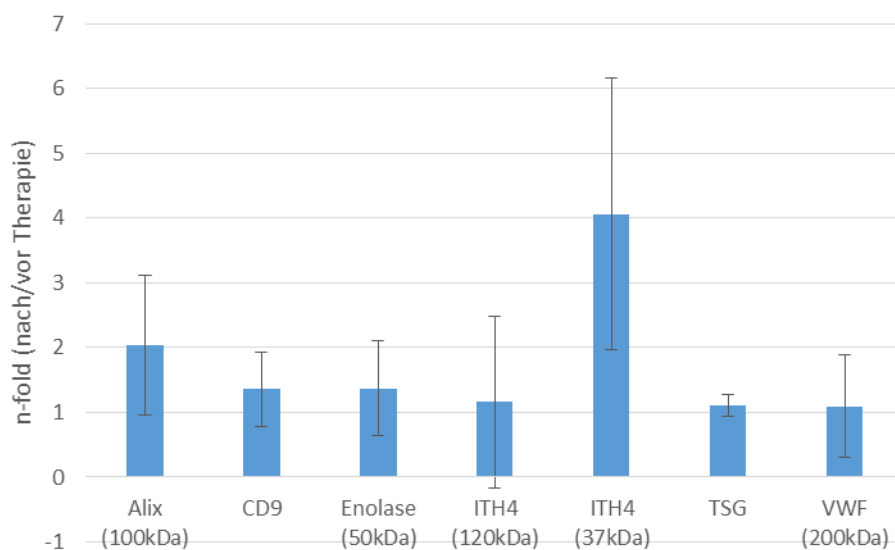
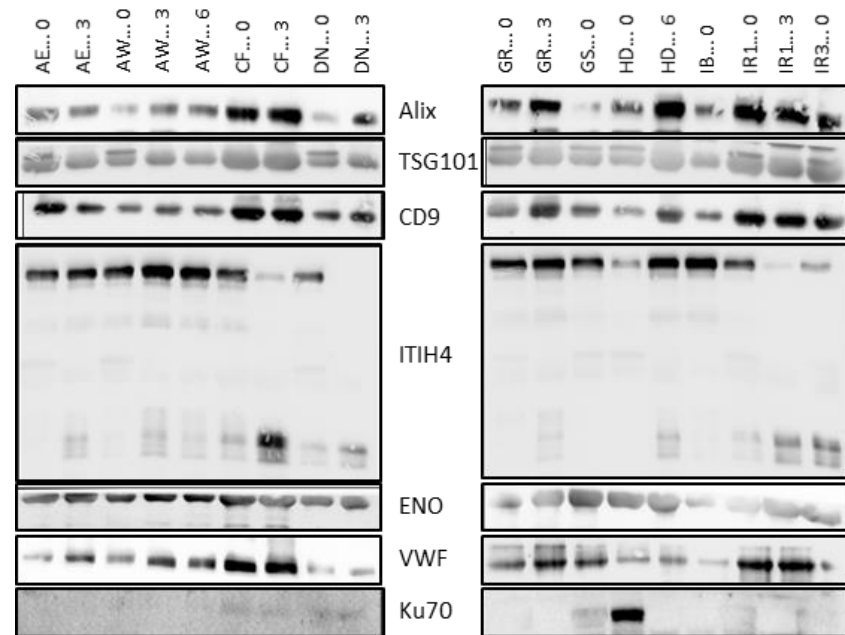


Abbildung 5.4: Western Blot Analyse ausgewählter exosomaler Proteine, die aus dem Blut von Strahlentherapiepatienten isoliert wurden (oben). Mittelwerte der N-fachen Veränderungen in der Proteinexpression in Proben die nach der Therapie gewonnen wurden im Vergleich zu Proben vor Therapiebeginn (unten). Die beiden Zeitpunkte wurden gemeinsam ausgewertet.

Die konstantesten Veränderungen zeigte ITIH4. Die trunkierte Form dieses Proteins (35 kDa) lag in allen sieben analysierten Patienten nach Bestrahlung in erhöhter Menge vor ($p=0,0004$,

T-Test). ITIH4 (Plasma-Kallikrein sensitives Glykoprotein) ist ein Mitglied der Inter-alpha-Trypsin Inhibitor (ITI) Familie. Als einziges Mitglied dieser Familie beinhaltet ITIH4 eine C-terminale Sequenz, welche durch Plasma Kallikrein gespalten werden kann und zu zwei Fragmenten in den Größen 100 kDa und 35 kDa führt. Besonders das 35 kDa Fragment wird derzeit als Biomarker für Entzündungsprozesse nach Traumata untersucht. Darüber hinaus gibt es auch Hinweise auf eine erhöhte Expression des 35 kDa Fragments bei Gebärmutter-, Eierstock- und Brustkrebs (Mohamed, 2013).

5.4.5 Endogene MicroRNA- und Proteinexpression in Brustkrebspatientinnen

Exosomen in Körperflüssigkeiten werden mittlerweile häufig als Biomarker für Diagnose, Prognose und Therapieansprechen bei zahlreichen Erkrankungen diskutiert. Auch bei Brustkrebserkrankungen sind Veränderungen in der Exosomenmenge und Beladung beschrieben (Gonzalez-Villasana, 2019). In diesem Kontext wurde sowohl die aus Exosomen gewonnene Gesamt-RNA und Proteinmenge wie auch spezifische miRNAs und Proteine zwischen gesunden Spendern (Tabelle 5.5) und Strahlentherapiepatientinnen (Tabelle 5.1) verglichen. Es konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede in den exosomalen Protein- oder microRNA-Mengen zwischen gesunden Spendern und ehemaligen Strahlentherapiepatienten nachgewiesen werden.

Tabelle 5.5: exosomale RNA und Proteinmengen isoliert aus dem Plasma gesunder Spender

Plasma	ng/μl RNA 0 Gy	ng/μl RNA 6 Gy	μg/μl Protein 0 Gy	μg/μl Protein 6 Gy
Pool 1	9,43	10,67	47,5	42,4
Pool 2	10,59	5,60	54,8	46,6
Pool 3	8,66	4,62	57,7	47,6
Donor 1.1	8,63	--	40,3	--
Donor 1.2	9,81	--	33,3	--

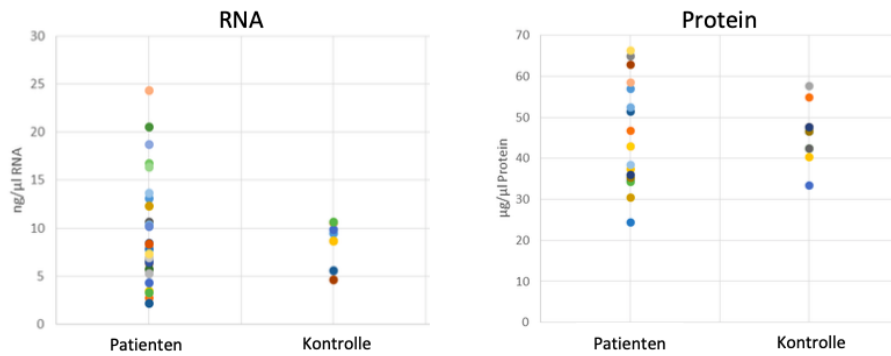


Abbildung 5.5: RNA- (links) und Proteinkonzentration (rechts) in Exosomen, die aus Plasma von Brustkrebspatientinnen (vor und nach Bestrahlung) und gesunden Spendern (unbestrahlt) isoliert wurden. Bei den Patientinnen werden die beiden Zeitpunkte nach Bestrahlung werden gemeinsam betrachtet.

Neben der absoluten Menge an RNA wurden auch spezifische microRNAs quantifiziert. Dabei waren die microRNAs let-7e, miR-106a-5p, miR-155-5p und miR-451a in Exosomen sowohl von gesunden Spendern als auch von Strahlentherapiepatienten nachweisbar. Ein Vergleich der relativen Expressionen zeigte für let-7e, miR-155-5p und miR-451a keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. miR-106a-5p war in der Kontrollgruppe signifikant höher exprimiert (Abb.6). Diese microRNA ist in der Literatur als Tumorsuppressor beschrieben und wurde als Inhibitor der Proliferation und Migration in verschiedenen Zellsystemen beschrieben (Pan, 2017).

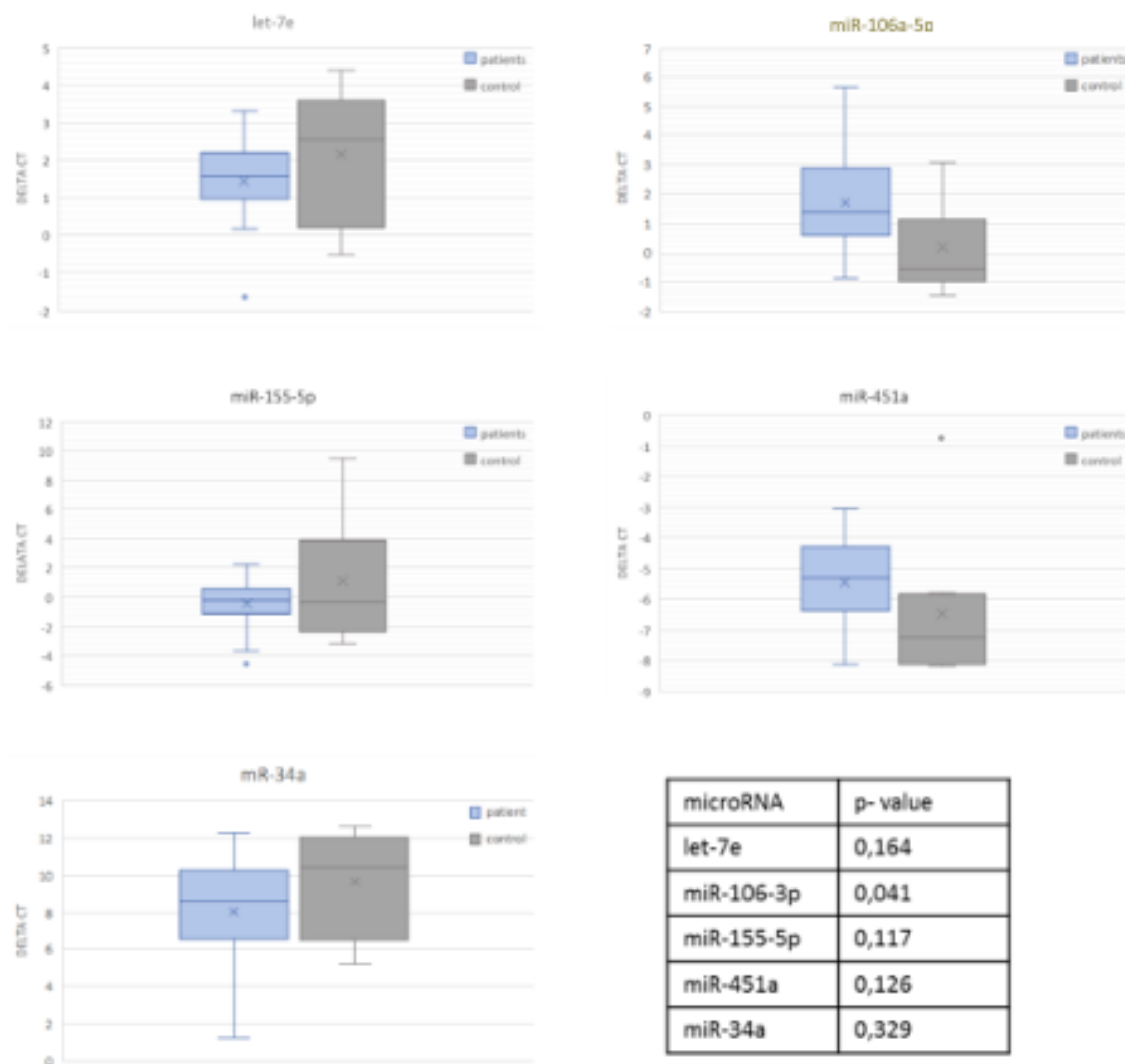


Abbildung 5.6: Expression exosomaler miRNAs im Plasma von Strahlentherapiepatienten (vor Therapiebeginn) im Vergleich zu gesunden Spendern. Gezeigt ist die normalisierte Expression (miR-26a-5p). p-Werte wurden mittels Students T-Test berechnet.

5.5 Zusammenfassung

In diesem Arbeitspaket wurden strahleninduzierte Veränderungen in der Protein- und microRNA Zusammensetzung von Exosomen aus dem Blut von Strahlentherapiepatienten nachgewiesen. Analysiert wurden Kandidatenmoleküle, die zuvor als strahlenveränderte Komponenten in Exosomen aus Lymphozyten von gesunden Spendern identifiziert wurden.

Insgesamt wurden fünf microRNAs (let-7e, miR-34a-5p, miR-106a-p, miR-155-5p, miR-451a) und vier Proteine (ENO1, ITIH4, Ku70, VWF) analysiert.

Alle fünf microRNAs zeigten an beiden Analysenzeitpunkten (3 Wochen bzw. 6 Monate nach Bestrahlungsende) in den meisten Patienten Veränderungen im Vergleich zu unbestrahlten Proben. Dies deutet darauf hin, dass eine Strahlentherapie länger anhaltende Veränderungen in Plasma-ständigen Exosomen induziert. Eine über alle Patienten signifikante Veränderung zeigte miR-155-5p, welche auch akut nach Bestrahlung in Exosomen aus Lymphozyten verändert war. Von den analysierten Proteinen konnte für ITIH4 eine strahleninduzierte Deregulation in allen analysierten Patienten festgestellt werden. Sowohl miR-155-5p als auch ITIH4 sind funktionell an der Regulation von Entzündungsprozessen beteiligt. In zukünftigen Studien ist es nun wichtig zu untersuchen, ob diese Veränderungen in den Exosomen mit klinischen Parametern, wie z.B. dem Therapieansprechen oder mit Nebenwirkungen korreliert sind. Da Exosomen von Zellen aufgenommen werden können und deren Phänotyp beeinflussen, stellt sich auch die Frage, inwieweit erhöhte miR-155-5p und ITIH4 Level die Funktionen von potentiellen Empfängerzellen beeinflussen.

5.6 Literatur

Arcsott WT, Tandle AT, Zhao S, Shabason JE, Gordon IK, Schlaff CD, Zhang G, Tofilon PJ, Camphausen KA. 2013. Ionizing radiation and glioblastoma exosomes: implications in tumor biology and cell migration. *Translational oncology*. Dec 1;6:638-648.

de Jong OG, Verhaar MC, Chen Y, Vader P, Gremmels H, Posthuma G, Schiffelers RM, Gucek M, van Balkom BW. 2012. Cellular stress conditions are reflected in the protein and RNA content of endothelial cell-derived exosomes. *Journal of extracellular vesicles*.1.

Stefano Alivernini, Elisa Gremese, Charles McSharry, Barbara Tolusso, Gianfranco Ferraccioli, Iain B. McInnes and Mariola Kurowska-Stolarska MicroRNA-155—at the Critical Interface of Innate and Adaptive Immunity in Arthritis

Front. Immunol., 05 January 2018 | <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01932>

Jelonek K, Wojakowska A, Marczak L, Muer A, Tinhofer-Keilholz I, Lysek-Gladysinska M, Widlak P, Pietrowska M. 2015. Ionizing radiation affects protein composition of exosomes secreted in vitro from head and neck squamous cell carcinoma. *Acta biochimica Polonica*.62:265-272.

Mutschelknaus L, Azimzadeh O, Heider T, Winkler K, Vetter M, Kell R, Tapio S, Merl-Pham J, Huber SM, Edalat L, Radulović V, Anastasov N, Atkinson MJ, Moertl S. Radiation alters the cargo of exosomes released from squamous head and neck cancer cells to promote migration of recipient cells. *Sci Rep*. 2017 Sep 29;7(1):12423.

Mohamed, E., Jayapalan, J.J., Abdul-Rahman, P.S. et al. Enhanced expression of a 35 kDa fragment of inter-alpha-trypsin inhibitor H4 in sera of healthy pregnant women and patients with hydatidiform mole. *Biomark Res* 1, 19 (2013) doi:10.1186/2050-7771-1-19

Yao-Jie Pan, Lu-Lu Wei, Xiao-Jin Wu, Fu-Chun Huo, Jie Mou & Dong-Sheng Pei

MiR-106a-5p inhibits the cell migration and invasion of renal cell carcinoma through targeting PAK5
Cell Death & Disease volume 8, pagee3155 (2017)

Vianey Gonzalez-Villasana, Mohammed H. Rashed, Yessica Gonzalez-Cantú, et al., "Presence of Circulating miR-145, miR-155, and miR-382 in Exosomes Isolated from Serum of Breast Cancer Patients and Healthy Donors," *Disease Markers*, vol. 2019, Article ID 6852917, 9 pages, 2019.

Yanez-Mo M, Siljander PR, Andreu Z, Zavec AB, Borrás FE, Buzas EI, Buzas K, Casal E, Cappello F, Carvalho J, et al. 2015. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of extracellular vesicles*.4:27066.

Yentrapalli R, Merl-Pham J, Azimzadeh O, Mutschelknaus L, Peters C, Hauck SM, Atkinson MJ, Tapio S, Moertl S. 2017. Quantitative changes in the protein and miRNA cargo of plasma exosome-like vesicles after exposure to ionizing radiation. *International journal of radiation biology*. Jun;93:569-580. Epub 2017/03/08.

| Verantwortung für Mensch und Umwelt |

Kontakt:

Bundesamt für Strahlenschutz

Postfach 10 01 49

38201 Salzgitter

Telefon: + 49 30 18333 - 0

Telefax: + 49 30 18333 - 1885

Internet: www.bfs.de

E-Mail: ePost@bfs.de

Gedruckt auf Recyclingpapier aus 100 % Altpapier.



Bundesamt für Strahlenschutz